

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

MAPEO ASOCIATIVO PARA FENOLOGÍA EN EL CULTIVO DE CEBADA

por

Sofía Patricia BRANDARIZ ZERBONI

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO

URUGUAY

2013

Tesis aprobada por:

Director:

-----  
Ph.D. (Ing. Agr.) Lucía Gutiérrez

-----  
Ph.D. (Ing. Agr.) Ariel Castro

-----  
MSc. (Ing. Agr.) Luis Viega

-----  
MSc. (Ing. Agr.) Andrés Locatelli

Fecha:

14 de mayo de 2013

Autor:

-----  
Sofía Patricia Brandariz Zerboni

## AGRADECIMIENTOS

Por este medio tengo la oportunidad de agradecer a quienes hicieron posible que este trabajo se pudiera realizar. En primera instancia, a Lucía Gutiérrez y a Ariel Castro, quienes me brindaron la oportunidad y los conocimientos necesarios para llevar a cabo este análisis, guiándome tanto en el trabajo de campo como en el análisis posterior de los datos.

A su vez debo agradecer a todos los que me ayudaron en las medidas fenotípicas de los datos, pertenecientes a la Estación Experimental Mario A. Cassinoni, siendo indispensables a la hora de realizar dicha tarea.

Asimismo, hubo quienes estuvieron presentes en el estudio analítico, integrantes del Departamento de Biometría, Estadística y Computación, e integrantes del Departamento de Biología Vegetal que me brindaron una gran ayuda frente a mis dudas.

Debo mencionar a mis amigas de la Facultad de Agronomía quienes me acompañaron en las diferentes etapas de este emprendimiento y me aportaron un gran apoyo.

Por último, quiero agradecer a mi familia, en particular a mi padre por su guía y apoyo en mi elección de la carrera y en especial a mi madre, por poner siempre mis prioridades delante de las suyas. A su vez quiero agradecer a mis amigas que han estado conmigo a lo largo de mi vida y a Guillermo Pérez por su gran paciencia y cariño.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1 <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 <u>EL CULTIVO DE CEBADA</u> .....	3
2.1.1 <u>Importancia como cultivo</u> .....	3
2.1.2 <u>Genética de la cebada</u> .....	4
2.1.3 <u>Fenología</u> .....	5
2.1.3.1 <u>Definición e importancia</u> .....	5
2.1.3.2 <u>Período emergencia-antes</u> .....	6
2.1.3.3 <u>Sensibilidad al fotoperíodo</u> .....	7
2.1.3.4 <u>Sensibilidad a la vernalización</u> .....	7
2.1.3.5 <u>Precocidad <i>per se</i></u> .....	8
2.1.4 <u>Altura de planta</u> .....	9
2.1.5 <u>Peso de grano</u> .....	9
2.1.6 <u>Requerimientos biológicos de la cebada en el Uruguay</u> .....	10
2.2 <u>MAPEO ASOCIATIVO</u> .....	11
2.2.1 <u>Concepto</u> .....	11
2.2.2 <u>Diferencias entre el mapeo asociativo y el análisis clásico de QTL</u> .....	11
2.2.3 <u>Gen candidato vs. GWAS</u> .....	13
2.2.4 <u>Limitantes del mapeo asociativo</u> .....	13
2.2.5 <u>Cuantificación del desequilibrio de ligamiento</u> .....	15
2.2.6 <u>Requisitos para un exitoso mapeo asociativo</u> .....	16
2.2.7 <u>Análisis estadístico de asociación marcador-caracter</u> .....	17
2.2.7.1 <u>Métodos para mapeo asociativo</u> .....	17
2.2.7.2 <u>Modelos estadísticos para el mapeo asociativo</u> .....	17
2.2.7.3 <u>Importancia del tamaño de la muestra y número de marcadores</u> .....	19
2.2.7.4 <u>Softwares disponibles</u> .....	20
2.2.8 <u>Aspectos a destacar del AM</u> .....	20
2.3 <u>GENES Y QTL RESPONSABLES DE CARACTERES DE INTERÉS</u> .....	21

2.3.1 <u>Estudios de genes y QTL</u> .....	21
2.3.2 <u>Genes responsables en cebada para fenología</u> .....	21
2.3.2.1 Genes responsables de la precocidad <i>per se</i> .....	22
2.3.2.2 Genes responsables de la sensibilidad a la vernalización....	22
2.3.2.3 Genes responsables de la sensibilidad al fotoperíodo .....	23
2.3.2.4 QTL para precocidad <i>per se</i> .....	24
2.3.2.5 QTL responsables del período emergencia-antesi s .....	25
2.3.3 <u>Genes responsables en cebada para altura de planta</u> .....	25
2.3.4 <u>Genes responsables en cebada para peso de grano</u> .....	27
3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	28
4 <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	31
4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO PARA VARIABLES FENOTÍPICAS .....	31
4.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO PARA MARCADORES MOLECULARES .....	35
4.3 ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES MOLECULARES Y QTL DETECTADOS .....	36
4.4 QTL DE MAYOR EFECTO ADITIVO EN LA POBLACIÓN Y COINCIDENCIAS CON REPORTES PREVIOS .....	50
5 <u>CONCLUSIONES</u> .....	65
6 <u>RESUMEN</u> .....	66
7 <u>SUMMARY</u> .....	67
8 <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	68
9 <u>ANEXOS</u> .....	75

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Importancia relativa de la cebada a nivel mundial.....	3
2. Importancia relativa de la cebada a nivel nacional .....	4
3. QTL reportados para altura de planta.....	26
4. QTL reportados para peso de grano .....	27
5. Densidad de los marcadores moleculares para cada cromosoma. Se muestran grupos de ligamientos (cromosoma), cuántos marcadores por grupo existen, largo total de cada cromosoma (longitud -cM-), distancia máxima entre marcadores dentro de un grupo (longitud máxima -cM-), mediana, primer (q.25) y tercer cuartil (q.75). .....	35
6. QTL coincidentes para Darista, Despiga y Dmadurez. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.....	42
7. QTL coincidentes para Darista2, Despiga2 y Dmadurez2. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio. ....	43
8. QTL coincidentes para las variables fenológicas: Darista, Despiga, Dmadurez, Darista2, Despiga2, Dmadurez2, RFP, Llenado y Llenado2. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.....	46
9. QTL coincidentes para Darista, Despiga, Dmadurez, Llenado, RFP y Alturacm. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio. ....	48

10. QTL coincidentes para Darista y Pgranos. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio. ....	50
11. Configuración alélica (AA o BB) de marcadores moleculares ligados a QTL de mayor efecto aditivo para Darista (Da), Darista2 (Da2), Despiga (De), Despiga2 (De2), Dmadurez (Dm), Dmadurez2 (Dm2) y su posición en cM. La configuración mostrada es la del alelo asociado al fenotipo de mayor valor para el marcador. Cromo: cromosoma.....	56
12. Configuración alélica (AA o BB) de marcadores moleculares ligados a QTL de mayor efecto aditivo para Llenado (Lle), Llenado2 (Lle2), RFP, Pgranos (Pgr), Alturacm (Alt) y su posición en cM. La configuración mostrada es la del alelo asociado al fenotipo de mayor valor para el marcador. Cromo: cromosoma.....	57
13. Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Darista y Darista2. Cromo: Cromosoma. ....	58
14. Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Despiga y Despiga2. Cromo: Cromosoma. ....	59
15. Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Dmadurez y Dmadurez2. Cromo: Cromosoma. ....	60
16. Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Llenado, Llenado2 y RFP. Cromo: Cromosoma. ....	62
17. Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Alturacm y Pgranos. Cromo: Cromosoma. ....	63

## Figura No.

1. QTL encontrados para Darista (violeta) y Darista2 (verde). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento. .... 37
2. QTL encontrados para Despiga (violeta) y Despiga2 (verde). A la izquierda se ubica la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento. .... 39
3. QTL encontrados para Dmadurez (violeta) y Dmadurez2 (azul). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento..... 41
4. QTL encontrados para Llenado (celeste) y Llenado2 (amarillo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento..... 44
5. QTL encontrados para RFP (amarillo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento. .... 45
6. QTL encontrados para Alturacm (rojo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con

una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento. ....	47
7. QTL encontrados para Pgranos (rojo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento. ....	49
Gráfico No.	
1. Gráfico de caja (“box-plot”) para los BLUPs de Darista, Darista2, Despiga, Despiga2, Dmadurez, Dmadurez2, Pgranos, Alturacm, RFP, Llenado y Llenado2. Se observa por variable la mediana, primer y tercer cuartil, y desvío estándar. ....	32
2. Gráfico de correlaciones, histogramas y diagramas de dispersión para: Darista, Darista2, Despiga, Despiga2, Dmadurez, Dmadurez2, Pgranos, Alturacm, RFP, Llenado y Llenado2. La diagonal muestra los histogramas, a la derecha se visualizan las correlaciones entre las características fenotípicas y a la izquierda los diagramas de dispersión.....	34
3. Gráfico de genotipos idénticos. El eje horizontal representa la proporción de alelos compartidos, y el vertical la frecuencia de dicha proporción. ....	36

## 1 INTRODUCCIÓN

Hace aproximadamente 10000 años tuvo lugar la domesticación de los cultivos de los que actualmente depende la alimentación de la población humana. En dicho proceso se fueron modificando ciertos caracteres como la adaptación al tiempo a floración en distintas áreas por respuesta diferencial a estímulos ambientales (Pourkheirandish y Komatsuda, 2007). Uno de los cultivos más importantes en este proceso fue la cebada (*Hordeum vulgare* L.). La misma fue en el 2011 el doceavo producto a nivel de producción mundial con un valor de 134279415 Mton (FAO, 2013).

La cebada ha sido objeto de interés de programas de mejoramiento en todo el mundo (Gutiérrez et al., 2009), siendo la fenología uno de los caracteres de mayor importancia en este proceso. Dicho aspecto es de gran relevancia para la adaptación a los distintos ambientes de producción, y le ha permitido a este cultivo flexibilidad en la adaptación a diferentes regiones y prácticas de manejo (Borràs-Gelonch et al., 2010). Según el cultivar se difiere en el tiempo a floración, respuesta al fotoperíodo y a la vernalización; siendo estos caracteres gobernados por QTL (*Quantitative Trait Loci*) (Castro et al., 2008b) y genes de efecto mayor que han sido mapeados por varios autores (Laurie et al. 1995, Laurie et al. 2004, Pourkheirandish y Komatsuda 2007, Castro et al. 2008a, Castro et al. 2008b, Borràs-Gelonch et al. 2010, von Zitzewitz et al. 2011, Locatelli et al. 2011) El análisis clásico de QTL y más recientemente el Mapeo Asociativo (abreviado como AM), han sido de elección para identificar loci que codifican para caracteres complejos (Risch y Merikangas, citados por Pritchard et al., 2000).

El AM consiste en la identificación de marcadores con frecuencias alélicas significativamente diferentes entre individuos que presentan el fenotipo de interés. Considerándose que la asociación estadística entre el marcador molecular y el fenotipo es evidencia de un ligamiento entre el marcador y el locus que codifica para dicho fenotipo (Pritchard et al., 2000).

El presente informe tiene como objetivo principal la identificación de QTL para fenología en genotipos de cebada con diferentes requerimientos ambientales, evaluados en el Uruguay. Busca también definir el comportamiento frente al fotoperíodo con el fin de comprender mejor los comportamientos de las líneas. Asimismo, busca determinar las correlaciones entre las diferentes variables fenológicas estudiadas (días a antesis, días a espigazón, días a madurez, respuesta al fotoperíodo y período de llenado de grano) y

asociarlas con variables de fácil medición como altura y peso de grano, que se sospecha presentan cierto grado de asociación con las anteriores.

Para cumplir con estos propósitos, se utilizó el AM donde varios modelos fueron evaluados para ubicar el que se adapte mejor al set de datos utilizados, y así reportar los QTL identificados comparándolos con los anteriormente reportados. Se analizó un total de 327 genotipos, evaluados en el Uruguay, en la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC), Departamento de Paysandú, año 2011.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EL CULTIVO DE CEBADA

#### 2.1.1 Importancia como cultivo

La cebada es un cereal de gran importancia a nivel mundial, ocupando en comparación con los otros cereales el quinto lugar en relación al área cosechada, en los últimos años (2008, 2009, 2010 y 2011) (FAO, 2013).

Cuadro No. 1: Importancia relativa de la cebada a nivel mundial

Cultivos	Área (ha)	Rendimiento (ton*ha) <sup>-1</sup>	Producción (ton)
Trigo	221006110	3.08	681227300
Maíz	163392258	5.17	844377316
Arroz	159141250	4.35	692099208.5
Soja	100199195	2.43	244229356.3
Cebada	51457742	2.74	141005605.3
Sorgo	40489997	1.44	58167912.75

·Área cosechada

Fuente: FAO (2013).

Presenta varios usos, siendo el principal la alimentación animal, con el mismo nivel nutritivo que el maíz; poseyendo alto contenido de carbohidratos, moderado de proteína, calcio y fósforo, y pequeños contenidos de vitamina B; y usándose en segunda instancia con el fin de procesamiento para malta, seguido por semilla y uso humano (Zhou, 2009). Es de gran relevancia también a nivel nacional, siendo el segundo cereal más importante de invierno después del trigo (Locatelli et al., 2012), y el cuarto según el área cosechada (2008, 2009, 2010 y 2011) (FAO, 2013).

Cuadro No. 2: Importancia relativa de la cebada a nivel nacional

Cultivos	Área (ha)	Rendimiento (ton*ha) <sup>-1</sup>	Producción (ton)
Soja	553000	1.47	1031860
Trigo	370604	2.58	1194404
Arroz	137395	6.28	1081788
Cebada	79492	2.54	254135
Maíz	69000	3.26	283960
Sorgo	34500	3.32	147360

Área cosechada

Fuente: FAO (2013).

Su uso en Uruguay es principalmente para malteo, lo que implica restricciones de calidad de grano, siendo importante granos de diámetro de más de 2.5 mm para ser aceptada la producción en maltería. Esto implica un reto en el mejoramiento genético local, buscándose genotipos de adaptación local, alto rendimiento y calidad maltera aceptable (Locatelli et al., 2012).

### 2.1.2 Genética de la cebada

La cebada es una especie diploide con fórmula genómica  $2n=2x=14$  (Wang et al., 1991). La cebada domesticada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) es una gramínea correspondiente a la subfamilia *Pooideae*, que evolucionó a partir de la silvestre (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) (Glémin y Bataillon, 2009). El proceso de domesticación se favoreció por la selección consciente (realizada por el hombre) e inconsciente (resultado del cambio ambiental). Esto dio paso a los síndromes de domesticación que son características genéricas que adquieren o pierden los cultivos en su proceso de evolución; siendo en cebada las principales: la pérdida del raquis quebradizo, la aparición de espiga de seis carreras y el cariopse desnudo. Son también la reducción de la vernalización, la insensibilidad al fotoperíodo y la pérdida de dormición de la semilla otros síndromes que permitieron a la cebada migrar hacia nuevas áreas (Pourkheirandish y Komatsuda, 2007). Es decir, los mecanismos que poseía la cebada silvestre para florecer en las condiciones más favorables para polinización, desarrollo de semilla y dispersión de la misma, se fueron modificando por la selección (Laurie et al., 2004). Esto provoca que la cebada sea versátil en el sentido que se ha adaptado bien durante su evolución, produciéndose en regiones donde el maíz o el arroz no logran

crecer bien (Zhou, 2009). Con el fin de predecir su comportamiento en las distintas regiones y su adaptación a las nuevas áreas y prácticas culturales, se ha estudiado a los genes que controlan la fenología de la misma, poniendo énfasis en el tiempo a antesis (Boyd et al., 2007).

### 2.1.3 Fenología

#### 2.1.3.1 Definición e importancia

La fenología cumple un rol esencial en los cultivos, actuando como una escala biológica de tiempo, donde directa o indirectamente controla procesos relevantes como la senescencia, el llenado de grano y la fotosíntesis (Mirschel et al., 2005). Es el factor que más influye en el rendimiento potencial y la adaptación a regiones y prácticas de manejo, por posibilitar coincidir las distintas etapas del desarrollo con las variaciones climáticas (Richards, citado por Borràs-Gelonch et al., 2010), y permitiendo ajustar un calendario de actividades de manejo desde la siembra hasta la cosecha (Mirschel et al., 2005).

Existe una brecha entre el rendimiento potencial (aquel que se obtiene en condiciones de crecimiento sin restricciones de agua ni nutrientes y en ausencia de estreses bióticos) y el rendimiento real (Evans y Fischer, citados por Slafer y Savin, 2011). La brecha entre ambos se debe a condiciones desfavorables durante el crecimiento del cultivo, aún cuando el manejo del mismo se realice de forma adecuada (Slafer y Savin, 2011). Se ha determinado que el rendimiento de trigo y cebada es mucho más sensible a los cambios en el crecimiento durante el período comprendido entre aproximadamente tres semanas antes (20 días) y pocos días después (10 días) de la antesis que a cambios en cualquier otro momento, definiéndose éste como el período crítico del rendimiento. Esto se debe a que uno de los componentes del rendimiento (granos por unidad de superficie) está muy influenciado por la radiación solar (de forma lineal y positiva) y por la temperatura (lineal y negativa) en ese período cercano a la antesis (Fischer, 1985). Mientras que la radiación afecta la tasa de crecimiento promoviéndola, la temperatura acelera el desarrollo por reducción de la duración del período de mayor acumulación de asimilados en la espiga. La relación entre la radiación media total interceptada y la temperatura media mayor a 4,5°C, es el coeficiente

fotothermal (Q), predictor lineal del número de granos por unidad de superficie (Fischer, 1985). Por tanto la antesis debe ocurrir en un momento donde se optimice la producción de biomasa y el potencial de rendimiento antes de que ésta ocurra, pero sin comprometer el desarrollo del grano posterior, ya que directamente determina el número de hojas iniciadas en el tallo principal e indirectamente las duraciones de las fases de formación de flores y llenado de grano (Boyd et al., 2003). Este cambio del primordio de vegetativo a reproductivo puede explicarse como un componente integral de la ontogenia (que comprende la totalidad del desarrollo de un individuo de cualquier especie, desde su formación hasta que completa su desarrollo vital, iniciándose un nuevo ciclo) (Quesada y Valpuesta, 2008).

Es así crucial conocer y predecir las distintas etapas del desarrollo para planificar el período crítico alejado de situaciones desfavorables, lo que lleva a la elección diferencial de un cultivar según la disponibilidad de fechas de siembra existentes. Dicho evento crítico en el desarrollo del cultivo, se acelera en respuesta a señales del ambiente (Hay y Ellis, 1998), provocando que se defina por: sensibilidad a la vernalización (Takahashi y Yasuda, 1970); sensibilidad al fotoperíodo (Roberts et al., 1988); y precocidad *per se* (Gallagher et al., 1991) (Castro et al., 2008b). A su vez la temperatura es un factor que de forma universal acelera el tiempo a antesis, difiriendo los genotipos en la sensibilidad e interacciones con la misma (Boyd et al., 2003).

### 2.1.3.2 Período emergencia-antesis

En referencia a los distintos períodos en que se divide el intervalo emergencia-antesis, se han reportado efectos específicos de ciertos QTL correspondientes para cada período. En Uruguay se identificaron QTL codificantes para tres subperíodos: emergencia a macollaje (ZE-Z20), macollaje (Z20-Z30) y final de macollaje a antesis (Z30-Z65) (Castro et al., 2008a). Para otra población resultante del cruzamiento entre Henni×Meltan se encontraron QTL diferentes para el período entre siembra e iniciación de espiguilla, y entre iniciación de espiguilla y floración, no correspondiendo a QTL de efecto mayor en la literatura (Borràs-Gelonch et al., 2010). Estos análisis permiten la mayor comprensión del comportamiento genético en cuanto al tiempo a antesis, y permiten según los genotipos que se están estudiando, variar las diferentes etapas del ciclo a antesis sin involucrar un atraso de la floración que pueda comprometer el llenado de grano sometándolo a condiciones menos favorables.

### 2.1.3.3 Sensibilidad al fotoperíodo

La inducción floral es sensible a la luz que llega a los fitocromos, donde la forma inactiva *Pr* absorbe la radiación roja incidente y causa una transformación a la forma activa *Pfr*. Existe foto-reversibilidad ya que al absorber *Pfr* la radiación rojo-lejano se vuelve a la forma inactiva. Esto se repite durante los ciclos día/noche, donde se sintetiza un “estímulo de floración” en las hojas, que se translocará al ápice. La duración relativa de luz/oscuridad (fotoperíodo) es un factor que determina la foto-reversibilidad, donde un alargamiento de los días provoca una menor cantidad de *Pfr* disminuyendo promoviendo la inducción floral, y disminuyendo el intervalo de acumulación del “estímulo de floración”. Este período de acumulación se determina también por la temperatura y su interacción con el fotoperíodo (Boyd et al., 2003). Lo anterior implica que el alargamiento de los días promueva la inducción floral en cebada, mostrando variaciones entre cultivares según la sensibilidad diferencial que exista entre ellos al fotoperíodo (Boyd et al., 2007). Dentro de la especie, los cultivares por cuya adaptación no responden al mismo, se consideran de “día neutro” o “insensibles”, y en cuanto a los “sensibles” a medida que los días se alargan se induce la floración.

Por tanto, se concluye que la cebada es una especie en la que el cambio de estado del primordio se da en respuesta al fotoperíodo de día largo, siendo la respuesta del tipo cuantitativa, variando el óptimo entre cultivares (Hay y Ellis, 1998).

### 2.1.3.4 Sensibilidad a la vernalización

Algunos genotipos de cebada requieren exposición a temperaturas bajas antes de la floración (Boyd et al., 2003), lo que se conoce como sensibilidad a la vernalización. Ésta es la responsable que el cultivo que presente sensibilidad a la misma alargue el ciclo a floración en ausencia de frío, variando el requerimiento entre cultivares así como la temperatura óptima (Ritchie, citado por Boyd et al., 2007). El requerimiento de vernalización permite clasificar a los genotipos dentro de tres grupos de hábito de crecimiento: primaveral, invernal o facultativo. Las líneas que presentan crecimiento invernal responden altamente a la vernalización (donde la tolerancia a la baja temperatura está implícita pero no definida). Las de hábito primaveral tienen nula

respuesta a la vernalización. Las líneas de hábito de crecimiento facultativo se refiere a las que presentan comportamiento intermedio de las anteriores, con una delección del *VRN-H2* y con alelo invernal en el *VRN-H1* –genes involucrados en la vernalización– (von Zitzewitz et al., 2011). El hábito de crecimiento permite diferenciar qué cultivar sembrar por zona, ya que en las distintas partes geográficas los estímulos ambientales varían. Las condiciones reinantes en el Uruguay, donde los inviernos son templados no cumpliendo con los requisitos de las líneas invernales, requieren la siembra de solamente genotipos primaverales.

#### 2.1.3.5 Precocidad *per se*

Cuando no hay efectos (o son despreciables) de fotoperíodo o vernalización en cierta región, igualmente los genotipos presentan diferencias en la fecha a antesis, factor adjudicado con varios nombres, entre ellos “precocidad *per se*” o “duración mínima a antesis” (Boyd et al., 2003). Varios autores han tratado de analizar el por qué de este suceso. Se había acreditado a un período pre inductivo insensible al fotoperíodo, que duraba desde la germinación de la planta hasta antes de florecer. Después se identificó que los genotipos variaban en su período de desarrollo, dado que cambiaba la “precocidad *per se*” según el genotipo y no se asociaba con el número medio de hojas (Roberts et al., citados por Boyd et al., 2003). Posteriormente, se propuso que dicha variación se asociaba a diferencias genéticas que respondían a un aumento en la temperatura (Takahashi y Yasuda, Flood y Halloran, citados por Boyd et al., 2003). Luego se determinó que el rango de desarrollo hasta la antesis, estaba afectado por interacciones entre los genotipos y la temperatura (Slafer y Rawson, citados por Boyd et al., 2003). Más tarde, se llegó a que la “precocidad *per se*” está correlacionada con el número medio de hojas en tallo, donde el número de hojas iniciadas en el tallo principal, combinado con los rangos de desarrollo y la temperatura provocan los distintos tiempos a antesis (Hay y Ellis, 1998). Esto se sostiene por varios QTL de efecto menor que han sido encontrados codificantes para esta característica (Laurie et al., 1995).

#### 2.1.4 Altura de planta

Controlar la altura de planta permite evitar la pérdida de rendimiento por volcado o quebrado, y aumentar también el índice de cosecha. Es una característica de fácil medición, y se conoce que actúa sobre la misma un gen de alta importancia (gen candidato *denso*) que asimismo afecta a la fenología; por lo que su estudio es de interés genético con el fin de conocer cómo las variaciones alélicas de dicho gen afectan a la fenología y altura de forma simultánea (Bezant et al., 1995). Asimismo, es afectada por varios otros QTL (Thomas et al. 1995, von Korff et al. 2004, Gyenis et al. 2007, Inostroza et al. 2009, Wang et al. 2010).

#### 2.1.5 Peso de grano

El rendimiento en grano de cebada se define por: número de espigas por área, granos por espiga y peso de grano. La relativa importancia de cada componente depende del estadio en el que se encuentre el cultivo (Kjaer y Jensen, 1996). El número de espigas por área se definirá durante la implantación, macollaje y crecimiento de tallos. Luego, en los ápices de los tallos se generarán las estructuras que formarán los granos de las espigas, donde después de la floración cada grano adquirirá su peso final (Hoffman et al., 2006). De estos, el que muestra mayor heredabilidad es peso de grano (Hockett y Nilan, citados por Kjaer y Jensen, 1996). Sin embargo, el número de granos por superficie (es decir, granos por unidad de área pudiendo expresarse como  $\text{granos.m}^{-2}$ ) es el que determina mayormente el rendimiento (Slafer y Savin, 2011). Los  $\text{granos.m}^{-2}$  se definen por la acumulación de materia seca en la espiga durante el período crítico del rendimiento (Fischer, 1985). Se conoce que cuando los  $\text{granos.m}^{-2}$  superan el valor de 11-12000, la relación número y peso de grano se vuelve muy negativa lo que lleva a pérdidas del rendimiento potencial (Evans, Fischer et al., Abbate et al., citados por Hoffman et al., 2006). Por lo tanto, se debe evitar valores superiores al explicitado para no perder granos que sean segregados por el sistema de pre limpieza de la cosechadora (Hoffman et al., 2006).

Por esto es de importancia conocer el efecto genético que haya sobre peso de grano ya que puede determinar caídas en el rendimiento potencial, conociendo de esta forma cuáles variedades presentan QTL que codifiquen para altos pesos de grano. Así

también conocer su relación con la floración y el llenado de grano, ya que estos influyen en el peso final del grano afectando el rendimiento obtenido. Esto se debe a que las variaciones del peso se asocian a las condiciones ambientales que afectan la expresión del mismo, en especial la temperatura y el déficit hídrico después de la floración (Slafer y Savin, 2011).

#### 2.1.6 Requerimientos biológicos de la cebada en el Uruguay

La cebada es un cereal de invierno cuya estación de crecimiento a nivel nacional es entre junio y noviembre (anual), donde su época de siembra se ubica en junio-julio con respuesta variable al fotoperíodo de día largo y nulo requerimiento de vernalización (Castro et al., 2008b).

Dadas las condiciones climáticas nacionales, donde los inviernos son templados aumentando rápido la temperatura en primavera, se debe evitar una antesis tardía que comprometa el llenado de grano en condiciones de altas temperaturas (Locatelli et al., 2012). Materiales de ciclo a espigazón relativamente corto, lento crecimiento inicial y rápido crecimiento preantesis, son los adecuados para alto rendimiento y buena calidad maltera (Castro et al., 1997). Por tanto la combinación de una floración temprana y período largo de llenado de grano se asocian a alto potencial de rendimiento y estabilidad (Castro et al., 2008b). Sin embargo, fechas de siembras muy tempranas si bien alargan el período de llenado de grano pueden causar daño por posibles heladas en el período de floración, reduciendo el riesgo los genotipos que posean respuesta al fotoperíodo por atraso de la misma (Germán et al., 2000). Otro aspecto importante es la estabilidad en alto rendimiento y calidad maltera aceptable en años de condiciones climáticas contrastantes (Castro et al., 1997), donde material de calidad maltera por debajo de los requisitos implica baja rentabilidad al productor.

Se puede concluir que la forma de manejar el ciclo de un cultivo, es mediante la elección de la época de siembra y del cultivar a sembrar (Ernst et al., citados por Viega et al., 2006), donde mediante la combinación de estos factores se definirá el período crítico y por lo tanto el potencial del rendimiento (Viega et al., 2006).

## 2.2 MAPEO ASOCIATIVO

### 2.2.1 Concepto

El mapeo asociativo es una técnica que consiste en identificar los QTL que codifican para caracteres de interés mediante asociaciones entre los marcadores y dichos caracteres basados en el desequilibrio de ligamiento o desequilibrio de la fase gamética (LD).

El LD es el grado de asociación no aleatoria entre alelos de distintos loci (Yu y Buckler 2006a, Zhu et al. 2008), es decir la proporción de gametos con los que no segregan al azar. Su objetivo radica en identificar marcadores de herencia simple próximos a factores que afectan características del tipo cuantitativas (entendiéndose por carácter cuantitativo al afectado por varios genes de efecto menor con influencia ambiental) (Jannink et al., 2009). Su diferencia con el ligamiento físico consiste en que éste refiere a correlaciones físicas entre loci en un cromosoma, mientras que el LD refiere a correlaciones entre alelos en una población (Flint-Garcia et al., 2003).

Como afirman Zhu et al. (2008), en los últimos años se ha incrementado el uso del mapeo asociativo con el objetivo de la identificación de genes responsables de características complejas con interés agronómico.

### 2.2.2 Diferencias entre el mapeo asociativo y el análisis clásico de QTL

El mapeo asociativo, también conocido como GWAS (*Genome-Wide Association*) junto con el análisis clásico de QTL, han sido las técnicas más utilizadas para comprender los caracteres cuantitativos (Zhu et al., 2008).

El análisis clásico de QTL explota la herencia compartida de polimorfismos funcionales y marcadores moleculares adyacentes, dentro de familias o pedigrís de ancestría conocida, en poblaciones derivadas de cruzamientos de dos padres (Yu y Buckler, 2006a). Es decir, se basa en el desarrollo de poblaciones segregantes derivadas del cruzamiento entre líneas (Malosetti et al., 2007). El AM analiza también la herencia

compartida pero de una colección de individuos sin requerimientos específicos de parentesco, donde se ha dado lugar a una gran recombinación (Yu y Buckler, 2006a).

En el análisis clásico de QTL, la creación y remoción del LD ocurren dentro de los límites del experimento, pero en contraste a esto, ambos procesos en el AM se producen fuera de los límites del experimento y por lo tanto no se encuentran bajo control experimental. Los principales mecanismos que provocan el LD son la mutación y deriva, mientras que la recombinación reduce el LD (Jannink et al., 2009).

Si bien ambos análisis se basan en la herencia compartida de polimorfismos funcionales y variantes vecinas de ADN, las pocas generaciones en las que se produce recombinación en el análisis clásico de QTL dentro de familias y pedigrís con ancestros conocidos, resulta en una baja resolución de mapeo permitiendo poca oportunidad de disipación del LD (Zhu et al., 2008). En el AM varios ciclos de recombinación en general pueden ocurrir antes del experimento y debido a esto el LD puede decaer a un corto espacio. Por esto para obtener una exitosa detección de QTL la densidad de marcadores debe de coincidir con el rango de decaimiento del LD (Jannink et al., 2009). Por ejemplo, si el LD decae de forma rápida, una mayor densidad de marcadores se requiere para capturar marcadores lo suficientemente cerca de los sitios funcionales (Yu y Buckler, 2006a). Es decir, en el análisis clásico de QTL la variación genética es limitada para cada población, y en ausencia de polimorfismos alélicos entre padres no se pueden identificar QTL (Malosetti et al., 2007). A su vez, en el análisis clásico la base genética donde se realiza el estudio no es representativa del germoplasma elite (Jannink et al., citados por Malosetti et al., 2007), y las pocas generaciones que ocurren después del máximo LD (Filial 1 o F1), implican pocas muestras llevando a largos estiramientos del cromosoma en LD.

Por tanto, las ventajas del AM consisten en la falta de cruzamientos diseñados entre parentales o líneas mejoradas, y en la posibilidad de identificar QTL en cultivos con difíciles patrones de segregación. A su vez, para el AM se puede presentar más de dos alelos por locus y los alelos de QTL pueden ser mapeados en germoplasma que sea relevante para programas de mejoramiento (Malosetti et al., 2007). Por lo tanto, las ventajas ofrecidas por el AM consisten en mejorar la resolución del mapeo, disminuir el tiempo de investigación, considerar una población más amplia y mejorar el número alélico. Por otro lado, se destaca que ambos análisis se complementan en términos de proveer información de gran relevancia, validación de cruzamientos y poder estadístico (Yu y Buckler, 2006a).

### 2.2.3 Gen candidato vs. GWAS

El AM en general se divide en dos categorías: gen candidato para AM, que refiere a la identificación de ciertos genes con un importante rol en controlar la variación fenotípica de caracteres de interés; y escaneo amplio del genoma para AM que resume la variación genética en todo el genoma con el objetivo de encontrar señales de asociaciones para varios caracteres complejos (Risch y Merikangas, citados por Zhu et al., 2008).

Los avances tecnológicos en genotipado y secuenciación han conducido a una reducción en el costo por marcador molecular, en particular de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Esto sumado a la posible identificación de numerosos SNPs a través de la re secuenciación de diversas líneas, y a la posibilidad de disponerse de sistemas automatizados de alta capacidad que permiten el genotipado de los SNPs en muchas muestras, determina un mayor uso del GWAS dentro del AM (Zhu et al., 2008).

Estas dos categorías de AM se distinguen básicamente, en que el GWAS investiga todo el genoma con el fin de encontrar la variación genética que provoca el control de caracteres cuantitativos, donde no se necesita el conocimiento de la especie para saber los genes candidatos pero sí de varios SNPs, experiencia y recursos económicos. Mientras que el análisis del gen candidato selecciona dicho gen con conocimiento previo por análisis de mutaciones, rutas bioquímicas o análisis de ligamiento de la característica de interés; donde se precisa un set independiente de marcadores aleatorios, siendo esta técnica de bajo costo, derivada de hipótesis y específica para esta característica (Zhu et al., 2008).

### 2.2.4 Limitantes del mapeo asociativo

El análisis de AM presenta limitantes. Éste puede brindar falsos positivos debido al origen geográfico, adaptación local e historia de cruzamientos o coancestría. El coeficiente de coancestría es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en dos individuos sean idénticos por descendencia (Malecot, 1949), generando estructuración poblacional y relaciones familiares. Ambas son las causantes de relaciones espurias entre los QTL y los marcadores. Estos falsos positivos aparecen cuando se testea marcadores genéticos aleatorios con diferentes frecuencias, dentro de subpoblaciones

para una característica con diferencias fenotípicas paralelas (Yu y Buckler, 2006a). Por lo que el AM puede ser de gran utilidad siempre y cuando las verdaderas asociaciones puedan ser diferenciadas de falsos positivos (Yu et al., 2006b). Sin embargo, si la distribución de los alelos funcionales se correlaciona altamente con la estructura poblacional, el control estadístico para dicha estructura puede resultar en falsos negativos, en especial cuando se trate de muestras de tamaño pequeño (Yu y Buckler, 2006a). La existencia de una asociación verdadera en un locus en particular, implica que el QTL relacionado a este locus debe existir en cruzamientos que involucren accesiones que tengan diferentes alelos del locus (Zhao et al., 2007).

El tipo de marcador molecular utilizado puede ser una limitante, dado que en el caso no de poseer una gran cantidad de marcadores puede ser difícil de detectar el nivel de polimorfismo de la población, siendo de preferencia los codominantes sobre los dominantes (marcadores que no diferencian genotipos heterocigotas de homocigotas dominantes) (Zhu et al., 2008).

En relación a dichos marcadores codominantes, es relevante conocer cuál se adecúa mejor al estudio de AM. Los SSRs (*Simple Sequence Repeats*) han sido los predominantes como herramienta para estudios de población y parentesco, por ser multialélicos, reproducibles, basados en PCR (*Polymerase Chain Reaction*, que permite amplificar ADN de interés y luego separar los fragmentos amplificados por electroforesis y estudiar dicho ADN) y neutrales (no codificantes) (Zhu et al., 2008). Sin embargo, el deslizamiento de la polimerasa que resulta en un gran polimorfismo de los loci de los SSRs, genera la homoplasia (alelos con igual tamaño pero de diferente origen) (Viard et al., citados por Zhu et al., 2008). Esto puede llevar a confundir alelos idénticos por descendencia con alelos idénticos por estado. Es entonces que los SNPs se están rápidamente convirtiendo en los marcadores de elección para el estudio de las características cuantitativas, sumado a su alta densidad genómica, menor nivel de mutación, mayor sensibilidad de detección y gran funcionalidad en sistemas de genotipado de alta capacidad (Zhu et al., 2008).

Otra limitante se relaciona a la capacidad de captar el LD. Si se cuenta con un alto LD y poca diversidad haplotípica (como es el caso de la cebada), se necesita un menor número de SNPs para lograr un nivel adecuado de resolución, pero al ser más pronunciada la caída de LD, se espera una mayor resolución de mapeo pero la densidad adecuada de marcadores para captarlo se incrementa (Aranzana et al., Rostoks et al., citados por Zhu et al., 2008).

El AM es un análisis de cada marcador individual, donde varias pruebas se testean contra hipótesis nulas, esperándose algunas resulten significativas. Sin embargo, al aumentar el número de pruebas aumenta la probabilidad de cometer error de tipo I ( $\alpha$ ), por lo que ciertas correcciones deben ser implementadas (Storey y Tibshirani, 2003).

### 2.2.5 Cuantificación del desequilibrio de ligamiento

Existen formas de cuantificar el LD. Una de ellas explicitada por Zhu et al. (2008) consiste en la diferencia (D) entre la frecuencia observada de haplotipos (considerados como combinación de alelos que es transmitida como una unidad) y la frecuencia esperada, basada en las frecuencias alélicas; donde D se calcula como:  $D = P_{AB} - P_A P_B$  siendo  $P_{AB}$  la frecuencia del gameto AB, y  $P_A$  y  $P_B$  son las frecuencias de cada alelo. Por tanto, se puede analizar que si  $D=0$ , A y B no están ligados, ya que la frecuencia observada coincide con la esperada, segregando de forma independiente por encontrarse alejados, cumpliéndose de esta forma que:  $P(A,B) = P(A)P(B) = \text{frec}(A)\text{frec}(B)$ . Si D es mayor o menor a cero, se considera que existe una asociación estadística de desequilibrio de ligamiento entre alelos de distintos loci donde la magnitud de dicho ligamiento se mide por el valor absoluto de D.

Si la recombinación se produce por cruzamientos al azar el LD disminuirá según la siguiente función:  $D_t = D_0 (1 - r)^t$ , siendo  $D_t$  el LD residual después de t generaciones de cruzamiento al azar entre dos loci a partir del original  $D_0$ , y r representa la recombinación (Zhu et al., 2008).

Por otra parte, el  $r^2$  entre los loci es otra forma de cuantificar el LD, afirmándolo como el parámetro clave; ya que la fracción de la varianza fenotípica que un marcador va a explicar está directamente relacionada al  $r^2$  con el QTL. En el análisis clásico de ligamiento con cruzamiento de dos padres, la relación entre el  $r^2$  y la distancia genética es sencilla, debido en parte a que las frecuencias alélicas son cercanas a 0.5; pero dentro de una población F2 o de dobles haploides,  $r^2 \approx 1 - 4c$ , donde c es la frecuencia de recombinación (Flint-Garcia et al. 2003, Jannink et al. 2009). Sin embargo, para AM el LD no se comporta de dicha forma, siendo la esperanza del  $r^2$  definida como:  $E(r^2) = 1 / (1 + 4Nc)$ , donde N es el tamaño de población efectivo (Zhu et al., 2008).

### 2.2.6 Requisitos para un exitoso mapeo asociativo

Un requisito es la elección del germoplasma como rasgo de alta importancia para conseguir un análisis de AM exitoso. Esto es debido a que el LD se ve influenciado por las frecuencias alélicas y recombinación en una población, y por tanto, por el tipo de reproducción de la especie; extendiéndose a mayores distancias en autógamias como la cebada (homocigota), determinando que la resolución de mapeo sea menor pero que se precise un menor número de marcadores (Flint-Garcia et al., 2003).

Considerando la utilización de marcadores codominantes, este tipo de marcadores tienen menor ambigüedad que los dominantes, estimando mejor la estructuración poblacional (Q) y la matriz de parentesco (K). Q es una matriz  $n \times p$  que presenta el número de individuos y el número de subpoblaciones; mientras que K es una matriz  $n \times n$  donde la diagonal tiene un valor de uno para las especies autógamias, y tiene un valor de  $0.5 \times (1 + F_x)$  para las alógamas, siendo  $F_x$  el coeficiente de endogamia (Zhu et al., 2008).

Centrándose en el estudio del gen candidato, los SNPs por poseer mejor resolución para el análisis de QTL y alto potencial para LD por el polimorfismo causante son los más utilizados para este estudio. Se debe priorizar la identificación de los SNPs causantes de la variación fenotípica, es decir, que codifiquen o regulan a ésta (Zhu et al., 2008).

Asimismo debe tomarse especial cuidado en el diseño de campo realizado con el fin de medir el fenotipo de interés, en particular en proyectos de gran escala, donde la replicación en varias localidades y años es dificultosa (Zhu et al., 2008). Esto se refleja en que la determinación del fenotipo es esencial ya que los largos proyectos implican fenotipado en varios años (Flint-Garcia et al., citados por Zhu et al., 2008). Por tanto la precisión y el costo del fenotipado son de gran importancia (Yu y Buckler, 2006a).

## 2.2.7 Análisis estadístico de asociación marcador-carácter

### 2.2.7.1 Métodos para mapeo asociativo

Muchos modelos fueron propuestos para estudiar la asociación marcador-carácter (Gutiérrez et al., 2011). Para corregir las asociaciones espurias por estructuración poblacional en plantas se recomendó el uso de STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Posteriormente se integró la matriz de relaciones entre individuos como efectos aleatorios en un modelo mixto (Parsseaux y Bernardo, 2004). Yu et al. (2006b) propusieron un modelo mixto unificado considerando como efectos fijos a la estructura de la población (Q), y efectos aleatorios a las relaciones (alelos idénticos por descendencia) entre individuos (K). Este modelo presenta un mejor control de los errores de tipo I y II que los métodos anteriores, siendo un gran complemento por considerar la estructura poblacional y la relación de parentesco.

Los análisis pueden prescindir del uso de la matriz Q ya que el algoritmo de STRUCTURE es intensivo en uso de equipo e impracticable en grandes sets de datos (Zhao et al., 2007). Por esto se sugirió el uso del PCA (*Principal Components Analysis*) con el fin de resumir los patrones de relaciones a lo largo del genoma en lugar del uso de la matriz Q, con otra matriz de efectos fijos (Price et al., citados por Zhao et al., 2007). Una propuesta posterior, consiste en el uso de una matriz de efectos fijos de escala multidimensional no métrica (M) para medir la estructura poblacional (Zhu y Yu, citados por Gutiérrez et al., 2011).

Sin embargo, destacan que lo más importante no es el método a utilizar, sino que el método utilizado controle de manera eficiente la estructura poblacional (Gutiérrez et al., 2011).

### 2.2.7.2 Modelos estadísticos para el mapeo asociativo

El modelo más sencillo es el “Naive” que proporciona información de los marcadores analizados, consistiendo en  $y = X\beta + e$ , donde  $y$ = Vector fenotípico,  $X$ : matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar, y  $e$ : error residual.

El modelo propuesto por Pritchard et al. (2000), conocido comúnmente como modelo “fijo” o “Q”, basado en marcadores genéticos que infieren la estructura de población, es  $y = X\beta + Qv + e$ , donde  $y$ : vector fenotipo,  $X$ : matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar,  $Q$ : matriz de probabilidades de pertenencia a una población obtenida por STRUCTURE,  $v$ : vector de efectos poblacionales (fijos) a estimar,  $e$ : error residual.

Posteriormente fue propuesto el modelo “kinship” donde se consideran a los marcadores como efectos fijos y se introduce la matriz kinship ( $K$ ) como efectos aleatorios (Parisseaux y Bernardo, 2004). Esta matriz  $K$  estima la identidad por descendencia ajustando la probabilidad de identidad por estado entre dos individuos, con la probabilidad media de identidad por estado entre dos individuos aleatorios (Yu et al., 2006b). Este modelo consiste en  $y = X\beta + Zu + e$ , donde  $y$ : vector fenotipo,  $X$ : matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar,  $Z$ : matriz de identidad que relaciona cada medida con cada individuo del cual se obtuvo (efecto aleatorio),  $u$ : vector de las predicciones de los efectos poligénicos aleatorios (desvíos aleatorios por relaciones en el genoma) de los genotipos,  $e$ : error residual.

Dicho modelo supera las limitantes de estudios anteriores por utilizar una matriz de marcadores para las relaciones de parentesco en lugar de coeficientes de coancestría que pueden ser impracticables cuando se trata de pedigrís incompletos, mejoramiento, selección y deriva; y por poseer la capacidad de considerar múltiples niveles de relaciones entre individuos (Yu et al., 2006b).

Tanto Gutiérrez et al. (2011) en el estudio de calidad maltera para el programa de mejoramiento de cebada invernal, como anteriormente Zhao et al. (2007) en el análisis del tiempo medio a floración de 95 accesiones de Arabidopsis, y niveles de expresión de 2 genes claves en floración- FLC (represor de floración) y FRI (promotor de floración), y von Zitzewitz et al. (2011) en el estudio de genética para cebada resistente al frío; optaron por el modelo “mixto” ( $Q + K$ ) propuesto por Yu et al. (2006b). Este modelo considera como efectos fijos a la estructura poblacional y como aleatorios a las relaciones genéticas. Se compone de la siguiente manera:  $y = X\beta + Qv + Zu + e$ , donde  $y$ : vector fenotipo,  $X$ : matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar,  $Q$ : matriz de probabilidades de pertenencia a una población obtenida por STRUCTURE,  $v$ : vector de efectos poblacionales (fijos) a estimar,  $Z$ : matriz de identidad que relaciona cada medida con cada individuo del cual se obtuvo (efecto aleatorio),  $u$ : vector de las predicciones de los

efectos poligénicos aleatorios (desvíos aleatorios por relaciones en el genoma) de los genotipos, e: error residual.

Malosetti et al. (2007), proponen el modelo “mixto” donde se considera solamente a los marcadores moleculares y a la estructura, pero tomando como efectos aleatorios a la misma. Este modelo se basa en la estructura poblacional propuesta por Patterson et al. (2006), escribiéndose  $y = X\beta + Qv + e$ , donde y: vector fenotipo, X: matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar, Q: matriz de probabilidades de pertenencia a una población obtenida por STRUCTURE, v: vector de efectos poblacionales (fijos) a estimar, e: error residual.

Este modelo análogamente al de Yu et al. (2006b), ofrece dos formas de representar las relaciones genotípicas: estructurando la matriz varianza-covarianza de los efectos genotípicos utilizando información de pedigrís o marcadores; e introduciendo un factor de agrupamiento para representar la asociación estructurada (Malosetti et al., 2007).

### 2.2.7.3 Importancia del tamaño de la muestra y número de marcadores

Varios autores han remarcado la importancia de considerar un tamaño adecuado de la muestra de germoplasma a utilizar y del número mínimo de marcadores a considerar, con el fin de encontrar asociaciones entre los marcadores y las características que sean significativas. Entre ellos, Zhu et al. (2008) destacan que en el AM el tamaño de muestra permanece pequeño, no superando en general las 100 líneas o accesiones a estudiar. Se afirma que la elección del tamaño poblacional a analizar dependerá de las relaciones entre los individuos y la extensión del LD, del tipo de estudio (gen candidato o escaneo del genoma) y del número de marcadores. Sin embargo, en varios casos el incremento del tamaño poblacional puede implicar aumentar la diversidad por inclusión del germoplasma que no es representativo del programa de mejoramiento (Wong y Bernardo, 2008). Por otra parte el número de marcadores requerido es mayor en el caso de SNPs bialélicos que en el caso de SSRs multialélicos (Zhu et al., 2008).

#### 2.2.7.4 Softwares disponibles

Para el análisis de AM en plantas ha sido utilizado el software conocido como TASSEL. Para estimar la matriz Q se utiliza en general el software STRUCTURE mientras que para estimar la matriz K se utiliza el software SPAGeDi (Zhu et al., 2008). Propuestas alternativas al uso de STRUCTURE, consisten en métodos clásicos de análisis multivariado con el fin de clasificar genotipos (Malosetti et al. 2007, Zhao et al. 2007, Zhu et al. 2008). En ese caso, distancias genotípicas se calculan a partir de información brindada por marcadores moleculares, y se usan como entrada para técnicas de escalas o agrupamiento (Ivandic et al., Kraakman et al., citados por Malosetti, et al., 2007). El EINGENSTRAT se usa con el fin de estimar el PCA y corregir por estratificación poblacional. Los software SAS y R son utilizados para varios métodos por investigadores avanzados (Zhu et al., 2008).

#### 2.2.8 Aspectos a destacar del AM

Estudios que se realicen con alta densidad de SNPs, tamaño de muestra representativo de la población y con poca estructuración, son los de mayor potencialidad en el análisis de caracteres cuantitativos; esperándose un uso mayor del escaneo del genoma a medida que evolucionan las tecnologías referentes al AM. De todas formas, el estudio del gen candidato para el AM tiene su utilidad cuando se está comenzando a estudiar una entidad, con el fin de una adecuada comprensión de la estructura poblacional, relaciones familiares, diversidad nucleótica y decaimiento del LD. Una limitante a considerar para el análisis del gen candidato en AM es la forma de selección de dicho gen, ya que la selección se suele dar comparando mutantes y especies silvestres, donde una frecuencia alélica sesgada es de difícil detección (Zhu et al., 2008).

Se estimó el poder de detectar verdaderos QTL a través de modelos mixtos en poblaciones de cultivos autógamias utilizando soja (*Glycine max*), detectando que la combinación de poblaciones más grandes, caracteres de mayor heredabilidad y menor número de QTL controlando la característica de interés, llevan a un aumento del poder y reducción de rango de falsos positivos, siendo mayor el poder y menor el rango en cultivos alógamas que autógamias, aunque continúan siendo de gran utilidad los modelos mixtos para las autógamias (Arbelbide et al., 2006).

## 2.3 GENES Y QTL RESPONSABLES DE CARACTERES DE INTERÉS

### 2.3.1 Estudios de genes y QTL

Los genetistas y mejoradores han estudiado el control genético de caracteres de interés agronómico a través del análisis de la variación alélica de su especie de interés, no siendo la cebada una excepción (Nilan, citado por Hay y Ellis, 1998).

Los caracteres fenológicos de la planta son caracteres cuantitativos de acuerdo a su distribución, controlados por un número desconocido de genes, cada uno con la habilidad de segregarse y recombinarse, y con la posibilidad de efectos epistáticos (un gen influye el efecto de otro) o pleiotrópicos (una variación en un gen se traduce en varios efectos fenotípicos) (Hay y Ellis, 1998).

En base al estudio de diversas poblaciones, se han identificado y localizado numerosos QTL utilizando los métodos detallados anteriormente; cuya ejecución involucró la localización de marcadores, y la estimación de la “distancia” entre ellos y los QTL en términos de frecuencia de recombinación, donde dicha distancia se mide en centiMorgans (cM) y no se relaciona directamente con la distancia física pudiendo variar la relación entre ambas distancias a lo largo del genoma (Lee, Griffiths et al., citados por Hay y Ellis, 1998).

### 2.3.2 Genes responsables en cebada para fenología

Como la fenología está controlada por tres clases de genes conocidos en gramíneas que influyen el cambio del primordio de estado vegetativo a reproductivo, varios estudios han tenido como propósito analizar el control genético para esta característica en cebada, siendo algunos: Laurie et al. (1995), Laurie et al. (2004), Pourkheirandish y Komatsuda (2007), Castro et al. (2008a), Castro et al. (2008b), Borràs-Gelonch et al. (2010), von Zitzewitz et al. (2011). Los genes codificantes para fenología son los responsables de controlar los requerimientos de vernalización, la respuesta al fotoperíodo y el tiempo a floración independiente de estos factores, conocido como precocidad *per se* o *earliness per se* (*eps*) (Laurie et al., 1995).

### 2.3.2.1 Genes responsables de la precocidad *per se*

El gen de efecto mayor *denso* es pleiotrópico, ya que produce principalmente cambios en la altura de planta y asimismo es responsable junto a varios QTL de la precocidad *per se*, ubicándose en el cromosoma 3H. Este gen es conocido por atrasar la fecha a antesis (Riggs et al., Barua et al., Laurie et al., citados por Laurie et al., 1995). Asimismo, existen QTL de efecto menor para antesis (*eps*) ubicados a lo largo del genoma: *eps2S* en el cromosoma 2H, *eps3L* en el 3H, *eps4L* en el 4H, *eps5L* en el 5H, *eps6L.1* y *eps6L.2* en el cromosoma 6H, *eps7S* y *eps7L* en el 7H (Laurie et al., 1995). Estos QTL también han sido identificados en trigo (Halloran y Boyde, Hoogendoorn, Worland, citados por Boyd et al., 2003).

### 2.3.2.2 Genes responsables de la sensibilidad a la vernalización

La sensibilidad a la vernalización se determina por las relaciones epistáticas entre tres loci: *VRN-H1*, *VRN-H2* y *VRN-H3* (Pourkheirandish y Komatsuda 2007, von Zitzewitz et al. 2011). Para que exista sensibilidad a la vernalización, las configuraciones alélicas deben ser *Vrn-H2\_ vrn-H1vrn-H1 vrn-H3vrn-H3* (crecimiento invernal), mientras que cualquier otra configuración lleva a un crecimiento primaveral (Pourkheirandish y Komatsuda 2007, Takahashi y Yasuda, citados por von Zitzewitz et al. 2011). Se considera el determinante del *VRN-H2*, a un factor de transcripción de zinc (*ZCCT-H*) que lleva a la represión de la floración expresado en días largos (Yan et al., citados por von Zitzewitz et al., 2011). La localización de estos genes es en los cromosomas 4H (*vrn2*), 5H (*vrn1*) y 7H (*vrn3*) (Takahashi y Yasuda, Yasuda, Laurie et al., Yan et al., citados por Pourkheirandish y Komatsuda, 2007).

Para el loci *VRN-H3* el gen candidato es *HvFT1* (Yan et al., Faure et al., citados por von Zitzewitz et al., 2011), cuya expresión se induce por los días largos y parece mediar la respuesta de floración a días largos (Turner et al., citados por von Zitzewitz et al., 2011). Las bajas temperaturas activan un gen, *HvBM5A*, que promueve la floración (Trevaskis et al., Hemming et al., citados por von Zitzewitz et al., 2011), y es necesario para la expresión del gen *HvFT1*. A su vez, el factor *ZCCT-H* atrasa la floración suprimiendo la inducción del *HvFT1*. Por otra parte, el gen *HvBM5A* regula

negativamente al factor *ZCCT-H* y permite que el alargamiento de los días induzca al *HvFT1* (von Zitzewitz et al., 2011).

### 2.3.2.3 Genes responsables de la sensibilidad al fotoperíodo

El *PPD-H1* (cromosoma 2H) es importante en determinar la respuesta al fotoperíodo de día largo (Laurie et al., Karsai et al., Decousset et al., citados por Pourkheirandish y Komatsuda, 2007), mientras que la cebada silvestre que responde al fotoperíodo tiene el alelo dominante, la cebada cultivada puede o no tenerlo (Pourkheirandish y Komatsuda, 2007). Las plantas con el alelo dominante espigan alrededor de 20 días antes que las que presentan el alelo recesivo (Turner et al., citados por Pourkheirandish y Komatsuda, 2007). El *PPD-H1* es también conocido como *eam1* (*early maturity 1*) (Laurie et al., 2004). La variación alélica en el locus *HvPRR7* que es el gen candidato para el *PPD-H1* en el cromosoma 2H, es importante en cebada de crecimiento primaveral ya que el alelo recesivo le confiere insensibilidad a las condiciones de día largo, prolongando el período de crecimiento y permitiendo así mayores rendimientos (von Zitzewitz et al., 2011).

Un segundo gen de efecto mayor también afecta la respuesta al fotoperíodo, el *PPD-H2*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 1H, teniendo un efecto pequeño en días largos (13-16 hs) y mayor efecto en días cortos (10 hs) (Laurie et al., Szücs et al., citados por Pourkheirandish y Komatsuda, 2007). Es decir que el *PPD-H2* tiene efectos significativos en la floración durante días cortos y siembras otoñales (Pan et al., Cuesta-Marcos et al., citados por von Zitzewitz et al., 2011); siendo la variación alélica del locus *HvFT3*, el gen candidato para el *PPD-H2* en el cromosoma 1H, la responsable del cambio de estado debida a deleciones del gen en accesiones sensibles durante condiciones de día corto (Faure et al., Kikuchi et al., citados por von Zitzewitz et al., 2011).

Otros genes actúan a su vez bajo condiciones de fotoperíodo corto: *eam7* posicionado en 6H, *eam8* en 1H, *eam9* en 4H y *eam10* en 3H (Borràs-Gelonch et al., 2010). También se encuentra el *eam5* en 5H (Franckowiak, citado por Boyd et al., 2007) y el *eam11* o *vrs1* en 2H (Szucs et al., 2009).

Asimismo se ha detectado que genes del tipo *CO* (*CONSTANTS*) cumplen cierto rol en la respuesta al fotoperíodo. Forman parte de una familia de genes de

diecisiete miembros subdividida en tres clases. Actúan en las rutas bioquímicas en respuesta a la inducción de las horas de luz, entre el reloj circadiano y los genes que controlan la identidad del meristemo (Griffiths et al., 2003). En cebada se encontraron los *HvCO1* ubicado en el cromosoma 7H y *HvCO2* que se encuentra en el 6H. Si bien se conoce que están involucrados en la respuesta al fotoperíodo, siendo el *HvCO1* homólogo al *Hdl* del arroz, no concuerdan con los loci de mayores respuestas correspondientes al *PPD-H1* y *PPD-H2*, pudiendo deberse a que los cereales de clima templado evolucionaron en la respuesta al fotoperíodo involucrando más loci o que los *PPD* corresponden a otros genes aún no caracterizados (Laurie et al., 2004). Posteriormente, investigación centrada en identificar adecuadamente los efectos de los genes del tipo *CO* encontraron que genotipos con idéntico trasfondo genético del *PPD-H1* tuvieron diferencias en el tiempo a floración debidas a variaciones alélicas en el *HvCO1* (aunque estas diferencias se dejaron de observar si se corregía por origen geográfico de las accesiones) (Stracke et al., 2008).

#### 2.3.2.4 QTL para precocidad *per se*

Los *eps* tienen la característica de ser aditivos (Laurie et al., 1995), lo que implica que los efectos alélicos se suman, resultando en un fenotipo compuesto por independientes fenotipos, cada uno afectado por un QTL (Castro et al., 2008a). Algunos autores han identificado al *eps2S* con un efecto más considerable que los otros *eps* (Laurie et al. 1995, Castro et al. 2008b). Éste se asocia a antesis tempranas, conocido también como *eam6* (Borràs et al., 2010).

La precocidad *per se* es un tema que ha sido de interés profundizar, y para lograrlo ciertos autores han tratado de identificar los efectos de los *eps* sobre la rutas bioquímicas involucradas en la fenología (Hay y Ellis 1998, Baga et al. 2009). Se ha comparado tanto a la cebada como al trigo con la especie *Arabidopsis thaliana*, cuyo pequeño genoma (120 millones de pares de base), rápido ciclo (6 semanas), autogamia y pequeño tamaño, han permitido realizar varios estudios de rutas bioquímicas para poder llevarlos hacia especies de mayor relevancia mundial (Hay y Ellis, 1998). Se han detectado cuatro rutas en *Arabidopsis* reguladoras del tiempo a floración siendo éstas: floración autónoma, respuesta al fotoperíodo, requerimiento de vernalización, y genes responsables del metabolismo del ácido giberélico (Bernier y Périlleux, Bäurle y Dean, Kobayashi y Weigel, citados por Baga et al., 2009). Los *eps* podrían estar controlando a

los genes reguladores del número/rango de producción de primordios de hojas en el ápice (plastocrón) o a genes afectando el rango de aparición de hojas en el tallo (filocrón) (Hay y Ellis 1998, Baga et al. 2009). Se cree que el tiempo a antesis se define según: el número de hojas iniciadas y el filocrón, estando los *eps* más asociados al número final de hojas (Hay y Ellis, 1998).

#### 2.3.2.5 QTL responsables del período emergencia-antesis

El gen de efecto mayor *denso* y el QTL *eps2S* se encontraron responsables de los subperíodos entre la emergencia de plántula y la antesis, siendo responsable el *eps2S* de los subperíodos ZE-Z20 y Z30-Z65, mientras el *denso* del subperíodo Z20-Z30, para la población resultante del cruzamiento BCD47 x Baronesse (Castro et al., 2008a). Este análisis determina una mejor comprensión del comportamiento de dichos genes en relación al tiempo a antesis, permitiendo mayor especificidad en la elección de las líneas a mejorar en cuanto a duración de las distintas etapas, pudiendo así seleccionar por materiales de floración temprana pero con mayor período de Z30-Z65 (donde se genera gran parte del potencial de producción).

#### 2.3.3 Genes responsables en cebada para altura de planta

El gen candidato *denso* es de gran importancia para la altura y ha sido mapeado por varios autores (Bezant et al. 1995, Thomas et al. 1995, von Korff et al. 2004, Castro et al. 2008a, Castro et al. 2008b, Wang et al. 2010). Se asocia a un crecimiento juvenil postrado, ya que acorta los entrenudos del tallo aumentando el número de macollos (Bezant et al., 1995). Varios autores han reportado distintos QTL que afectan también a la altura de planta, a través de cruzamientos de diversas poblaciones (Cuadro No.3).

Cuadro No. 3: QTL reportados para altura de planta

Cromosoma	BIN	Referencia
1H	2	von Korff et al. (2004)
1H	12	Gyenis et al. (2007), Inostroza et al. (2009)
2H	5	Gyenis et al. (2007), Inostroza et al. (2009)
2H	8	von Korff et al. (2004)
2H	9	Inostroza et al. (2009)
2H	12	Gyenis et al. (2007)
2H	14	von Korff et al. (2004)
3H	5	Gyenis et al. (2007)
3H	6	Wang et al. (2010)
3H	7	Wang et al. (2010)
3H	13	von Korff et al. (2004), Wang et al. (2010)
4H	10	Inostroza et al. (2009)
4H	13	Inostroza et al. (2009)
5H	7	Inostroza et al. (2009)
5H	8	von Korff et al. (2004)
5H	9	Thomas et al. (1995)
5H	11	Inostroza et al. (2009)
6H	9	von Korff et al. (2004)
7H	4	Inostroza et al. (2009)
7H	6	Gyenis et al. (2007), Inostroza et al. (2009)
7H	7	Gyenis et al. (2007)
7H	8	Inostroza et al. (2009)

#### 2.3.4 Genes responsables en cebada para peso de grano

En relación a peso de grano, otros varios QTL han sido mapeados (Cuadro No.4), por lo que su control genético se afirma es cuantitativo y depende del ambiente en el que se esté analizando a la característica.

Cuadro No. 4: QTL reportados para peso de grano

Cromo.	BIN	Referencia
2H	6	Barabaschi et al. (2012)
2H	7	Barabaschi et al. (2012)
2H	13	Barabaschi et al. (2012)
3H	3	Barabaschi et al. (2012)
3H	7	Barabaschi et al. (2012)
3H	9	Thomas et al. (1995)
4H	6	Kjaer y Jensen (1996)
5H	11	Barabaschi et al. (2012)
7H	3	Barabaschi et al. (2012)
7H	7	Barabaschi et al. (2012)

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

Se caracterizó a una población de 327 genotipos de cebada provenientes del centro ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) y de programas de mejoramiento genético de Sudamérica.

La caracterización fenotípica se realizó en la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay (58°03'W, 32°55'S). Los cultivares se sembraron en dos fechas de siembra diferentes para el mismo año, 12/08/11 y 13/09/11. Para la primera fecha se sembraron parcelas de 0.12 m<sup>2</sup> (2 m de largo, con dos surcos de 0.20 m de cada genotipo, separados 0.30 m entre ellos). En la segunda fecha, las parcelas se distinguen de las anteriores en que son de 1 m de largo, con un total de 0.06 m<sup>2</sup>. La diferencia de tamaño fue determinada por la disponibilidad de la semilla. Las variables medidas fueron: días a anthesis (Darista en la siembra del 12/08/11 y Darista2 en la del 13/09/11), días a espigazón (Espiga en la siembra del 12/08/11 y Espiga2 en la del 13/09/11), días a madurez fisiológica (Dmadurez en la siembra del 12/08/11 y Dmadurez2 en la del 13/09/11), peso de 100 granos en gramos (Pgranos), y altura de planta en cm (Alturacm). Las fechas de cada evento fenológico para cada unidad experimental se tomaron cuando aproximadamente el 50% de las plantas correspondientes a cada una se encontraban en dicho estadio. Por lo tanto, se consideró anthesis cuando las aristas del 50% de las plantas de una unidad experimental se ubicaron 1 cm por encima de la hoja bandera; espigazón cuando el 50% de las plantas de una unidad experimental presentaron espigas completamente emergidas; y madurez cuando el 50% de las plantas de una unidad experimental presentaron espigas cuyo pedúnculos completaron el cambio de color de verde a marrón. El peso de 100 granos se midió en una balanza de precisión, dos veces para cada variedad en la fecha de siembra 12/08/11. Si bien se midió peso en la segunda fecha, varios de los granos de muchas líneas estaban vacíos, por lo que no se incluyó en el análisis para la siembra del 13/09/11. Para medir la altura de planta se colocó una regla en centímetros desde la base de la planta hasta la base de la espiga. La altura fue medida solamente en la primera fecha. Se analizaron también las variables período de llenado de grano (Llenado en la siembra del 12/08/11 y Llenado2 en la del 13/09/11) y respuesta al fotoperíodo (RFP), que se calcularon a partir de las otras variables. Para período de llenado de grano se calculó la diferencia entre días a madurez y días a arista para cada fecha de siembra. La respuesta al fotoperíodo se calculó como la diferencia entre días a arista para la fecha de siembra 13/09/11 y días a arista para la siembra del

12/08/11, basándose en que al alargarse los días los genotipos que respondan al fotoperíodo florecerán antes, demorando menos en florecer que en la primera fecha, habiendo mayor diferencia entre las variables Darista y Darista2 (Germán et al., 2000).

El diseño experimental se definió en bloques incompletos aumentados, con cultivares de cebada como testigo de comportamiento conocido en el Uruguay, que fueron los siguientes seis: Baronesse, Quebracho, Madi, Clipper, Dayman y CLE202.

La población fue caracterizada genótipicamente utilizando la plataforma BOPA 1 (First Barley Oligonucleotide Pool Assay) correspondiente al Barley CAP (Barley Coordinated Agricultural Project). Este set presenta 1536 SNPs siguiendo el protocolo de Illumina's GoldenGate Bead Array Technology. Detalles sobre la realización del BOPA 1 se ubican en Close et al. (2009). Del total de SNPs utilizados quedaron 1096 marcadores, debido a la eliminación de marcadores con más de 10% de datos faltantes, reduciéndose también los genotipos a 287 (Anexo 1).

Se obtuvieron los BLUPs (Best Linear Unbiased Prediction), para cada genotipo en cada ambiente para todas las variables aleatorias con el programa SAS. versión 9.1. Estos resultados se analizaron siguiendo el modelo:  $y_{ijk} = \mu + \beta_i + \text{Testigos}_j + \text{Genotipos}_{k(j)} + \varepsilon_{ijk}$ ; donde  $y_{ijk}$ : variable fenotípica dependiente (fenología, respuesta al fotoperíodo, período de llenado de grano, peso de 100 granos o altura de planta),  $\mu$ : media poblacional de la variable fenotípica en cuestión,  $\beta_i$ : efecto del  $i$ -ésimo bloque incompleto aumentado (aleatorio),  $\text{Testigos}_j$ : efecto del  $j$ -ésimo testigo,  $\text{Genotipos}_{k(j)}$ : efecto de  $k$ -ésimo genotipo anidado dentro del  $j$ -ésimo testigo (aleatorio),  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental asociado al  $i$ -ésimo bloque,  $j$ -ésimo testigo, y  $k$ -ésimo genotipo dentro del  $j$ -ésimo testigo. Siendo:  $i: 1,2,\dots,22$ ;  $j: 1,2,3,4,5,6$ ;  $k: 1,2,\dots,327$ .

Los supuestos en referencia al modelo son: el modelo es correcto (en relación al material experimental), es aditivo y no existe interacción bloque por tratamiento (genotipo). Considerando los supuestos de los errores experimentales ( $\varepsilon_{ijk}$ ), los bloques incompletos ( $\beta_i$ ) y los genotipos ( $G_{k(j)}$ ), estos son variables aleatorias independientes idénticamente distribuidas, donde cada uno se distribuye de la siguiente manera:  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_E)$ ,  $\beta_i \sim N(0, \sigma^2_B)$ ,  $G_{k(j)} \sim N(0, \sigma^2_G)$ .

Para la detección de QTL mediante el AM, primero se compararon diferentes modelos, “naive”, “fijo”, “kinship” y “mixto”, y después se eligió el mejor modelo y se reportaron QTL sobre ese modelo. El “naive” es el modelo más simple proporcionando solamente información de los marcadores moleculares. El modelo “fijo” incorpora

información sobre la estructura de la población “Q” considerándola como efecto fijo. El “kinship” introduce la probabilidad de relaciones familiares entre los individuos analizados a través de la matriz “k”, modelada como relaciones genéticas en el efecto aleatorio. Por último, el modelo “mixto” considera solamente a los marcadores moleculares y a la estructura, pero modela a la estructura como un efecto aleatorio. De estos el modelo seleccionado fue el modelo “kinship”:  $y = X\beta + Zu + e$ , donde y: vector fenotipo (BLUPs), X: matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar, Z: matriz de identidad (relaciona cada medida con cada individuo del cual se obtuvo), u: vector de las predicciones de los efectos poligénicos aleatorios (desvíos aleatorios por relaciones en el genoma, variable aleatoria), e: error residual.

El criterio tomado para definir un QTL como significativo fue la asociación marcador-carácter con p-valor  $\leq 0.05$  después de ajustar el umbral con p-valor  $\leq 0.001$ . Al haber marcadores significativos ligados se consideró como QTL al marcador con p-valor menor.

Se utilizó el programa R versión 2.10.1. para este análisis de AM, para el análisis descriptivo y el de correlaciones.

En el análisis de componentes principales (Anexo 2) se detectaron 31 ejes que explican el 60% de la varianza acumulada.

En el análisis de la distribución de las variables fenotípicas (Anexo 3) algunas se desvían de la distribución Normal como días a madurez para la fecha de siembra 12/08/11, y días a madurez y llenado de grano para la fecha de siembra 13/09/11. Pero aparentemente no existe un ordenamiento espacial de los datos (Anexo 4), ya que las gráficas de los datos medidos coinciden en su gran mayoría con la distribución teórica para cada variable.

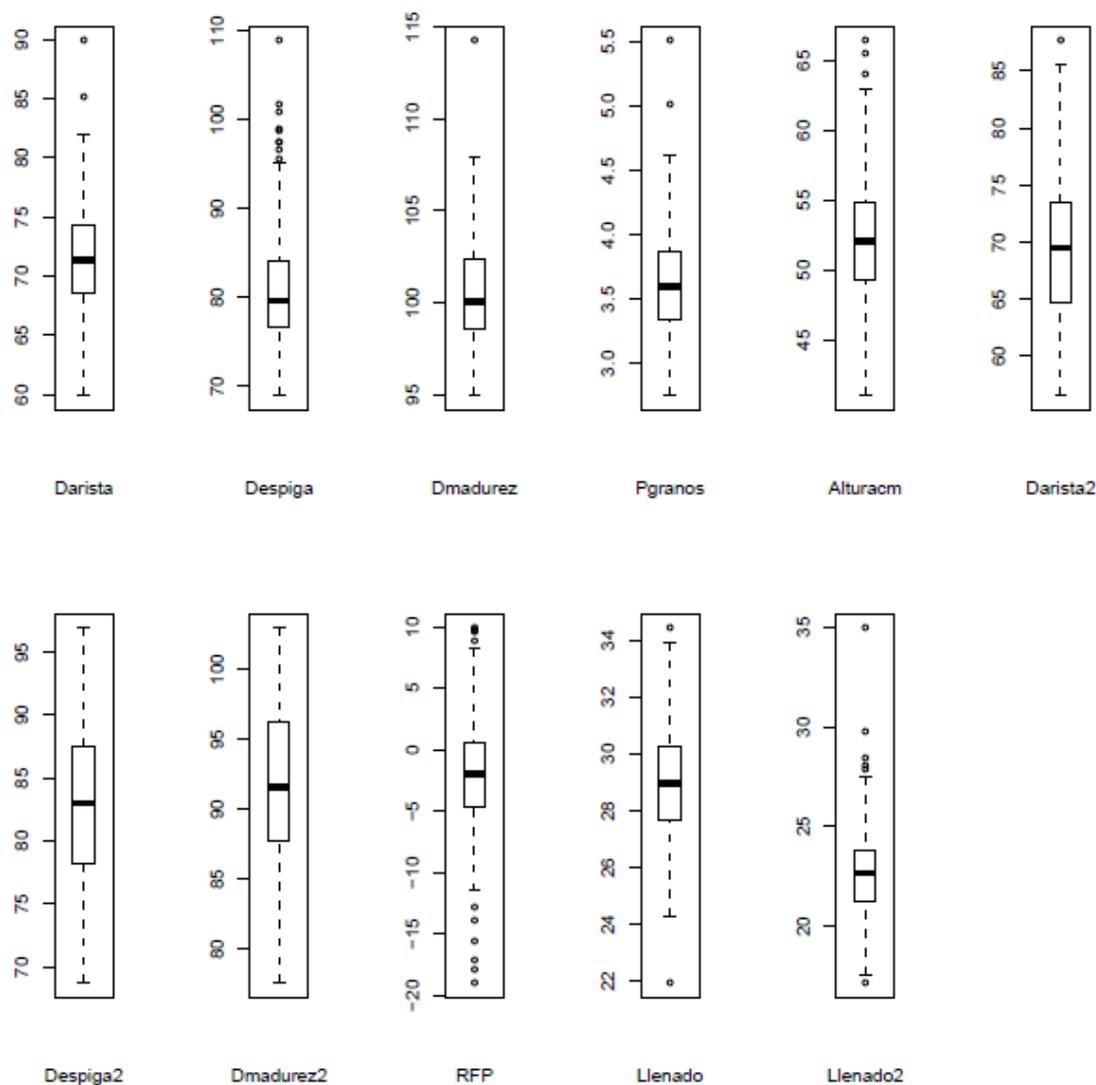
No existe un alto LD (Anexo 5) observándose principalmente el color azul a la derecha de la diagonal de 45° (la diagonal es roja ya que un marcador está correspondido consigo mismo y por tanto no recombina). Se muestran marcadores polimórficos (Anexo 6), que permitirán identificar variaciones alélicas entre variedades y así establecer diferencias entre ellas.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO PARA VARIABLES FENOTÍPICAS

Las distribuciones de las variables fenotípicas muestran valores que se ubican por encima del rango intercuartílico superior (Gráfico No.1). En relación a Pgranos y Alturacm, no es de gran relevancia que estos datos se comporten como valores extremos ya que los genotipos estudiados pueden que difieran en gran medida en dichas características fenotípicas debido a su diversidad genética por su origen y/o mejoramiento genético previo. Por tanto se podría seleccionar genotipos que presenten mayores pesos de grano y alturas moderadas (50-55 cm) para obtener un mayor rendimiento con bajo riesgo de vuelco. Los valores extremos para Darista y Dmadurez sí son de importancia, pudiendo ser adjudicados a mediciones no del todo correctas, aunque debiéndose destacar que las mediciones se realizaron por la misma persona lo que disminuye el error por menor ambigüedad. Es decir, se espera que bajo similares condiciones ambientales las líneas (por más que difieran genéticamente) se comporten dentro de ciertos límites de forma similar, sin existir esos datos fuera de rango. En la primera época, el genotipo con más días a antesis fue el FONT\_2, seguido por el FONT\_17, que luego presentó mayores días a espiga y a madurez fisiológica. También fue el FONT\_17 el que tuvo más días a antesis en la segunda fecha, pero el FONT\_13 fue el que más días a espiga y madurez presentó en dicha siembra (datos no presentados). Las razones de los valores extremos de las variables RFP, Llenado y Llenado2 pueden deberse a la forma en que se calcularon, es decir como las diferencias entre dos variables. En el análisis de dichos valores extremos, FONT\_148 y FONT\_149 fueron los de mayor respuesta al fotoperíodo (datos no presentados), presentando período de llenado mayor en la segunda fecha, y valores extremos para dicho llenado.

Gráfico No. 1: Gráfico de caja (“box-plot”) para los BLUPs de Darista, Darista2, Despiga, Despiga2, Dmadurez, Dmadurez2, Pgranos, Alturacm, RFP, Llenado y Llenado2. Se observa por variable la mediana, primer y tercer cuartil, y desvío estándar.



Las correlaciones entre Darista y Dmadurez son positivas y altas, siendo 0.81 y 0.76 (Gráfico No.2) para la primera y segunda fechas de siembra respectivamente. Esto sugiere que los genotipos que presenten menos días a antesis, en general también presentan un menor número de días a madurez para cada fecha.

Entre ambas fechas de siembra, Darista presenta una correlación de 0.57, y Dmadurez de 0.55; siendo éstas medianas y positivas. Puede significar que algunos de los cultivares que florecieron en promedio más temprano en la primera fecha de siembra, también lo hicieron en la segunda fecha. Sin embargo, la falta de correlaciones aún mayores puede implicar algún tipo de respuesta al fotoperíodo o interacciones de algunos genes de precocidad *per se* con las fechas de siembra.

Entre Llenado y Llenado2 hay bajas correlaciones (0.18) pudiendo indicar que los genotipos variaron su comportamiento entre antesis y madurez para cada fecha. Sumado a esto, Llenado presenta correlación alta y positiva (0.72) con Darista, lo cual no es esperable ya que a mayores días a arista, llenado más corto (Castro et al., 1997), mientras que Llenado2 mostró mayor correlación con Dmadurez (0.66). RFP presenta la mayor correlación con Darista2 (0.57), y un poco menor con Darista (0.37).



## 4.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO PARA MARCADORES MOLECULARES

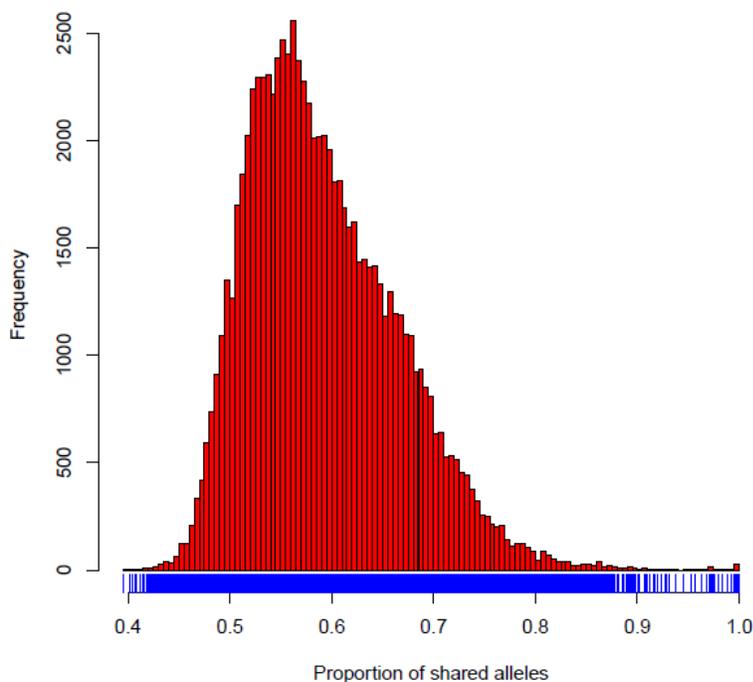
El número de marcadores varía por cada cromosoma (Cuadro No.5), siendo el cromosoma más cubierto el 5H, con un total de 201 marcadores, mientras el menos cubierto es el 1H, con 125 marcadores. El grupo de ligamiento de mayor longitud es el 5H (194 cM) y el de menor el 4H (122 cM). La distancia máxima entre marcadores dentro del grupo 1H es la mayor, es decir es donde existe el mayor espacio sin ser cubierto por marcadores. A pesar de esto, se muestra que existe una buena densidad ya que el tercer cuartil indica que por debajo del mismo, el 75% de los marcadores se encuentran a una distancia entre 1.2 a 1.5 cM dependiendo del grupo de ligamiento. Los cromosomas con menor distancia máxima entre marcadores (3H y 4H) son los de mayor densidad (Anexo 6).

Cuadro No. 5: Densidad de los marcadores moleculares para cada cromosoma. Se muestran grupos de ligamientos (cromosoma), cuántos marcadores por grupo existen, largo total de cada cromosoma (longitud -cM-), distancia máxima entre marcadores dentro de un grupo (longitud máxima -cM-), mediana, primer (q.25) y tercer cuartil (q.75).

Cromosoma	No. marcadores	Longitud (cM)	Longitud máxima (cM)	Mediana	q.25	q.75
1H	125	140	10.7	0.62	0	1.5
2H	187	150	8.2	0.58	0	1.2
3H	178	171	6.6	0.58	0	1.4
4H	131	122	7.5	0.6	0	1.4
5H	201	194	8	0.57	0	1.4
6H	147	129	8.6	0.47	0	1.4
7H	127	167	10.5	0.49	0	1.4

No hay genotipos idénticos (Gráfico No.3), ya que las frecuencias de la totalidad de alelos compartidos son mínimas.

Gráfico No. 3: Gráfico de genotipos idénticos. El eje horizontal representa la proporción de alelos compartidos, y el vertical la frecuencia de dicha proporción.

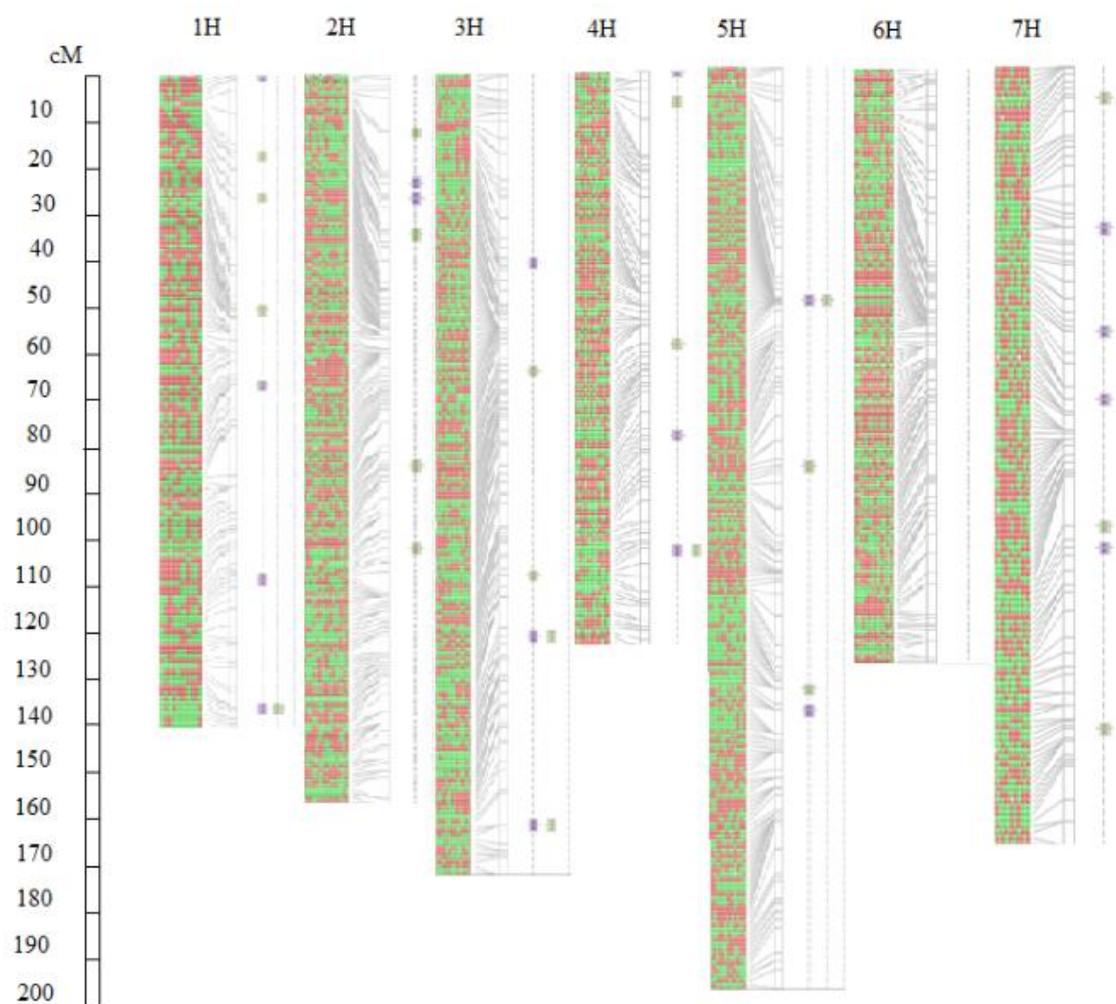


#### 4.3 ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES MOLECULARES Y QTL DETECTADOS

Se encontraron 18 QTL para Darista, y 21 QTL Darista2 (Figura No.1). Para Darista los QTL se distribuyeron de la siguiente manera: cuatro QTL en el 1H, dos QTL en el 2H, tres QTL en el 3H, tres QTL en el 4H, dos QTL en el 5H y cuatro QTL en el 7H. En Darista2 se ubicaron: cuatro QTL en el 1H, cuatro QTL en el 2H, cuatro QTL en el 3H, tres QTL en el 4H, tres QTL en el 5H y tres QTL en el 7H. De estos QTL, coinciden para las dos fechas: un QTL en el 1H (135.56 cM, BIN 14, marcador molecular 11\_11509); dos QTL en el 3H (122.14 cM, BIN 11-12, marcador molecular 11\_20944 y 162.15 cM, BIN 14, marcador molecular 11\_10702); un QTL en el 4H

(103.11 cM, BIN 10, marcador molecular 11\_10334); un QTL en el 5H (51 cM, BIN 4, marcador molecular 11\_10177).

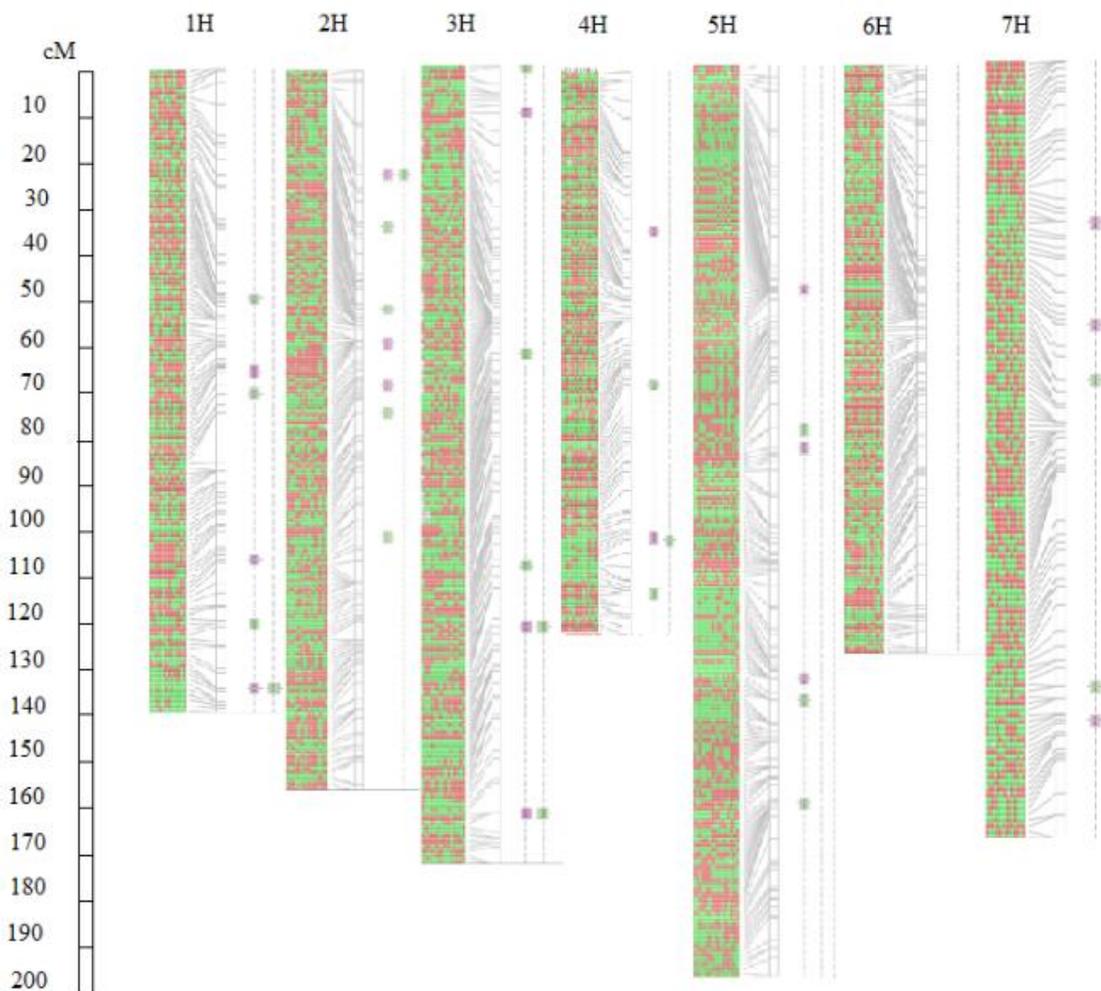
Figura No. 1: QTL encontrados para Darista (violeta) y Darista2 (verde). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



Se encontraron 17 QTL para Despiga, y 22 QTL Despiga2 (Figura No.2). Para Despiga los QTL se distribuyeron de la siguiente manera: tres QTL en el 1H, tres QTL

en el 2H, tres QTL en el 3H, dos QTL en el 4H, tres QTL en el 5H y tres QTL en el 7H. En Despiga2 se ubicaron: cuatro QTL en el 1H, cinco QTL en el 2H, cinco QTL en el 3H, tres QTL en el 4H, tres QTL en el 5H y dos QTL en el 7H. De estos QTL, coinciden para las dos fechas: un QTL en el 1H (135.56 cM, BIN 14, marcador molecular 11\_11509); un QTL en el 2H (28.44 cM, BIN 5, marcador molecular 11\_21366); dos QTL en el 3H (122.14 cM, BIN 11-12, marcador molecular 11\_20944 y 162.15 cM, BIN 14, marcador molecular 11\_10702); un QTL en el 4H (102.37 - marcador molecular 11\_10510 y 103.11 cM - marcador molecular 11\_10334, BIN 10).

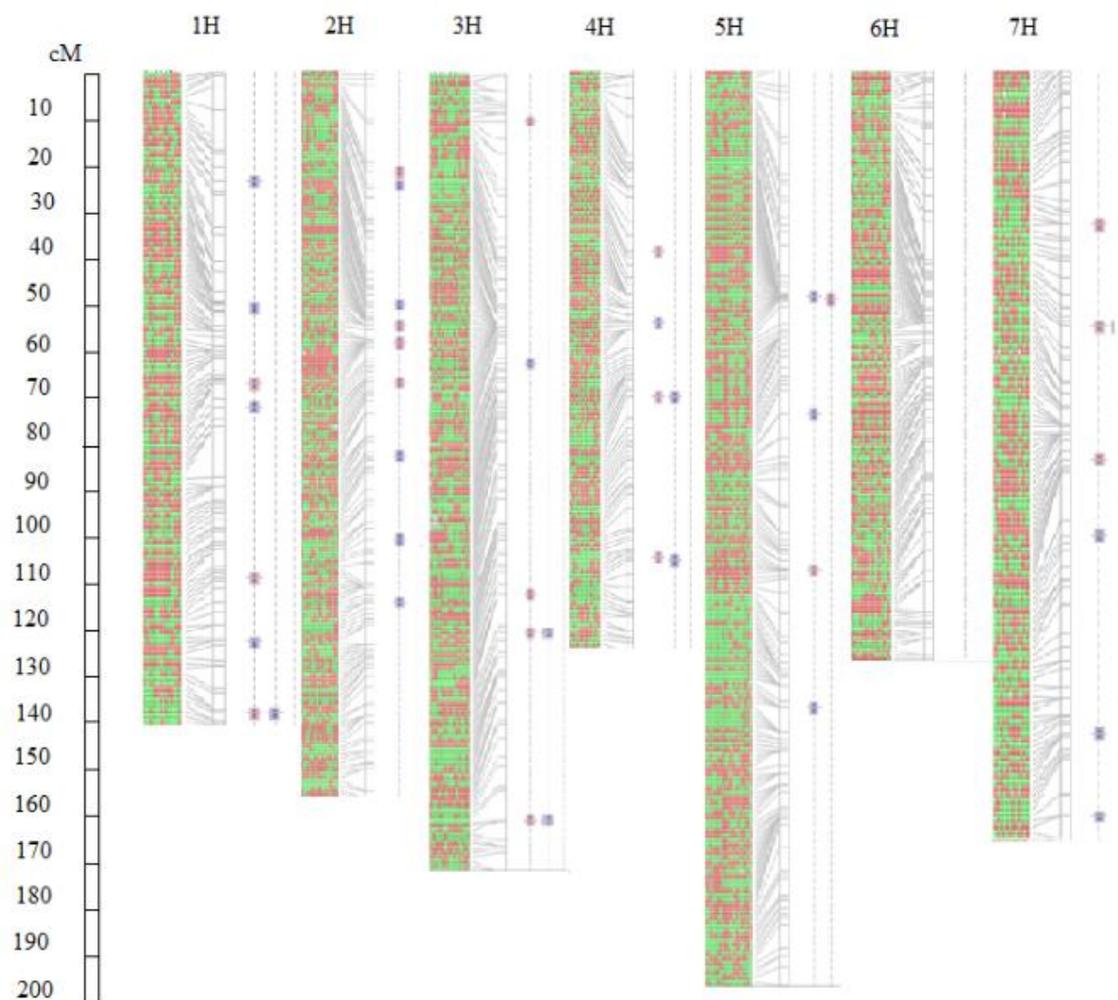
Figura No. 2: QTL encontrados para Despiga (violeta) y Despiga2 (verde). A la izquierda se ubica la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



Se encontraron 19 QTL para Dmadurez, y 23 QTL Dmadurez2 (Figura No.3). Para Dmadurez los QTL se distribuyeron de la siguiente manera: tres QTL en el 1H, cuatro QTL en el 2H, cuatro QTL en el 3H, tres QTL en el 4H, dos QTL en el 5H y tres QTL en el 7H. En Dmadurez2 se ubicaron: cinco QTL en el 1H, cinco QTL en el 2H, tres QTL en el 3H, tres QTL en el 4H, tres QTL en el 5H y cuatro QTL en el 7H. De estos QTL, coinciden para las dos fechas: un QTL en el 1H (135.56 cM - marcador molecular 11\_11509 y 136.31 - marcador molecular 11\_10753, BIN 14); un QTL en el

2H (28.44 cM – marcador molecular 11\_21366 y 31.02 cM – marcador molecular 11\_10891, BIN 5); dos QTL en el 3H (122.14 cM, BIN 11-12, marcador molecular 11\_20944 y 162.15 cM, BIN 14, marcador molecular 11\_10702); dos QTL en el 4H (uno en 69.51 cM, BIN 7, marcador molecular 11\_11513 y otro en 102.37 – marcador molecular 11\_10510 y 103.11 cM – marcador molecular 11\_10334, BIN 10); un QTL en el 5H (51 – marcador molecular 11\_10177 y 51.6 cM – marcador molecular 11\_11506, BIN 4); un QTL en el 7H (56.81 cM, BIN 6, marcador molecular 11\_20113).

Figura No. 3: QTL encontrados para Dmadurez (violeta) y Dmadurez2 (azul). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



Dentro de cada época, se detectaron varias coincidencias de asociaciones significativas entre las variables fenotípicas: días a antesis, días a espigazón y días a madurez (Cuadros No.6 y No.7). La mayoría son en común para las tres variables, mostrándose una mayor diferencia entre épocas que dentro de la misma fecha de siembra. Esto es consistente con las correlaciones encontradas para la misma fecha

(entre 0.76 y 0.93) en relación a las detectadas para la misma variable entre fechas (entre 0.53 y 0.57) (Gráfico No.2).

Cuadro No. 6: QTL coincidentes para Darista, Despiga y Dmadurez. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.

Ubicación (cM)	Cromosoma	BIN	Marcador molecular	Variables fenotípicas
66.7	1H	7	11_20956	Darista;Despiga;Dmadurez
107.55-108.31	1H	11	11_20220/11_20844	Darista;Despiga;Dmadurez
135.56-136.31	1H	14	11_11509/11_10753	Darista;Despiga;Dmadurez
28.44	2H	5	11_21366	Darista;Despiga;Dmadurez
63.53	2H	7	11_21399	Despiga;Dmadurez
71.56-72.33	2H	8	11_21258/11_20667	Despiga;Dmadurez
12.46	3H	2	11_20595	Despiga;Dmadurez
122.14	3H	11-12	11_20944	Darista;Despiga;Dmadurez
162.15	3H	15	11_10702	Darista;Despiga;Dmadurez
102.37-103.11	4H	10	11_10510/11_10334	Darista;Despiga;Dmadurez
51-51.6	5H	4	11_10177/11_11506	Darista;Despiga;Dmadurez
34.82	7H	3	11_20993	Darista;Despiga;Dmadurez
56.81	7H	5	11_20113	Darista;Despiga;Dmadurez

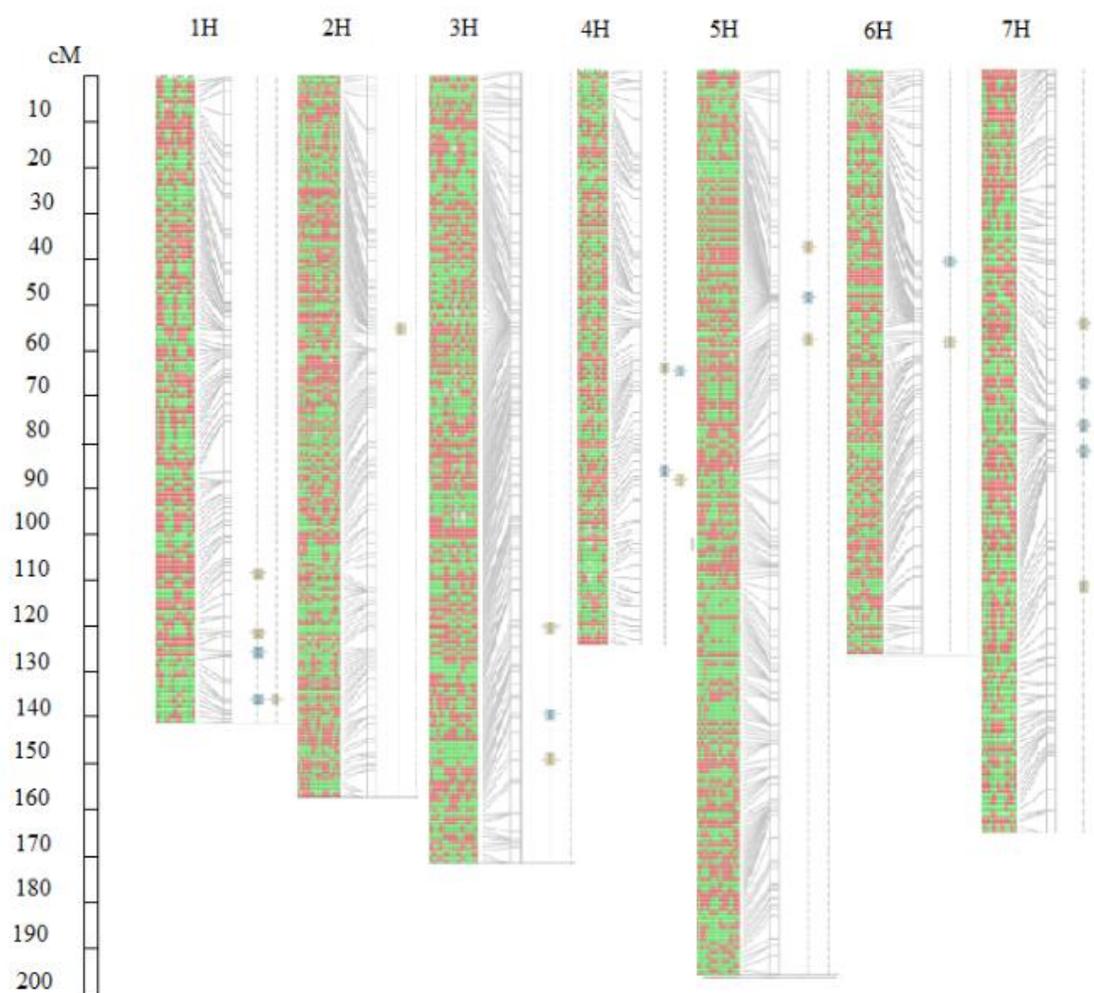
Cuadro No. 7: QTL coincidentes para Darista2, Despiga2 y Dmadurez2. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.

Ubicación (cM)	Cromosoma	BIN	Marcador molecular	Variabes fenotípicas
50.6	1H	6	11_20427	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
71.43	1H	8	11_10686	Despiga2;Dmadurez2
121.12	1H	12	11_20908	Despiga2;Dmadurez2
135.56- 136.31	1H	14	11_11509/11_10753	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
39.1	2H	4	11_10178	Darista2;Despiga2
55.67-56.28	2H	6	11_11505/11_10891	Despiga2;Dmadurez2
86.63	2H	9	11_10213	Darista2;Dmadurez2
103.67	2H	11	11_21340	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
64.19-65.52	3H	6	11_21120/11_11002	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
109.14	3H	10	11_21513	Darista2;Despiga2
122.14	3H	11-12	11_20944	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
162.15	3H	15	11_10702	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
69.51	4H	7	11_11513	Despiga2;Dmadurez2
103.11	4H	10	11_10334	Darista2;Despiga2; Dmadurez2
51	5H	4	11_10177	Darista2;Dmadurez2
137.16	5H	11	11_21241	Despiga2;Dmadurez2

Se encontraron diez QTL para Llenado, y 14 QTL para Llenado2 (Figura No.4). Para Llenado los QTL se distribuyeron de la siguiente manera: dos QTL en el 1H, un QTL en el 3H, dos QTL en el 4H, un QTL en el 5H, un QTL en el 6H y tres QTL en el 7H. En Llenado2 se ubicaron: tres QTL en el 1H, un QTL en el 2H, dos QTL en el 3H, dos QTL en el 4H, dos QTL en el 5H, un QTL en el 6H y tres QTL en el 7H. De estos QTL, coinciden para las dos fechas: un QTL en el 1H (135.56 cM, BIN 14, marcador molecular 11\_11509); dos QTL en el 4H (uno en 64.31 cM – marcador molecular 11\_20723 y 65.05 cM – marcador molecular 11\_10523, BIN7 y otro en 86.27 cM– marcador molecular 11\_20178 y 88.22 cM – marcador molecular 11\_20358, BIN 9); un

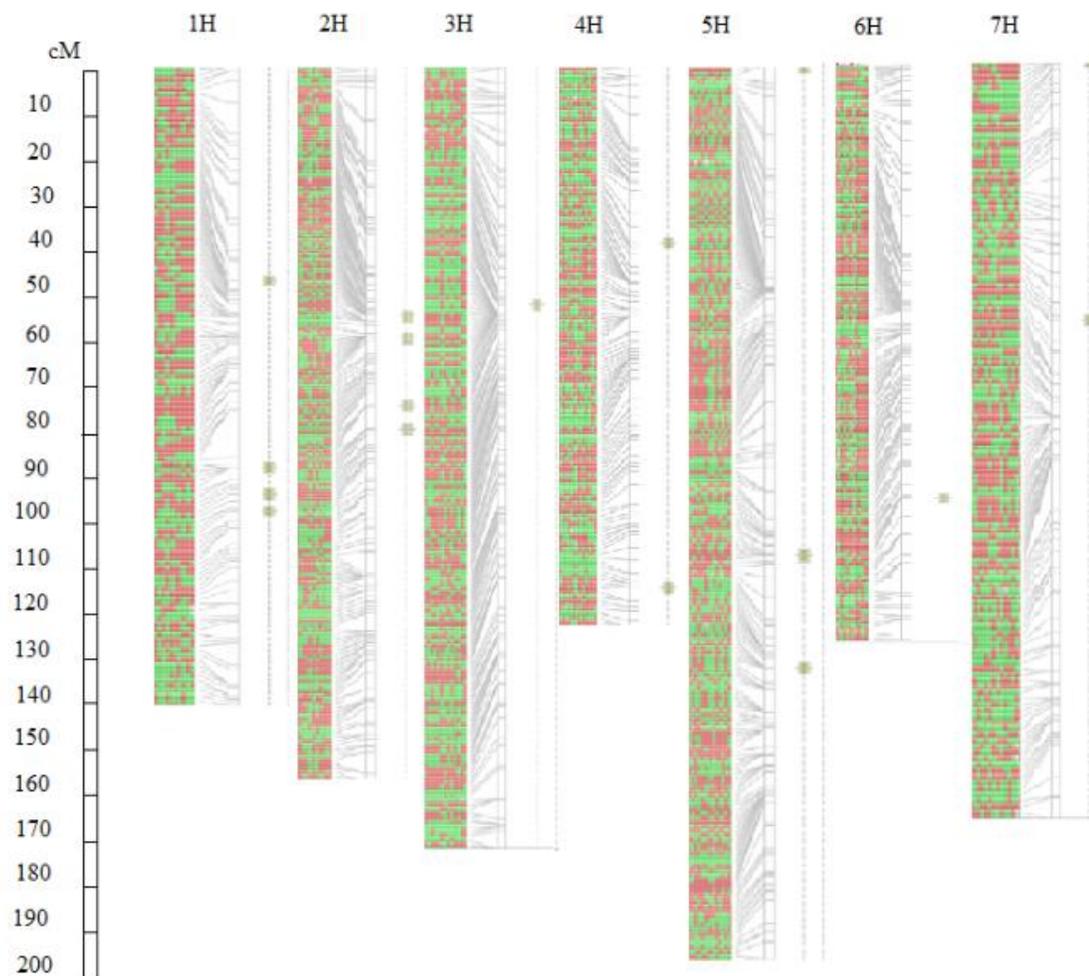
QTL en el 7H (77.85 cM – marcador molecular 11\_10394 y 79.6cM – marcador molecular 11\_11352, BIN 7).

Figura No. 4: QTL encontrados para Llenado (celeste) y Llenado2 (amarillo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



Se encontraron 17 QTL para RFP, ubicados: cuatro QTL en el 1H, cuatro QTL en el 2H, un QTL en el 3H, dos QTL en el 4H, tres QTL en el 5H, un QTL en el 6H y dos QTL en el 7H.

Figura No. 5: QTL encontrados para RFP (amarillo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



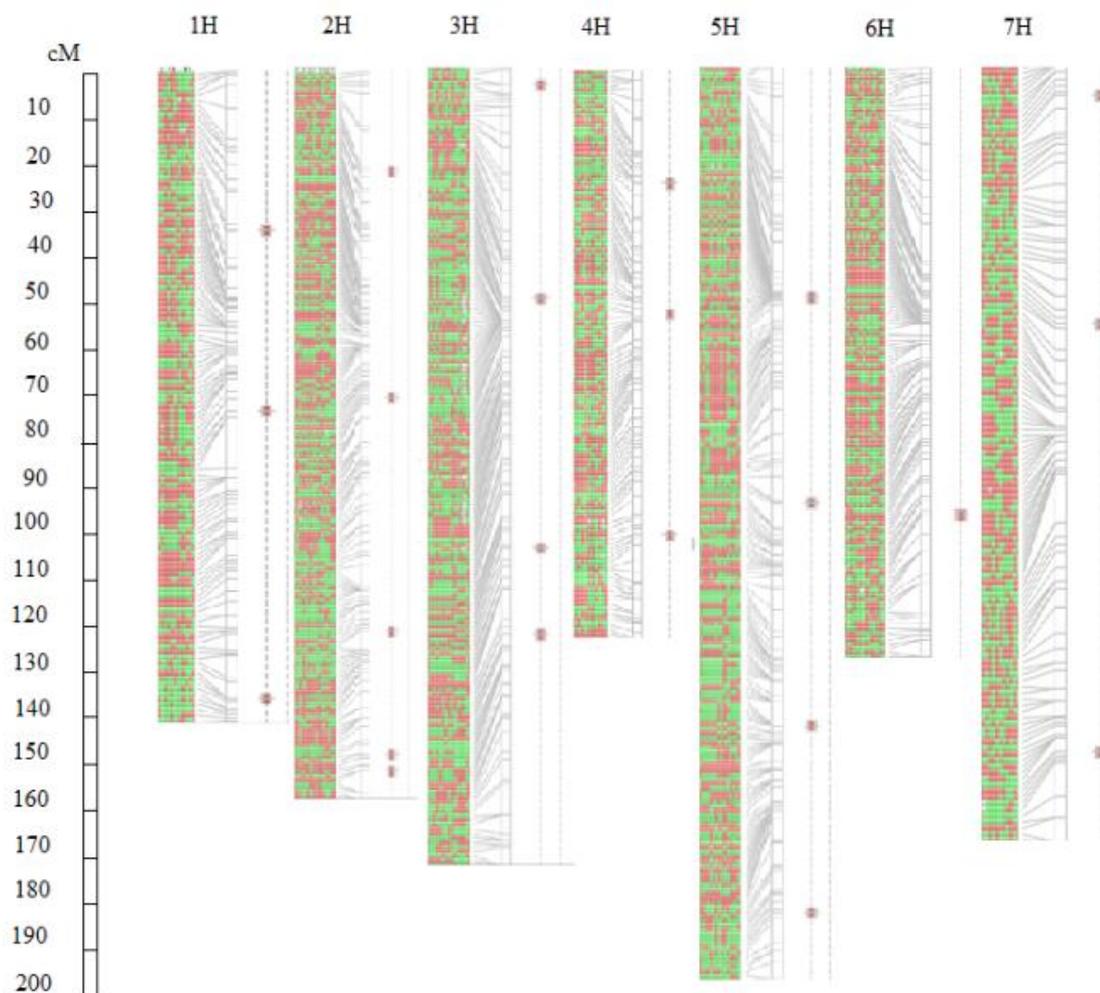
Considerando todas las variables fenológicas (Darista, Despiga, Dmadurez, Darista2, Despiga2, Dmadurez2, RFP, Llenado y Llenado2), varios QTL coinciden entre éstas, no necesariamente en la misma época (Cuadro No.8).

Cuadro No. 8: QTL coincidentes para las variables fenológicas: Darista, Despiga, Dmadurez, Darista2, Despiga2, Dmadurez2, RFP, Llenado y Llenado2. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.

Ubicación (cM)	Cromosoma	BIN	Marcador molecular	Variabes fenotípicas
107.55-108.31	1H	11	11_20220/11_20844	Darista;Despiga; Dmadurez;Llenado2
121.12	1H	12	11_20908	Despiga2;Dmadurez2; Llenado2
135.56-136.31	1H	14	11_11509/11_10753	Darista;Despiga;Dmadurez; Darista2;Despiga2;Dmadurez2; Llenado;Llenado2
58.9-59.9	2H	6	11_10679/11_20251	Dmadurez;Llenado2;RFP
63.53	2H	7	11_21399	Despiga;Dmadurez;RFP
78	2H	8	11_10196	Despiga2;RFP
122.14	3H	11-12	11_20944	Darista;Despiga;Dmadurez; Darista2;Despiga2;Dmadurez2; Llenado2
39.8	4H	4	11_20012	Dmadurez;RFP
114.7	4H	11-12	11_11513	Despiga2;RFP
51-51.6	5H	4	11_10177/11_11506	Darista;Despiga;Dmadurez; Darista2;Dmadurez2;Llenado
108.18	5H	9-10	11_20320	Dmadurez;RFP
132.6	5H	10	11_10705	Despiga;Darista2;RFP
55.63-56.81	7H	5-6	11_20790/11_20113	Darista;Despiga;Dmadurez; Dmadurez2;Llenado2;RFP
68.46	7H	6	11_20671	Despiga2;Llenado
83.44-84.92	7H	7	11_20349/11_20880	Dmadurez;Llenado

Se encontraron 23 QTL para Alturacm, ubicados: tres QTL en el 1H, cinco QTL en el 2H, cuatro QTL en el 3H, tres QTL en el 4H, cuatro QTL en el 5H, uno QTL en el 6H y tres QTL en el 7H.

Figura No. 6: QTL encontrados para Alturacm (rojo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



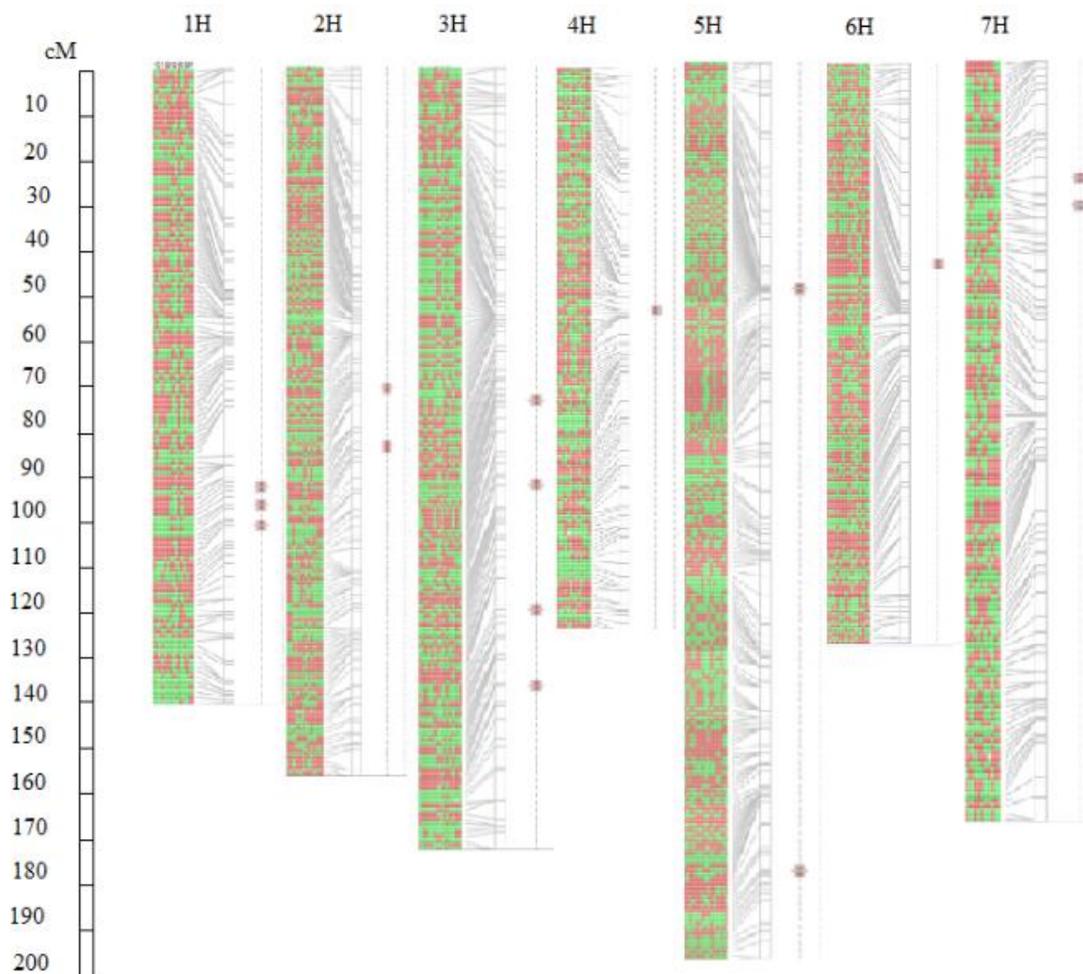
Existen QTL coincidentes entre Darista, Despiga, Dmadurez, Llenado, RFP y Alturacm (Cuadro No.9). Sólo se consideran las coincidencias para la primera época porque altura fue medida solamente en las líneas sembradas en dicha época.

Cuadro No. 9: QTL coincidentes para Darista, Despiga, Dmadurez, Llenado, RFP y Alturacm. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.

Ubicación (cM)	Cromosoma	BIN	Marcador molecular	Variables fenotípicas
135.56-136.31	1H	14	11_11509/11_10753	Darista;Despiga;Dmadurez; Llenado;Alturacm
28.44	2H	5	11_21366	Darista;Despiga;Dmadurez; Alturacm
73.75-74.37	2H	8	11_10632/11_20960	Pgranos;Alturacm
51.73-54.5	3H	5-6	11_11502/11_21120	RFP;Alturacm
54.3	4H	6	11_20610	Pgranos;Alturacm
100.74-103.11	4H	10	11_11470/11_10334	Darista;Despiga;Dmadurez; Alturacm
51-51.6	5H	4	11_10177/11_11506	Darista;Despiga;Dmadurez; Llenado;Pgranos;Alturacm
97.4	6H	9	11_10734	RFP;Alturacm
55.63-56.8	7H	5-6	11_20113	Darista;Despiga;Dmadurez; RFP;Alturacm

Se encontraron 15 QTL para Pgranos, ubicados: tres QTL en el 1H, dos QTL en el 2H, cuatro QTL en el 3H, un QTL en el 4H, dos QTL en el 5H, un QTL en el 6H, dos QTL en el 7H.

Figura No. 7: QTL encontrados para Pgranos (rojo). A la izquierda se presenta la distancia en cM. A la derecha se muestran los cromosomas, cada uno con una primer gráfica que identifica los alelos en rojo o verde (0/1), seguido por el mapa de ligamiento indicando las distancias (en cM). Los QTL se muestran como barras en el mapa de ligamiento.



Existen QTL muy cercanos en posición entre Darista y Pgranos (Cuadro No.10). Sólo se consideran las coincidencias para la primera época porque Pgranos fue analizado solamente en las líneas sembradas en dicha época.

Cuadro No. 10: QTL coincidentes para Darista y Pgranos. La ubicación en cM es válida para el análisis bajo estudio.

Ubicación (cM)	Cromosoma	BIN	Marcador molecular	VARIABLES fenotípicas
120.6-122.14	3H	11-12	11_20628/11_20944	Darista;Peso
51	5H	4	11_10177	Darista;Peso
31.7-34.8	7H	3	11_10920/11_20993	Darista;Peso

#### 4.4 QTL DE MAYOR EFECTO ADITIVO EN LA POBLACIÓN Y COINCIDENCIAS CON REPORTES PREVIOS

La población de 327 genotipos evaluada con el fin de detectar QTL y de relacionar diferentes variables agronómicas, se considera una colección amplia. Esto influye en la precisión de detección de QTL y el poder estadístico ya que grandes poblaciones permiten mejorar a ambos (Wang et al., 2012), aunque el tamaño óptimo varíe según las relaciones entre individuos, la extensión del LD y los marcadores moleculares (Zhu et al., 2008). Al analizar varias líneas y aumentar la diversidad, se puede estar comprometiendo la representación del germoplasma elite (Wong y Bernardo, 2008). Pero poblaciones pequeñas pueden no detectar QTL con frecuencias alélicas menores (Wang et al., 2012), siendo una ventaja así estudiar una amplia colección. Por tanto, con esta población se estaría consiguiendo una adecuada detección de QTL.

La detección de QTL es asimismo una función de la heredabilidad y del número de QTL que codifican para una característica (Wang et al., 2012). Por lo tanto, los QTL pueden variar al analizar cada característica. Esto se suma a que la base genética estudiada se caracterizó por poseer una gran variabilidad en ciclo y peso de grano, y mediana en período de llenado de grano; lo que puede llevar también a encontrar diversos QTL que afecten distintas etapas del ciclo del cultivo (Castro et al., 2008b).

Para cada carácter se encontraron dentro de los QTL detectados, algunos de mayor efecto aditivo en los que se analizó su configuración alélica (Cuadros No.11 y No.12). Ciertos QTL se ubicaron en regiones genómicas que afectan a más de una variable fenotípica, pudiendo deberse a efectos pleiotrópicos o a ligamientos físicos. A su vez, se encontraron coincidencias en configuración alélica para varias características en simultáneo. Esto ocurrió principalmente entre las variables Darista, Despiga, Dmadurez, Darista2, Despiga2, Dmadurez2 y Llenado. Si se analiza el total de QTL encontrados, hubo coincidencias o aproximaciones a la ubicación de genes o QTL de reportes previos (Cuadros No.13, No.14, No.15, No.16 y No.17).

Considerando los QTL de mayor efecto aditivo, el QTL vinculado al marcador molecular 11\_11509 (cromosoma 1H a 135.56 cM), tuvo AA de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para las variables excepto en Llenado, donde fue BB (Cuadros No.11 y No.12). Para la primera fecha de siembra, al no detectarse el QTL con apreciable efecto en Dmadurez, el resultado es esperado ya que a mayor Darista y Despiga, si Dmadurez no es afectado el Llenado será menor. Esto es consistente con lo que han indicado las caracterizaciones de germoplasma en Uruguay: ciclo a antesis más corto, llenado más largo (Castro et al., 1997). Los alelos de este QTL difieren en cuatro días en la mayoría de las variables. También fue detectado en Alturacm y Llenado2, pero al presentar un efecto menor no fue incluido en el análisis de configuración alélica. Este QTL se ubica en la región genómica del *eam8* (Borrás et al., 2010). Se ha detectado al *eam8* como gran responsable de la respuesta al fotoperíodo para distintos niveles del mismo, en una población de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) en diferentes fechas de siembra (abril y octubre) bajo condiciones controladas (Sameri et al., 2011). En esta población sin embargo, no se ha podido detectar una respuesta al fotoperíodo, dado que las dos fechas de siembra fueron tardías ya que fueron posteriores a las de junio-julio (Castro et al., 2008b). Al ser tardías las líneas crecieron cuando los días ya se alargaron y por tanto las fechas son poco adecuadas para detectar una respuesta al fotoperíodo (Germán et al., 2000), siendo los datos fenotípicos limitados. Esto se evidenció en que la ocurrencia de la antesis fue entre principios de octubre y principios de noviembre para la primera fecha, y entre principios de noviembre y principios de diciembre para la segunda, con promedios de 71 días para Darista y 69 días para Darista2. Otra razón de la falta de detección de una respuesta al fotoperíodo consiste en que no fueron calculados los  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}^{-1}$  para las variables fenológicas, es decir no fueron medidas en tiempo térmico, pudiendo ocasionar que la diferencia en suma térmica sea mayor a la debida exclusivamente a la diferencia en días, generando que una posible respuesta al fotoperíodo no sea detectada.

Otro QTL de mayor efecto aditivo, fue el vinculado al marcador molecular 11\_20113 (cromosoma 7H a 56.81 cM), que tuvo BB de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para las variables (Cuadro No.11). Los alelos de este QTL difieren en tres días en la mayoría de las variables. También fue detectado en RFP y Dmadurez2, pero al presentar un efecto menor no fue incluido en el análisis de configuración alélica. En regiones genómicas cercanas se ubicaron QTL para Altura<sub>cm</sub> y Llenado2 (55.63 cM), no siendo de alta importancia. Este QTL coincide con el QTL *HvCO1* reportado por Laurie et al. (2004) y con uno reportado para altura por Inostroza et al. (2009). El *HvCO1* es un gen *CONSTANS* (CO) y el efecto de estos en la transición al meristemo floral fue analizado en *Arabidopsis thaliana* y llevado a los cereales. La expresión de estos genes se controla por el reloj circadiano brindando un pico de expresión en las horas vespertinas. La proteína para los CO se estabiliza en el día y degrada en la noche, por lo que su forma funcional se detecta en plantas expuestas al día largo promoviendo a los intermediarios bioquímicos FLT (*Flowering Locus T*) y AGL20 (*AGAMOUS-LIKE20*), que llevan a la transición del meristemo, ocurriendo la antesis (Laurie et al., 2004). Dada la diferencia de dos días entre los promedios de Darista y Darista2 y al haberse detectado en ambos ambientes, no se considera que el QTL encontrado en esta región involucre una respuesta al fotoperíodo para esta población.

QTL de efecto menor fueron detectados en regiones genómicas coincidentes para otros genes/QTL de respuesta al fotoperíodo. Se detectó un QTL en la región del *PPD-H1* (cuadros No.13, No.14 y No.15), del *PPD-H2* (cuadros No.13, No.14, No.15 y No.16) y en la región del *eam7* (cuadros No.16 y No.17). Al no encontrarse en las regiones de alguno de los QTL de efecto más relevante en la población, no se considera que realmente impliquen efectos de importancia bajo este análisis. Esto se suma a que si bien varios QTL encontrados en Darista no se detectaron en Darista2, los QTL coincidentes para ambas variables tuvieron la misma configuración alélica, y el ciclo a antesis no presentó un fuerte acortamiento por lo que un efecto importante de fotoperíodo no fue detectado. La detección diferencial de QTL en regiones distintas de los QTL/genes reportados para fotoperíodo, puede deberse a la composición de las líneas bajo análisis. Al subdividir la población en grupos por origen, los grupos pueden presentar respuesta diferencial al fotoperíodo según dicho origen. Es decir, diversos genotipos que componen la población pueden tener distinto fotoperíodo crítico. Esto puede implicar que para ciertos genotipos ya haya pasado su fotoperíodo crítico por lo que no sería detectable una respuesta al mismo, pero para otros puede esto no suceder lo que implicaría las diferencias en los días a la antesis, variando entre 60-90 días para Darista, entre 56-87 días para Darista2, y en dos días entre los promedios de Darista y

Darista2. Esta detección diferencial también se puede deber a la complejidad genética de esta variable (Wang et al., 2012). Por tanto a pesar de encontrar QTL en la variable RFP, estos no son consistentes con lo anteriormente analizado.

Por otro lado, la detección de QTL en la región del gen *eps2S* para Despiga, Despiga2, Dmadurez y RFP es consistente con lo reportado por trabajos nacionales (Castro et al., 2008b). Si bien el *eps2S* no coincide con los QTL más importantes en esta población su reporte por trabajos nacionales y la falta de una respuesta al fotoperíodo, puede llevar a considerarlo relevante en este análisis. A pesar de encontrar en este análisis un QTL para RFP en la región del *eps2S*, no se conoce aún si el *eps2S* presenta o no interacción con el fotoperíodo, pero sí se conoce que afecta el ciclo a antesis modificando la duración de las etapas siembra a macollaje, y encañazón a antesis (Castro et al., 2008a). En la antesis se ha analizado la manera en que los *eps* afectan la transición del meristemo de vegetativo a reproductivo, estudiando a *Arabidopsis thaliana* y llevándolo a otros genomas como el de la cebada. Se ha detectado que regula a la baja al locus FLC (*Flowering Locus C*) y por ende estimula a los intermediarios bioquímicos FLT y AGL20, promoviendo la transición floral (Laurie et al., 2004).

El QTL de mayor efecto aditivo vinculado al marcador molecular 11\_21366 (cromosoma 2H a 28.44 cM), tuvo AA de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para las variables en donde se detectó (Cuadro No.11). Los alelos de este QTL difieren en tres días en la mayoría de las variables. También fue detectado en Darista, pero al presentar un efecto menor no fue incluido en el análisis de configuración alélica. Para Alturacm se ubicó un QTL cercano a esta posición (27.29 cM) pero con otro marcador molecular asociado siendo el 11\_21015 (Cuadro No.12) que presentó la configuración alélica BB asociada al mayor valor fenotípico. El QTL vinculado al marcador molecular 11\_21366 no coincide con reportes previos para fenología (variables en las que se detectó), pero si se encontró en Locatelli et al. (2012) para índice de cosecha y porcentaje de granos con diámetro superior a 2.8 mm (datos no presentados). Esto podría establecer la realización de un nuevo estudio donde análisis de variables fenológicas se combinaran con análisis de granos con diámetro mayor a 2.8 mm para conocer si este QTL se expresa y permite relacionar a ambas variables.

El QTL de mayor efecto aditivo vinculado al marcador molecular 11\_21399 (cromosoma 2H a 63.53 cM), tuvo AA de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para las variables en que se detectó excepto en RFP, donde fue BB (Cuadro No.11 y No.12). Los alelos de este QTL llegan a diferir en seis días para Despiga. La diferencia entre la configuración alélica puede deberse a que a menor valor de Despiga,

probablemente exista menor valor de Darista (correlacionadas con un valor de 0.87, Gráfico No.2). Por lo tanto, a menores Darista, mayor valor de RFP se encontrará, siendo contraria la configuración alélica para este marcador. Este QTL coincide con uno reportado para peso de grano por Barabaschi et al. (2012), no así con variables fenológicas ni de respuesta al fotoperíodo, y no fue detectado en el presente análisis para Pgranos. Por tanto no es posible vincular en esta población pesos de granos con variables fenológicas a través de este QTL.

El QTL de mayor efecto aditivo vinculado al marcador molecular 11\_20944 (cromosoma 3H a 122.14 cM), tuvo BB de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para las variables en que se analizó (Cuadro No.11). Los alelos de este QTL difieren en tres días en la mayoría de las variables. También fue detectado en Darista y Darista2 pero al presentar un efecto menor no fue incluido en el análisis de configuración alélica. En regiones genómicas cercanas se ubicaron un QTL para Alturacm (123.68 cM) que implicó diferencias de 3 cm, y un QTL para Pgranos (120.6 cM). Estos tres QTL coinciden con el gen de efecto mayor *denso* que es consistente con lo reportado por trabajos anteriores (Bezant et al. 1995, Laurie et al. 1995, Hay y Ellis 1998, von Korff et al. 2004, Castro et al. 2008b, Wang et al. 2010). Al ser el gen *denso* de mayor efecto en altura y de efecto pleiotrópico en fenología (Bezant et al., 1995), se esperaba que el mismo QTL asociado al marcador 11\_20944 fuera el que afectara también a Alturacm y no otro muy próximo. Esta falta de relación se evidencia en las bajas correlaciones de Alturacm con el resto de las variables (Gráfico No.2). Esto se puede deber a la gran diversidad encontrada para esta variable, donde las líneas posiblemente presenten diferentes QTL afectando altura, y el efecto del QTL en la región de *denso* no sea tan importante. Otra razón puede consistir en la herencia compleja de esta variable, donde varios factores genéticos interactúan con las condiciones ambientales (Kjaer et al., citados por Wang et al., 2010), y en esta situación podría implicar el bajo efecto del QTL encontrado en dicha región. Para Alturacm se detectaron otros QTL que también coinciden con reportes previos, siendo ocho los QTL coincidentes (Cuadro No.15), ubicados dos en el cromosoma 2H, uno en el 3H, uno en el 4H, dos en el 5H, uno en el 6H y otro en el 7H.

El QTL de mayor efecto aditivo vinculado al marcador molecular 11\_10334 (cromosoma 4H a 103.11 cM), tuvo AA de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para las variables (Cuadro No.11). Los alelos de este QTL llegan a diferir en cinco días para Despiga2 y Dmadurez2. En regiones genómicas cercanas se ubicaron QTL para Alturacm (100.74 cM), y para Despiga y Dmadurez (102.37 cM), no siendo de alta importancia. Este QTL no coincide con reportes previos.

El QTL de mayor efecto aditivo vinculado al marcador molecular 11\_10177 (cromosoma 5H a 51 cM), tuvo AA de configuración alélica asociada al fenotipo de mayor valor para la mayoría de las variables excepto en Llenado, donde fue BB (Cuadros No.11 y No.12). Para la primera fecha de siembra, al no detectarse el QTL con gran efecto en Dmadurez, el resultado es esperado ya que a mayor Darista el Llenado será menor. Los alelos de este QTL difieren en tres días en la mayoría de las variables. También fue detectado en Pgranos y Dmadurez2, pero al presentar un efecto menor no fue incluido en el análisis de configuración alélica. Este QTL no coincide con reportes previos.

Cuadro No. 11: Configuración alélica (AA o BB) de marcadores moleculares ligados a QTL de mayor efecto aditivo para Darista (Da), Darista2 (Da2), Despiga (De), Despiga2 (De2), Dmadurez (Dm), Dmadurez2 (Dm2) y su posición en cM. La configuración mostrada es la del alelo asociado al fenotipo de mayor valor para el marcador. Cromo: cromosoma.

Cromo.	Ubicación		Caracter	Da	Da2	De	De2	Dm	Dm2
	cM	BIN	Marcador molecular						
1H	50.6	5-6	11_20427				AA		AA
1H	135.56	14	11_11509	AA	AA	AA	AA		AA
2H	28.44	5	11_21366			AA	AA	AA	
2H	63.53	7	11_21399	AA		AA			
2H	78.03	8	11_10196				AA		
2H	86.63	9	11_10213		AA				AA
2H	156.72	14	11_10085		AA				
3H	109.14	10	11_21513		AA				
3H	122.14	11-12	11_20944			BB		BB	BB
3H	162.15	15	11_10702	BB					BB
4H	103.11	10	11_10334	AA	AA		AA		AA
5H	51	4	11_10177	AA	AA	AA			
5H	80.61	8	11_21133		BB	BB	BB		
5H	84.51	8	11_20096			BB			
7H	6.79	1	11_20534		BB				
7H	56.81	6	11_20113	BB		BB		BB	
7H	98.5	8-9	11_21201		AA				

Cuadro No. 12: Configuración alélica (AA o BB) de marcadores moleculares ligados a QTL de mayor efecto aditivo para Llenado (Lle), Llenado2 (Lle2), RFP, Pgranos (Pgr), Alturacm (Alt) y su posición en cM. La configuración mostrada es la del alelo asociado al fenotipo de mayor valor para el marcador. Cromo: cromosoma.

Cromo.	Ubicación		Caracter	Lle	Lle2	RFP	Pgr	Alt
	cM	BIN	Marcador molecular					
1H	92.8	10	11_20475				BB	
1H	125.27	12	11_10722	BB				
1H	135.56	14	11_11509	BB				
2H	27.29	3	11_21015					BB
2H	63.53	7	11_21399			BB		
2H	74.37	8	11_20960				AA	
2H	78.03	8	11_10196			AA		
2H	86.63	8	11_10213				BB	
2H	156.72	14	11_10085				BB	
3H	105.3	9	11_21493					AA
4H	54.25	6	11_20610				BB	
4H	88.22	9	11_20358		AA			
5H	51	4	11_10177	BB				
5H	108.18	10	11_20320			AA		
5H	142.2	11	11_10755					AA
6H	60.23	6	11_10270		BB			

Considerando Darista y Darista2, se ubicaron QTL en regiones cercanas a genes/QTL de reportes previos (Cuadro No.13). En ambas variables se detectaron QTL en la región genómica del *PPD-H1* (ubicados a 31.72 cM para Darista y 39.1 cM para Darista2, cromosoma 2H), en la región del *eam8* (ubicados a 135.56 cM para ambas variables, cromosoma 1H) y en la región de *denso* (ubicados a 122.14 cM para ambas variables, cromosoma 3H). La correlación entre ambas es de 0.57 (media) por lo que la coincidencia parcial de QTL sería consistente con la misma.

Tanto para las variables Despiga y Despiga2, se ubicaron QTL en regiones cercanas a genes/QTL de reportes previos (Cuadro No.14). En ambas variables se detectaron QTL en la región genómica del *eam8* (ubicados a 135.56 cM para ambas variables, cromosoma 1H), *eps2S* (ubicados a 72.33 cM para Despiga y 78.03 cM para Despiga2, cromosoma 2H), *denso* (ubicados a 122.14 cM para ambas variables,

cromosoma 3H), *HvCOI* (ubicados a 56.81 cM para Despiga y 68.46 cM para Despiga2, cromosoma 7H), *eps7L* (ubicados a 140.99 cM para Despiga y 133.79 cM para Despiga2, cromosoma 7H). Si bien varios QTL se encontraron en común para estas características, la correlación entre ellas es relativamente baja (0.30).

Cuadro No. 13: Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Darista y Darista2. L.1995: Laurie et al. (1995), KyJ.1996: Kjaer y Jensen (1996), G.2007: Gyenis et al. (2007), I.2009: Inostroza et al. (2009), B.2010: Borrás et al. (2010), B.2012: Barabaschi et al. (2012), Cromo: Cromosoma.

Caracter	Cromo.	Marcador ligado	BIN	Genes/QTL reportados	Referencia
Darista	1H	11_20844	11	<i>PPD-H2</i>	L.1995
Darista; Darista2	1H	11_11509	14	<i>eam8</i>	B.2010
Darista; Darista2	2H	11_20864/11_10178	4	<i>PPD-H1</i>	L.1995
Darista; Darista2	3H	11_20944	11-12	<i>denso</i>	L.1995
Darista	4H	11_10602	6	QTL peso	KyJ.1996
Darista	4H	11_10823	9	<i>eps4L</i>	L.1995
Darista	5H	11_10095	11	<i>VRN-H1</i> -QTL altura-QTL peso	L.1995- I.2009-B.2012
Darista	7H	11_20993	4	<i>VRN-H3</i> -QTL altura	L.1995-I.2009
Darista	7H	11_20113	6	<i>HvCOI</i> -QTL altura	L.2004- G.2007, I.2009
Darista	7H	11_20060	7	QTL altura-QTL peso	G.2007- B.2012
Darista2	7H	11_10550	12	<i>eps7L</i>	L.1995

Cuadro No. 14: Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Despiga y Despiga2. L.1995: Laurie et al. (1995), vK.2004: von Korff et al. (2004), G.2007: Gyenis et al. (2007), I.2009: Inostroza et al. (2009), B.2010: Borrás et al. (2010), B.2012: Barabaschi et al. (2012), Cromo: Cromosoma.

Caracter	Cromo.	Marcador ligado	BIN	Genes/QTL reportados	Referencia
Despiga	1H	11_20220	11	<i>PPD-H2</i>	L.1995
Despiga; Despiga2	1H	11_11509	14	<i>eam8</i>	B.2010
Despiga2	2H	11_10178	4	<i>PPD_H1</i>	L.1995
Despiga	2H	11_21399	7	QTL peso	B.2012
Despiga; Despiga2	2H	11_20667/11_10196	8	<i>eps2S</i> -QTL altura	L.1995- vK.2004
Despiga; Despiga2	3H	11_20944	11-12	<i>denso</i>	L.1995
Despiga2	5H	11_10705	11	<i>VRN-H1</i> -QTL altura-QTL peso	L.1995- I.2009-B.2012
Despiga2	7H	11_20993	4	<i>VRN-H3</i> -QTL altura	L.1995-I.2009
Despiga; Despiga2	7H	11_20113	6	<i>HvCOI</i> -QTL altura	L.2004- G.2007, I.2009
Despiga; Despiga2	7H	11_10687/11_10861	12	<i>eps7L</i>	L.1995

En relación a Dmadurez y Dmadurez2, se ubicaron QTL en regiones cercanas a genes/QTL de reportes previos (Cuadro No.15). En ambas fechas se detectaron QTL en la región genómica del *eam8* (ubicados a 135.56 cM para Dmadurez2 y 136.31 cM para Dmadurez, cromosoma 1H), *denso* (ubicados a 122.14 cM para ambas variables, cromosoma 3H), *HvCOI* (ubicados a 56.81 cM para ambas variables, cromosoma 7H). Esto es consistente con la correlación entre ambas variables de 0.40 (Gráfico No.2). En RFP, también se detectaron QTL en la región de *eps2S* (78 cM, cromosoma 2H) y *HvCOI* (56.8 cM, cromosoma 7H) (Cuadro No.16).

Cuadro No. 15: Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Dmadurez y Dmadurez2. L.1995: Laurie et al. (1995), vK.2004: von Korff et al. (2004), G.2007: Gyenis et al. (2007), I.2009: Inostroza et al. (2009), B.2010: Borrás et al. (2010), B.2012: Barabaschi et al. (2012), Cromo: Cromosoma.

Caracter	Cromo.	Marcador ligado	BIN	Genes/QTL reportados	Referencia
Dmadurez	1H	11_20220	11	<i>PPD-H2</i>	L.1995
Dmadurez; Dmadurez2	1H	11_11509	14	<i>eam8</i>	B.2010
Dmadurez2	2H	11_10891	4	<i>PPD_H1</i>	L.1995
Dmadurez	2H	11_21258	8	<i>eps2S</i> -QTL altura	L.1995- vK.2004
Dmadurez; Dmadurez2	3H	11_20944	11-12	<i>denso</i>	L.1995
Dmadurez2	5H	11_20367	6	<i>eps5L</i> - QTL altura	L.1995
Dmadurez2	5H	11_21241	11	<i>VRN-H1</i> -QTL altura- QTL peso	L.1995-I.2009- B.2012
Dmadurez	7H	11_20993	4	<i>VRN-H3</i> -QTL altura	L.1995-I.2009
Dmadurez; Dmadurez2	7H	11_20113	6	<i>HvCOI</i> -QTL altura	L.2004- G.2007, I.2009
Dmadurez2	7H	11_10861	12	<i>eps7L</i>	L.1995

Tanto para Llenado como para Llenado2, se ubicaron QTL en regiones cercanas a genes/QTL de reportes previos (Cuadro No.16). En ambas fechas de siembra se detectaron QTL en la región genómica del *eam8* (ubicados a 135.56 cM para ambas variables, cromosoma 1H), *eps4L* (ubicados a 86.27 cM para Llenado y 88.22 cM para Llenado2, cromosoma 4H), *eam7* (ubicados a 42.36 cM para Llenado y 60.23 cM para Llenado2, cromosoma 6H), *HvCOI* (ubicados a 68.46 cM para Llenado y 55.63 cM para Llenado2, cromosoma 7H). Considerando la baja correlación entre Llenado y Llenado2 de 0.18 (Gráfico No.2), se busca comprender si se está en presencia o no de una interacción genotipo por fecha de siembra.

Si bien ambas siembras fueron desfavorables para el crecimiento de la cebada, la segunda vio en mayor medida comprometido el llenado. Esto se evidenció en espigas con varios granos vacíos o de escaso peso, imposibilitando realizar una medida general de peso de grano en esta fecha. La temperatura es gran responsable de acelerar el desarrollo de los cultivos (Boyd et al., 2003), por lo que las altas temperaturas de la

localidad de Paysandú, Uruguay en los meses de noviembre y diciembre debieron de ser responsables de un llenado acelerado comprometiendo el peso. En el año 2011, la temperatura media para noviembre fue de 26.1°C y para diciembre de 27.7°C, ambas consideradas relativamente altas para la localidad, por lo que explican un llenado acelerado en especial para la segunda siembra.

El llenado de grano al estar comprendido entre la antesis y la madurez fisiológica, se ve afectado por los QTL que afectan a uno de dichos eventos fisiológicos o podría estar afectado por QTL *per se* (lo cual no se conoce aún). En esta población se encontró doce QTL en común para Darista y Dmadurez, detectándose cinco QTL solamente para Darista y siete QTL sólo para Dmadurez. Entre Darista2 y Dmadurez2, se detectó también en común doce QTL, encontrándose sólo para Darista2 seis QTL y sólo para Dmadurez2 siete QTL. Si bien para cada fecha existen QTL que no coinciden entre los días a antesis y los días a madurez fisiológica que podrían estar afectando el llenado, no hubo grandes diferencias entre las fechas en los QTL detectados en relación a estas variables. Esto lleva a preguntarse si los QTL detectados para Llenado y Llenado2 coinciden con algunos de los detectados solamente para esas variables. Para la siembra del 12/08/11, se detectó QTL muy próximos entre Darista y Llenado (7H, 68.46-71.1 cM) y entre Dmadurez y Llenado (7H, 83.44-84.92 cM). Para la siembra del 13/09/11, se encontró un QTL en común entre Despiga2, Dmadurez2 y Llenado2 (1H, 121.12 cM). Esto puede implicar que para cada siembra haya QTL que afecten el llenado, aunque la diferencia entre las fechas de siembras no sea suficiente para detectar una interacción genotipo por fecha.

Cuadro No. 16: Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Llenado, Llenado2 y RFP. L.1995: Laurie et al. (1995), G.2007: Gyenis et al. (2007), I.2009: Inostroza et al. (2009), B.2010: Borrás et al. (2010), Cromo: Cromosoma.

Caracter	Cromo.	Marcador ligado	BIN	Genes/QTL reportados	Referencia
Llenado2	1H	11_20844	11	<i>PPD-H2</i>	L.1995
Llenado; Llenado2	1H	11_11509	14	<i>eam8</i>	B.2010
Llenado2	3H	11_21405	12-13	<i>denso</i>	L.1995
Llenado; Llenado2	4H	11_20178/11_10270	9	<i>eps4L</i>	L.1995
Llenado; Llenado2	6H	11_10494/11_10270	5	<i>eam7</i>	B.2010
Llenado; Llenado2	7H	11_20671/11_20790	6	<i>HvCOI-QTL</i> altura	L.2004- G.2007, I.2009
RFP	2H	11_10196	8	<i>eps2S-QTL</i> altura	L.1995
RFP	7H	11_11028	6	<i>HvCOI-QTL</i> altura	L.2004- G.2007, I.2009

Al haberse analizado el peso de 100 granos solamente bajo la primera época (Pgranos), sólo es posible detectar asociaciones con floración para dicha época (Darista). Fueron encontrados para ambas variables tres QTL en posiciones muy próximas (Cuadro No.10). Si bien autores nacionales reportan correlación alta entre estas variables indicando que una floración temprana está asociada a mayores pesos en grano (Castro et al., 1997), no se ha podido detectar en este trabajo, ya que dos de los tres QTL próximos no presentan los mismos marcadores moleculares asociados, siendo independiente la configuración alélica para cada marcador de los otros, por ser automática. Una posible explicación sería la siembra de los genotipos en condiciones no óptimas para la cebada (Castro et al., 2008b), ya que al no poder expresarse una consistente respuesta al fotoperíodo, no se puede detectar una asociación entre genotipos de floración más temprana que a su vez tengan pesos mayores. Asimismo, condiciones favorables para el rendimiento en grano favorecen la detección de los factores genéticos que afectan variables asociadas al rendimiento (Locatelli et al., 2012), por lo que el peso se vería perjudicado en esta situación.

Cuadro No. 17: Resumen de genes/QTL reportados anteriormente en la misma región donde se encontraron QTL para Alturacm y Pgranos. L.1995: Laurie et al. (1995), T.1995: Thomas et al. (1995), KyJ.1996: Kjaer y Jensen (1996), vK.2004: von Korff et al. (2004), G.2007: Gyenis et al. (2007), I.2009: Inostroza et al. (2009), B.2010: Borrás et al. (2010), W.2010: Wang et al. (2010), B.2012: Barabaschi et al. (2012), Cromo: Cromosoma.

Caracter	Cromo.	Marcador ligado	BIN	Genes/QTL reportados	Referencia
Alturacm	2H	11_10632	8	<i>eps2S</i> -QTL altura	L.1995-vK.2004
Alturacm	2H	11_10791	12	QTL altura	G.2007
Alturacm	3H	11_20704	7	QTL altura- QTL peso	W.2010-B.2012
Alturacm	3H	11_10754	12-13	<i>denso</i>	L.1995
Alturacm	4H	11_11470	10	QTL altura	I.2009
Alturacm	5H	11_20320	9	QTL altura	T.1995
Alturacm	5H	11_10755	11	<i>VRN-H1</i> -QTL altura-QTL peso	L.1995-I.2009-B.2012
Alturacm	6H	11_21201	9	QTL altura	vK.2004
Alturacm	7H	11_20790	6	<i>HvCO1</i> -QTL altura	L.2004-G.2007, I.2009
Pgranos	2H	11_20960	8	<i>eps2S</i> -QTL altura	L.1995-vK.2004
Pgranos	2H	11_20944	11-12	<i>denso</i>	L.1995
Pgranos	4H	11_20610	6	QTL peso	KyJ.1996
Pgranos	6H	11_10462	5	<i>eam7</i>	B.2010
2 Pgranos	7H	11_20495/11_10920	3	<i>eps7S</i> - QTL peso	L.1995

QTL en regiones coincidentes con genes de sensibilidad a la vernalización fueron detectados en: Darista, Despiga2, Damadurez2 para el *VRN-H1*; y Darista, Despiga2 y Dmadurez para el *VRN-H3*. No se encontró ningún QTL de efecto mayor en estas regiones genómicas para las variables analizadas. El requerimiento de vernalización no fue posible detectarlo, lo cual era esperable debido a dos razones. Una consiste en la consideración de una población de cebadas de hábito de crecimiento primaveral, donde al no presentar la configuración *Vrn-H2\_vrn-H1vrn-H1 vrn-H3vrn-H3* (von Zitzewitz et al., 2011), no requieren frío para que el gen *HvBM5A* regule negativamente al factor *ZCCT-H* y permita que el alargamiento de los días induzca al

*HvFT1* (von Zitzewitz et al., 2011), promoviendo la floración. Otra razón implica que las condiciones ambientales reinantes a nivel nacional no son las adecuadas para la expresión de la vernalización, ya que predominan inviernos templados con rápido ascenso de temperatura en primavera (Locatelli et al., 2012), donde el frío no es suficiente, en especial en el Norte del país, para la ocurrencia de vernalización.

Los QTL encontrados en este trabajo pueden ayudar a una mejor comprensión de los factores genéticos que afectan las características analizadas de la cebada para esta población, pero deben complementarse con QTL encontrados en otros estudios ya que solamente una localidad y año fueron analizados, y estudios de interacción genotipo por ambiente podrían llevarse a cabo. Estos nuevos análisis de interacción serían útiles ya que se está en presencia de caracteres cuantitativos que son afectados por QTL, interacciones entre estos, el ambiente e interacciones entre factores ambientales y QTL (Zhu et al., 2008). La fenología es afectada por varias condiciones ambientales, principalmente por la temperatura, y también por el fotoperíodo o la vernalización dependiendo de la región en que se encuentre el genotipo y de qué genotipo sea (Mirschel et al., 2005). Esto implica que puede variar según los factores ambientales que predominen siendo de importancia el estudio de una posible interacción. El peso de grano también se ve afectado, dado que se modifica según la temperatura y el déficit hídrico que experimenten las plantas después de la floración (Slafer y Savin, 2011). La altura de planta asimismo se altera, ya que se ha ido modificando en el proceso de evolución de la cebada siendo cada vez menor (Kolodinska-Brantestam et al., 2008), presentando una herencia compleja donde varios factores genéticos interactúan con las condiciones ambientales (Kjaer et al., citados por Wang et al., 2010).

## 5 CONCLUSIONES

Al analizar una amplia colección de líneas se consiguió una buena detección de QTL.

Para días a antesis, días a espigazón y días a madurez fisiológica, se encontraron mayores diferencias entre fechas que para la misma fecha de siembra en cuanto a los QTL detectados (Cuadro No.6 y Cuadro No.7). Esto se afirma con las correlaciones detectadas (Gráfico No.2), siendo mayores dentro de las fechas (0.76-0.93) que entre fechas (0.53-0.57).

La coincidencia de efectos de QTL detectados es consistente con las correlaciones fenotípicas encontradas para las variables analizadas.

Se encontraron QTL de mayor efecto aditivo para las variables estudiadas en esta población. Se detectó un QTL en el cromosoma 1H (135.56 cM) asociado al marcador molecular 11\_11509, afectando principalmente Darista, Darista2, Despiga, Despiga2, Dmadurez2 y Llenado. Se detectó un QTL en el cromosoma 2H asociado al marcador molecular 11\_21366 (28.44 cM), afectando principalmente Despiga, Despiga2, Dmadurez. Se detectó un QTL en el cromosoma 2H asociado al marcador molecular 11\_21399 (63.53 cM), afectando Darista, Despiga y RFP. Se detectó un QTL en el cromosoma 3H asociado al marcador molecular 11\_20944 (122.14 cM), afectando principalmente Despiga, Dmadurez y Dmadurez2. Se detectó un QTL en el cromosoma 4H asociado al marcador molecular 11\_10334 (103.11 cM), afectando principalmente Darista, Darista2, Despiga2 y Dmadurez2. Se detectó un QTL en el cromosoma 5H asociado al marcador molecular 11\_10177 (51 cM), afectando principalmente Darista, Darista2, Despiga y Llenado. Se detectó un QTL en el cromosoma 7H asociado al marcador molecular 11\_20113 (56.81 cM), afectando principalmente Darista, Despiga y Dmadurez. Algunos de estos QTL coincidieron con reportes previos.

Los QTL encontrados en este trabajo pueden ayudar a una mejor comprensión de los factores genéticos que codifican para características de la cebada, pero deben complementarse con QTL que se encuentren en estudios de interacción genotipo por ambiente.

## 6 RESUMEN

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una especie de gran importancia a nivel mundial y nacional, cuyo proceso de domesticación implicó su adaptación a nuevas regiones geográficas y prácticas de manejo. Para predecir su comportamiento en los distintos ambientes consiguiendo un alto rendimiento y buena calidad de grano, se han analizado los QTL (*Quantitative Trait Loci*) responsables de la fenología, rendimiento y componentes, y caracteres agronómicos asociados como altura de planta. El objetivo de este informe consistió en identificar QTL para fenología, altura de planta y peso de grano en 327 líneas con distintos requerimientos ambientales, analizando la existencia de respuesta al fotoperíodo y buscando correlaciones entre estas características. El análisis se realizó a través del mapeo asociativo (AM), donde se utilizó el modelo estadístico “kinship”:  $y = X\beta + Zu + e$ , donde y: vector fenotipo (BLUPs), X: matriz de marcadores moleculares (genotipos),  $\beta$ : vector desconocido de efectos alélicos a estimar, Z: matriz de identidad, u: vector de las predicciones de los efectos poligénicos aleatorios (variable aleatoria), e: error residual. Los ensayos se llevaron a cabo en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), Paysandú - Uruguay, con dos fechas de siembra (12/08/11 y 13/09/11). El diseño experimental fue de bloques incompletos aumentados. El genotipado consistió en 1536 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) correspondientes al BOPA1 (*First Barley Oligonucleotide Pool Assay*), quedando 1096 SNPs y 287 líneas por eliminar marcadores con más de 10% de datos faltantes. En general las correlaciones encontradas fueron consistentes con los QTL detectados. Los QTL de mayor importancia en esta población fueron asociados a los marcadores: 11\_11509 (1H), 11\_21366 (2H), 11\_21399 (2H), 11\_20944 (3H), 11\_10334 (4H), 11\_10177 (5H) y 11\_20133 (7H). Tres de estos coincidieron con QTL de reportes previos siendo: gen *denso* para el QTL asociado al marcador 11\_20944, *HvCOI* asociado al marcador 11\_20113 y un QTL para peso de grano asociado al marcador 11\_21399. Los QTL encontrados en este trabajo deberían complementarse con QTL detectados en otros estudios con más de una localidad y año, con el fin de analizar la interacción genotipo por ambiente e incorporar los alelos positivos de los QTL a líneas para liberación comercial.

Palabras clave: Cebada; Mapeo asociativo; Quantitative trait loci; Fenología.

## 7 SUMMARY

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is a species of global and national relevance. Its domestication process determined its adaptation to new geographic regions and cultural practices. In order to predict high yielding and grain quality, QTL (*Quantitative Trait Loci*) for phenology, yield and its components, and other agronomic traits like plant height had been detected. The aim of this work was to identify QTL for phenology, plant height and grain weight in 327 barley genotypes with different environmental requirements, analyzing a possible response to photoperiod and searching for correlations between the traits. The analysis was performed through association mapping (AM), with the statistical model “kinship”:  $y = X\beta + Zu + e$ , where  $y$ : phenotypic vector (BLUPs),  $X$ : molecular marker matrix (genotypes),  $\beta$ : unknown vector of allele effects to be estimated,  $Z$ : identity matrix,  $u$ : vector of random background polygenic effects,  $e$ : residual error. The trials were evaluated in the Estación Mario A. Cassinoni (EEMAC), Paysandú – Uruguay, with two sowing dates (12/08/11 y 13/09/11). It was use augmented incomplete block for experimental design. The population was genotyped with 1536 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) using the BOPA1 (*First Barley Oligonucleotide Pool Assay*), remaining 1096 SNPs and 287 lines after markers elimination with more than 10% of missing data. In general correlations were consistent with the QTL found. Most important QTL for this population were associated to the following markers: 11\_11509 (1H), 11\_21366 (2H), 11\_21399 (2H), 11\_20944 (3H), 11\_10334 (4H), 11\_10177 (5H) and 11\_20133 (7H). Three of these QTL coincided with previous reports: *denso* gene with 11\_20944 marker, *HvCO1* with 11\_20113 marker and a QTL for grain weight with 11\_21399 marker. QTL found in this work should be supplemented with QTL found in works with more localities and years, with the aim to analyzed interactions genotype for environment and incorporated positive alleles of QTL to genotypes for commercial release.

Keywords: Barley; Associative mapping; Quantitative trait loci; Phenology.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. ARBELBIDE, M.; YU, J.; BERNARDO, R. 2006. Power of mixed-model QTL mapping from phenotypic, pedigree and marker data in self-pollinated crops. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 876–884.
2. BAGA, M.; FOWLER, D.B.; CHIBBAR, R.N. 2009. Identification of genomic regions determining the phenological developments leading to floral transitions in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*. 60 (12): 3575-3585.
3. BARABASCHI, D.; FRANZIA, E.; TONDELLI, A.; GIANINETTI, A.; STANCA, A.M.; PECCHIONI, N. 2012. Effect of the nud gene on grain yield in barley. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 48: 10-22.
4. BARLEY CAP. 2012. Coordinated Agricultural Project. (en línea). Minneapolis. Consultado 17 ago. 2012. Disponible en <http://www.barleycap.org>.
5. BERNARDO, R. 2004. What proportion of declared QTL in plants are false? *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 419–424.
6. BEZANT, J.; LAURIE, D.; PRATCHETT, N.; CHOJECKI, J.; KEARSEY, M. 1996. Marker regression mapping of QTL controlling flowering time and plant height in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Heredity*. 77: 64-73.
7. BORRÀS-GELONCH, G.; SLAFER, G.A.; CASAS, A.M.; VAN EEUWIJK, F.; ROMAGOSA, I. 2010. Genetic control of pre-heading phases and other traits related to development in a double-haploid barley (*Hordeum vulgare* L.) population. *Field Crops Research*. 119: 36–47.
8. BOYD, W.J.R.; LI, C.D.; GRIME, C.R.; CAKIR, M.; POTIPIBOOL, S.; KAVEETA, L.; MEN, S.; JALAL KAMALI, M.R.; BARR, A.R.; MOODY, D.B.; LANCE, R.C.M.; LOGUE, S.J.; RAMAN, H.; READ, B.J. 2003. Conventional and molecular genetic analysis of factors contributing to variation in the timing of heading among spring barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes grown over a mild winter growing season. *Australian Journal of Agricultural Research*. 54: 1277-1301.
9. \_\_\_\_\_; LI, C.; GRIME, C.R. 2007. Genetic control of heading date in spring barley. In: Australian Barley Technical Symposium (13<sup>th</sup>, 2007,

Fremantle). Proceedings. Fremantle, University of Western Australia. pp. 1-8.

10. CASTRO, A.; ERNST, O.; HOFFMAN, E.; BENTANCUR, O. 1997. Caracterización del germoplasma de cebada en Uruguay, de acuerdo a variables agronómicas y de calidad de grano. *Agrociencia*. 1 (1): 80-87.
11. \_\_\_\_\_.; GONZÁLEZ O.; HAYES, P.M.; LOCATELLI, A.; MOSQUEIRA, J.; SILVEIRA, M.; VIEGA, L. 2008a. Additivity of anthesis date QTLs is explained by individual QTLs operative at different periods within the crop growth cycle. *In*: International Barley Genetics Symposium (10<sup>th</sup>, 2008, Alexandria). Proceedings. Alexandria, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). pp. 105- 109.
12. \_\_\_\_\_.; HAYES, P.; VIEGA, L.; VALES, I. 2008b. Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breeding*. 127: 561-568.
13. CLOSE, T.J.; BHAT, P.R.; LONARDI, S.; WU, Y.; ROSTOKS, N.; RAMSAY, L.; DRUKA, A.; STEIN, N.; SVENSSON, J.T.; WANAMAKER, S.; BOZDAG, S.; ROOSE, M.L.; MOSCOU, M.J.; CHAO, S.; VARSHNEY, R.K.; SZUCS, P.; SATO, K.; HAYES, P.M.; MATTHEWS, D.E.; KLEINHOF, A.; MUEHLBAUER, G.J.; DeYOUNG, J.; MARSHALL, D.F.; MADISHETTY, K.; FENTON, R.D.; CONDAMINE, P.; GRANER, A.; WAUGH, R. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BioMed Central Genomics*. 10: 582-594.
14. FAO. 2013. FAOSTAT. (en línea). Roma. Consultado 22 ene. 2013. Disponible en <http://faostat.fao.org>.
15. FISCHER, R.A. 1985. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *The Journal of Agricultural Science*. 105: 447-461.
16. FLINT-GARCIA, S.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 357-374.
17. GERMÁN, S.; ARBELBIDE, M.; ABADIE, T.; ROMERO, R.; RECLUSO, A. 2000. Characterization of photoperiod response of barley genotypes from diverse origin. *In*: International Barley Genetics Symposium (8<sup>th</sup>, 2000,

Adelaide, South Australia). Proceedings. Adelaide, South Australia, Susan Logue. pp. 212-214.

18. GLÉMIN, S.; BATAILLON, T. 2009. A comparative view of the evolution of grasses under domestication. *New Phytologist*. 183: 273–290.
19. GRIFFITHS, S.; DUNFORD, R.P.; COUPLAND, G.; LAURIE, D. 2003. The evolution of *CONSTANTS*-Like gen families in barley, rice and arabidopsis. *Plant Physiology*. 131: 1855- 1867.
20. GUTIÉRREZ, L.; NASON, J.D.; JANNINK, J. 2009. Diversity and mega-targets of selection from the characterization of a barley collection. *Crop Science*. 49:483–497.
21. \_\_\_\_\_.; CUESTA-MARCOS, A.; CASTRO, A.; VON ZITZEWITZ, J.; SCHMITT, M.; HAYES, P.M. 2011. Association mapping of malting quality quantitative trait loci in winter barley; positive signals from small germplasm arrays. *The Plant Genome*. 4: 256–272.
22. GYENIS, L.; YUN, S.J.; SMITH, K.P.; STEFFENSON, B.J.; BOSSOLINI, E.; SANGUNETI, M.C.C; MUEHLBAUER, G.J. 2007. Genetic architecture of quantitative trait loci associated with morphological and agronomic trait differences in a wild by cultivated barley cross. *Genome*. 50: 714-723.
23. HAY, R.K.M.; ELLIS, R.P. 1998. The control of flowering in wheat and barley; what recent advances in molecular genetics can reveal. *Annals of Botany*. 82: 541-554.
24. HOFFMAN, E.; VIEGA, L.; DUCAMP, F.; MAZZILLI, S. 2006. Concreción del rendimiento a nivel de chacra de cebada cervecera en Uruguay. La importancia del peso de grano. Facultad de Agronomía (Montevideo). Nota técnica no. 51. 19 p.
25. KOLODINSKA-BRANTESTAM, A.; VON BOTHMER, R.; RASHAL, I.; GULLORD, M.; MARTYNOV, S.; WEIBULL, J. 2008. Variation of agronomic traits in Nordic and Baltic spring barley. In: International Barley Genetics Symposium (10<sup>th</sup>, 2008, Alexandria). Proceedings. Alexandria, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). pp. 39-45.

26. ILLUMINA. 2012. Illumina's GoldenGate Bead Array Technology (en línea). San Diego. s.p. Consultado 17 ago. 2012. Disponible en <http://www.illumina.com>.
27. INOSTROZA, L.; DEL POZO, A.; MATUS, J.; CASTILLO, D.; HAYES, P.; MACHADO, S.; COREY, A. 2009. Association mapping of plant height, yield, and yield stability in recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Molecular Breeding*. 23: 365–376.
28. JANNINK, J.; IWATA, H.; BHAT, P.R.; CHAO, S.; WENZL, P.; MUEHLBAUER, G.J. 2009. Marker imputation in barley association studies. *The Plant Genome*. 2: 11–22.
29. KJAER, B.; JENSEN, J. 1996. Quantitative trait loci for grain yield and yield components in a cross between a six-rowed and a two rowed barley. *Euphytica*. 90: 39- 48.
30. LAURIE, D.A.; PRATCHETT, N.; BEZANT, J.H.; SNAPE J.W. 1995. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome*. 38: 575-585.
31. \_\_\_\_\_; GRIFFITHS, S.; DUNFORD, R.P.; CHRISTODOULOU, V.; TAYLOR, S.A.; COCKRAM, J.; BEALES, J.; TURNER, A. 2004. Comparative genetic approaches to the identification of flowering time genes in temperate cereals. *Field Crops Research*. 90: 87–99.
32. LOCATELLI, A.; CUESTA-MARCOS, A.; GUTIÉRREZ, L.; HAYES, P.M.; SMITH, K.P.; CASTRO, A. 2013. Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germplasm in Uruguay. *Molecular Breeding*. 31 (3): 631-654.
33. MALECOT, A. 1948. *Les mathématiques de l'hérédité*. Paris, Masson. pp. 1-64.
34. MALOSETTI, M.; VAN DER LINDEN, C.G.; VOSMAN, B.; VAN EEUWIJK, F.A. 2007. A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Genetics*. 175: 879–889.

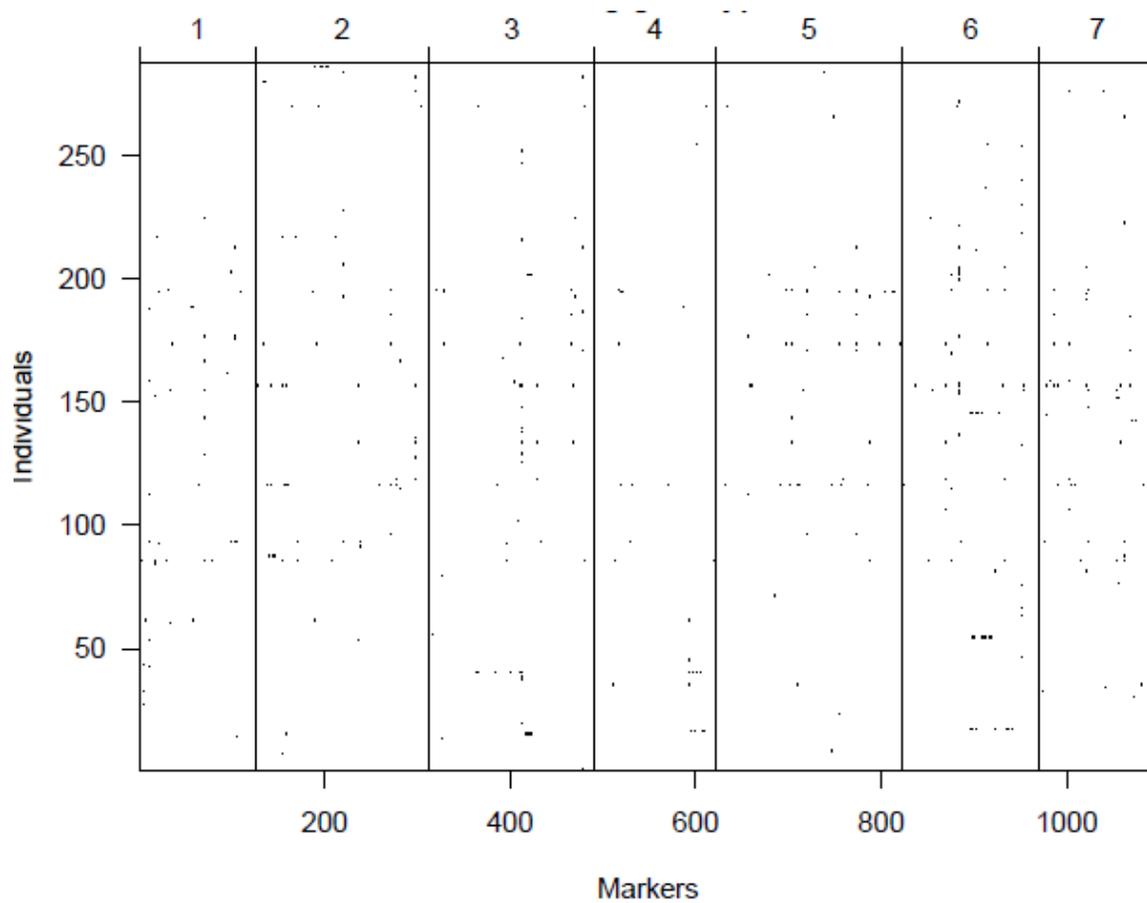
35. MIRSCHEL, W.; WENKEL, K.; SCHULTZ, A.; POMMERENING, J.; VERCH, G. 2005. Dynamic phenological model for winter rye and winter barley. *European Journal of Agronomy*. 23: 123–135.
36. PARISSEAU, B.; BERNARDO, R. 2004. In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 508–514.
37. POURKHEIRANDISH, M.; KOMATSUDA, T. 2007. The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Annals of Botany*. 100: 999–1008.
38. PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N.A.; DONNELLY, P. 2000. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*. 67: 170–181.
39. QUESADA, M.A.; VALPUESTA, V. 2000. Juvenilidat, senescencia y abscisión; Ontogenia vegetal. *In*: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. eds. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana. pp. 450-451.
40. R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2005. R; A language and environment for statistical computing, reference index version 2.10.1; package emma modified version by GAPIT (en línea). Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. s.p. Consultado 18 oct. 2011. Disponible en <http://www.R-project.org>.
41. SAMERI, M.; POURKHEIRANDISH, M.; CHEN, G.; TONOOKA, T.; KOMATSUDA, T. 2011. Detection of photoperiod responsive and non-responsive flowering time QTL in barley. *Breeding Science*. 61: 183-188.
42. SAS INSTITUTE. 2004. Statistical analysis system online documentation, version SAS 9.1; procedures guide. Cary, NC. s.p.
43. SLAFER, G.A.; SAVIN, R. 2011. Limitantes generales a la producción de trigo y cebada; limitantes a la expresión del potencial asociadas al estrés térmico. *In*: Castro, A.; Hoffman, E.; Viega, L. eds. *Limitaciones para la productividad de trigo y cebada*. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 11-20.
44. STOREY, J.D.; TIBSHIRANI, R. 2003. Statistical significance for genomewide studies. *PNAS*. 100 (16): 9440-9445.

45. STRACKE, S.; HASENEYER, G.; VEYRIERAS, J.; GEIGER, H.H.; SAUER, SASCHA; GRANER, A.; PIEPHO, H. 2008. Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of flowering time in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 118: 259–273.
46. SZUCS, P.; BLAKE, V.C.; BHAT, P.R.; CHAO, S.; CLOSE, T.J.; CUESTA-MARCOS, A.; MUEHLBAUER, G.J.; RAMSAY, L.; WAUGH, R.; HAYES, P.M. 2009. An integrated resourced for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *The Plant Genome*. 2: 134–140
47. THOMAS, W.T.B.; POWELL, W.; WAUGH, R.; CHALMERS, K. J.; BARUA, U.M.; JACK, P.; LEA, V.; FORSTER, B.P.; SWANSTON, J.S.; ELLIS, R.P.; HANSON, P.R.; LANCE, R.C.M. 1995. Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 91: 1037-1047.
48. VALES, M.I.; SCHÖN, C.C.; CAPETTINI, F.; CHEN, X.M.; COREY, A.E.; MATHER, D.E.; MUNDT, C.C.; RICHARDSON, K.L.; SANDOVAL-ISLAS, J.S.; UTZ, H.F.; HAYES, P.M. 2005. Effect of population size on the estimation of QTL; a test using resistance to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics*. 111: 1260- 1270.
49. VIEGA, L.; HOFFMAN, E.; GONZÁLEZ, S.; OLIVO, N. 2006. Potencial de producción de cebada cervecera en Uruguay. Definición del número de granos por espiga. Facultad de Agronomía (Montevideo). Nota técnica no. 52. 17 p.
50. VON KORFF, M.; WANG, H.; LEÓN, J.; PILLEN, K. 2004. Detection of QTL for agronomic traits in an advanced backcross population with introgressions from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). In: EUCARPIA General Congress (17<sup>th</sup>, 2004, Tulln). Proceedings. Moncada, Promolibro. pp. 207-211.
51. VON ZITZEWITZ, J.; CUESTA-MARCOS, A.; CONDON, F.; CASTRO, A.; CHAO, S.; COREY, A.; FILICHKIN, T.; FISK, S.P.; GUTIERREZ, L.; HAGGARD, K.; KARSAI, I.; MUEHLBAUER, G.J.; SMITH, K.P.; VEISZ, O.; PATRICK H.M. 2011. The genetics of winterhardiness in barley; perspectives from genome-wide association mapping. *The Plant Genome*. 4: 76–91.

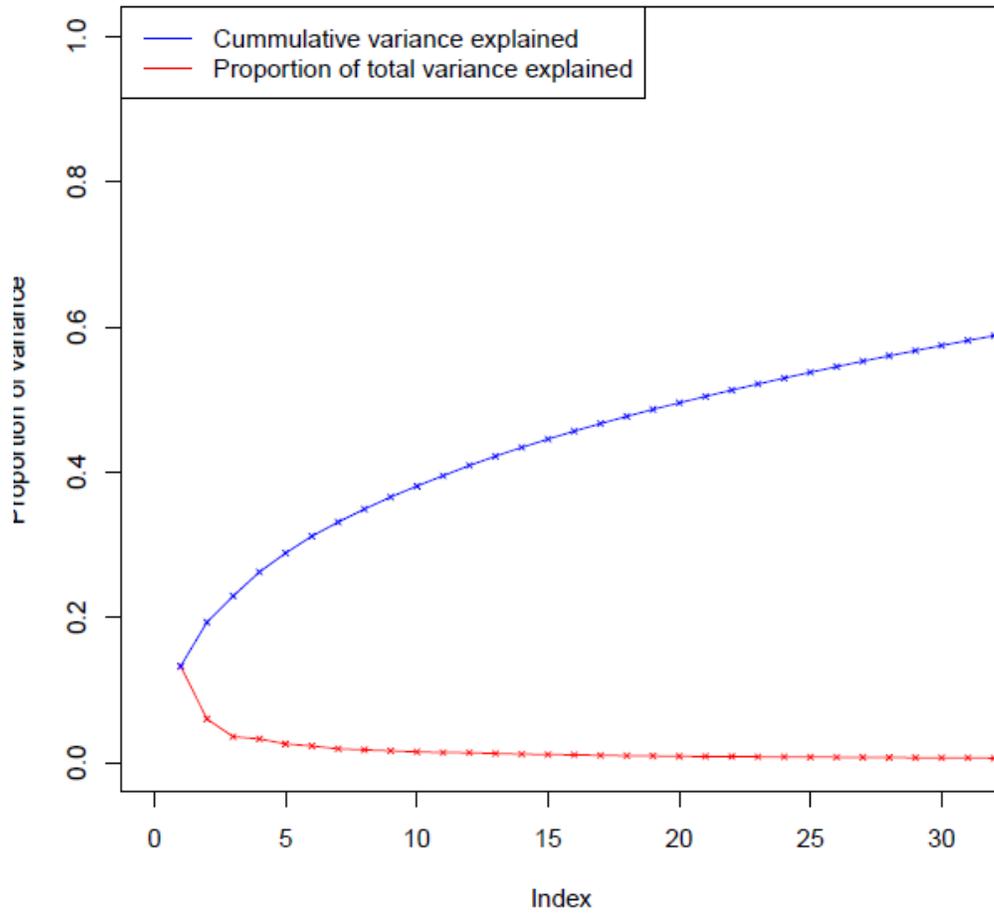
52. WANG, S.; LAPITAN, N.L.V.; TSUCHIYA, T. 1991. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by in situ hybridization in normal diploid barley. Japanese Journal of Genetics. 66: 313-316.
53. WANG, J.; YANG, J.; McNEIL, D.L.; ZHOU, M. 2010. Identification and molecular mapping of a dwarfing gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its correlation with other agronomic traits. Euphytica. 175: 331-342.
54. WANG, H.; SMITH, K.P.; COMBS, E.; BLAKE, T.; HORSLEY, R.D.; GARY, J.M. 2012. Effect of population size and unbalanced data sets on QTL detection using genome-wide association mapping in barley breeding germplasm. Theoretical and Applied Genetics. 124: 111-124.
55. WONG, C.K.; BERNARDO, R. 2008. Genomewide selection in oil palm; increasing selection gain per unit time and cost with small populations. Theoretical and Applied Genetics. 116: 815-824.
56. YU, J.; BUCKLER, E.S. 2006a. Genetic association mapping and genome organization of maize. Current Opinion in Biotechnology. 17: 155-160.
57. \_\_\_\_\_; PRESSOIR, G.; BRIGGS, W.H.; VROH, B.I.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY, J.F.; McMULLEN, M.D.; GAUT, B.S.; NIELSEN, D.M.; HOLLAND, J.B.; KRESOVICH, S.; BUCKLER, E.S. 2006b. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature Genetics. 38: 203-208.
58. ZHAO, K.; ARANZANA, M.J.; KIM, S.; LISTER, C.; SHINDO, C.; TANG, C.; TOOMAJIAN, C.; ZHENG, H.; DEAN, C.; MARJORAM, P.; NORDBORG, M. 2007. An arabidopsis example of association mapping in structured samples. PLoS Genetics. 3 (1): s.p.
59. ZHOU, M.X. 2009. Barley production and consumption; Introduction. In: Zhang, G.; Li, C. eds. Genetics and improvement of barley malt quality. Zhejiang, Zhejiang University Press/Springer. pp. 1-2.
60. ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. The Plant Genome. 1: 5-20.

9 ANEXOS

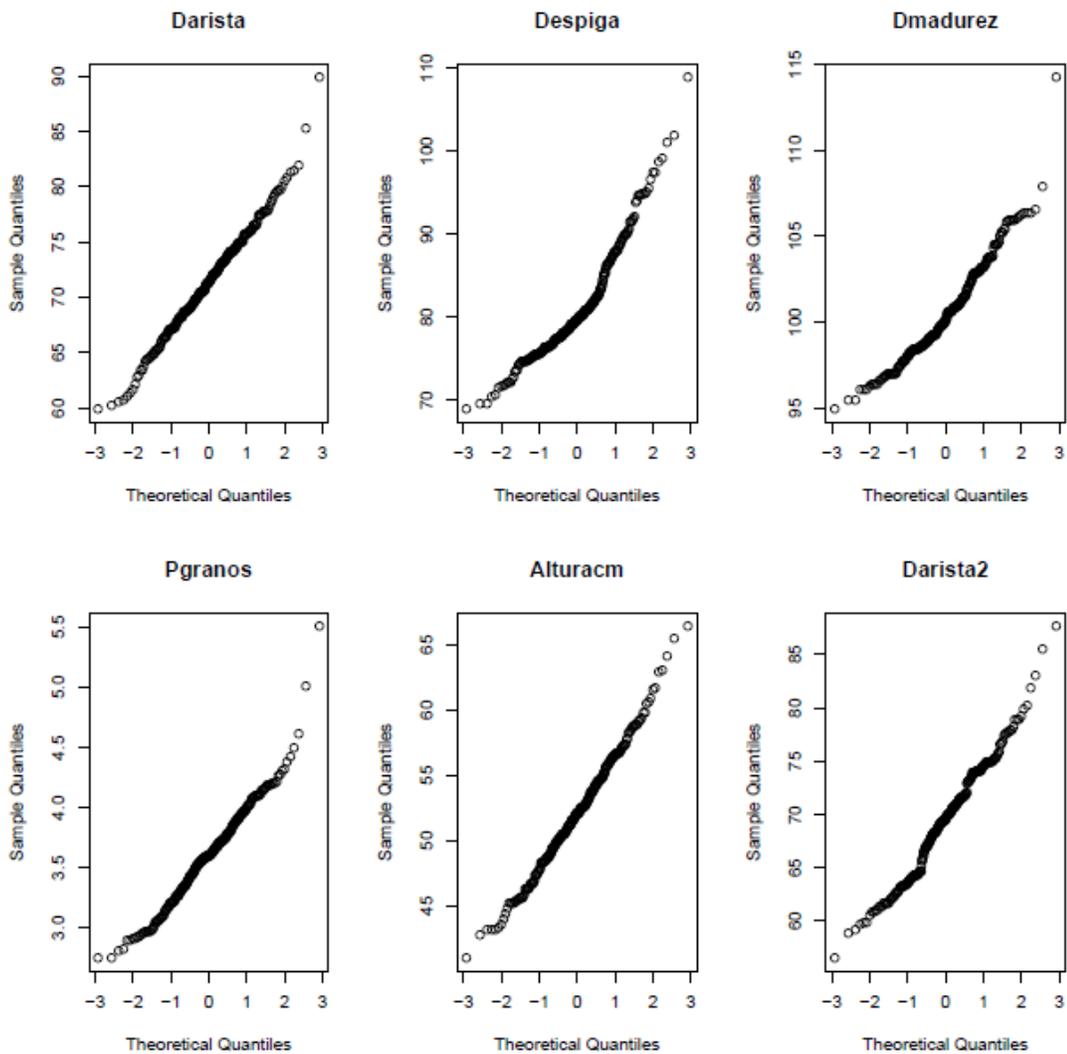
ANEXO 1: Gráfico de datos faltantes en forma de puntos negros para los individuos o marcadores moleculares.



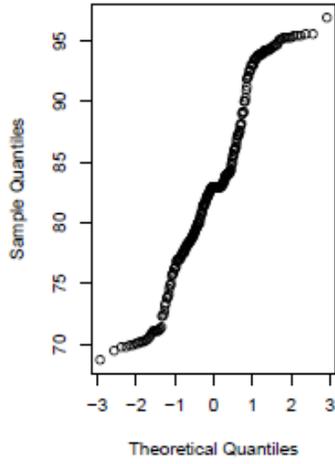
ANEXO 2: Análisis de componentes principales. La línea azul indica la varianza acumulada y la línea roja qué proporción aporta cada eje de la varianza total.



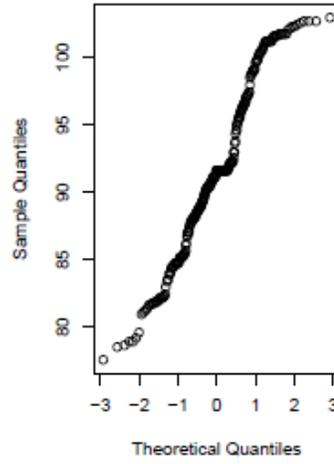
ANEXO 3: Gráficos de “Q-Q Plot” para: Darista, Darista2, Despiga, Despiga2, Dmadurez, Dmadurez2, Pgranos, Alturacm, RFP, Llenado y Llenado2. Cuantiles teóricos versus observados, donde una distribución de los valores próxima a la diagonal de 45° grados implicaría una distribución normal.



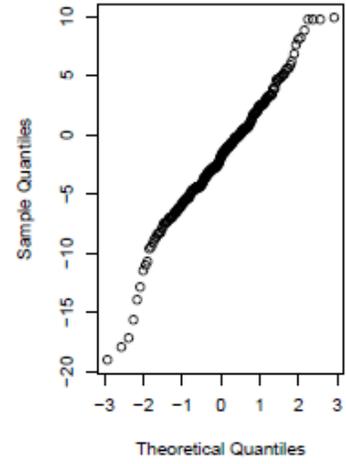
**Despiga2**



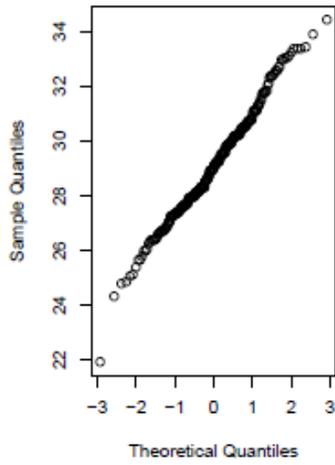
**Dmadurez2**



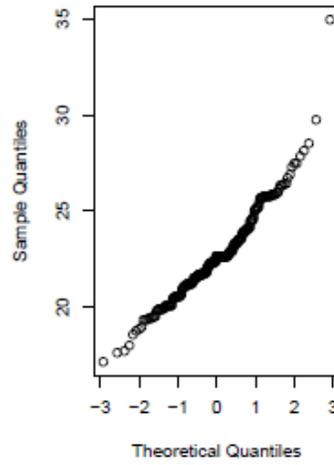
**RFP**



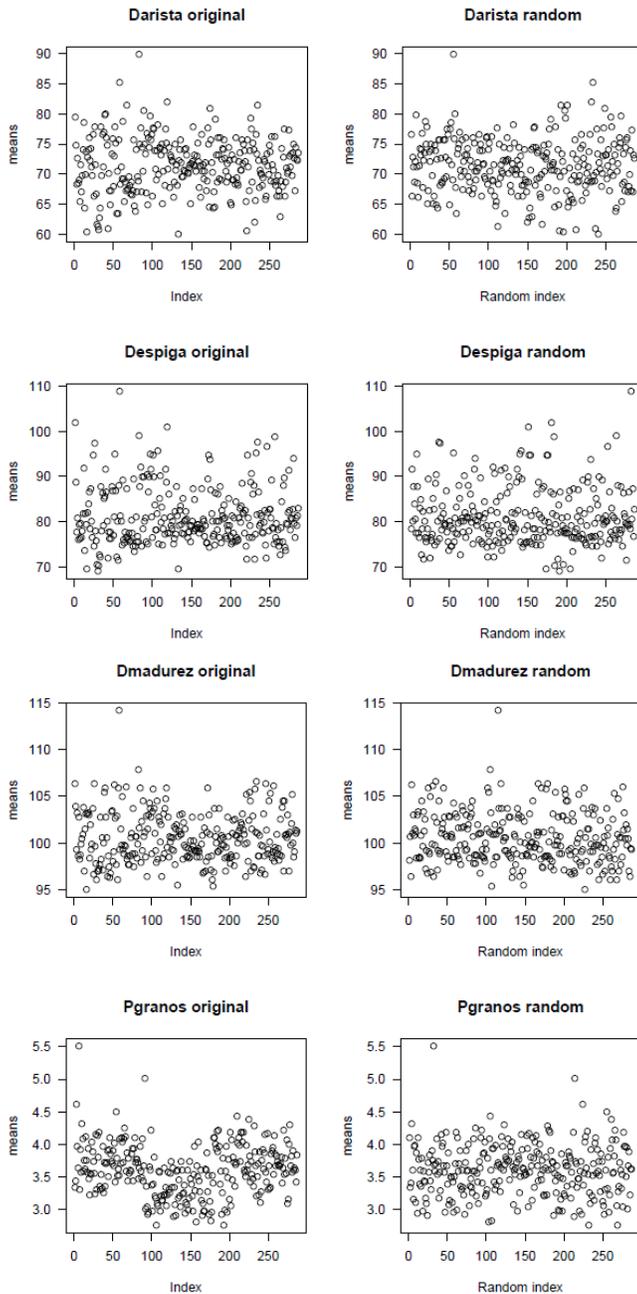
**Llenado**



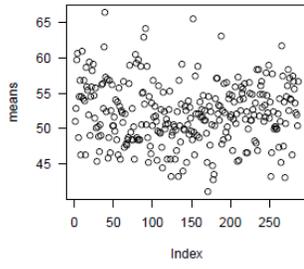
**Llenado2**



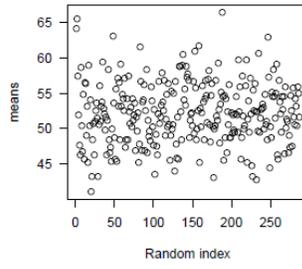
ANEXO 4: Gráficos de ordenamiento de datos para: Darista, Darista2, Despiga, Despiga2, Dmadurez, Dmadurez2, Pgranos, Alturacm, RFP, Llenado y Llenado2. Muestra la distribución de los datos obtenidos en paralelo a la distribución teórica aleatoria de los mismos.



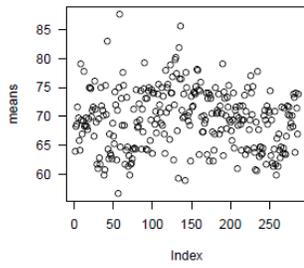
**Alturacm original**



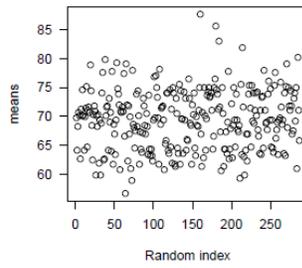
**Alturacm random**



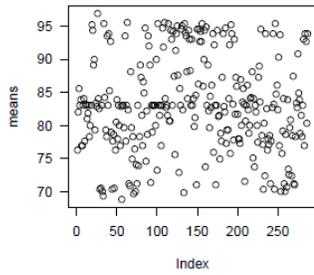
**Darista2 original**



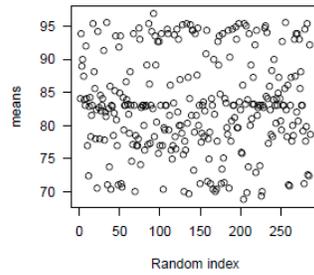
**Darista2 random**



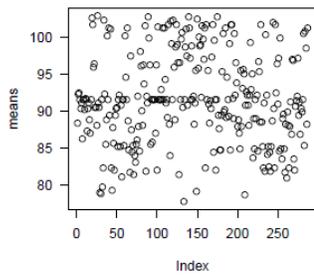
**Despiga2 original**



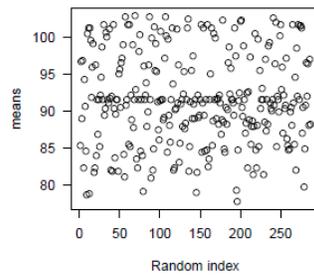
**Despiga2 random**



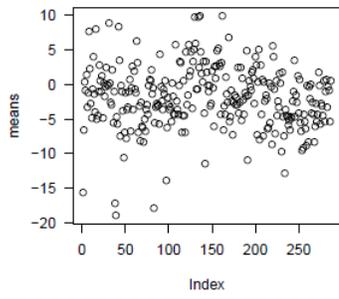
**Dmadurez2 original**



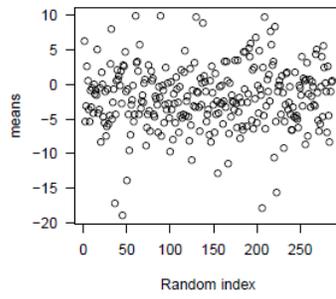
**Dmadurez2 random**



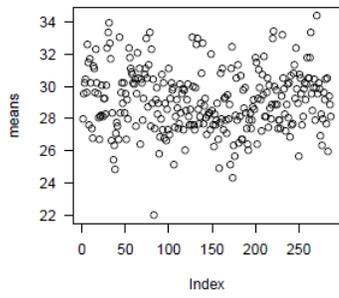
**RFP original**



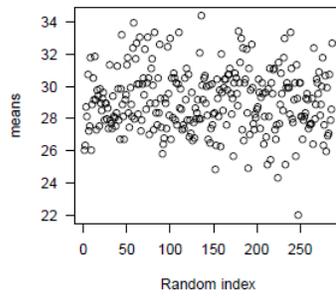
**RFP random**



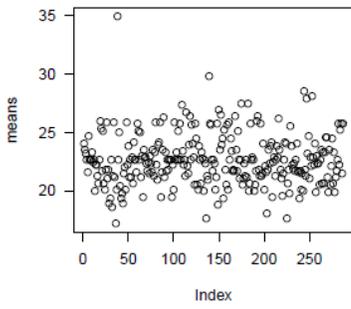
**Llenado original**



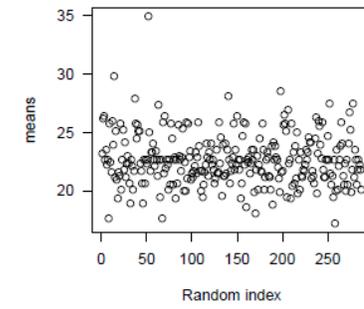
**Llenado random**



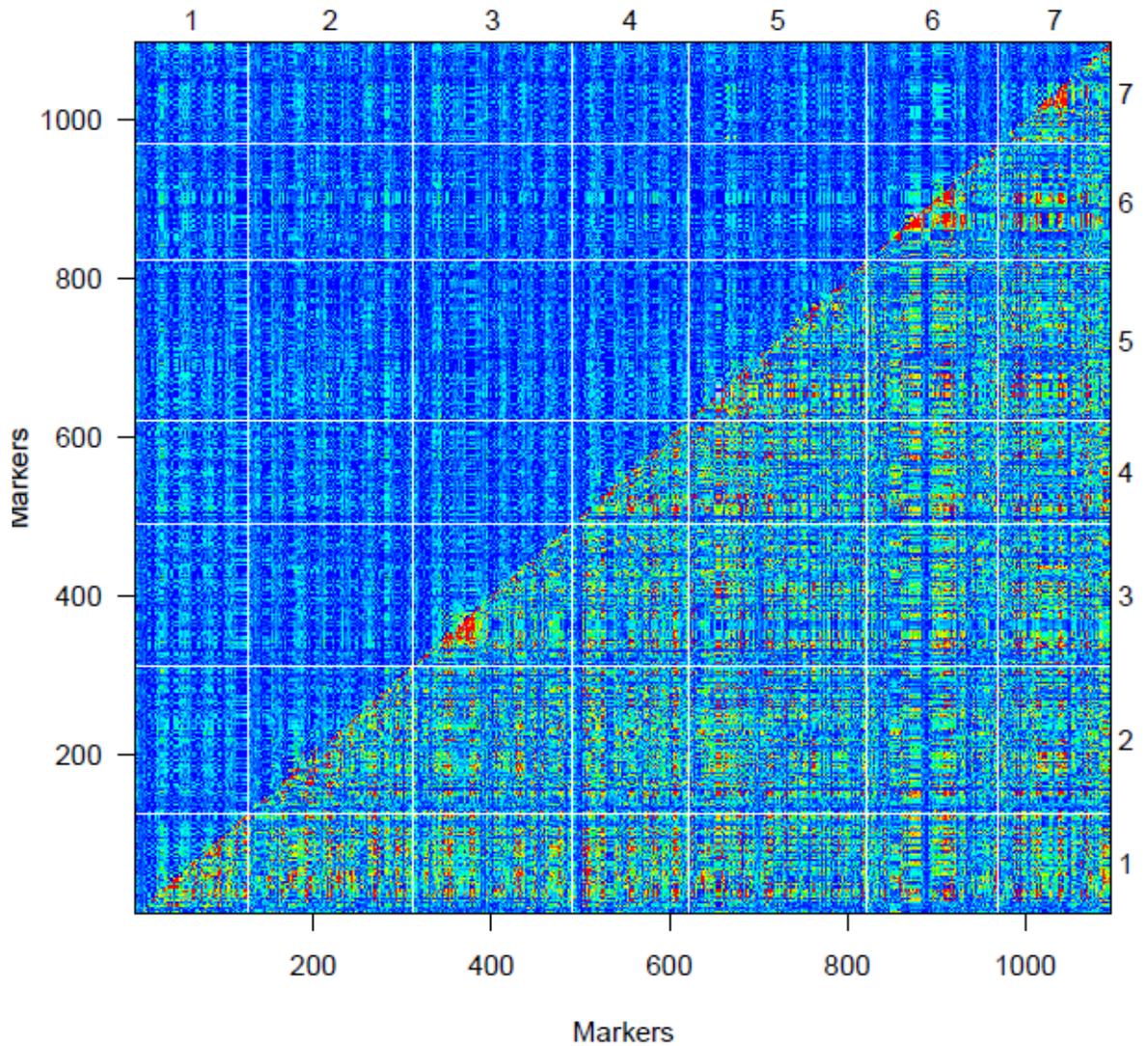
**Llenado2 original**



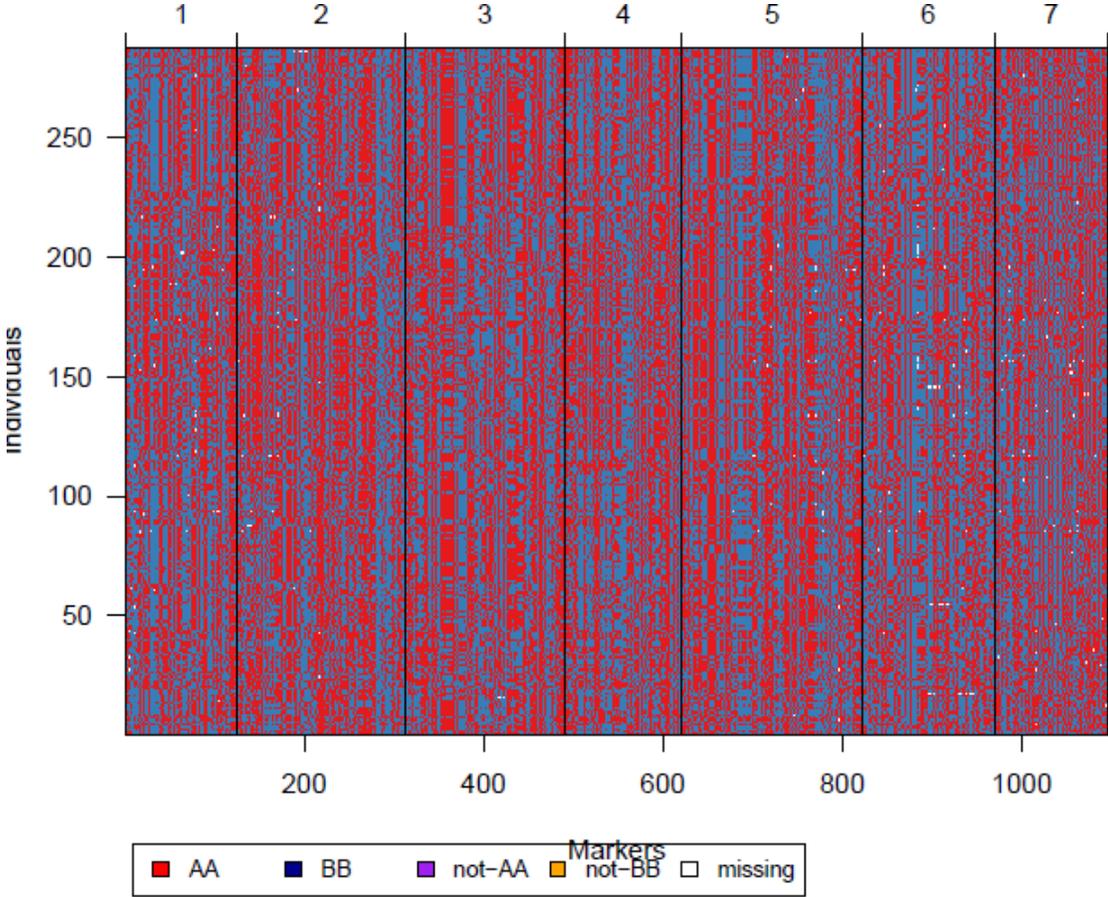
**Llenado2 random**



ANEXO 5: Fracciones de recombinación y scores de LOD. Muestra en ambos ejes a los marcadores moleculares, indica a la izquierda de la diagonal de 45° a través de diferentes colores la recombinación entre los marcadores (rojo nula recombinación, azul máxima), y a la derecha los scores de LOD (*Logarithm of odds*).



ANEXO 6: Gráfico de datos genotípicos. La combinación de color en el sentido vertical implica polimorfismo de los marcadores, y la combinación de color en el sentido horizontal indica recombinación de genes para cada genotipo.



ANEXO 7: Mapa genético de cebada. Muestra la cobertura de los marcadores por cada grupo de ligamiento, graficándose para cada cromosoma la distancia entre marcadores.

