

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**BASES GENÉTICAS DE LAS VARIABLES AGRONÓMICAS DE
INTERÉS LOCAL EN EL GERMOPLASMA DE CEBADA
(*Hordeum vulgare L.*) UTILIZADO EN URUGUAY**

por

Andrés LOCATELLI FAGÚNDEZ

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

PAYSANDÚ
URUGUAY
2011

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Lucía Gutiérrez, la Dra. Silvia Germán y el Dr. Jarislav von Zitzewitz el 17 de octubre 2011.
Autor: Ing. Agr. Andrés Locatelli Fagúndez. Director Dr. Ariel Castro.

Dedico este trabajo a mis padres, Magela y Ricardo, las personas que siempre han estado a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Silvana por su apoyo emocional constante durante el desarrollo del trabajo. Además por su paciencia, comprensión, tesón y sus consejos, elementos todos, que me han ayudado mucho para finalizar la tesis.

Agradezco a mi tutor Ariel Castro por su orientación y estímulo para la realización de este trabajo.

A Lucía Gutiérrez por el tiempo destinado a resolver y ejecutar varios puntos de la tesis.

A los compañeros de la EEMAC, Juan Mosqueira, Sebastián Bartaburu, David Gandolfo, Reinaldo Quintana, Julio Mosqueira, Juan González y a la EEMAC misma, quienes de alguna forma u otra hicieron posible llevar a cabo este trabajo.

A los compañeros de Maltería Uruguay S.A., Álvaro Medina, Sergio Pieroni y Lorena Cammarota por la gran ayuda y el trabajo realizado en los ensayos de Ombúes de Lavalle.

A Clara Pritsch por sus aportes a mi trabajo.

A Ricardo por ayudarme en la elaboración de datos específicos y trascendentes del trabajo.

A Susana Rodríguez por su paciencia en las tareas desarrolladas en el laboratorio de la Facultad de Agronomía en Sayago, Montevideo.

A Federico Condón por su paciencia y preocupación en la resolución de algunos temas específicos del trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1. EL CULTIVO DE CEBADA EN URUGUAY.....	1
1.2. VARIABLES AGRONÓMICAS DE INTERÉS PARA EL URUGUAY.....	2
1.3. MEJORAMIENTO DE CEBADA EN URUGUAY E IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO DE LAS BASES GENÉTICAS DE VARIABLES DE INTERÉS.....	4
1.4. MARCADORES GENÉTICOS.....	5
1.5. MAPAS DE LIGAMIENTO Y MOLECULARES.....	6
1.6. CARACTERES CUANTITATIVOS – ANÁLISIS DE QTL	7
1.7. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y MAPEO ASOCIATIVO.....	9
1.8. ASOCIACIONES ESPURIAS.....	12
1.9. ESTUDIOS GENÓMICOS DE CEBADA EN URUGUAY.....	14
2. <u>GENOME-WIDE ASSOCIATION MAPPING OF AGRONOMIC TRAITS IN RELEVANT BARLEY GERMPLASM IN URUGUAY</u>	
2.1. SUMMARY.....	17
2.2. RESUMEN.....	18
2.3. INTRODUCTION.....	19
2.4. MATERIALS AND METHODS.....	22
2.4.1. <u>Plant Material and Phenotyping</u>	22
2.4.2. <u>Genotyping</u>	23

2.4.3. <u>Kinship and Population Structure</u>	25
2.4.4. <u>Phenotypic Analysis</u>	26
2.4.5. <u>Association Analysis</u>	26
2.5. RESULTS.....	27
2.5.1. <u>Genotyping</u>	27
2.5.2. <u>Structure and Relatedness of the Germplasm</u>	27
2.5.3. <u>Phenotypic and Genome-Wide Association mapping</u>	29
2.5.4. <u>Linkage disequilibrium</u>	37
2.6. DISCUSSION.....	38
2.7. REFERENCES.....	49
2.8. ANEXOS.....	57
3. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u>	61
4. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	71

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

2. BASES GENÉTICAS DE LAS VARIABLES AGRONÓMICAS DE INTERÉS LOCAL EN EL GERMOPLASMA DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.) UTILIZADO EN URUGUAY

Tabla N°.	Página
1. Composición de la población basada sobre país de origen, año de liberación y tipo de genotipo.....	24
2. Medias mínimo cuadráticas y coeficientes de variación de las variables evaluadas para cada ensayo.....	31
3. Matriz de correlación fenotípica por experimento entre las variables analizadas en los ensayos de Ombúes de Lavalle (Col07 y Col08) y Paysandú (Pay07, Pay08a y Pay08b).....	32
4. QTL para variables agronómicas detectados en los cinco experimentos.....	34
5. Tres mayores haplotipos identificados en el brazo corto del cromosoma 2H.....	59

Figura N°

1. Dendograma de los genotipos de acuerdo a su coancestría y representación gráfica del grado de pertenencia a cada sub-grupo según el programa STRUCTURE. A la izquierda de la figura cada genotipo es representado por una columna segmentada en cuatro colores, constituyendo el porcentaje de pertenencia a cada uno de los sub-grupos. Los números entre paréntesis a la derecha de los genotipos, corresponden al grupo que pertenece cada uno de ellos. Genotipos sin número fueron aquellos que no se pudieron adjudicar a ningún grupo. A la derecha de la figura se

observa un dendograma construido a partir de la información de pedigrí, el que se contrapone con los sub-grupos formados a partir de los 1033 SNPs

informativos.....**28**

2. Caracterización térmica y pluviométrica durante ambos años de estudio y su promedio histórico, para las dos localidades.....**30**

3. Representación triangular de desequilibrio de ligamiento (LD) en las áreas de mayor concentración de QTL, sobre los cromosomas 2H (a) y 4H (b). Los cuadrados fueron producidos utilizando estimaciones de valores de LD (r^2) de a pares de marcadores con el programa Haploview (Barret et al., 2005). Los valores de r^2 se muestran dentro de los cuadrados. Los cuadrados completamente negros representan un valor de r^2 entre dos marcadores de 1.0.....**37**

4. Representación triangular de desequilibrio de ligamiento (LD) entre 8, 6 y 8 SNPs sobre los cromosomas 2H, 5H y 7H. Los cuadrados fueron producidos utilizando estimaciones de valores de LD (r^2) de a pares de marcadores con el programa Haploview (Barret et al., 2005). Los valores de r^2 se muestran dentro de los cuadrados. Los cuadrados completamente negros representan un valor de r^2 entre dos marcadores de 1.0.....**39**

5. Representación triangular de desequilibrio de ligamiento (LD) entre 10 SNPs sobre el cromosoma 7H. Note que el marcador 11_20710 está en LD con la mayoría de sus marcadores vecinos, desde los 0 cM hasta los 17.2 cM. Los cuadrados fueron producidos utilizando estimaciones de valores de LD (r^2) de a pares de marcadores con el programa Haploview (Barret et al., 2005). Los valores de r^2 se muestran dentro de los cuadrados. Los cuadrados completamente negros representan un valor de r^2 entre dos marcadores de 1.0.....**57**

6. Mapa de ligamiento con los marcadores clave según los resultados del mapeo asociativo. El ordenamiento de los marcadores y distancias en centimorgans (cM) se basan en el BOPA 1 (Close et al., 2009). La distancias en cM se muestran a la derecha de los cromosomas. Marcadores clave con su denominación, asociados a los principales QTLs encontrados, se representan a la derecha de los cromosomas y a la derecha de estos están los alelos (A o B) favorables. Debajo de cada cromosoma se muestran los genotipos que poseen los haplotipos deseables identificados...**58**

**BASES GENÉTICAS DE LAS VARIABLES AGRONÓMICAS DE INTERÉS
LOCAL EN EL GERMOPLASMA DE CEBADA (*Hordeum vulgare L.*)
UTILIZADO EN URUGUAY**

RESUMEN

Las bases genéticas de las características agronómicas que determinan la adaptación a las condiciones de producción específicas es un aporte fundamental para el mejoramiento en cualquier especie agrícola, incluyendo la cebada cervecera (*Hordeum vulgare L.*). El objetivo de este estudio fue determinar dichos componentes genéticos mediante cartografía por desequilibrio de ligamiento (DL) en una población de 76 genotipos de cebada representativa del pasado y presente del germoplasma en Uruguay. La base de datos fenotípicos se obtuvo en cinco ensayos parcelarios sembrados en dos años y en dos localidades, donde se midieron 13 variables agronómicas. La población fue caracterizada genotípicamente con 1033 SNPs. Se encontraron 79 loci de efecto cuantitativo (QTL) para todas las combinaciones entre ensayos/caracteres analizadas. Los cromosomas con mayor número de QTL detectados fueron el 2H y el 4H. El peso y el tamaño de grano fueron las variables con mayor número de QTL detectados. Dos bloques de marcadores en desequilibrio de ligamiento (DL) asociados a un gran número de caracteres se observaron en el cromosoma 2HS. En el mayor, se identificaron tres haplotipos, posiblemente provenientes de tres ancestros comunes con diferente origen geográfico. También se detectaron regiones genómicas en DL entre los cromosomas 2H, 5H y 7H, en algunos casos asociadas a caracteres agronómicos. Creemos que este estudio contribuye significativamente al entendimiento de la genética de la adaptación agronómica de cebada en el cono sur de América del Sur.

Palabras clave: Mapeo asociativo – Adaptación agronómica – QTL (Quantitative trait loci) – Mapeo por desequilibrio de ligamiento – SNP – Cebada cervecera

GENOME-WIDE ASSOCIATION MAPPING OF AGRONOMIC TRAITS IN RELEVANT BARLEY GERMPLASM IN URUGUAY

SUMMARY

The genetic basis of agronomic traits determining adaptation to specific production conditions is key to the improvement of crops, including malting barley (*Hordeum vulgare L.*). The aim of this study was to determine the genome-wide genetic components associated with agronomic phenotypes of local and global significance in a population of 76 barley genotypes that have been introduced into Uruguay in different chronological periods. The phenotypic database was obtained from five plot trials, planted in two years and two locations, where a total of 13 agronomic traits were determined. The population was genotyped with 1033 polymorphic SNPs. We found a total of 79 quantitative trait loci (QTL) for all the trait/experiment combinations analyzed. The highest concentration of QTL was detected on chromosomes 2H and 4H. Most QTL were detected for grain plumpness and weight. Two (linkage disequilibrium) LD blocks associated with a large number of traits were detected on 2HS. The largest LD block was composed of three haplotypes, possibly derived from three ancestors of different geographical origin. We also detected three genomic regions in different chromosomes (2H, 5H and 7H) in LD between them, associated with agronomic traits. This study provides a contribution to the understanding of the genetics of barley adaptation in the Southern cone of South America.

Keywords: Association mapping – Agronomic adaptation – Quantitative trait loci (QTL) – Linkage disequilibrium mapping – SNP – Malting barley

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. EL CULTIVO DE CEBADA EN URUGUAY

La cebada cervecera (*Hordeum vulgare L.*) es el quinto cultivo en términos de producción total en el mundo siendo las áreas de mayor producción la Unión Europea, Rusia y Norte América (FAO, 2009). Su destino es principalmente la alimentación animal y la elaboración de cerveza, siendo cultivado en ambientes con un amplio rango de temperaturas, altitud y condiciones hídricas (Varshney *et al.*, 2004). El género *Hordeum* está formado por 32 especies, comprendiendo 45 taxa de los cuales *H. vulgare ssp. vulgare* es la única especie que ha sido sometida a domesticación (von Bothmer *et al.*, 1995). Existen registros de su domesticación a partir de su progenitor *Hordeum vulgare ssp. spontaneum* desde hace 10000 años, probablemente en la parte oeste de la media luna fértil, por lo que es considerada como una de las especies fundadoras de la agricultura moderna (Badr *et al.*, 2000).

Se trata de una especie casi exclusivamente autógama con $2n=2x=14$ y un tamaño genómico de aproximadamente 5.3×10^9 bp (Bennett y Smith, 1976). Posee características que la hacen una especie muy apropiada para estudios genómicos de Triticeas: la posibilidad de desarrollar líneas dobles haploides (DH), la disponibilidad de numerosos mutantes y stocks citogenéticos como líneas de adición de trigo/cebada y la disponibilidad de numerosas bibliotecas genómicas (Kleinhofs y Graner, 2001).

La cebada es el segundo cultivo de invierno en importancia en Uruguay ([MGAP](#), 2010), siendo su principal destino la producción de malta para la fabricación de cerveza.

1.2. VARIABLES AGRONÓMICAS DE INTERÉS PARA EL URUGUAY

Un alto porcentaje del cultivo en Uruguay ha sido ocupado por variedades introducidas, de origen argentino, europeo, australiano y más recientemente brasileño y estadounidense (North Dakota), con un nivel de adaptación relativo a las condiciones locales. Esto reflejó en cierta medida la prioridad en el uso de material con calidad maltera conocida e hizo evidente la necesidad del desarrollo de genotipos adaptados (Castro *et al.*, 1997). La investigación nacional ha avanzado en la definición del ideotipo del cultivo para las condiciones nacionales, en términos de características fenológicas y morfo-fisiológicas. Variables como el índice de cosecha (IC), altura de planta, granos por superficie, granos por espiga, peso de grano, tiempo a floración y duración del llenado de grano surgieron como objetivos a mejorar por su importancia en la adaptabilidad agronómica (Castro *et al.*, 1993).

El cultivo de cebada en el Uruguay no tiene limitaciones severas para lograr altos valores de biomasa aérea (13000 kg/ha materia seca) (Hoffman *et al.*, 1993a), pero la proporción de esta que corresponde a grano es sensiblemente menor que la lograda en regiones de alto potencial de producción (Riggs *et al.*, 1981). Si bien no es esperable llegar a los límites biológicos de IC de 0.62 planteados por Austin (1980) o a los observados en planta individual a nivel local (0.60) (Viega, comunicación personal), sería un objetivo alcanzable aumentar los niveles de 0.40 obtenidos en buenas condiciones (Castro *et al.*, 1997). Planteado este problema, las variedades liberadas en la década del '90 lograron un avance importante en rendimiento a través de una mejor partición de la materia seca producida (Castro *et al.*, 1993). Hoffman *et al.* (1992) y Ernst *et al.* (1991) determinaron que los niveles de partición de asimilados sufren modificaciones con variaciones en la curva de crecimiento del cultivo. Bajo nuestra reducida estación de crecimiento para el cultivo, condicionada por las altas temperaturas hacia fin de ciclo (octubre-noviembre), una curva de crecimiento inicial más lenta (bajas tasas de acumulación de materia seca (MS) desde emergencia hasta macollaje) posibilitando altas tasas de producción de MS pre-antésis, aparece como la forma de mantener el IC frente a

elevados niveles de producción de MS (Hoffman *et al.*, 1993a). Este patrón de crecimiento asegura altos valores de granos/superficie, explicados por aumentos de espigas/superficie, sin reducir el rendimiento/espiga (Hoffman *et al.*, 1993a). A pesar de haber detectado los factores que estarían jugando un rol fundamental sobre la adaptación agronómica de los genotipos en esta región, actualmente es muy difícil llegar a valores de IC de 0.40 en situaciones de alta producción de biomasa (Castro *et al.*, 1997).

En ausencia de estrés durante el crecimiento del grano, el cultivo de cebada tiene limitado el incremento en rendimiento por la capacidad de la fosa de acumular asimilados y no por la capacidad de la fuente de proveerlos (Gallagher *et al.*, 1995; Dreccer *et al.*, 1997; Bingham *et al.*, 2007). Para trigo Slafer *et al.* (1994) concluyeron que el rendimiento en grano es limitado por fosa o hasta a veces colimitado por fuente y fosa, pero nunca sólo por fuente. Si esto es así, sería biológicamente posible aumentar el número de granos por unidad de superficie y su peso. El aumento en número puede lograrse en base al aumento de espigas por superficie y/o, al aumento del número de granos por espiga.

Por otro lado, tanto a nivel local como internacional y tanto en cebada (Castro *et al.*, 1997) como en trigo (Loss y Sidique, 1994), ha sido demostrado que dentro del período emergencia-madurez fisiológica, el IC y el rendimiento de los cultivares que poseen un tiempo a floración más corto son mayores que aquellos que florecen más tarde. Para las condiciones de Uruguay, contar con materiales que lleguen a floración tempranamente estaría permitiendo que el período de llenado de grano transcurriera bajo un escenario de menores temperaturas (Castro *et al.*, 1994), por lo tanto afectando positivamente caracteres como peso de grano, rendimiento, IC y clasificación de grano (Castro, 1994). Hoffman *et al.* (1993b) trabajando con un grupo de 11 cultivares comerciales concluyen que el grupo de genotipos de mayor potencial de rendimiento fue el que presentó una duración de llenado de grano mayor.

La información generada a nivel nacional pudo establecer cuáles son las variables clave que hacen a la adaptación del cultivo en el Uruguay. Conocer sus

bases genéticas permitiría contar con una herramienta muy sólida, que incrementaría la eficiencia de nuestros programas de mejoramiento.

1.3. MEJORAMIENTO DE CEBADA EN URUGUAY E IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO DE LAS BASES GENÉTICAS DE VARIABLES DE INTERÉS

Los primeros cruzamientos para el mejoramiento del cultivo en Uruguay se realizaron en 1968 con el establecimiento del campo experimental de FNC (actualmente MOSA). Hasta ese entonces el mejoramiento había consistido sólo en la selección de líneas introducidas y diversos genotipos utilizados por productores locales. Luego de un período interrumpido, en la década de los '80 con el comienzo de las actividades de mejoramiento de CYMPAY (luego MUSA y actual AMBEV), Facultad de Agronomía e INIA, se consolidó el mejoramiento de cebada en el Uruguay.

Dadas las exigencias industriales por genotipos capaces de satisfacer las crecientes demandas de calidad maltera, el germoplasma introducido en el mejoramiento nacional tuvo como principal requisito aportar respuestas a tales demandas. La gran mayoría de los genotipos introducidos para esto si bien eran fuentes de calidad, no estaban adaptados a las condiciones ambientales locales. En este escenario surge la necesidad de desarrollar genotipos que además de presentar buenas cualidades malteras posean adaptabilidad agronómica en esta región. Si bien INIA ha liberado cultivares de media a alta calidad maltera con buena adaptación, el conocimiento de las bases genéticas que están detrás, tanto de variables de calidad maltera como agronómicas sería de gran ayuda para facilitar la obtención del germoplasma buscado.

El conocimiento de la localización y el número de las regiones genómicas asociadas a variables de interés puede ser una herramienta significativa para la mejora de la eficiencia en un programa de mejoramiento. En primer lugar permite conocer la diversidad realmente existente dentro del germoplasma disponible, por otra parte permite la planificación precisa de los programas de cruzamiento de

manera de utilizar de la forma más efectiva dicha variabilidad, y en tercer lugar habilita el uso de estrategias alternativas (como selección asistida) para el desarrollo más eficiente de germoplasma que maximice el uso de dicha variabilidad. Para lograr eso se necesita el desarrollo de un cuerpo importante de información genómica referida a la especie y al germoplasma bajo estudio.

1.4. MARCADORES GENÉTICOS

El mejoramiento vegetal históricamente se basó en la identificación fenotípica de aquellos individuos sobresalientes para ciertos caracteres dentro de una población. El cuello de botella siempre estuvo en la fidelidad de la identificación de aquellos individuos genéticamente sobresalientes, ya que el ambiente juega un papel distorsionador sobre la apreciación fenotípica. En este contexto es que los marcadores genéticos surgieron como una herramienta de gran potencial en el mejoramiento. Son tres los tipos de marcadores genéticos más utilizados: 1) morfológicos, marcadores que ellos mismos son rasgos fenotípicos o propiamente caracteres, 2) bioquímicos, marcadores que incluyen a variantes alélicas de enzimas llamadas isoenzimas, 3) moleculares, marcadores de ADN que revelan variantes en el ADN en determinados sitios del cromosoma (Jones *et al.*, 1997). Debido a que tanto los marcadores morfológicos como los bioquímicos presentan las desventajas de que pueden ser limitados en número, estar influenciados por factores ambientales o por el estado de desarrollo de las plantas, los marcadores moleculares se han convertido en los más usados, debido principalmente a su abundancia y a la ausencia de interacción con factores ambientales y estado fenológico de la planta (Winter y Kahl, 1995). Dichos marcadores han aportado mucha información sobre la ubicación de muchos genes encontrados previamente en mapas de ligamiento.

1.5. MAPAS DE LIGAMIENTO Y MOLECULARES

Un mapa de ligamiento puede ser definido como una disposición física o arreglo lineal de genes, resultado de los datos fenotípicos de recombinación entre gametos provenientes de dos individuos distintos en los caracteres a evaluar.

La disponibilidad de un mapa de ligamiento en el que se encuentre incluido un gen de interés, permite ubicarlo en relación a otros genes y/o marcadores (en términos de recombinación) y eventualmente en relación a los cromosomas de la especie.

En el pasado, los mapas genéticos de plantas superiores estuvieron enteramente basados en marcadores morfológicos y bioquímicos. Debido a sus limitantes ya mencionadas, los marcadores moleculares facilitaron la construcción de mapas de alta densidad en muchas de las especies cultivadas (Philips and Vasil, 2001). En general los mapas moleculares, al basarse en la segregación de una determinada población, se construyen siguiendo estos pasos para su elaboración: 1) producción de la población de mapeo, 2) identificación de polimorfismo de los marcadores utilizados, 3) análisis de ligamiento entre marcadores (Collard *et al.*, 2005).

En cebada el primer reporte de un mapa de marcadores moleculares fue para el cromosoma 6H en 1988 (Kleinhofs *et al.*, 1988) y un mapa parcial de todo el genoma incorporando marcadores RFLPs, morfológicos, isoenzimas y PCR fue publicado en 1990 (Shin *et al.*, 1990). Un hito importante fue el desarrollo del primer mapa consenso, que utilizó tres diferentes F1 derivadas de poblaciones doble haploides: Igri x Franka (Graner *et al.*, 1991), Proctor x Dudinka (Heun *et al.*, 1991) y Steptoe x Morex (Kleinhofs *et al.*, 1993), seguido de trabajos similares de armado y utilización de mapas integrados con el objetivo básico de tener una mayor cobertura y resolución del genoma (Langridge *et al.*, 1995; Sherman *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 1998). Como forma de intentar desarrollar una solución más genérica en la integración de la información proveniente de diferentes mapas de mediana resolución, Kleinhofs y Graner (2001) dividieron el genoma de cebada en intervalos de 10 cM aproximadamente (“BINS”). Cada BIN está definido por dos marcadores

que han sido “anclados” en los mapas formados a partir de Steptoe/Morex e Igri/Franka.

Más recientemente se han reportado grandes mapas consenso altamente saturados de marcadores. Aghnoum *et al.* (2010) desarrollaron un gran mapa consenso, construido por siete poblaciones de mapeo: cuatro poblaciones doble haploides y tres poblaciones de líneas recombinantes endocriadas (L94/Vada, Vada/SusPrit, Steptoe/Morex, líneas Oregon Wolfe Barley (OWB), Igri/Franca, Cebada Capa/SusPrit, Nure/Tremois). Tiene como características generales la de reunir 6990 marcadores de diverso tipo, hacer una cobertura de 1093 cM (largo del mapa) y además subdividirse en 217 BINs, quedando separados cada uno de ellos por sólo 5 cM. Close *et al.* (2009) elaboraron un mapa integrado a partir de cuatro poblaciones de mapeo doble haploides (Wolfe Multiple Dominant/Wolfe Multiple Recessive de la población de mapeo OWB, Steptoe/Morex, Haruna Nijo/OHU602, Morex/Barke). El largo total del mapa fue de 1099 cM y el número de marcadores empleados fue de 4718. A diferencia de los anteriores mapas consenso, este mapa sólo empleó marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), además de los clásicos marcadores “ancla”.

1.6. CARACTERES CUANTITATIVOS – ANÁLISIS DE QTL

En el pasado la localización de los genes en los mapas de ligamiento estuvo restringida a *loci* de caracteres con herencia cualitativa. Los genes que contribuyen a caracteres complejos poseen características especiales que hacen más dificultoso su detección, incluyendo heterogeneidad de locus, epistasis, baja penetrancia, expresividad variable y pleiotropía, a la vez que se dispone de un limitado poder de detección estadístico (Doerge, 2002; Dekkers y Hospital, 2002). Sin embargo, muchos de los caracteres de mayor importancia en la agricultura tales como rendimiento, calidad y resistencia a algunas enfermedades, están controlados por muchos genes y son conocidos como caracteres cuantitativos (también “poligénicos”, “multifactoriales” o “caracteres complejos”). En los estudios clásicos, el número de genes afectando tales caracteres era estimado a partir de métodos estadísticos,

basados sobre la asunción de que todos ellos tenían efectos aditivos, ausencia de ligamiento entre loci, igual efecto para todos los loci y que los loci de un padre afectaban a un carácter en una sola dirección (Wright, 1968).

El análisis de caracteres complejos o análisis de QTL (Quantitative trait *locus*) (QTL = una región en alguna parte del genoma que es responsable por la variación de un carácter cuantitativo) fue desarrollado a fines de los '80 teniendo su mayor actividad hacia fines de los '90 (Asins, 2002). Básicamente se puede definir como el análisis de asociación estadística entre la segregación de marcadores genotípicos y valores fenotípicos de variables de interés, sobre líneas individuales. El objetivo del análisis es identificar el número, posición y efecto de los *loci* asociados a algún carácter cuantitativo. A partir de esta información, muchos estudios de mejoramiento trabajando con caracteres como rendimiento o calidad, podrían plantearse como objetivo reunir todos los alelos favorables en líneas elite (Borevitz *et al.*, 2004).

En el caso de cebada, los primeros trabajos de análisis de QTL se basaron en los mapas de ligamiento iniciales y se concentraron en características de fácil medición (días a floración, altura de planta, hábito de crecimiento, etc), (Barua *et al.*, 1993; Laurie *et al.*, 1995), incluyendo progresivamente variables más complejas como rendimiento y sus componentes (Hayes *et al.*, 1993; Backes *et al.*, 1995; Tinker *et al.*, 1996; Kjaer and Jensen, 1996; Mather *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1999; Spaner *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1999; Teulat *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Gyenis *et al.*, 2007).

El análisis de QTL requiere tener una población segregante (en plantas, el mapeo de QTL generalmente es realizado utilizando una población derivada de un cruzamiento entre dos líneas endocriadas) y balanceada, con un mapa de ligamiento derivado de ella y con líneas caracterizadas genotípicamente. El hecho de necesitar una población segregante proveniente de una cruce definida limita la base genética a las diferencias entre los parentales. Por otra parte la tendencia a utilizar progenitores con claras diferencias para los caracteres de estudio como forma de maximizar las posibilidades de detección de componentes genéticos significa que la base genética es poco representativa del germoplasma en uso en mejoramiento.

1.7. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y MAPEO ASOCIATIVO

Una alternativa a las limitantes mencionadas del análisis de QTL basado en poblaciones con un número limitado de parentales ha sido el uso de análisis de desequilibrio de ligamiento o mapeo asociativo. La disponibilidad de mapas de alta densidad de marcadores moleculares la han hecho viable aportando una mayor resolución y la posibilidad de tener mayor análisis por locus. Es una técnica desarrollada para la genética humana, donde el uso de poblaciones balanceadas no es posible (Flint-García *et al.*, 2003). Los términos “desequilibrio de ligamiento” (DL) y “mapeo asociativo” (MA) a menudo se utilizan indistintamente en la literatura. Sin embargo, mientras el MA se refiere a una asociación física (ligamiento) significativa entre un marcador molecular y un carácter fenotípico, el LD se refiere también a una asociación no aleatoria, pero entre dos marcadores o dos genes/QTL o entre un gen/QTL y un marcador, en la forma en que segregan. De esta forma se entiende que el mapeo asociativo es uno de los usos importantes del DL. En sentido estadístico el mapeo asociativo corresponde a la covarianza de un marcador polimórfico y un carácter de interés, mientras que el DL representa la covarianza de polimorfismos exhibidos por dos marcadores/genes moleculares (Gupta *et al.*, 2005). Existen diferentes cálculos para la estimación de DL entre 2 loci con marcadores bialélicos (SNPs y AFLPs), los principales son: D , D' , r^2 , R , D^2 , D^* , F' , $X(2)$, δ , etc. De todos estos los preferidos son D' y r^2 . De todas maneras, entre ellos se destacan claras diferencias, mientras D' sólo estima las diferencias de recombinación, r^2 resume la recombinación y la historia de mutación (Jorde *et al.*, 2000; Ardlie *et al.*, 2002). También r^2 es un indicativo de cómo los marcadores podrían estar correlacionados con los QTL de interés, así que para estudios de asociación, a menudo r^2 es preferido. Su forma de cálculo se basa en las frecuencias de alelos que existen de a pares de sitios en alguna parte del genoma en un grupo de individuos. Por lo tanto:

$$r^2 = \frac{(P_{1A2G} - (P_{1A})(P_{2G}))^2}{(P_{1A})(P_{1T})(P_{2G})(P_{2C})}$$

donde P_{1A2G} es la frecuencia en la que se encuentra en una población, un alelo A en el sitio 1 y un alelo G en el sitio 2, P_{1A} y P_{1T} es la frecuencia en la que se encuentra

en el sitio 1 los alelos A y T respectivamente, en tanto que P_{2G} y P_{2C} es la frecuencia en la que se encuentra en el sitio 2 los alelos G y C respectivamente.

Existen varios factores reportados que estarían afectando el DL y por ende la utilización y los resultados del mapeo asociativo, entre ellas: sistema de reproducción (autogamia o alogamia), fijación de determinadas regiones cromosómicas por diferentes tasas de recombinación, estructura poblacional, historia poblacional, deriva genética y selección direccional (Gaut y Long, 2003). Conocer el LD de una especie o población no sólo ayudará a interpretar mejor los resultados de un MA, sino que es considerado un prerequisite para detectar asociaciones entre datos genotípicos y fenotípicos, pudiendo en algunos casos, corregir algunas de las herramientas utilizadas, como es el caso de la densidad de los marcadores moleculares empleados.

En la última década el desarrollo de estudios de genes candidatos y de grandes plataformas genotípicas han promovido al MA como una alternativa viable del análisis de QTL clásico (Waugh *et al.*, 2009). El DL ha sido investigado en varias especies de plantas como *Arabidopsis* (Nordborg *et al.*, 2002), maíz (Remington *et al.*, 2001; Tenaillon *et al.*, 2001; Whilson *et al.*, 2004; Mc Mullen *et al.*, 2009), girasol (Kolkman *et al.*, 2007; Fusari *et al.*, 2008), soja (Zhu *et al.*, 2003), arroz (Garris *et al.*, 2003; Agrama *et al.*, 2007), ryegrass (Fiil *et al.*, 2010), sorgo (Hamblin *et al.*, 2004), trigo duro (Maccaferri *et al.*, 2005), trigo de pan (Chao *et al.*, 2007), pino (Brown *et al.*, 2004) y en cebada (Kraakman *et al.*, 2004; Morrell *et al.*, 2005; Rostocks *et al.*, 2006; Malysheva *et al.*, 2006). En la generalidad de los casos estos trabajos indican que el DL decae con la distancia, pero la tasa de disminución depende fundamentalmente del sistema de apareamiento. En aquellas especies autógamas como cebada, trigo, sorgo y arroz debido a una menor tasa de eventos de recombinación, la reducción del DL cae más lentamente que en especies alógamas como maíz, ryegrass perenne y pino. A causa de la alogamia de estas últimas, la probabilidad de que un evento de recombinación rompa un bloque de ligamiento establecido es mucho mayor que en especies autógamas. Sin embargo, en cebada la extensión del DL puede variar de forma importante con la historia evolutiva que hayan tenido las poblaciones que se estén analizando (Caldwell *et al.*, 2006).

Alrededor del locus *hardness* Caldwell *et al.* (2006) encontraron que los cultivares modernos presentaron una sustancial región en desequilibrio de ligamiento, opuesto a lo encontrado en variedades criollas. Por otro lado, rápidas tasas de disminución en el DL también fueron encontradas por Morrell *et al.* (2005) en accesiones de cebada salvaje. En aquellos genotipos que han pasado por algún proceso de selección es dable detectar reducción de la variabilidad alélica en regiones genómicas asociadas a las variables objetivo, este hecho podría estar explicando el DL alrededor del locus *hardness*. Por el contrario, en germoplasma que no ha experimentado fuertes procesos de selección (cebada salvaje) es esperable lo encontrado por Morrell *et al.* (2005), rápidas caídas en el DL, explicadas por la ausencia de un fuerte proceso de selección (selección artificial).

La técnica del MA a partir del DL ha sido utilizada en trigo (Maccaferri *et al.*, 2005, 2008; Breseghello *et al.*, 2006; Tommasini *et al.*, 2007; Massman *et al.*, 2011), arroz (Agrama *et al.*, 2007; Ordóñez *et al.*, 2010), maíz (Buckler *et al.*, 2006), ryegrass (Sköt *et al.*, 2005), papa (Simko *et al.*, 2004). Si bien no son muchos los trabajos para cebada en mapeo asociativo utilizando desequilibrio de ligamiento como base, han ido en aumento. Existen trabajos que han determinado las bases genéticas para caracteres complejos como rendimiento (Comadran *et al.*, 2008), su estabilidad (Kraakman *et al.*, 2004), cualidades malteras (Beattie *et al.*, 2010), en otros trabajos se analizaron los componentes genéticos de la vernalización (Cockram *et al.*, 2008), tolerancia al frío (Von Zitzewitz *et al.*, 2011), tiempo a floración (Stracke *et al.*, 2009), cualidades y resistencia a enfermedades como mancha borrosa (*Cochliobolus sativus*) (Roy *et al.*, 2010). Kraakman *et al.* (2006), trabajando con un conjunto de 148 variedades europeas modernas, determinaron las bases genéticas para un conjunto de variables: altura de planta, tiempo a floración, resistencia a roya de la hoja, resistencia al virus del enanismo amarillo (BYD), longitud del raquis, y tamaño de la lodícula. La gran mayoría de los estudios en MA en cebada se han concentrado en el análisis de variables de valor relativo para el Uruguay, siendo escasos los trabajos sobre variables complejas como rendimiento y sus componentes, las cuales además, deben estudiarse localmente por su alta interacción con el ambiente. Entre las ventajas que plantea el mapeo asociativo para plantas, en

comparación al análisis clásico de QTL se encuentran: la utilización de una base genética amplia, posibilidad de incluir un background genético más representativo, sin necesidad de la utilización de una población segregante ni que esta sea balanceada, elevada robustez en los resultados (debido a la utilización de individuos con alto número de meiosis en su desarrollo y a la posibilidad de analizar grandes tamaños poblacionales), mayor análisis por locus (en poblaciones biparentales sólo se cuenta con 2 alelos por locus) y la posibilidad de utilizar información fenotípica previamente colectada (Kraakman *et al.*, 2004).

1.8. ASOCIACIONES ESPURIAS

La base del MA es la inferencia de que las asociaciones marcador-carácter detectadas, se deban a una asociación física entre el marcador y el o los genes responsables de parte de la variación detectada. Pero debido a que generalmente las poblaciones utilizadas para MA son genéticamente amplias, es decir, que se espera que exista un gran número de recombinaciones entre los individuos y un elevado número de alelos por locus, la metodología puede estar ocasionando fallas en la estimación de las asociaciones marcador – carácter (asociaciones espurias o falsos positivos). Una población posee estructura cuando dentro de ella existen subpoblaciones que co-evolucionaron separadamente, lo suficiente como para contar con extensas regiones genómicas propias. El hecho de que cada subgrupo de genotipos posea regiones genómicas propias, aumenta la probabilidad de detectar asociaciones entre un carácter distintivo entre los subgrupos y varias de dichas regiones. Por lo tanto, la estructura poblacional (Pritchard *et al.*, 2000), puede provocar asociaciones marcador – carácter debidas a la estructura misma y no necesariamente a un ligamiento físico (Thornsberry *et al.*, 2001).

Otra causa habitual de detección de falsos positivos son las relaciones de parentesco entre los individuos. En este caso la confusión se debe a que ciertos alelos de interés pueden ser idénticos por estado y no por descendencia (Yu *et al.*, 2006). Dos individuos en un locus poseen dos alelos idénticos por estado (IPE) cuando a pesar de tener para ese locus alelos idénticos, no comparten ningún ancestro común,

por lo que no podemos afirmar que ambos alelos provengan de un único genotipo, o lo que es más importante, no podemos estar seguros de que la región alrededor de ese locus sea la misma en ambos individuos. Por el contrario, dos individuos en un locus poseen dos alelos idénticos por descendencia (IPD), cuando en el pedigrí de ambos se puede detectar un ancestro común, por lo que consideramos que dicho alelo proviene de un mismo genotipo. Debido a que en la gran mayoría de los casos los alelos marcadores con los que se trabaja en mejoramiento no son ni están dentro de los genes funcionales de interés, la diferenciación entre alelos IPE e IPD es muy importante para asegurarnos que efectivamente ligado a nuestro marcador se encuentre la región de interés (gen). Para corregir estos problemas se han propuesto una serie de modelos que proporcionan estimaciones más precisas, con mayor poder y menor tasa de falsos positivos. Los primeros estudios recomendaban corregir por asociaciones espurias debidas a la estructura de la población utilizando inferencia de estructura basada en modelos tales como los obtenidos con el software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Este software estima la estructura existente en una población con metodología bayesiana. Examinando las correlaciones genotípicas de marcadores no ligados asigna un grado de pertenencia de cada genotipo a cada sub-población y además estima el número de grupos (sub-poblaciones) en base al incremento en la probabilidad de pertenencia de cada uno de ellos al agregar un nuevo grupo. Este análisis permite estimar la proporción del genoma de un individuo que contribuye a cada sub-población y esa información es la que contiene la matriz Q. A esta metodología se la llamó el modelo Q. Yu *et al.* (2006) propusieron la utilización de modelos mixtos para corregir por un lado las asociaciones espurias causadas por la estructura, y por otro lado, aquellas causadas por el relacionamiento entre los individuos. Ellos propusieron la utilización de un modelo Q+K, donde Q es la matriz de estructura de efectos fijos (aportada por STRUCTURE por ejemplo) y K es la matriz de coancestría (o relacionamiento) entre individuos de efectos aleatorios. La matriz K puede ser formada tanto por información de pedigrí como por información genotípica a partir de alelos marcadores compartidos entre los genotipos. El uso de modelos mixtos ha resultado efectivo para la detección de genes en maíz (Parsseaux y Bernardo, 2004; Arbelbide *et al.*, 2006) y estudios de

simulación han demostrado que el mapeo genético mediante modelos mixtos es útil en especies autóгамas (Arbelbide *et al.*, 2006). La utilización de modelos mixtos permite estimaciones adecuadas incluso con poblaciones pequeñas siempre que el número de marcadores sea grande y el tamaño poblacional lo suficientemente grande como para estimar la estructura de la población y el grado de relacionamiento de los individuos (Yu *et al.*, 2006).

1.9. ESTUDIOS GENÓMICOS DE CEBADA EN URUGUAY

El desarrollo de estudios en genómica de cebada en Uruguay, con énfasis en el germoplasma utilizado en mejoramiento y sobre las variables de interés local, ha sido reducido. El primer estudio de diversidad a nivel molecular fue realizado a partir de la conformación de una colección nacional de germoplasma, utilizando una muestra reducida de materiales caracterizados mediante RAPDs (Balbi *et al.*, 1995). Capdevielle (1999) identificó marcadores asociados a calidad maltera (porcentaje de extracto), utilizando líneas avanzadas de la población Defra x Quebracho. Albín (2005) estudió la diversidad existente en genotipos con diferentes niveles de resistencia a mancha borrosa (*Cochliobolus sativus*) utilizando marcadores RAPDs para caracterizar los patrones de diversidad genética y marcadores microsatélites (SSRs) para realizar una descripción preliminar de la diversidad mediante genotipos gráficos. Gómez (2005) estudió la diversidad alélica para el gen *Bmy1*, que codifica beta-amilasa, en líneas avanzadas de los programas nacionales de mejoramiento y variedades en evaluación oficial. Castro *et al.* (2008) determinaron los componentes genéticos de la fenología de la población BCD47/Baronesse (dos genotipos similares en cuanto a perfiles de crecimiento y desarrollo) mediante análisis de QTL. En la misma población Castro *et al.* (2010) encontraron regiones con efectos de QTL coincidentes para dormancia de la semilla, sensibilidad al agua y caracteres de calidad maltera.

En síntesis, si bien en Uruguay ha habido interés en atender la problemática, teniendo la certeza de que la genómica tiene su sitio ganado como insumo básico en

el desarrollo de nuevos genotipos que superen limitantes de producción, es una herramienta poco explorada a nivel nacional. Internacionalmente, la cebada es uno de los cultivos con mayor desarrollo en genómica, pero en el Uruguay la utilización de esa información como apoyo en los programas de mejoramiento, si bien es de libre acceso al público, está limitada básicamente por dos causas: varias de las variables objetivo a nivel local no están incluidas en los análisis y el germoplasma incluido no es representativo del utilizado en el mejoramiento nacional.

La generación de información referente a las bases genéticas de las variables agronómicas de mayor importancia para la adaptación del cultivo de cebada en Uruguay puede ser un insumo de importancia para el desarrollo de estrategias más eficientes para la obtención de genotipos superiores. Con ese objetivo, el presente trabajo busca establecer la ubicación de efectos alélicos significativos para variables de importancia agronómica para la cebada en Uruguay. Para esto se analizaron 76 genotipos representativos del germoplasma que ha sido utilizado a nivel local, el cual se ha caracterizado genotípicamente con 1033 marcadores SNPs y para aislar las asociaciones marcador - carácter de los posibles efectos de estructura poblacional y confusión de identidad alélica ocasionados por el método de mapeo, se utilizó el modelo lineal mixto QK propuesto por Yu *et al.* (2006).

Una de las posibles limitantes que presenta este trabajo para cumplir con los objetivos planteados es el bajo tamaño poblacional utilizado. Pequeñas poblaciones (alrededor de 100 genotipos) en análisis de QTL son a menudo la causa principal de la pérdida de poder de detección de muchas asociaciones marcador – carácter (Melchinger *et al.*, 1998), además de la sobreestimación de los efectos de las asociaciones detectadas, imprecisión en la ubicación de los QTL y aumento de la tasa de detección de falsos positivos. Si bien esto es correcto, utilizando poblaciones pequeñas para MA, aumenta en cierto grado el DL dentro de la población (Hamblin *et al.*, 2010), favoreciendo de esta forma el poder de detección de QTL (Bradbury *et al.*, 2011). Por lo tanto, creemos que los estudios con poblaciones pequeñas podrían en algunos casos, presentar menor poder de detección que aquellos con grandes poblaciones, pero no por ello favorecer la tasa de falsos positivos.

Pensamos que nuestro estudio tiene como puntos fuertes el relativo alto número de marcadores y el uso de información de pedigrís complejos que permite utilizar el nivel de relacionamiento entre los individuos para mejorar las estimaciones de las regiones genómicas.

Se espera que este aporte sea un escalón más hacia un uso más eficiente del mejoramiento en el cultivo, teniendo además la posibilidad de un uso más fluido de las herramientas en genómica desarrolladas a nivel internacional.

2. GENOME-WIDE ASSOCIATION MAPPING OF AGRONOMIC TRAITS IN RELEVANT BARLEY GERMPLASM FOR URUGUAY

2.1. SUMMARY

The genetic basis of agronomic traits determining adaptation to specific production conditions is key to the improvement of crops, including malting barley (*Hordeum vulgare L.*). The aim of this study was to determine, the genome-wide genetic components associated with agronomic phenotypes of local and global significance in a population of 76 barley genotypes that have been introduced into Uruguay in different chronological periods. The phenotypic database was obtained from five plot trials, planted in two years and two locations, where a total of 13 agronomic traits were determined. The population was genotyped with 1033 polymorphic SNP markers. We found a total of 79 quantitative trait loci (QTL) for all the trait/experiment combinations analyzed. The highest concentration of QTL was detected on chromosomes 2H and 4H. Most QTL were detected for grain plumpness and weight. Two (linkage disequilibrium) LD blocks associated with a large number of traits were detected on 2HS. The most distal LD block was composed of three haplotypes, possibly derived from three ancestors of different geographical origin. We also detected three genomic regions in different chromosomes (2H, 5H and 7H) in LD between them, associated with agronomic traits. This study provides a contribution to the understanding of the genetics of barley adaptation in the Southern cone of South America.

Keywords: Association mapping – Agronomic adaptation – Quantitative trait loci (QTL) – Linkage disequilibrium mapping – SNP – Malting barley

2.2. RESUMEN

Las bases genéticas de las características agronómicas que determinan la adaptación a las condiciones de producción específicas es un aporte fundamental para el mejoramiento en cualquier especie agrícola, incluyendo la cebada cervecera (*Hordeum vulgare L.*). El objetivo de este estudio fue determinar dichos componentes genéticos mediante cartografía por desequilibrio de ligamiento (DL) en una población de 76 genotipos de cebada representativa del pasado y presente del germoplasma en Uruguay. La base de datos fenotípicos se obtuvo en cinco ensayos parcelarios sembrados en dos años y en dos localidades, donde se midieron 13 variables agronómicas. La población fue caracterizada genotípicamente con 1033 SNPs. Se encontraron 79 loci de efecto cuantitativo (QTL) para todas las combinaciones entre ensayos/caracteres analizadas. Los cromosomas con mayor número de QTL detectados fueron el 2H y el 4H. El peso y el tamaño de grano fueron las variables con mayor número de QTL detectados. Dos bloques de marcadores en desequilibrio de ligamiento (DL) asociados a un gran número de caracteres se observaron en el cromosoma 2HS. En el mayor, se identificaron tres haplotipos, posiblemente provenientes de tres ancestros comunes con diferente origen geográfico. También se detectaron regiones genómicas en DL entre los cromosomas 2H, 5H y 7H, en algunos casos asociadas a caracteres agronómicos. Creemos que este estudio contribuye significativamente al entendimiento de la genética de la adaptación agronómica de cebada en el cono sur de América del Sur.

Palabras clave: Mapeo asociativo – Adaptación agronómica – QTL (Quantitative trait loci) – Mapeo por desequilibrio de ligamiento – SNP – Cebada cervecera

2.3. INTRODUCTION¹

Barley (*Hordeum vulgare L.*) is the fifth most important cereal crop in terms of total world production (FAO, 2009, verified 19 July 2011), and the second most important spring crop in Uruguay, after wheat (MGAP, 2010, verified 19 July 2011). It is mainly used as a source of malt for brewing, which imposes several restrictions in terms of quality requirements. In order to provide farmers with an economical alternative, the continuous availability of adapted genotypes with increasing yield potential and malting quality is essential. Therefore, the knowledge of the genetic basis of traits associated with crop adaptation and yield potential in relevant germplasm for Uruguay is a key factor for the efficient development of improved cultivars.

Barley is planted in Uruguay in June/July and harvested in November. Winter are mild and temperatures increase rapidly during the spring, so late anthesis leads to grain filling under unfavorably high temperatures, decreasing yield and grain quality. Under these climatic conditions, certain agronomic traits become restrictive for obtaining high yields. Total biomass production is similar to values achieved in regions considered of higher yield potential for spring barley as Western Europe (Castro *et al.* 1997). Yield however, is significantly lower, showing that biomass partition (measured by the harvest index) rather than biomass production is the bottleneck for achieving high yield. During grain filling, sink capacity limits the yield potential of barley (Gallagher *et al.* 1995; Dreccer *et al.* 1997; Bingham *et al.* 2007) and wheat (Borrás *et al.* 2004). Slafer *et al.* (1994) conclude that grain yield of wheat is either sink-limited or co-limited by both source and sink but never source-limited. Considering that, it may be biologically possible to increase sink capacity through the increasing of the number of grains per unit area and/or its weight (Abeledo *et al.* 2002). The increase in number can be achieved through an increase of the number of spikes per area and/or an increase in the number of grains per spike. Other traits providing agronomic adaptability are heading date and grain filling. There is evidence in barley (Castro *et al.* 1997) and wheat (Loss and Sidique 1994)

¹ Este trabajo será enviado para su publicación a la revista Molecular Breeding.

that in cultivars with similar length of the emergence-physiological maturity period, harvest index and yield are negatively correlated with anthesis time and positively correlated with the duration of the grain filling period. Finally, the control of plant height can be used to reduce yield losses arising from lodging, therefore increasing harvest index (Bezant *et al.* 1996). Although in this geographic region agronomic traits such as plant height, spikes per area, grains per spike, grain weight, harvest index, flowering time and duration of grain filling were reported as key factors determining barley agronomic adaptation (Castro *et al.* 1997), there is limited knowledge about their genetic basis in the germplasm used in the region.

QTL mapping and more recently genome-wide association (GWA) mapping are the main tools used for the study of the genetic basis of complex characters. The latter has become feasible with the availability of abundant high-density maps of molecular markers. The technique, developed for its use in species that preclude the development of balanced populations (Flint-García *et al.* 2003), is based in the detection of significant linkage disequilibrium (LD) between a molecular marker and a phenotypic trait (Gupta *et al.* 2005). Among the advantages presented by this method for plants as compared to classical QTL analysis are the use of a broad genetic base, the possibility of including a more representative genetic background (as it does not need a segregating or balanced population), the higher robustness of the results and the possibility of use of phenotypic information previously collected (Kraakman *et al.* 2004).

The genetic components determining agronomic traits were studied using QTL analysis in several mapping populations: Blenheim/E224/3 (Barua *et al.* 1993), Steptoe/Morex (Hayes *et al.* 1993), Igri/Triumph (Laurie *et al.* 1995), Tysofte Prentice/Vogelsanger Gold (Kjaer and Jensen 1996), Harrington/TR306 (Tinker *et al.* 1996), Blenheim/Kym (Bezant *et al.* 1997), Vada/L94 (Qi *et al.* 1998), Prisma/Apex (Yin *et al.* 1999), Chevron/M69 (de la Peña *et al.* 1999), Harrington/Morex (Marquez-Cedillo *et al.* 2000), Brenda/HS584 (Li *et al.* 2006). A more detailed review is available at <http://barleyworld.org/northamericanbarley/QTLsum9150x.htm> (verified 19 July 2011). However, most of the QTL reports refer to a limited number of easily

measurable traits such as plant height and heading date and the germplasm used is not representative of South America.

GWA mapping has been applied in barley. The focus has been on yield (Comadran *et al.* 2008), stability (Kraakman *et al.* 2004), vernalization requirement (Cockram *et al.* 2008), low temperature tolerance (Von Zitzewitz *et al.* 2011), phenology (Stracke *et al.* 2009), spot blotch resistance (Roy *et al.* 2010), fusarium head blight resistance (Massman *et al.* 2011) and plant height, heading date, leaf rust, barley yellow dwarf virus (BYD) resistance and morphological traits (rachilla hair length, lodicules size) (Kraakman *et al.* 2006). There are very few GWA studies focused on mapping complex traits such as yield and none for many of the key components of the agronomic adaptation of barley in the southern cone of South America.

The objective of this research is to determine the genetic regions associated to traits for the adaptation of barley to Uruguayan environmental conditions and their genomic location, in relevant germplasm for spring malting barley breeding in spring barley breeding germplasm. We used a germplasm collection representative of barley breeding in Uruguay, a throughout genotypic and phenotypic characterization and appropriate GWA analysis tools.

2.4. MATERIALS AND METHODS

2.4.1. Plant Material and Phenotyping

We used a population of 76 spring barley genotypes, mostly two-row (except from two six-row genotypes: Karl and Atlas 57), consisting of historical varieties commercially used in Uruguay, advanced lines from breeding programs, ancestors present in the pedigree of several varieties used in the country and malting quality sources (Table 1). The population was characterized in five field experiments, planted at two locations in Uruguay. Three experiments were planted at Paysandú (Experimental Station 'Dr Mario A. Cassinoni', 58° 03'W, 32° 55'S) the 16th of July of 2007 (Pay07), the 24th of June of 2008 (Pay08a) and the 4th of August of 2008 (Pay08b). The other two experiments were planted at Ombúes de Lavalle (57° 50'W, 33° 55'S) the 9th of July of 2007 (Col07) and 10th of July of 2008 (Col08).

We evaluated thirteen agronomic traits: plant height ($PH_{(g)}$), yield ($YLD(Kg\ ha^{-1})$), biomass ($BM(Kg\ ha^{-1})$), harvest index (HIN), grain plumpness measured as the percentage of grains with larger diameter than 2.8 mm ($GP2$) and percentage of grains with larger diameter than 2.5 mm (GPI), weight of 1000 grains ($TGW(g)$), spikes per squared-meter (SPM^2), grains per spike (GS), grains per squared-meter (GM^2), coefficient of variation of grains per spike ($CVGS(\%)$), time to anthesis (HD) and duration of grain filling period (GF) both measured in days.

The plot size in Col07 and Col08 was 2.5 m² (5m long, 3 rows separated by 0.15m), while that Paysandú experiments, the plot size was 3.6 m² (4m long, 6 rows separated by 0.15m).

The experimental design was an augmented unreplicated α -lattice with 15 random incomplete blocks, with six repeated checks in five replications. The trials were kept free of weeds and diseases by spraying with agrochemicals.

2.4.2. Genotyping

DNA for genotyping was extracted of each genotype. Leaf segments (5-8 cm lengths) from 2-week-old seedling were cut and freeze-dried in 2.0 ml Eppendorf tubes. DNA was then extracted following a modified sodium dodecyl sulphate (SDS) method (Pallota *et al.* 2003). The general quality and quantity of DNA was verified on a 0.8% agarose gel.

For the genotypic characterization the first barley oligonucleotide pool assay (BOPA 1) was used, established for the Coordinated Agricultural Project (CAP) (www.barleycap.org.uy) containing allele-specific oligos for a set of 1536 SNPs, following the protocols of Illumina's GoldenGate Bead Array Technology (Illumina, San Diego, CA, USA) (Fan *et al.* 2003; 2006; Olliphant *et al.* 2002). SNP genotyping was done at the University of Minnesota. Details on the development of the OPAs are described elsewhere (Close *et al.* 2009; Szűcs *et al.* 2009).

To eliminate any markers with potential errors in allele calls, we removed all markers and individual with more than 10% missing data points. Each marker with less than 10% minor allele frequency was also excluded. The estimated positions of the SNPs are based on the consensus map developed by Close *et al.* 2009, and are available by downloading the 1.77 version of the barley HarvEST database (<http://harvest.ucr.edu>; verified 19 July 2011). The SNPs were referred to the bins described by Kleinhofs and Graner (2001).

Table 1 Composition of the population based upon country of origin, time of release and germplasm type.

Genotype	Country of origin	Year ^a	Germ. ^b	Genotype	Country of origin	Year ^a	Germ. ^b
Baronesse	Germany	1989	CULT	Logan	USA	1994	CULT
Berolina	Germany	1984	CULT	ND14016	USA	1994	EXPL
Bido	Germany	1960	CULT	ND14600	USA	1993	EXPL
Cheri	Germany	1987	CULT	ND15140	USA	1994	EXPL
Clivia	Germany	1985	CULT	ND 10277	USA	1994	EXPL
Danuta	Germany	2000	CULT	Aurore	France	1993	CULT
Defra	Germany	1984	CULT	Beka	France	1954	CULT
Haisa	Germany	1939	CULT	Pl. Archer	U. Kindom	1914	CULT
Isaria	Germany	1924	CULT	Diamant	C. Republic	1965	CULT
Lisa	Germany	1969	CULT	Hanna	C. Republic	1895	CULT
Piroline	Germany	1957	CULT	Perun	C. Republic	1987	CULT
Scarlett	Germany	1995	CULT	Gull	Sweden	1913	CULT
Trumpf	Germany	1973	CULT	Ymer	Sweden	1985	CULT
Union	Germany	1955	CULT	Ambev 488	Uruguay	2003	CULT
Villa	Germany	1965	CULT	C 8730	Uruguay	1999	EXPL
Volla	Germany	1957	CULT	C 8806	Uruguay	1999	EXPL
WMR I	Germany	1930	EXPL	C 8828	Uruguay	2002	EXPL
Ana	Argentina	1978	CULT	C 9035	Uruguay	2002	EXPL
Bonita	Argentina	1973	CULT	C 9038	Uruguay	2002	EXPL
FNC I-22	Argentina	1982	CULT	C 9046	Uruguay	2002	EXPL
Magnific 102	Argentina	ND	CULT	C 9053	Uruguay	2002	EXPL
Magnific 104	Argentina	ND	CULT	C 9172	Uruguay	2003	EXPL
Malt. Heda	Argentina	1943	CULT	C 9173	Uruguay	2003	EXPL
Q. Ayelen	Argentina	1996	CULT	C 9205	Uruguay	2003	EXPL
Q. Pampa	Argentina	1982	CULT	C 9315	Uruguay	2004	EXPL
Clipper	Australia	1968	CULT	C 9528	Uruguay	2006	EXPL
Prior	Australia	1903	CULT	C 9616	Uruguay	2007	EXPL
Quebracho	Australia	1990	CULT	Carumbe	Uruguay	1998	CULT
Stirling	Australia	1982	CULT	CLE 176	Uruguay	1999	CULT
Br2	Brazil	1999	CULT	CLE 178	Uruguay	1999	CULT
Mn 599	Brazil	1988	CULT	CLE 202	Uruguay	2001	CULT
Mn 610	Brazil	1990	EXPL	CLE 203	Uruguay	2001	CULT
Harrington	Canada	1981	CULT	CLE 226	Uruguay	2005	CULT
Kenia	Denmark	1931	CULT	CLE 232	Uruguay	2005	EXPL
Atlas 57	USA	1959	CULT	CLE 233	Uruguay	2005	CULT
BCD 47	USA	2000	CULT	Dayman	Uruguay	1999	CULT
Bowman	USA	1984	CULT	FNC 1	Uruguay	1981	CULT
karl	USA	1974	CULT	FNC 6-1	Uruguay	1987	CULT

^aYear of release. For the EXPL, the likely date of release was estimated as the year when they completed three years of evaluation in official tests. **ND**: no data.

^bType of germplasm: **CULT**: Genotype used as a commercial cultivar, **EXPL**: experimental line.

2.4.3. Kinship and Population Structure

The population structure was estimated by developing a matrix of population structure (Q matrix) using the program STRUCTURE version 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). To estimate the number of groups we used three runs of 10000 simulations after discarding 10000 burnin simulations for values of K between 1 and 10. To incorporate the possibility of linkage between the markers we used the Linkage model. (Falush *et al.* 2003). According to the criteria proposed by Pritchard *et al.* 2000, in which the resolution of the number of groups were established based on the least number of them that produces a significant increase in the probability of belonging to the groups, four groups were established. The probability of belonging to each group (Q^i) was then estimated with 100000 simulations after discarding 10000 burnin simulations.

From pedigree data, kinship relationships among individuals was estimated using coancestry coefficient (f) (Malecot 1949), with the procedure developed by Condón (2006). A cluster analysis to group genotypes using a dissimilarity coefficient based on pedigree information was performed in SAS statistical software (SAS Institute, 2004). We used the Ward method (Ward 1963) of clustering to group similar genotypes based on coancestry. It is a hierarchical method that groups lines producing the least increase in the sum of squares within groups (Manly 1988). The cubic clustering criterion and pseudo-F were used to decide on the number of groups (SAS Institute, 2004; Franco *et al.* 2005). Pedigree data were obtained from cultivar descriptions, records of local breeding programs, personal communication with breeders, databases available on line (GRIN: <http://www.ars-grin.gov/npgs/>; CPRO: <http://www.cpro.dlo.nl/cgn/database/>, Nordic Gene Bank (NGB): <http://tor.ngb.se/Databases/>, the Bayerische LFL: <http://www.lfl.bayern.de/ipz/gerste/09740/>), and published records (Baum *et al.* 1985, Arias *et al.* 1983; Fitzsimmons and Wrigley 1984; Luizzi and Castro 1992).

2.4.4. Phenotypic Analysis

Phenotypic results were analyzed using the following model:

$$Y_{ijkl} = G_i + E_j + TE_{(ij)} + B_{k(j)} + Sbl_{(jk)} + e_{ijkl}$$

where: G_i = effect of i-th genotype, E_j = effect of j-th trial, $GE_{(ij)}$ = effect of interaction between the i-th genotype and j-th trial, B_k = incomplete block within trial, Sbl = sub-block within trial, e_{ijkl} = experimental error. G , E and GE are fixed effects and the other are random effects. The analysis was performed using PROC MIXED in SAS 9.0 (SAS Int. 2004). The least square means of all traits and all genotypes in each trial were used for association analysis.

2.4.5. Association Analysis

To determine the associations between molecular markers and quantitative traits the following linear mixed model was used:

$$y = X\beta + Qv + Ku + e$$

where X is the matrix of molecular markers, β is the vector of parameters related to the simple regression of the markers on the phenotype, Q is the matrix structure that gives the probability of belonging of each individual in a sub-population, v is a vector of effects of each group or sub-population, K is the identity matrix, u is the vector of background polygenic effects, e is the vector of random errors. The analysis was performed using TASSEL, version 2.0.1 (Bradbury *et al.* 2007). The model used was the mixed linear model (MLM, Q + K) (Yu *et al.* 2006).

By considered the existence of significant trait-marker association a false discovery rate (FDR) (Benjamini and Hochberg 1995) of $p < 0.05$ was used. The criteria used to define a QTL was to detect a significant marker/trait association with an FDR of $p \leq 0.05$, and considering marker–trait associations for the same trait with a linkage distance lower than a 10-12 cM and LD (measured as r^2 from pair-wise analysis) higher than 0.20 as part of the same QTL.

2.5. RESULTS

2.5.1. Genotyping

From the 1536 SNP, 1033 were informative for analysis. The average marker density was 1.08 cM/marker. The chromosome with the highest marker density was 1H (0.90 cM/marker) and the one with the lowest density was 7H (1.43 cM/marker). Gaps larger than 3 cM without markers were found in Bins 4 and 8 on chromosome 1H and in the Bins 9 and 10 on chromosome 7H.

2.5.2. Structure and Relatedness of the Germplasm

A total of five major groups were identified based on information of relatedness between individuals (pedigree) of the population estimated by the coefficient of coancestry (f) (Fig. 1). One group includes the variety Quebracho (of Australian origin), the old variety Ymer (which is in Quebracho ancestry) and their offspring (Group 1). Another group is composed mainly by genotypes from the North Dakota State University (NDSU) breeding program and their offspring (Group 2). The third group consists mainly of dwarf European genotypes. The fourth group includes other European genotypes and their offspring. The last consists of genotypes without a significant degree of kinship. The f of the population ranged from 0 to 0.939, averaging 0.064.

The analysis of the population genetic structure (using Bayesian methods in STRUCTURE) indicated an optimum number of four groups (Fig. 1). The grouping was relatively consistent with that made with the pedigree data. We could identify the groups with materials mostly from North Dakota, the group with Quebracho, Ymer and his descendants, the group with semi-dwarf European genotypes and their offspring and the group with European genotypes.

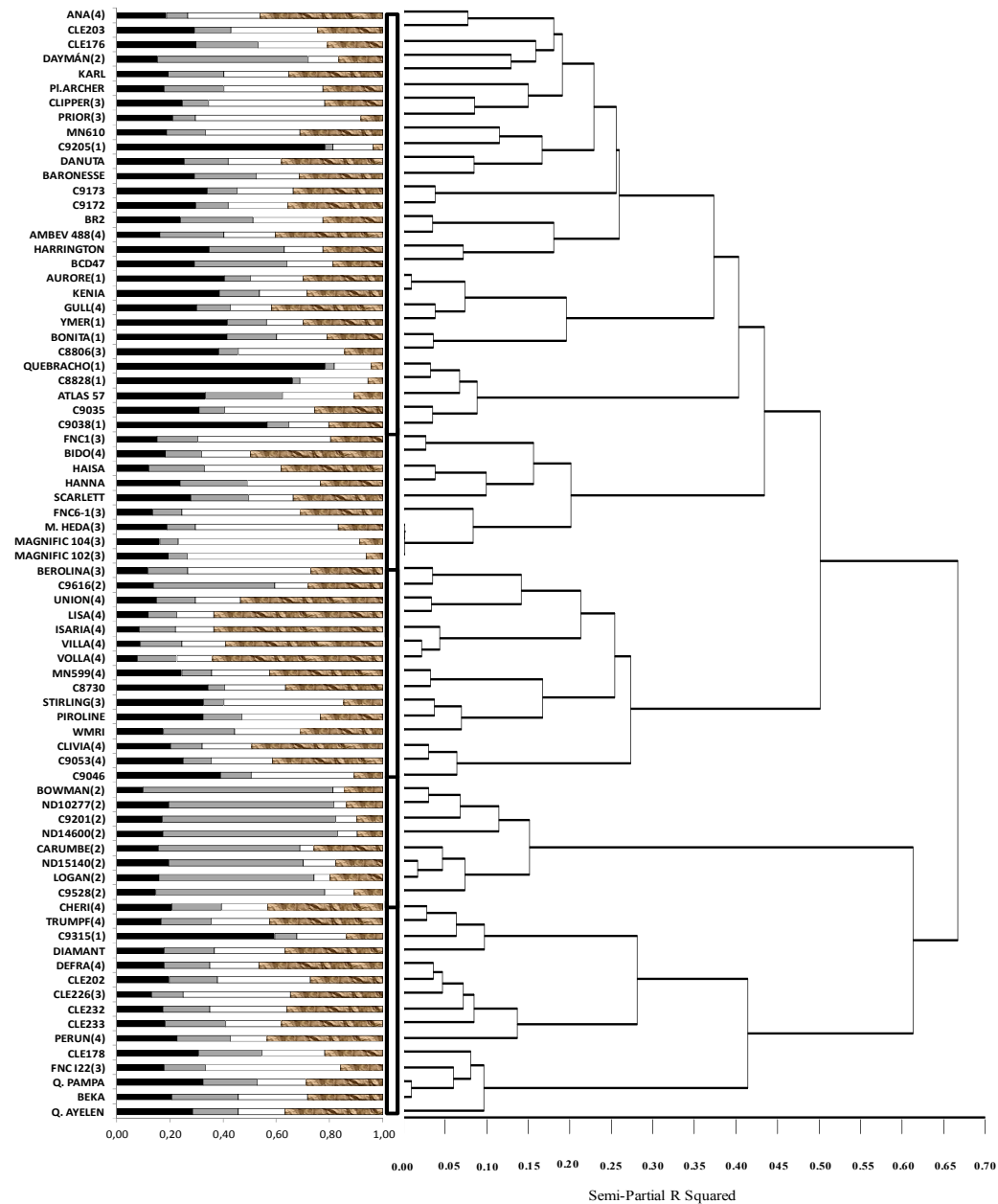


Fig. 1 STRUCTURE output for $K = 4$ and dendrogram of the genotypes according to their coancestry. To the left of the figure: each individual is represented by a column partitioned in four coloured segments that represent the individual's estimated membership fractions to each one of the four clusters. Black: Group 1, Gray: Group 2, White: Group 3, Degraded: Group 4. The numbers to the right of the genotype names correspond to the group with largest probability of belonging. Genotypes without number could not be awarded to any group. The center of figure: the bar segments represent the groups formed based on the cubic

clustering criterion and pseudo-F function of SAS 9.0 (SAS Inst. 2004) from pedigree data. To the right of the figure: dendrogram constructed from pedigree information using Ward method (Ward 1963) and inferred population structure base on 1033 SNP markers using STRUCTURE.

2.5.3. Phenotyping and Genome-Wide Association Mapping

Environmental conditions at both locations (Paysandú and Ombúes de Lavalle) showed variations between years, both in temperature and rainfall (Fig. 2). Temperatures during 2007 were generally lower than the historical average. Rainfall was also lower than the historical average except from October, when it was significantly above the average. For 2008, temperatures were above and rainfall below the historical averages. Col07 and Col08 were the experiments with lowest yield (Table 2). Correlation between traits was different in these two experiments compared with the ones at Paysandú (Table 3). Low-yielding conditions reflected in SPM^2 and GS averages, while TGW and HIN showed some level of compensation (Table 2). Grain size and weight (TGW , $GP1$ and $GP2$) did not correlate with GS at Ombúes de Lavalle and had a significant and negative correlation at Paysandú. For the experiments at Paysandú, early planting experiments (Pay07 and Pay 08a) had a significant and positive correlation between TGW and GF , while the late planting experiment (Pay08b) showed lower correlation between these traits (Table 3).

A total of 79 QTL were detected for the trait/experiment combinations (Table 4). The p -value equivalent to a FDR of $p \leq 0.05$ for the tests ranged from 0.0013 for HIN in Pay08b to 0.00000018 also for HIN in Pay08a, averaging 0.00024 for all significant associations. Significant QTL were detected for all traits studied, with an average of 6.1 per trait. Most of the QTL (53 out of 79) were detected in the experiments conducted at Paysandú (Pay07, Pay08a and Pay08b). A much lower number of QTL (13) was detected in experiments Col07 and Col08, and 13 QTL were detected in both locations. In many cases the effects were significant in only one environment, but there were no cross-over between favorable alleles in different environments.

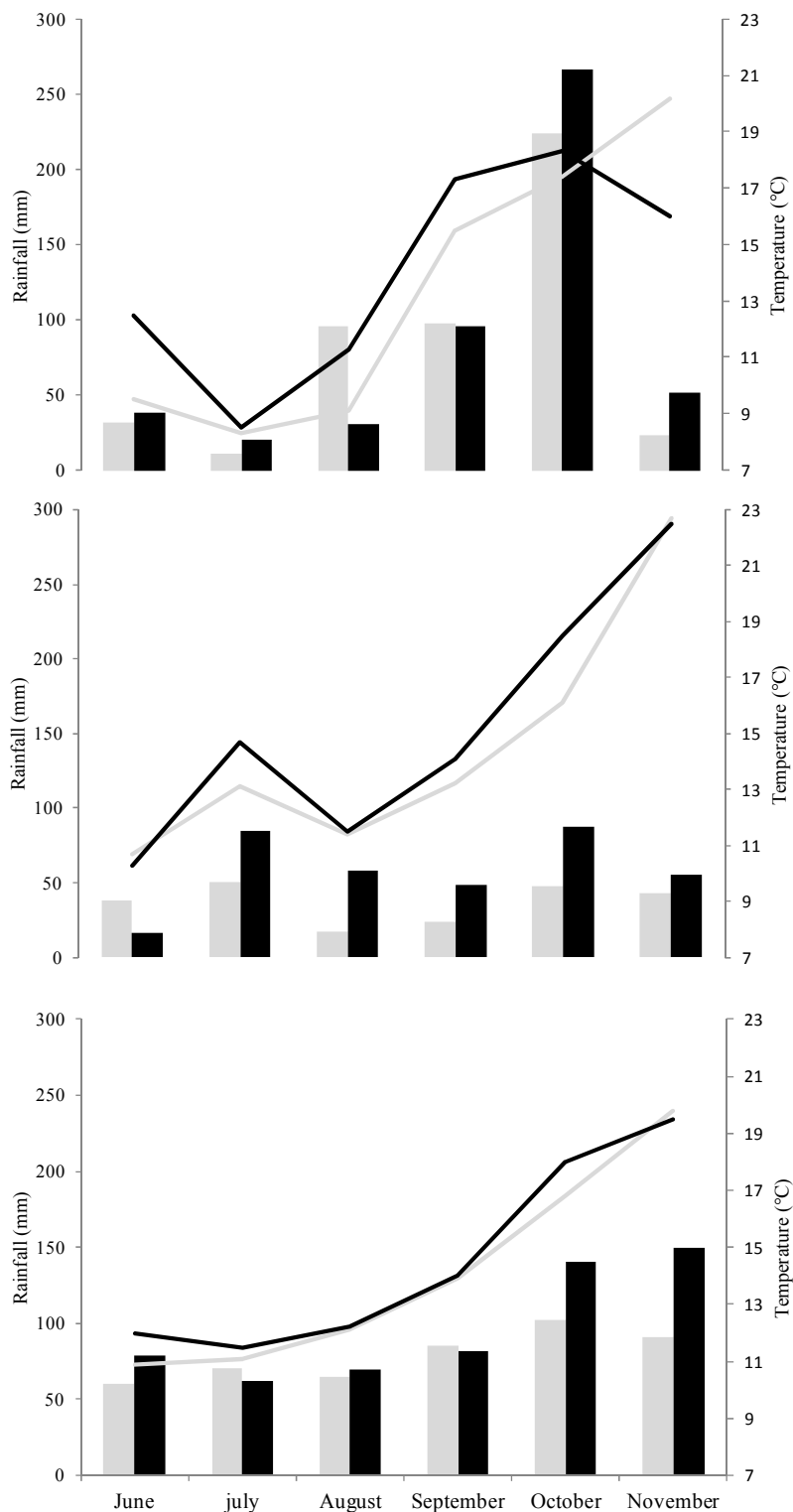


Fig. 2 Rainfall (bars) and temperature (lines) in Ombúes de Lavalle (light gray) and Paysandú (black). a) 2007, b) 2008, c) historical averages.

Table 2 Least square means and variations coefficient (in parenthesis) of the traits by experiment.

Trait	Experiments				
	Col07	Col08	Pay07	Pay08a	Pay08b
YLD (ton/ha)	2.46(25.2)	1.93 (24.2)	3.72 (17.1)	5.10 (15.9)	4.58 (17.2)
GM² (thousand)	6.68 (23.8)	4.94 (20.5)	10.2 (16.7)	13.93 (13.5)	12.98 (14.7)
SPM²	380.0 (23.6)	241.3 (22.0)	511.6 (23.8)	533.2 (15.1)	583.2 (18.7)
GS	17.8 (17.1)	20.7 (12.4)	20.7 (21.1)	26.4 (13.0)	22.7 (16.1)
TGW (g)	36.53 (9.52)	39.50 (12.7)	37.18 (10.6)	36.6 (11.9)	35.2 (11.4)
BM (ton/ha)	4.89 (23.8)	3.91 (13.6)	10.00 (13.3)	17.05 (9.5)	11.19 (7.9)
HIN	0.41 (13.1)	0.40 (21.5)	0.32 (14.8)	0.30 (14.8)	0.37 (15.0)
GP2 (%)	47.8 (37.7)	30.6 (73.9)	48.4 (40.0)	51.1 (44.7)	40.6 (45.7)
GPI (%)	86.0 (10.5)	75.2 (28.8)	82.7 (14.2)	81.9 (17.4)	76.5 (18.4)
CVGS	27.6 (29.9)	19.8 (25.5)	24.3 (38.8)	13.7 (20.2)	16.5 (27.8)
HD (days)	ut	ut	73.3 (7.0)	81.9 (6.3)	65.0 (6.8)
GF (days)	ut	ut	39.6 (9.5)	40.3 (10.7)	32.6 (16.9)
PH (cm)	ut	ut	68.7 (8.3)	83.7 (20.2)	62.3 (11.5)

ut: unmeasured traits

Table 3 Phenotypic correlation matrix by experiment of the traits analyzed in the population grown in Ombúes de Lavalle (Col07 and Col08) and Paysandú (Pay07, Pay08a and Pay08b).

Traits		GM ²	SPM ²	GS	TGW	BM	HIN	GP2	GP1	CVGS	HD ¹	GF ¹	PH ¹
YLD	Pay07	0.78***	0.62***	-0.17	0.35**	0.64***	0.57***	0.45***	0.47***	-0.07	-0.16*	0.21*	-0.01
	Col07	0.91***	0.67***	0.29**	0.31**	0.85***	0.41***	0.23*	0.28**	-0.38***	ut	ut	ut
	Pay08a	0.66***	0.67***	-0.05	0.48***	0.31**	0.82***	0.55***	0.61***	-0.20*	-0.14	0.12	-0.35**
	Pay08b	0.73***	0.69***	-0.21	0.54***	0.71***	0.84***	0.65***	0.61***	-0.24	-0.60***	0.09	-0.21
GM ²	Col08	0.70***	0.61***	-0.01	0.46***	0.59***	0.60***	0.44***	0.43***	-0.11	ut	ut	ut
	Pay07	1	0.54***	0.11	-0.26*	0.64***	0.31**	-0.09	-0.07	-0.26**	0.25*	-0.19	0.04
	Col07	1	0.74***	0.33***	-0.07	0.81***	0.32**	-0.10	-0.01	-0.34**	ut	ut	ut
	Pay08a	1	0.74***	0.27*	-0.33*	0.18	0.53***	-0.16	-0.04	-0.03	0.35**	-0.24	-0.46***
SPM ²	Pay08b	1	0.69***	0.05	-0.17	0.55***	0.64***	0.05	0.01	-0.25*	-0.11	-0.12	-0.24*
	Col08	1	0.85***	0.06	-0.07	0.48***	0.68***	-0.01	0.01	-0.03	ut	ut	ut
	Pay07	1	1	-0.71***	0.17	0.32**	0.46***	0.32**	0.37**	0.38***	-0.28*	0.30**	0.00
	Col07	1	1	-0.34*	-0.07	0.73***	0.11	-0.09	0.07	-0.07	ut	ut	ut
GS	Pay08a	1	1	-0.40***	-0.03	0.05	0.63***	0.11	0.20	-0.21*	0.18	-0.21	-0.52***
	Pay08b	1	1	-0.65***	0.15	0.41***	0.67***	0.33**	0.32**	-0.11	-0.28**	0.03	-0.20
	Col08	1	1	-0.45***	-0.01	0.38***	0.59***	0.02	0.06	0.14	ut	ut	ut
	Pay07	1	1	1	-0.45***	0.05	-0.28*	-0.47***	-0.52***	-0.57***	0.45***	-0.48***	0.02
TGW	Col07	1	1	1	-0.02	0.15	0.19*	-0.05	-0.14	-0.24*	ut	ut	ut
	Pay08a	1	1	1	-0.37**	0.18	-0.20	-0.34**	-0.34**	0.31*	0.17	-0.04	0.12
	Pay08b	1	1	1	-0.39***	-0.06	-0.24*	-0.41***	-0.45***	0.010	0.18	-0.07	-0.03
	Col08	1	1	1	-0.10	0.05	0.01	-0.06	-0.12	-0.21*	ut	ut	ut
BM	Pay07	1	1	1	1	-0.06	0.46***	0.87***	0.86***	0.28	-0.61***	0.63***	-0.12
	Col07	1	1	1	1	0.09	0.36**	0.82***	0.75***	-0.17	ut	ut	ut
	Pay08a	1	1	1	1	0.15	0.44***	0.89***	0.84***	-0.19*	-0.61***	0.42**	0.11
	Pay08b	1	1	1	1	0.34**	0.49**	0.89***	0.87***	-0.04	-0.67***	0.28**	-0.01
HIN	Col08	1	1	1	1	0.32**	0.35***	0.90***	0.88***	-0.12	ut	ut	ut
	Pay07	1	1	1	1	1	-0.21	0.02	0.03	-0.28*	0.14	-0.13	0.14
	Col07	1	1	1	1	1	-0.06	0.08	0.19	-0.21	ut	ut	ut
	Pay08a	1	1	1	1	1	-0.20	0.10	0.12	0.04	0.17	-0.09	0.07
GP2	Pay08b	1	1	1	1	1	0.33*	0.44***	0.41***	-0.13	-0.41**	-0.02	-0.01
	Col08	1	1	1	1	1	-0.02	0.23*	0.25*	-0.01	ut	ut	ut
	Pay07	1	1	1	1	1	1	0.54***	0.54***	0.24*	-0.32**	0.40***	-0.07
	Col07	1	1	1	1	1	1	0.26*	0.18	-0.40***	ut	ut	ut
GP1	Pay08a	1	1	1	1	1	1	0.55***	0.62***	-0.21*	-0.20*	0.08	-0.42***
	Pay08b	1	1	1	1	1	1	0.59***	0.56**	-0.22	-0.51***	0.15	-0.30**
	Col08	1	1	1	1	1	1	0.42***	0.39**	-0.10	ut	ut	ut
	Pay07	1	1	1	1	1	1	0.94***	0.34**	-0.61***	0.62**	-0.09	
CVGS	Col07	1	1	1	1	1	1	0.89***	-0.16	ut	ut	ut	
	Pay08a	1	1	1	1	1	1	0.94***	-0.23*	-0.58***	0.37***	0.05	
	Pay08b	1	1	1	1	1	1	0.93***	-0.07	-0.68***	0.21*	-0.05	
	Col08	1	1	1	1	1	1	0.85***	-0.14	ut	ut	ut	
HD ¹	Pay07	1	1	1	1	1	1	0.38***	-0.60***	0.62**	-0.08		
	Col07	1	1	1	1	1	1	1	-0.18	ut	ut	ut	
	Pay08a	1	1	1	1	1	1	1	-0.22	-0.44***	0.27**	-0.10	
	Pay08b	1	1	1	1	1	1	1	0.01	-0.60***	0.28**	-0.08	
GF ¹	Col08	1	1	1	1	1	1	1	-0.10	ut	ut	ut	
	Pay07	1	1	1	1	1	1	1	1	-0.39***	0.36**	-0.03	
	Col07	1	1	1	1	1	1	1	1	ut	ut	ut	
	Pay08a	1	1	1	1	1	1	1	1	0.04	0.09	0.13	
PH ¹	Pay08b	1	1	1	1	1	1	1	1	-0.01	0.08	-0.05	
	Col08	1	1	1	1	1	1	1	1	ut	ut	ut	
	Pay07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0.88***	-0.09	
	Col07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ut	ut	
GF ¹	Pay08a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0.85***	-0.31**	
	Pay08b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0.30**	0.22*	
	Col08	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ut	ut	
	Pay07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.07	
PH ¹	Col07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ut	
	Pay08a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.22	
	Pay08b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0.11	
	Col08	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ut	

¹ Traits measured only in the environment: Pay07, Pay08a and Pay08b.

p* value < 0.05, *p* value < 0.01, ****p* value < 0.001.

A relatively high proportion of the QTL were detected for grain-related traits. For *GP2*, a total of fourteen QTL were detected in all chromosomes except 1H and nine QTL were detected for *GPI* on four chromosomes (Table 4). In the case of *TGW* a total of eleven QTL were detected in all chromosomes except 3H. Several of the QTL for *GPI*, *GP2* and *TGW* were coincident. The most significant association was detected with the marker 11_20748 located on the short arm of 2H (56.3cM), which was associated significantly with *GP2* and *GPI* for all the experiments, with *p*-values always lower than 0.001 and in some cases lower than 0.000001. Of all the genotypes analyzed, seventy-one percent have the favorable allele for this marker. For *TGW*, this marker was significantly associated in Pay07 ($p \leq 0.0001$), Pay08b ($p \leq 0.000001$) and Pay08a ($p \leq 0.00001$). This marker was found in LD ($r^2 > 0.2$) with a group of four neighboring markers (11_20891, 11_21388, 11_11522, 11_10422), but only 11_20891 was significantly associated with the same variables (with a $r^2 = 0.82$ with 11_20748) (Fig. 3a).

For *YLD* eight QTL were detected at three experiments (Col07, Pay08a and Pay08b) on five chromosomes (Table 4). No yield QTL was detected in Pay07 and Col08. Only one QTL was detected in more than one environment: the one detected on chromosome 1H (11_11509, 135.6 cM) for Pay08a ($p \leq 0.0001$) and Pay08b ($p \leq 0.00001$). Fifty-three percent of the genotypes analyzed had the favorable allele for this marker.

The traits with the lower number of detected QTL were *GS* and *CVGS*. Only one region with significant QTL effects was detected for each trait. The QTL associated to *GS* was on the short arm of 2H (11_21166, at 66.8cM) in Pay07 ($p \leq 0.0001$), while the QTL associated to *CVGS* was detected on chromosome 6H (11_10331, at 81.2cM) in Pay08a ($p \leq 0.0001$). The favorable allele of 11_21166 (associated with *GS*) was present in fifty-three percent of the genotypes and the favorable allele of 11_10331 (*CVGS*) was present in only nineteen percent of the genotypes.

Table 4 QTL for agronomic traits detected in the five experiments.

Trait ^a	Chr ^b	Marker ^c	cM ^d	Bin ^e	Col07 ^f		Pay07 ^f		Col08 ^f		Pay08a ^f		Pay08b ^f		Population ^h	Reference
					<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g		
YLD	1H	11_11509	135.6	11	NS		NS		NS		***	380.3	****	448.4	Step toe/Morex Brenda/HS584	Hayes <i>et al.</i> 1993
	2H	11_20748	56.3	5	NS		NS		NS				***	419.4	Brenda/HS584 A. Mapping	Li <i>et al.</i> 2006 Comadran <i>et al.</i> 2008
	2H	11_10656	128.3	9	**	312.5	NS		NS		NS		NS		A. Mapping Tysofte/Prentice/Vogensalger Gold	Psawarayi <i>et al.</i> 2008 Kjaer and Jensen (1996)
	4H	11_10052	65.1	5	NS		NS		NS		NS		***	428.7	Harrington/Morex	Marquez <i>et al.</i> 2000 Rostocks <i>et al.</i> 2006
	5H	11_10116	50.3	2	***	452.8	NS		NS		NS		NS		Bleinhem/Kym Harrington/TR306	Bezant <i>et al.</i> 1997 Tinker <i>et al.</i> 1996 Rostocks <i>et al.</i> 2006
	5H	11_11350	104.5	6	***	305.3	NS		NS		NS		NS		A. mapping Step toe/Morex	Comadran <i>et al.</i> 2008 Hayes <i>et al.</i> 1993
	5H	11_20884	137.2	8	**	332.8	NS		NS		NS		NS		A. mapping Step toe/Morex	Comadran <i>et al.</i> 2008 Psawarayi <i>et al.</i> 2008 Hayes <i>et al.</i> 1993
	7H	11_20652	111.0	7	**	390.5	NS		NS		NS		NS		Bleinhem/Kym Harrington/TR306 A. mapping A. mapping	Bezant <i>et al.</i> 1997 Tinker <i>et al.</i> 1996 Comadran <i>et al.</i> 2008 Psawarayi <i>et al.</i> 2008
GM ²	1H	11_21219	66.7	7	NS		**	268.8	NS		NS		NS			
	1H	11_11509	135.6	11	NS		NS		NS		NS		****	1158		
	2H	11_21088	128.3	9	***	965.5	NS		NS		NS		NS			
	3H	11_11258	52.5	4	NS		NS		NS		NS		**	1313		
	5H	11_11350	104.6	6	***	809.1	NS		NS		NS		NS			
	5H	11_10217	153.5	9	NS		NS		**	589.9	NS		NS			
	7H	11_10576	41.8	3	NS		NS		NS		***	2268.1	NS			
SPM ²	1H	11_20959	117.8	10	NS		NS		NS		***	63.2	NS			
	1H	11_11509	135.6	11	NS		NS		NS		***	45.7	****	65.8		
	2H	11_10191	63.5	5	NS		NS		NS		NS		**	63.3		
	3H	11_11258	52.5	4	NS		NS		NS		**	54.0	**	78.3		
	4H	11_20906	65.1	5	NS		NS		NS		****	52.3	**	52.7		
	6H	11_21339	58.6	5	NS		NS		NS		NS		***	53.9		
GS	2H	11_21166	66.8	6	NS		***	2.52	NS		NS		NS			
TGW	1H	11_20754	99.9	9	NS		NS		NS		NS		**	1.83		
	2H	11_21265	28.4	3	NS		NS		****	2.45	**	1.7	**	1.58	Bleinhem/Kym Tysofte/Prentice/Vogensalger Gold	Bezant <i>et al.</i> 1997 Kjaer <i>et al.</i> 1996
	2H	11_20891	56.3	5	NS		NS		***	2.05	*****	2.26	****	1.9	Brenda/HS584	Li <i>et al.</i> 2006 Rostocks <i>et al.</i> 2006
	2H	11_10446	125.5	9	NS		NS		NS		NS		**	1.67		
	4H	11_10668	44.9	4	**	1.71	NS		NS		***	2.21	****	2.05		

Continue table 4...

Trait	Chr	Marker	cM	Bin	Col07	Pay07		Col08	Pay08a		Pay08b		Population ^h	Reference	
					<i>p</i>	<i>p</i>	<i>asc</i> ^g	<i>p</i>	<i>asc</i> ^g	<i>p</i>	<i>asc</i> ^g				
	4H	11_20412	55.6	5	NS	NS		NS	***	2.11	**	1.71			
	5H	11_10845	142.2	8	NS	NS		NS	**	3.98	***	3.66			
	6H	11_20996	93.1	6	NS	NS		NS	**	2.04	NS		Brenda/HS584	Li <i>et al.</i> 2006	
	7H	11_20710	3.3	1	NS	NS		NS	**	2.85	NS		Bleinheim/Kym	Bezant <i>et al.</i> 1997	
	7H	11_10576	41.8	3	NS	NS		NS	NS		**	2.98			
	7H	11_20485	88.6	6	NS	NS		NS	**	4.98	**	4.13	Brenda/HS584	Li <i>et al.</i> 2006	
HIN	1H	11_20959	117.8	10	NS	NS		NS	**	0.030	NS				
	1H	11_11509	135.6	11	NS	NS		NS	***	0.020	**	0.024			
	2H	11_21261	28.4	3	NS	NS		NS	**	0.020	NS				
	2H	11_20748	56.3	5	NS	NS		NS	NS		**	0.030			
	3H	11_11258	52.5	4	NS	NS		NS	*****	0.040	**	0.040			
	3H	11_21427	141.5	9	NS	NS		NS	NS		*	0.030			
	4H	11_10262	55.6	5	NS	NS		NS	NS		**	0.030			
	4H	11_21087	62.1	5	NS	NS		NS	***	0.030	NS				
BM	2H	11_20943	149.6	10	NS	NS		NS	**	869.8	NS				
	3H	11_20172	16.3	2	NS	NS		NS	**	904.7	NS				
	5H	11_11221	60.7	3	NS	NS		NS	***	1052.0	NS				
	5H	11_11350	104.5	6	***	610.0	NS	NS	NS		NS				
	5H	11_10855	137.2	8	***	693.3	NS	NS	NS		NS				
GP2	2H	11_10180	21.6	3	NS	***	10.8	NS	NS		**	9.9			
	2H	11_21265	28.4	3	NS	NS		***	10.8	**	9.7	8.1			
	2H	11_20748	56.3	5	***	9.0	***	8.5	**	9.0	*****	10.3	Bleinheim/E224/3	Thomas <i>et al.</i> 1995	
	2H	11_21166	66.8	6	NS	NS		***	10.5	NS	***	10.0			
	2H	11_21340	103.7	8	NS	NS		**	8.5	NS	**	8.0			
	3H	11_20944	122.1	7	NS	NS		**	9.0	NS	NS				
	4H	11_10668	44.9	4	NS	NS		***	11.2	NS	**	8.7			
	4H	11_10262	55.6	5	NS	NS		**	8.7	***	11.4	***	8.5		
	4H	11_20838	96.6	6	NS	NS		**	21.5	NS	***	22.5			
	5H	11_20236	80.6	5	NS	NS		NS	NS	NS	**	10.4			
	5H	11_20388	150.3	9	NS	NS		NS	NS	NS	**	3.9			
	6H	11_20996	93.1	6	NS	NS		**	11.6	**	12.7	NS			
	7H	11_20710	3.3	1	NS	NS		NS	NS	**	16.6	NS			
7H	11_20485	88.6	6	NS	NS		NS	NS	**	30.1	**	23.8			
GP1	2H	11_10180	21.6	3	NS	****	7.4	NS	NS		****	9.5			
	2H	11_21265	28.4	3	NS	**	5.4	****	11.7	NS	NS				
	2H	11_20748	56.3	5	***	5.2	****	6.2	****	11.5	*****	7.6	Bleinheim/E224	Thomas <i>et al.</i> 1995	
	3H	11_11258	52.5	4	NS	NS		NS	**	8.6	NS				
	3H	11_20017	69.6	5	NS	NS		NS	NS	**	**	5.6	Bleinheim/E224	Thomas <i>et al.</i> 1995	
	4H	11_20262	55.6	5	NS	**	5.3	***	10.9	***	7.4	**	6.6		
	4H	11_20838	96.6	6	NS	**	14.8	NS	NS	NS	NS	NS			
	7H	11_20249	52.8	4	NS	NS		***	9.8	NS	NS				
7H	11_20230	86.4	6	NS	NS		NS	**	15.4	NS					
CVGS	6H	11_10331	81.2	6	NS	NS		NS	***	1.9	NS				

Continue table 4...

Trait	Chr	Marker	cM	Bin	Col07	Pay07		Col08	Pay08a		Pay08b		Population ^h	Reference
					<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g	<i>p</i>	ase ^g		
HD	2H	11_21110	67.5	6	ND	***	2.4	ND	NS	NS	NS	Igri/Triumpf Vada/L94	Laurie <i>et al.</i> 1995 Qi <i>et al.</i> 1998	
	7H	11_20485	88.6	6	ND	NS		ND	***	6.5	NS	Chevron/M69 Harrington/TR306 Chevron/M69	De la Peña <i>et al.</i> 1999 Tinker <i>et al.</i> 1996 De la Peña <i>et al.</i> 1999	
GF	2H	11_20585	63.5	5	ND	***	1.7	ND	NS	NS	NS			
	4H	11_21110	103.1	7	ND	**	1.8	ND	NS	NS	NS			
	5H	11_20105	58.0	3	ND	**	1.4	ND	NS	NS	NS			
	7H	11_10838	38.3	3	ND	**	1.5	ND	NS	NS	NS			
	7H	11_20845	88.6	6	ND	**	4.0	ND	NS	NS	NS			
PH	1H	11_20434	88.2	8	ND	***	3.8	ND	NS	NS	NS	Harrington/Morex	Marquez <i>et al.</i> 2000	
	3H	11_21266	148.9	9	ND	NS	ND	ND	***	4.6	NS			

NS not significant, ND no data

^a **YLD**: yield (kg / ha Dry Mater), **GM**²: grains/m², **SPM**²: espigas/m², **GS**: grains per spike, **TGW**: 1000 grain weight, **HIN**: harvest index, **BM**: total dry matter production (kg / ha) **GP2**: (percentage of grains with a diameter > 2.8mm), **GP1**: (percentage of grains with a diameter > 2.5mm), **CVGS**: (coefficient of variation of grains per spike), **HD** (heading date), **GF** (length of grain filling), **PH**: plant height.

^b Chromosome where QTL was positioned

^c Markers are indicated only with a more meaningful and FDR < 5%, * *p* value <0.01, ** *p* value <0.001, *** *p* value <0.0001, **** *p* value <0.00001, ***** *p* value <0.000001. For QTL with more than 1 significant marker-trait association within an LD block, the marker with the most significant association was reported.

^d Chromosomal positions (in CentiMorgans) of significantly associated SNP markers were according to Close *et al.* (2009)

^e BIN location of barley chromosomes according to Kleinhofs and Graner (2001).

^f Test of individual markers

^g Allele substitution effect

^h Mapping population where coincident QTL were detected

2.5.4. Linkage Disequilibrium

The chromosomes with the highest concentration of QTL were 2H and 4H. In most cases, markers with significant associations for the same trait or traits related biologically and located relatively close (Table 4) had LD values higher than 0.20. For 2H there are three areas that showed an $r^2 \geq 0.2$ for the markers associated significantly with a trait, two of them located on the short arm and one in the long arm. In this chromosome, we detected a large region comprising 11.1 cM, from 11_10796 (58.2 cM) to 11_21144 (69.3 cM) in LD with $r^2 \geq 0.2$ and associated to *GF* (Fig. 3a). In 4H we detected two regions in LD with significant marker-trait associations, both located on the short arm (Fig. 3b).

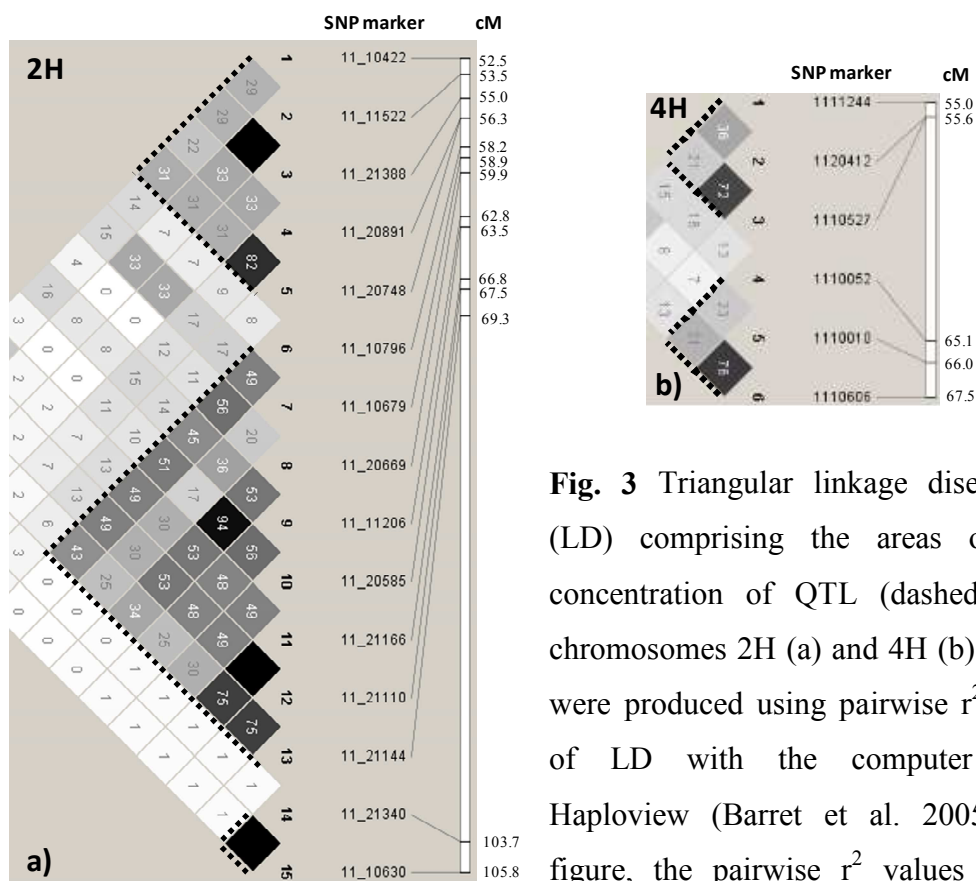


Fig. 3 Triangular linkage disequilibrium (LD) comprising the areas of highest concentration of QTL (dashed line) on chromosomes 2H (a) and 4H (b). The plots were produced using pairwise r^2 estimates of LD with the computer program Haploview (Barret et al. 2005). In the figure, the pairwise r^2 values are given inside the boxes. The solid black boxes represent a pairwise r^2 value of 1.0.

Some of the LD regions within each chromosome associated with agronomic traits were also associated with other regions on other chromosomes. Markers on the short and long arm of 2H were in LD with markers on 5H and 7H (Fig. 4).

2.6. DISCUSSION

In order to advance in the understanding of the genetic basis of agronomic adaptation of spring barley in Uruguay, we studied seventy-six genotypes in two locations and two years. Most of the genotypes were old cultivars with a significant historical impact in the crop in the southern cone of South America, both by their direct use in production and their role in the development of local cultivars. We used a genome-wide association (GAW) mapping approach, which allows us the use of such a genotypically diverse collection. Identified marker-trait associations would provide information about the location of the genomic regions associated with the genetic control of the traits of interest, helping to understand and use the genetic value of each of the genotypes under study.

In our study, the average density was 147.6 markers per chromosome, higher than most of previous studies with comparable objectives. Kraakman *et al.* (2004), Rostoks *et al.* (2006) and Comadran *et al.* (2009) have reported association mapping in barley with average densities of 33.7, 93.7 and 116 markers per chromosome, respectively. Considering the relative homogeneity of the population, we are confident that the marker coverage is adequate to reach the objectives.

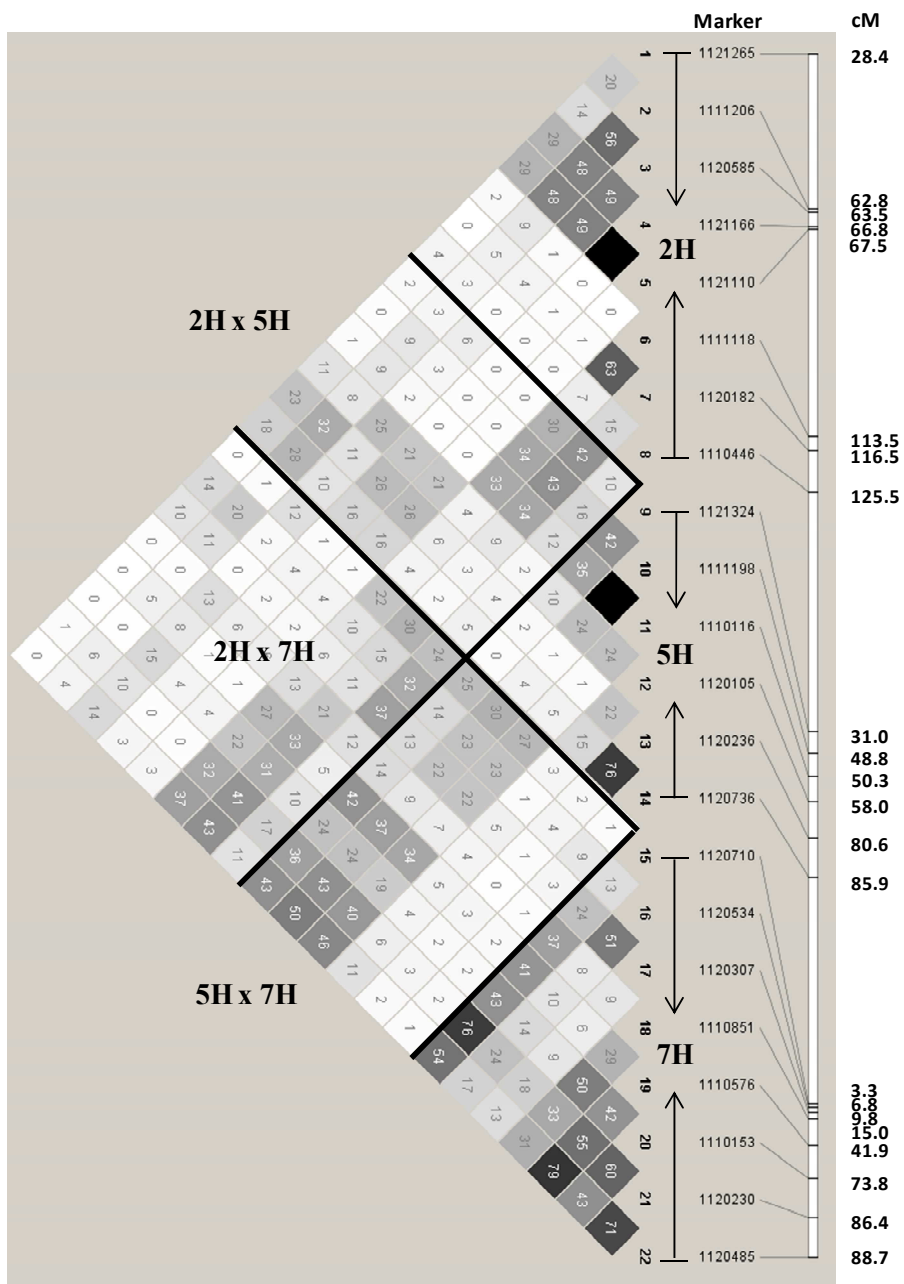


Fig. 4 Triangular linkage disequilibrium (LD) matrix plot between 8, 6 and 8 SNP associated with some agronomic trait or not associated with agronomic trait but in LD with them on the chromosome 2H, 5H and 7H, respectively. The plots were produced using pairwise r^2 estimates of LD with the computer program Haploview (Barret *et al.* 2005). In the figure, the pairwise r^2 values are given inside the boxes. The solid back boxes represent a pairwise r^2 value of 1.0.

Kraakman *et al.* (2004) working with a representative sample of contemporary commercial European two-row spring genotypes, detected strong population structure in their population. In this case there was a significant geographical bias and the populations used evidenced the presence of selection for specific adaptative traits. Rostocks *et al.* (2006) using elite germplasm representative of northwestern Europe but composed of both spring and winter-sown varieties, detected two subgroups based on cold requirements to heading. Comadran *et al.* (2009), Zhang *et al.* (2009) and Cockram *et al.* (2008), detected significant population structure working with large and diverse populations, comprising the past and present of crop improvement in the Mediterranean, Canada and the European Union. In our study, we detected a population structure that reflects, even when the size of population was small, the wide diversity of the origins of the germplasm used in breeding in the southern cone of South America. The patterns of genetic diversity explaining the structure in our study are the same reported by Comadran *et al.* (2009) in their study: key ancestors and regions of origin of the germplasm.

Both structure and relatedness of the germplasm divided the population into basically four distinct groups: Quebracho and its offspring, including Atlas 57 and Ymer as common ancestors (Group 1); genotypes from North Dakota (Bowman, Logan) and their offspring (Group 2); old genotypes selected in the South America (Malteria Heda, Magnific 102, FNC 6-1), their offspring and some common ancestors (Prior, Hanna) (Group 3); and some old German genotypes (Lisa, Volla, Villa, Union), a common ancestor (Isaria) and their offspring (Group 4). In the history of barley breeding in South America there are some key germplasm sources that may explain these groups. Prior and its offspring have been one of the foundations of malting barley, first in Argentina then in Uruguay. Many of the European genotypes included in the study were instrumental in the achievement of acceptable malting quality levels (Hanna or Union for example). Quebracho introduced from Australia and released in the mid-nineties, was a significant leap forward in terms of yield and adaptation in Uruguay. Germplasm from the North Dakota State University program has shown a remarkable level of adaptation to the

production environment of northern Uruguay, characterized by high temperatures during the last part of the growing cycle (Castro *et al.* 1997).

Grain plumpness (either *GP1* or *GP2*) was the trait with the highest detected number of regions with QTL effects. QTL (11_20748/11_20891; 56.3 cM) on the short arm of 2H, was detected in every environment. For *TGW*, QTL effects were mapped in the same region in three out of five environments. The consistency between environments in the QTL detected for these traits reflex the lack of genotype x environment found (data not shown). This region (bin 5) had the highest number of QTL detected in more than one environment. Many of those QTL were coincident with previous reports: Li *et al.* (2006) reported QTL effects for *YLD HD*, *PH*, *GS* and *TGW* working with a back-cross population (Brenda as the recurrent parent and the *H. vulgare ssp. spontaneum* accession HS584 as the donor parent) and Thomas *et al.* (1995) reported QTL effects for grain plumpness in the same region. QTL effects for other traits as *SPM*², *GF* or *HIN* have not been previously reported for this region in the literature.

Only one of the eight genomic regions with significant associations with *YLD* located on the long arm of chromosome 1H (11_11509, 135.6 cM), was detected in more than one environment (Pay08a and Pay08b). This region was also associated with yield by Hayes *et al.* (1993) in the Steptoe/Morex mapping population. In our study the same region was also associated with *SPM*² and *HIN* (in the same environments as *YLD*) and with *GM*² (only in Pay08b). The three traits presented high and positive correlations with *YLD* in those environments (Table 3). Laurie *et al.* (1995) reported the presence of the photoperiod response gene *Ppd-H2* in short day conditions (10 h. daylength) in this region. The lack of significant marker – trait associations for phenological traits in our work may be related to the fact that the photoperiod length in the experiments at Paysandú (58° 03'W, 32° 55'S) was above the threshold for this gene's response to photoperiod. In six out of eight regions, QTL effects for *YLD* were coincident with QTL effects for traits with significant phenotypic correlation with *YLD* in the same environment. Those coincident locations should explain at least part of the mentioned correlations. However, two of the regions associated with *YLD*, one on 5H (11_10116; 50.3cM) and one on 7H

(11_20652; 110.0cM), showed no significant association with any yield component. As suggested by Yin *et al.* (2002), this can be explained by the fact that these regions could have simultaneous and limited effects of the same sign on more than one yield component. Therefore, we may not be able to detect association with any of the component but with *YLD* that includes all components. On the contrary, we detected significant associations of two markers (11_21166; 66.8cM / 11_21110; 67.5cM) on 2H (in Pay07 and Pay08b) with *GS* and *SPM*² but not *YLD*. In this case *SPM*² was highly correlated with *YLD* and *GS* has a low correlation with *YLD* and a high and negative correlation with *SPM*² (Table 3). Either a higher experimental error for *YLD* or negative compensation between components may explain the lack of association with *YLD*. The coincidence between QTL effects for yield and its components was not consistent across the genome, and several of the QTL detected for *TGW*, *GM*², *SPM*² or *GS* were not coincident with *YLD* QTL. The two main components of yield are grains/area (*GM*²) and grain weight (*TGW*), which are defined before and after flowering respectively (Miralles and Slafer 1999). Therefore, depending on the weather conditions during each phenological stage in each environment yield can be more associated with a different component in each situation (Francia *et al.* 2011).

Considering all chromosomes, most of the detected QTL in this study were located in genomic regions associated with more than one agronomic trait. For example, 15 of the 22 genomic regions detected for chromosome 2H, showed coincident QTL effects for more than one trait. To elucidate if those location coincidences are due to pleiotropy or linkage would require an increase in the resolution of the analysis and even with a better resolution the relative homogeneity and small size of the population used would be limiting (Chen *et al.* 2010). The analysis of the biological relationships between correlated traits could provide some elements to advance in this discussion. There is an accumulation of QTL effects for several phenotypically related traits in an interval located between 52.5 cM (11_10422) and 56.3 cM (11_20748/11_20891) on the short arm of chromosome 2H (Table 4): *YLD*, *GPI*, *GP2*, *TGW* and *HIN*, all these traits are physiologically related. *TGW* and *GP* were positively and strongly correlated and can be considered as different ways of measuring the same phenotype (essentially the grain size). Also had

a positive correlation with *HIN* (Table 3). In other genomic regions such as in chromosome 7H between 86.4 and 88.6 cM, several markers were significantly associated with yield components and with phenological traits (*HD* and *GF*). As mentioned before, have at normal planting dates the grain filling period of genotypes with earlier flowering date occur under lower temperatures and, at least in Uruguayan conditions, this is associated with increases in *HIN* (Kemanian *et al.* 2007), *TGW*, *GP* and *YLD* (Castro *et al.* 1997).

Most of the QTL found included more than one marker in LD, having in common the association to some trait, as shown by Roy *et al.* (2010). Regions with significant marker-trait associations were observed with any agronomic trait and in some cases with in LD comprising wide areas of the genome. One example is region in the short arm of 2H, which spanned 11.1 cM between 11_10796 (58.2 cM) and 11_21144 (69.3 cM). It was associated with *GF* (in Pay07) (Fig. 3a). We cannot be completely sure that markers with a $r^2 \geq 0.2$ between them and significantly associated with the same trait belong to the same QTL if their interval is high. It is easier to conclude that the QTL is the same in those cases where the markers involved were much closer, as observed on chromosome 4H between 11_10010 (66.0 cM) and 11_10606 (67.5 cM). In this case both markers were associated with *SPM²*, in LD ($r^2 = 0.76$) and only separated by 1.5 cM (Fig. 3b). The large LD region found on 2H may be due to the breeding history of the germplasm used as suggested by Caldwell *et al.* (2006). Although the population includes genotypes from different latitudes, all genotypes were the result of a strong breeding process (the population does not include landraces or wild barleys). It is possible that the genomic region in question has been fixed during the selection process in some of the geographical regions, particularly associated with phenological traits (*HD*, *GF*) and yield components (*GPI*, *GP2*, *SPM²*, *HIN*), considering that marker - trait association in this genomic region were found for both types of traits. The LD detected in this region of 2H can be explained by more than one group of genotypes clustered with a particular pattern. It would be unlikely that in different production conditions the breeding process would follow the same direction for this particular genomic region. In fact, analyzing the different haplotypes present in this block and information based

on pedigree data, we found that the LD is explained mainly by three or two dominant haplotypes. Each one of these haplotypes are present in three different groups of genotypes that share some common geographical origin and a common ancestor to which the group's haplotype can be traced. The largest group (22 genotypes) has the old Swedish variety Gull as its haplotype of origin, Prior is the common ancestor of the second group (13 genotypes) and the old Czech variety Hanna is the common ancestor of the third group (10 genotypes) (Supplementary Table 5). The largest (haplotype 1) and third haplotype are very similar and are represented by old European genotypes and their offspring. In contrast, the second group contains genotypes adapted mainly to the cone of South America and several of their common ancestors are Australians. This large region may be the product of the dragging caused by the co-selection for different haplotypes in response to more than one trait and resulting in a wider region in LD. Several markers within the region were not associated to any traits but in LD with any neighbor markers (data not shown), a fact may be related to the mentioned dragging effect. Although the QTL effect in this region were detected primarily on only two locations (Pay07 and Pay08b) (Table 4), the extent of LD between markers associated with agronomic traits highlights its potential value for breeding. Also, there is a possibility that the detected LD was related to traits not included in the present study. Hayes *et al.* (1993) and Han *et al.* (1995) reported QTL effects for malting quality traits (diastatic power and beta glucans respectively) on this region in the Steptoe/Morex mapping population. Working with the Blenheim/E224-3 mapping population, Thomas *et al.* (1996) reported QTL for germination and grain nitrogen, and Powell *et al.* (1997) also detected QTL for seed water sensitivity, both in the same region. These reports suggest that selection for malting quality may have played a role in the conservation of particular haplotypes in this region. We are presently studying marker-trait associations for malting quality in this population in order to clarify this point.

The fact that some regions in LD are also associated with regions on other chromosomes may indicate the fixation in parallel of these regions by selection processes. Ford-Lloyd *et al.* (2001), working two rice populations, suggest that these kind of associations (involving associations with agronomic traits) may be the result

of the maintenance of adaptative gene complexes involving agronomically important QTL. We detected that some regions in this situation have indeed markers associated with agronomic traits (Fig. 4). The marker 11_20710 (3.3 cM) on 7H associated with *GP2* and *TGW* in Pay08a, is in LD with the markers 11_11198 (48.3 cM) and 11_10116 (50.3 cM) ($r^2 = 0.30$ and 0.27 , respectively) on 5H, both related to *YLD* in Col07 and the marker 11_10446 (125.5 cM) ($r^2 = 0.24$) on 2H, associated with *TGW* in Pay08b. However, the markers on the 2H and 5H are not in LD between them, only the marker 11_20710 is in LD with the other two regions. Considering that around this marker there is extensive LD (data not shown), we might suggest that in this population, BIN 1 on 7H was a recurrent region in the selection process, dragging unlinked areas both on 7H and other chromosomes. However we could not affirm that the selection has been for the traits measured in this study.

Most QTL were detected in the environments with better agronomic and experimental conditions: 53 out of 79 QTL were detected in Pay07, Pay08a and Pay08b. Experiments at Ombúes de Lavalle were probably affected by suboptimal planting conditions, mainly related with the planting equipment used but also with the soil preparation, which derived in less homogeneous plant stands, varying from 20 to 45 plants per row meter in both years at this location (data not shown). In contrast, all experiments at Paysandú showed homogeneous plant stands (data not shown). It is well known that complex traits under stress often reduce the genetic variance, significantly decreasing the heritability (van Eeuwijk *et al.* 2010), which in turn can reduce the ability and power for QTL detection. In contrast, high-yielding conditions, generally lacking noticeable stresses, can favor the detection of genetic effects. Those conditions also favor the expression of genes affecting traits associated with yield potential. Yin *et al.* (2002), working with a population of 94 RILs, reported most QTL in high-yielding conditions. Vales *et al.* (2005) comparing different population sizes and phenotypic assessment strategies concluded about the key importance of good environmental conditions for cultivation if the goal is to optimize the estimated number of QTL, effects and interactions (QTL x QTL and QTL x environment).

Only 13 of the 79 detected QTL were significant in both higher (Pay07, Pay08a and Pay08b) and lower (Col07 and Col08) yielding environments, and only 13 other QTL were significant in lower yielding environments. As discussed by Pswarayi (2008), this can be explained by both increases in the genotype x environment interaction (GEI) imposed by the heterogeneity of the environments, the possible existence of specific environment-dependent QTL and different heritability values for each trait (*YLD* vs *TGW*). By modifying the growing conditions, we may also modify the relationships between many of the agronomic traits (Volis *et al.* 2004). For example, some traits may be phenotypically correlated in one environment and have significant marker-trait associations with the same markers in that environment, and that correlation may not repeat or express in another environment. The correlation coefficient between GM^2 and *TGW* was -0.26, -0.33 and -0.17 in Pay07, Pay08b and Pay08a, respectively and -0.07 in Col07 and Col08 (Table 3). On yield limiting environments, the number of grains per area, reported as the main yield component (Muñoz *et al.* 1998; Abeledo *et al.* 2003) was much lower than in environments of higher potential (Table 2). In this situation, some genotypes may compensate the low number of grains increasing their weight and modifying the correlation between the traits and therefore, our ability to detect QTL. Another example is the relationship between *TGW* and *GF*. In early planted environments (Pay07 and Pay08a), the correlation between the two traits was between 0.63 and 0.42, while for Pay08b (late planting) the correlation was 0.28. Longer *GF* were always associated with higher *TGW*, reflecting the effect of the duration of the phase on the end result (Castro *et al.* 1997). Early planting allowed longer *GF* and wider variation on the trait between genotypes, while late planting the phenotypic variation for the trait is reduced and the correlation with *TGW* lower.

On the other hand, the QTL for *YLD* found in bin 7 of chromosome 7H, possibly located in the same region as the yield QTLs reported by Tinker *et al.* (1996), was detected only in one of the low-yielding environments suggesting the existence of specific environment-dependent QTL (Table 4). Comadran *et al.* (2008) reported the possible existence of a yield QTL specific for stressful environments in the same genomic region. It was found only in environments characterized by water

stress, where yields did not exceed 1200 kg/ha. The favorable allele came from Harrington in our study and in Tinker *et al.* (1996). This fact supports the idea that may be involucred the same region and that the favourable allele may have been contributed by ancestors of Harrington as Hanna and Gull, since both genotypes have the same allele.

Our work highlights the potential and limitations of a GWA mapping approach as a tool for understanding the genetic basis of important traits. The QTL detected in this study cannot be considered by any means a complete picture of the genetic factors underlying the agronomic traits under study in this population. The population was small, there were limitations in some of the environments and a excessively demanding statistical criteria (FDR) was used. It is indeed possible that some of the marker-trait associations identified were actually spurious. Sub-structure effects due to factors such as geographical origin and genetic relationship among genotypes of the population is hard to avoid, even when the population is carefully selected (Cockram *et al.* 2008). Also the contribution of the statistical model used to detect false positives (Q+K model) may not have been the best. To correct for structure, Price *et al.* (2006) proposed the use of principal component analysis (PCA) and more recently Zhu and Yu (2009) proposed the use of non-metric multidimensional scaling. Moreover, the matrix of relationships between genotypes (K) used in this study, created from pedigree information, is not the only option. There are different ways to correct for relations between individuals. Zhao *et al.* (2007) raises the possibility of using a kinship matrix alternative to that proposed by Yu *et al.* (2006), which is based on defining the identity by state as the expected amount of allele sharing between unrelated individuals.

Nevertheless, all factors considered, we believe that the methodology used was adequate to detect key genomic regions associated to quantitative traits of interest and to provide useful information for practical plant breeding. The information obtained in this work is substantial given the lack of this kind of studies for this germplasm and geographical conditions. The amount of phenotypes measured is rather extensive and compares favorably with similar studies. There is plenty of work ahead, but in order to accumulate practical advances to improve the knowledge about

the genomic regions of interest an adequate balance between the results expected and the resources required must be maintained. With that in mind, important contributions can be achieved even with the use of populations of relatively limited size and medium density maps.

2.7. REFERENCES

- Abeledo GL, Calderini DF, Slafer GA (2002) Physiological Changes Associated with Genetic Improvement of Grain Yield. In: Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I (eds) Barley Science, Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality. Food Product Press, NY, 361-385.
- Abeledo GL, Calderini DF, Slafer GA (2003) Genetic improvement of barley yield potential and its physiological Determinants in Argentina (1944-1998). *Euphytica* 130:325-334.
- Arias G, Reiner L, Penger A, Mangstil A (1983) Directory of Barley cultivars and lines. Verlag Eugen, Stuttgart 391 p.
- Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2):263-265.
- Barua UM, Chalmers KJ, Thomas WTB, Hackett CA (1993) Molecular mapping of genes determining height, time to heading, and growth habit in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36:1080-1087.
- Baum BR, Bailey LG, Thompson BK (1985) Barley register. Agric Canada Publ 1783B. Ottawa, Canada.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B Methodol* 57:149-155.
- Bezant J, Laurie D, Pratchett N, Chojecky 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.
- Bezant J, Laurie D, Pratchett N, Chojecki J, Kearsey M (1997) Mapping controlling yield components in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. *Mol Breeding* 3(1):29-38.
- Bingham IJ, Blake J, Foulkes MJ, Spink J (2007) Is Barley yield in UK sink limited? I. Post-Anthesis radiation interception, radiation-use efficiency and source-sink balance. *Field Crop Research* 101:198-211.

- Borrás L, Slafer GA, Otegui ME (2004) Seed dry weight response to source-sink manipulation in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research* 86:131-146.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) Tassel: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatic application note* 23:2633-2635.
- Caldwell KS, Russell J, Langridge P, Powell W (2006) Extreme population-dependent linkage disequilibrium detected in an inbreeding plant species, *Hordeum vulgare*. *Genetics* 172:557–567.
- Castro A, Ernst O, Hoffman E, Bentancur O (1997) Barley germplasm characterization using agronomic and quality traits. *Agrociencia* 1:80-87.
- Chen Y, Lübberstedt T (2010) Molecular basis of trait correlations. *Trends in Plant Science* 15:454-461.
- Close TJ, Prasanna RB, Bhat PR et al (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10:582.
- Cockram J, White J, Leigh FJ, Lea VJ, Chiapparino E, Laurie DA, Mackay IJ, Powell W, O'Sullivan DM (2008) Association mapping of partitioning loci in barley. *Genetic* 9:9-16.
- Comadran J, Thomas WTB, van Eeuwijk FA et al (2009) Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. *Theor Appl Genet* 119:175-187.
- Comadran J, Russell JR, van Eeuwijk FA et al (2008) Mapping adaptation of barley to droughted environment. *Euphytica* 161:35-45.
- Condón F (2006) Genetic grain, diversity, and marker-trait association in Minnesota barley germplasm. Ph.D dissertation, University of Minnesota St. Paul
- de la Peña RC, Smith KP, Capettini F, Muehlbauer GJ, Gallo-Meagher M, Dill-Mackay R, Somers DA, Rasmusson DC (1999) Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Theor Appl Genet* 99:561-569.

- Dreccer F, Grashoff C, Rabbinge R (1997) Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling: effects on senescence and grain protein concentration. *Field Crop Research* 49:269-277.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics Society of America* 164:1567-1587.
- Fan JB, Gunderson KL, Bibicoba M, Yeakley JM, Chen J, Wickman-Garcia E, Lebruska LL, Laurent M, Shen R, Barker E (2006) Illumina universal bead arrays. *Methods Enzymol* 410:57-73.
- Fan JB, Oliphant A, Shen R et al (2003) Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:69-78.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2009) FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/370/default.aspx>. Accessed 26 July 2011.
- Fitzsimmons RW, Wrigley CW (1984) *Australian barleys*, 2nd edn. CSIRO, Melbourne.
- Flint-Garcia SA (2003) Structure of Linkage Disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:357-374.
- Ford-Lloyd BV, Newbury HJ, Jackson MT, Virk PS (2001) Genetic basis for co-adaptative gene complexes in rice (*Oriza sativa* L.) landraces. *Heredity* 87:530-536.
- Francia E, Tondelli A, Rizza F, Badeck FW, Li Destri Nicossia O, Akkar T, Grando S, Al-Yassin A, Benbelkacem A, Thomas WTB, van Eeuwijk F, Romagosa I, Stanca AM, Pecchioni N (2011) Determinants of barley grain yield in a wide range of Mediterranean environments. *Field Crop Research* 120:169-178.
- Franco J, Crossa J, Taba S, Shands H (2005). A sampling strategy for conserving genetic diversity when forming core subsets. *Crop Sci* 45:1035-1044.
- Gallagher JN, Biscoe PJ, Scott RK (1995) Barley and its environment. V. Stability of grain weight. *J App Ecol* 12:319-336.
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in high plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* 57:461-485.

- Han F, Ullrich SE, Chirat S, Menteur S, Jestin L, Sarrafi A, Hayes PM, Jones BL, Blacke TK, Wesenberg DM, Kleinhofs A, Kilian A (1995) Mapping of β glucan content and β glucanase activity loci in barley grain and malt. *Theor Appl Genet* 91(6-7):921-927.
- Hayes PM, Liu BH, Knapp SJ, Chen F, Jones B, Blake T, Franckowiak J, Rasmusson D, Sorrells M, Ullrich SE, Wesenberg D, Kleinhofs A (1993) Quantitative trait locus and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theor Appl Genet* 87:392-401.
- Kemanian AR, Stöckle CO, Huggins DR, Viega LM (2007) A simple method to estimate harvest index in grain crops. *Field Crops Research* 103:208-216.
- Kjaer B, Jensen J (1996) Quantitative trait loci for grain yield and yield components in a cross between a six-rowed and two-rowed barley. *Euphytica* 90:39-48.
- Kleinhofs A, Graner A (2001) An integrated map of the barley genome. In: Philips R.L, I.K, Vasil (eds) *DNA-based markers in plants*, 2nd edn. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp 187-200.
- Kraakman ATW, Niks RE, Van den Berg MMM, Stam P, van Eeuwijk FA (2004) Linkage Disequilibrium Mapping of Yield and Yield Stability in Modern Spring Barley Cultivars. *Genetic* 168:435-446.
- Kraakman ATW, Martinez F, Mussiraliev B, van Eeuwijk FA, Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol Breeding* 17:41-58.
- Laurie DA, Pratchett N, Bezant JH, Snape JW (1995) RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare*) cross. *Genome* 38:575-585.
- Li JZ, Huang XQ, Heinrichs F, Ganai MW, Röder M.S (2006) Analysis of QTL for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advanced backcross population of spring barley. *Genome* 49:454-466.
- Loss SP, Siddique KHM (1994) Morphological and Physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. *Adv Agron* 52:229-276.

- Luizzi D, Castro A (1992) Variabilidad genética: su contribución al desarrollo del cultivo de cebada en el Uruguay. In: Resúmenes de la IIª Reunión Nacional de investigación en Cebada cervecera. La Estanzuela, mayo de 1991. INIA, Montevideo, Uruguay.
- Malecot A, (1949) Les mathématiques de l'hérédité. Masson & Cie. Paris.
- Manly BFJ (1988) The comparison and scaling of student assessment marks in several subjects. *Appl Statist* 37(3):385-395.
- Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Jones BL, Kleinhofs A, Legge WG, Rossangel BG, Sato K, Ullrich E, Wesenberg DM (2000) QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm group. *Theor Appl Genet* 101:173-184.
- Massman J, Cooper B, Horsley R, Neate S, Dill-Macky R, Chao S, Dong Y, Schwarz P, Muelhauer GJ, Smith KP (2011) Genome-wide association mapping of Fusarium head blight resistance in contemporary barley breeding germplasm. *Mol Breeding* 27:439-454.
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) (2010) Uruguay. Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias. Anuario Estadístico Agropecuario 2010. <http://www.mgap.gub.uy/portal/>. Accessed 26 July 2011.
- Miralles DJ, Slafer, GA (1999) Wheat development. In: Satorre EH, Slafer GA (eds) *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. Food Product Press, New York, 13–43.
- Muñoz P, Voltas J, Araus JL, Igartua E, Romagosa I (1998) Changes over time in the adaptation of barley releases in northeastern Spain. *Plant Breed* 117:531–535.
- Olliphant A, Barker DL, Stuelpangel JR, Chee MS (2002) BeadArray technology: enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotec Suppl* 5:6-58.
- Pallota MA, Warner P, Fox RL, Kuchel H, Jefferies SJ, Langridge P (2003) Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. In: Pogna NE,

- Romano M, Pogna EA, Galterio Z (eds) Proceeding of the 10th International Wheat Genetics Symposium, Paestum, 789-791.
- Powel W, Thomas WTB, Baird E, Lawrence P, Booth A, Harrower B, McNicol JW, Waugh R (1997) Analysis of quantitative trait in barley by the use of amplified fragment length polymorphism. *Heredity* 79:48-59.
- Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D (2006) Principal component analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *NatGenet* 38:904-909.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945-959.
- Pswarayi A, van Eeuwijk FA, Ceccarelli S et al (2008) Changes in alleles frequencies in landraces, old and modern barley cultivars of marker loci close to QTL for grain yield under high and low input conditions. *Euphytica* 163:435-447.
- Qi X, Stam P, Lindhout P (1998) Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet* 96:376-384.
- Rostock N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR, Roose ML, Svensson JT, Stein N, Varshney RK, Marshall DF, Graner A, Close TJ, Waugh R (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18656-18661.
- Roy JK, Smith KP, Muelbahuier GJ, Chao S, Close TJ, Steffenson BJ (2010) association mapping of spot blotch resistance in wild barley *Mol Breeding* 26:243-256.
- SAS Inst, (2004) Statistical Analysis System Online documentation. SAS. Cary. NC.
- Slafer GA, Savin R (1994) Source-sink relationship and grain mass at different positions within the spike in wheat. *Field Crops Research* 37:39-49.
- Stracke S, Haseneyer G, Veyrieras JB, Geiger HH, Sauer S, Graner A Piepho HP (2009) Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of Flowering time in barley. *Theor Appl Genet* 118:259-273.

- Szűcs P, Blake VC, Bhat PR, Chao S, Close TJ, Cuesta-Marcos A, Muehlbauer GJ, Ramsay L, Waugh R, Hayes PM (2009) An Integrated Resource for Barley Linkage Map and Malting Quality QTL Alignment. *Plant Gen* 2:134-140.
- Thomas WTB, Powell W, Waugh R, Chalmers KJ, Barua UM, Jack P, Lea V, Forster BP, Swanston JS, Ellis RP, Hanson PR, Lance RCM (1995) detection of quantitative trait loci agronomic, yield, grain, and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theor Appl Genet* 91:1037:1047.
- Thomas WTB, Powell W, Swanston JS, Ellis RP, Chalmers KJ, Barua UM, Jack P, Lea V, Forster BP, Waugh R, Smith DA (1996) Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. *Crop Science* 36:265-276.
- Tinker NA, Mather DE, Rossangel BG et al (1996) Regions of the Genome that Affect Agronomic Performance in Two-Row Barley. *Crop Science* 36:1053-1062.
- Vales MI, Schön CC, Capettini F, Chen XM, Corey AE, Mather DE, Mundt CC, Richardson KL, Sandoval-Islas JS, Utz HF, Hayes PM (2005) Effect of population size on the estimation of QTL: a test using resistance to barley rust. *Theor Appl Genet* 111:1260- 1270.
- van Eeuwijk FA, Bink MC, Chenu K, Chapman SC (2010) Detection and use of QTL for complex traits in multiple environments. *Plant Biology* 13:1-13.
- Volis S, Verhoeven KJF, Mendlinger S, Ward D (2004) Phenotypic selection and regulation of reproduction in different environments in wild barley. *J Evol Biol* 17:1121-1131.
- von Zitzewitz J, Cuesta-Marcos A, Condon F (2011) The genetics of winterhardiness in Barley: perspectives from genome-wide association mapping. *The Plant Genome* 4:76-91.
- Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Amer Statist Assoc* 58:236-244.
- Yin X, Stam P, Dourleijn CJ, Kropff MJ (1999) AFLP mapping of quantitative trait loci for yield-determining physiological characters in spring barley. *Theor Appl Genet* 99:244-253.

- Yin X, Chasalow SD, Stam P, Kropff M.J, Dourleijn CJ, Bos I, Bindraban PS (2002) Use of component analysis in QTL mapping of complex crop traits: a case study on yield in barley. *Plant Breeding* 121:314-319.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38:203-208.
- Zhang LY, Marchand S, Tinker NA, Belzile F (2009) Population structure and linkage disequilibrium in barley assessed by DArT markers. *Theor Appl Genet* 119:43-52.
- Zhao K, Aranzana MJ, 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 Genet* 3(1):e4. doi:10.1371/journal.pgen.0030004.
- Zhu C, Yu J (2009) Nonmetric multidimensional scaling corrects for population structure in association mapping with different sample types. *Genetics* 182(3):875-888.

2.8. ANEXOS

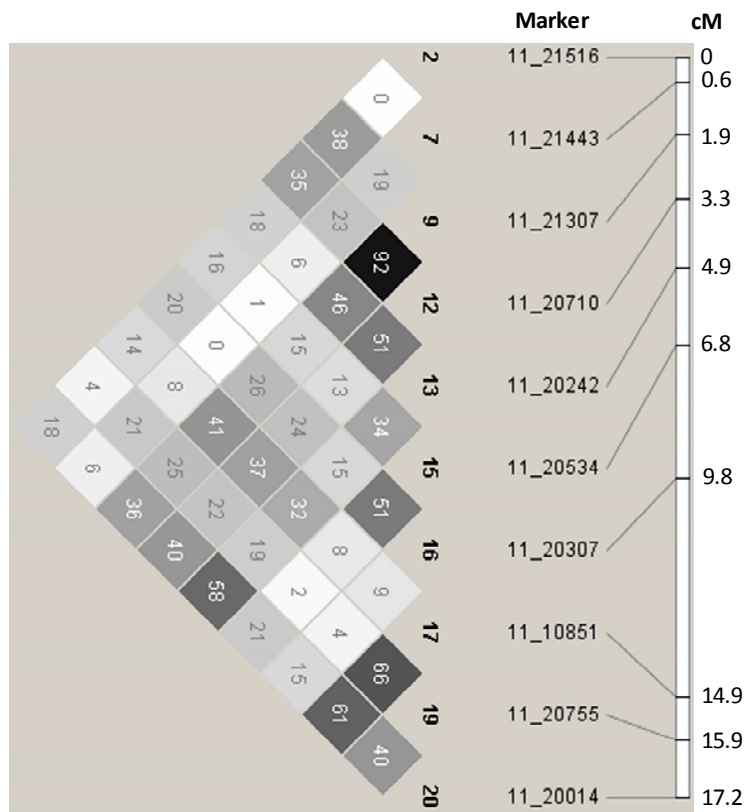


Fig. 5 Triangular linkage disequilibrium (LD) matrix plot between 10 SNPs on the chromosome 7H. Note that the 11_20710 marker is in LD with the most neighboring markers, from 0 cM to 17.2 cM. The plots were produced using pairwise r^2 estimates of LD with the computer program Haploview (Barret *et al.*, 2005). In the figure, the pairwise r^2 values are given inside the boxes. The solid back boxes represent a pairwise r^2 value of 1.0.

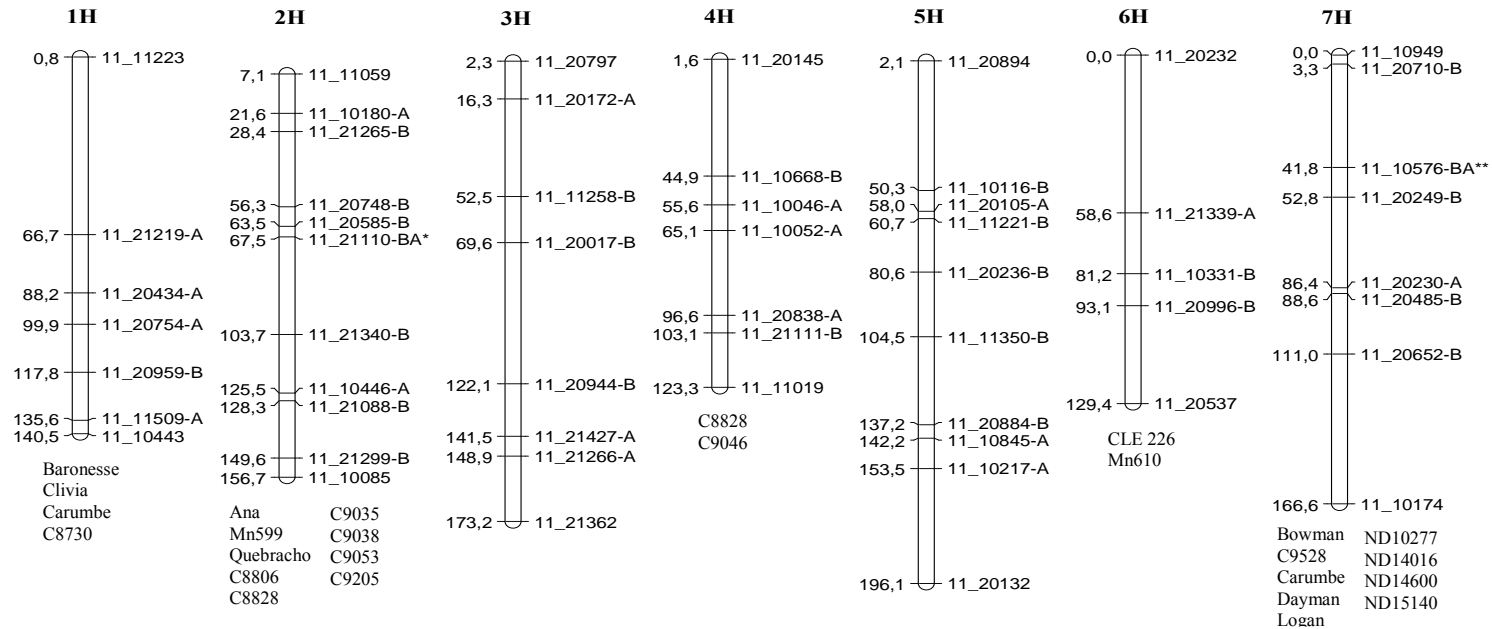


Fig. 6 Linkage map derived the 1033 SNPs for association mapping indicating markers and main QTLs found for the agronomic traits in the population of 76 genotypes. The order of markers and distances in centimorgans (cM) are based on the BOPA 1 (Close *et al.*, 2009). Distances in cM are to the left of the chromosomes. Markers and principal QTL found, with their abbreviations, are to the right of the chromosomes and to the right of these are allele (A or B) favorable for each of them. Below each chromosome genotypes possessing desirable identified haplotypes are shown.

* A allele is favorable to SPM^2 on Pay08b, $SF2$ on Pay 08b and Col08, GF , HD on Pay07, and only unfavorable to GS on Pay07.

** B allele is favorable and unfavorable to TGW and GM^2 respective.

Supplementary Table 5. Haplotypes identified in the interval (58.2 – 69.5 cM) of chromosome 2H.

		Marker																										
		11_10796 ^a	11_20476 ^a	11_10679 ^a	11_20039 ^b	11_10317 ^b	11_111178 ^b	11_20669 ^a	11_20251 ^b	11_20032 ^b	11_11206 ^a	11_10436 ^b	11_20390 ^b	11_20532 ^b	11_20887 ^b	11_10909 ^b	11_20585 ^a	11_10191 ^a	11_10692 ^a	11_21399 ^a	11_20438 ^a	11_10685 ^a	11_10632 ^b	11_11430 ^a	11_21166 ^a	11_21110 ^a	11_10651 ^b	11_21144 ^a
Position (cM)		58.2	58.9	58.9	58.9	59.9	59.9	59.9	59.9	59.9	62.8	62.8	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	64.2	66.8	67.5	68.2	69.5
Genotype		Allele																										
Haplotype 1	BARONESSE	B	A	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	C8730	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	C9035	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	C9172	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	C9173	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	CLE233	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	CHERI	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	CLIVIA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	DANUTA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	DEFRA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	DIAMANT	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	GULL	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	ISARIA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	KARL	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	LISA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	PERUN	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	Q. AYELEN	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	SCARLETT	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	TRUMPF	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
	UNION	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B
VILLA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B	
VOLLA	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B	
Haplotype 2	ANA	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	C8806	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	C8828	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	C9038	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	C9205	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	CLE226	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	CLIPPER	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
	FNC122	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A

Continue Supplementary material Table 5...

		Marker																										
		11_10796 ^a	11_20476 ^a	11_10679 ^a	11_20039 ^b	11_10317 ^b	11_11178 ^b	11_20669 ^a	11_20251 ^b	11_20032 ^b	11_11206 ^a	11_10436 ^b	11_20390 ^b	11_20532 ^b	11_20887 ^b	11_10909 ^b	11_20585 ^a	11_10191 ^a	11_10692 ^a	11_21399 ^a	11_20438 ^a	11_10685 ^a	11_10632 ^b	11_11430 ^a	11_21166 ^a	11_21110 ^a	11_10651 ^b	11_21144 ^a
Position (cM)		58.2	58.9	58.9	58.9	59.9	59.9	59.9	59.9	59.9	62.8	62.8	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	63.5	64.2	66.8	67.5	68.2	69.5
Genotype		Allele																										
MAGNIFIC104		A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
PRIOR		A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
Q. PAMPA		A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
QUEBRACHO		A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
STIRLING		A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	A
Haplotype 3	AUORE	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	BEKA	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	BONITA	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	HAISA	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	HANNA	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	HARRINGTON	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	KENIA	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	PIROLINE	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	WMRI	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B
	YMER	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B

^a markers associated with some agronomic trait.

^b markers not associated with any agronomic trait. Note that two of these markers (11_10909 – 63.5 cM y 11_10651 – 68.2 cM) are not representative of the groups proposed.

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

La adaptación de un cultivo a condiciones específicas de producción y por tanto su resultado productivo final depende en muchos casos de caracteres agronómicos relativamente complejos. El mejoramiento genético busca, precisamente, lograr mejoras en dichas variables, en forma directa o indirecta, con el objetivo último de mejorar el resultado productivo y económico del cultivo. El conocimiento de las bases genéticas que explican o afectan dichas variables es fundamental para un adecuado ajuste de las estrategias de mejoramiento vegetal.

Conocer las bases genéticas de tales variables implica el proceso de superar la evaluación de las líneas y cultivares como simplemente fenotipos para analizarlos como una combinación de genes particulares. La caracterización genotípica de los materiales que utiliza un programa de mejoramiento, junto con el conocimiento mencionado, abre la posibilidad de una utilización más eficiente de ellos, permitiendo el uso de herramientas como la selección asistida o la selección genómica, la elección genotípica de los padres a cruzar, el conocimiento del grado de dificultad al momento de seleccionar por más de una variable (distancia entre regiones asociadas a ellas), etc. Identificar asociaciones marcador – carácter provee información acerca de las regiones genómicas con control sobre variables de interés, por tanto nos ayudan a conocer el valor genético genuino de los genotipos con los que trabajamos. Para la determinación de las bases genéticas de variables de interés, la metodología más usada ha sido el análisis clásico de QTL en base a poblaciones bi-parentales. Más recientemente se ha comenzado a utilizar el mapeo asociativo (MA) a partir de desequilibrio de ligamiento (DL), técnica creada y usada en poblaciones humanas, donde la producción de poblaciones balanceadas no es posible (Flint-García *et al.*, 2003). Dentro de las ventajas se encuentra la posibilidad de utilizar una población de mapeo amplia y representativa, sin que esta tenga que ser balanceada, mayor análisis por locus y robustez en los resultados y capacidad de uso de datos fenotípicos colectados con anterioridad (Kraakman *et al.*, 2004).

El germoplasma extranjero ha tenido una fuerte predominancia a lo largo de la historia del cultivo de cebada en el Uruguay, siendo muy pocos los casos de

desarrollo de germoplasma local (Castro *et al.*, 1995). La investigación nacional en las dos últimas décadas desarrolló un ideotipo del cultivo para las condiciones de Uruguay caracterizado por un lento crecimiento inicial en combinación con altas tasas de crecimiento pre-antesis (Hoffman *et al.*, 1992; Ernst *et al.*, 1991; Castro y Kemanian, 1999). Este patrón de crecimiento asegura mayores IC y rendimiento a través de un aumento de espigas por superficie sin reducir los rendimientos por espiga (Hoffman *et al.*, 1993b). Aquellos genotipos que siguen dicho patrón comenzarán el período de llenado de grano antes, por lo que las temperaturas al ser menores, influirán menos sobre el acortamiento de esta etapa. Los caracteres favorables a combinar se encuentran: alto número de SPM², de GS, elevado peso de grano y porcentaje de 1^a + 2^a, corto ciclo a floración y largo período de llenado de grano (Castro *et al.*, 1993). A pesar de que estas variables se consideran claves para la adaptación del cultivo en las condiciones locales, nuestro conocimiento de sus bases genéticas es limitado. Si bien la información a nivel internacional es abundante, es escasa la posibilidad de utilizarla en nuestros programas de mejoramiento ya que muchos de los caracteres evaluados no son de interés en esta región y el germoplasma empleado en tales estudios no es representativo del utilizado en el Uruguay.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de las bases genéticas de las variables que definen la adaptación agronómica de cebada cervecera en Uruguay, estudiamos una población de 76 genotipos en dos localidades y en dos años. La mayoría de los genotipos fueron viejos cultivares con un importante impacto histórico sobre el cultivo en el Cono Sur, tanto por el uso directo como por su uso para el desarrollo de cultivares locales. Además la población contó con varias líneas experimentales provenientes de programas de mejoramiento locales y cultivares actuales, lo que facilitó conocer el origen y la variabilidad de algunas de las regiones más importantes asociadas a adaptabilidad agronómica. La técnica utilizada fue el estudio de asociación por desequilibrio de ligamiento a lo largo del genoma (genome-wide association, GWA), la cual permite el uso de poblaciones de interés y genéticamente diversas.

Aunque no se determinó la caída del LD, estimamos que sea lenta debido básicamente al tipo de reproducción de la especie (autogamia) y a la presencia en la población de una gran mayoría de genotipos que han pasado por procesos de selección (Gupta *et al.*, 2005). Comadran (2009), trabajando con una población de 192 genotipos representando el pasado y presente del germoplasma utilizado en el Mediterráneo, estableció valores de $r^2 > 0.15$ hasta 3.12 cM. Si esto se cumple, la densidad de marcadores utilizada no tendría que ser un impedimento para hallar asociaciones marcador – carácter a los largo del genoma en nuestra población. Si bien existe una tendencia en los trabajos de MA en trabajar con un muy alto número de marcadores con el objetivo de hacer un mapeo fino de las regiones de interés (Roy *et al.*, 2010), estudios previos en cebada (Kraakman *et al.*, 2004; Rostoks *et al.*, 2006; Comadran *et al.*, 2009) han reportado asociaciones marcador – carácter con densidades de marcadores por cromosoma sensiblemente por debajo de las que aquí se emplearon.

La estructura genética de la población utilizada estuvo explicada a nuestro juicio por dos factores claves: ancestros comunes y origen geográfico. El hábito de crecimiento (invernal vs primaveral) o el número de hileras en la espiga, que fueron caracteres claves para la separación de grupos con diferente estructura genética en reportes como los de Rostoks *et al.* (2006) y Comadran *et al.* (2009), no tiene mayor trascendencia en nuestra población dado que estuvo compuesta por genotipos primaverales y casi en su totalidad de dos hileras. De todas formas, en nuestro trabajo quedó claro que sin la incidencia de tales factores, los efectos de estructura pueden seguir presentes, ocasionando asociaciones espurias o falsos positivos en estudios de asociación

En las asociaciones marcador – carácter detectadas en este trabajo, se observaron ciertos patrones. En primer lugar, muchas de las asociaciones detectadas fueron localizadas en grupos y asociadas a más de una variable. El brazo corto del cromosoma 2H fue la región que reunió el mayor número de QTL detectados. En el Bin 5 los marcadores 11_20748 y 11_20891; 56.3 cM, se asociaron en todos los ambientes a *GPI* y *GP2* y para menos ambientes a *TGW*, *YLD*, *HIN* y *SPM*². Marcadores en DL ($r^2 \geq 0.2$) y vecinos a estos dos marcadores también tuvieron

asociación en algunos ambientes con las mismas variables (Figura 4a y Tabla 3). Observando estos resultados y teniendo en cuenta la existencia de reportes que asociaron a este segmento con *YLD* (Li *et al.*, 2006; Comadran *et al.*, 2008; Psawarayi *et al.*, 2008), *TGW* (Li *et al.*, 2006) y con *GPI* y *GP2* (Thomas *et al.*, 1995) se podría estar ante una región conservada con efectos pleiotrópicos o ligados sobre tales variables. Analizando los altos coeficientes de correlación que existieron entre estas variables (Tabla 4) y sumado al hecho de que alguna de estas variables son formas de medir lo mismo (*GPI*, *GP2*, *TGW*) o que unas forman a otras, es presumible que al menos en algunos casos la causa de la coincidencia de efectos detectados se deba a pleiotropía.

En segundo lugar, en numerosos QTL se encontraron varios marcadores cercanos asociados a la misma variable y en DL entre ellos. Ejemplos de esto se encuentran en el 4H entre los marcadores 11_10010 (66.0 cM) y 11_10606 (67.5 cM) asociados ambos a *SPM²* y con un r^2 de 0.76 entre ellos (Figura 4b) y en el 7H entre los marcadores 11_20249 (52.8 cM) y 11_20113 (56.8 cM) asociados ambos a *GPI*, con un r^2 de 0.27 entre ellos (Figura 3c). Dentro del brazo corto del 2H un conjunto de marcadores en DL entre el marcador 11_10796 (58.2 cM – Bin 5) y el marcador 11_21144 (69.3 cM – Bin 6) se asociaron a *GF* en Pay07 (Figura 3a). Este bloque en DL asociado principalmente a *GF* fue el más grande encontrado en nuestro trabajo. Ambos patrones o tipos de agrupamiento en las asociaciones marcador – carácter indican la potencial complejidad para delimitar la exacta ubicación de un gen aparentemente funcional. De todos modos, en términos del objetivo del trabajo, no impiden ni la detección de regiones asociadas a variables de interés ni su utilización en mejoramiento en la medida que los alelos favorables no se encuentren en fase de repulsión.

Como se mencionó anteriormente, la detección de importantes bloques de marcadores en DL puede estar dada por el tipo de población utilizada. Como lo plantean Caldwell *et al.* (2006), ciertas regiones del genoma en determinados grupos de individuos son más comunes que en otros. Poblaciones que han pasado por procesos de selección es esperable que fijen regiones genómicas asociadas a los caracteres seleccionados. Por lo tanto, el tipo de reproducción del cultivo y el hecho

de que la población esté formada por genotipos que han sido el resultado de procesos de selección artificial, surgen como las principales causas potenciales de presencia de bloques en DL. De todas formas, haber encontrado un bloque tan grande (11.1 cM en el 2H) asociado a varios caracteres agronómicos no deja de ser llamativo. Los ocho marcadores que forman ese bloque pertenecen parte al Bin 5 y parte al Bin 6 y tienen en común la asociación significativa a *GF*, aunque alguno de ellos también se asoció a variables como *GPI*, *GP2*, *YLD* y *HIN*. Considerando los reportes previos de variables agronómicas del Bin 5 mencionados anteriormente, existe la posibilidad de que hayamos detectado un gran bloque genómico relativamente conservado. La información nacional es coincidente en señalar a *GF* como una variable importante para la adaptabilidad agronómica del cultivo, en particular en lo que refiere a asegurar un buen tamaño de grano (Castro *et al.*, 1997; Castro y Kemanian, 1999) y las correlaciones fenotípicas encontradas en nuestros experimentos corroboran esto. De todas maneras es importante considerar que el proceso de desarrollo de la mayoría de los genotipos incluidos en el trabajo no tuvo como objetivo la adaptación a las condiciones locales. No hay estudios que informen de QTLs para *GF* en esta región, pero sí para otras variables fenológicas. Laurie *et al.* (1995) reportaron para el Bin 6 el gen *eps2S* asociado a precocidad *per se*, variable estrechamente relacionada ya que marca el principio de *GF*. En las condiciones climáticas uruguayas Castro *et al.* (2008) detectaron efectos de QTL para la duración del ciclo a antésis en la población haploide doblada Baronesse/BCD47 coincidentes con la localización de éste gen al que postulan como candidato. Otros caracteres asociados a este bloque son varios caracteres de calidad maltera. Hayes *et al.* (1993) y Han *et al.* (1995) detectaron QTLs para poder diastásico y contenido de beta-glucanos en la población Steptoe/Morex. Thomas *et al.* (1996) encontraron efectos de QTL para germinación y nitrógeno en grano y Powell *et al.* (1997) para contenido de nitrógeno en grano y sensibilidad al agua de la semilla, ambos grupos trabajando en la población Blenheim/E224-3. Estos resultados sugieren dos posibles causas del DL encontrado: las regiones conservadas están explicadas por variables no medidas en este trabajo (la calidad maltera es un factor trascendente en los todos los programas de mejoramiento involucrados) o las variables fenológicas pueden estar afectando de

algún modo las características de la semilla deseadas para el malteo. En el caso de nuestra población la etapa siguiente del trabajo es el análisis de las variables de calidad maltera, lo que puede aportar respuestas a la pregunta planteada.

Analizando los haplotipos existentes en nuestra población en el bloque cromosómico mencionado y basándonos en la información de datos de pedigree reportada por Arias *et al.* (1983), encontramos que el DL está explicado básicamente por tres grupos genotípicos conformados en base a tres ancestros comunes y a cuatro orígenes geográficos. El grupo más numeroso (22 de 76) tiene en común la presencia de Gull (Suecia) en la genealogía de todos los genotipos que lo forman, Prior (Australia) son los ancestros comunes del segundo grupo (13 de 76) y el tercer grupo (10 de 76) está compuesto por Hanna (Rep. Checa) como ancestro común. Reforzando la idea de que *HD* y *GF* hayan tenido un fuerte impacto en la consolidación del bloque, existen claras diferencias en los días promedio a floración y días de duración del llenado de grano entre los ancestros comunes mencionados arriba (datos sin publicar).

También se detectaron regiones genómicas en DL entre cromosomas. La situación de DL más notable es la detectada entre zonas del 2H, 5H y 7H. (Figura 4). El marcador 11_20710 (3.3 cM) en el 7H, asociado a *GP2* y *TGW* en Pay08a, está en DL con los marcadores 11_11198 (48.3 cM) y 11_10116 (50.3 cM) ($r^2=0.30$ y 0.27 , respectivamente) en el 5H, asociados ambos a *YLD* en Col07, y con el marcador 11_10446 (125.5 cM) ($r^2=0.24$) en el 2H asociado a *TGW* en Pay08b. Debido a la relación existente entre las variables asociadas, es posible sospechar de una co-selección entre las regiones, aunque es interesante destacar que si bien se detectó LD entre el marcador 11_20710 y los demás, no se observó DL entre los marcadores del 2H y 5H. Considerando esto, en primera instancia podríamos sugerir que estas tres regiones genómicas sobre estos tres cromosomas hayan estado sujetas a selección y que quizás el QTL sobre el 7H, por alguna razón haya sido mayormente seleccionado. Además, si analizamos el DL que existe en torno a este marcador (11_20710) también nos lleva a la misma hipótesis ya que se encuentra en DL con marcadores vecinos desde el inicio del 7H (11_20303 – 0 cM) hasta el marcador 11_20014 - 17.19 cM (Figura 5 - Anexos). Este extenso DL encontrado en el BIN 1

del 7H no es tan evidente en las otras dos regiones (2H y 5H). Estudiando los haplotipos existentes entre estos cuatro marcadores en DL, podemos diferenciar dentro de la población tres grupos (datos no presentados). El mayor grupo (39 genotipos) se integra por viejos genotipos europeos que aparecen con gran frecuencia en los pedigrís de variedades comerciales en todo el mundo (Prior, Hanna, Haisa) (Arias *et al.*, 1983) y la descendencia de ellos. Un segundo grupo lo componen 14 genotipos incluyendo fuentes originales europeas (Gull, Isaria) y su descendencia. El tercer grupo de 9 genotipos, lo componen materiales de North Dakota (Logan, Bowman) y su descendencia. Este último grupo tiene la particularidad de ser el único en presentar el alelo favorable del marcador 11_20710 para *TGW* y *GP2*. Esto limita la posibilidad de que el BIN 1 del 7H podría haber sido la región por la cual se haya seleccionado por *TGW* o *GP2* y abre la posibilidad de que la selección alrededor de este marcador haya sido por variables no medidas en este trabajo.

A partir de uno de los hallazgos principales del trabajo que fue el haber encontrado zonas del genoma con marcadores en DL y asociados significativamente a variables agronómicas, se utilizaron aquellos marcadores asociados a más variables en ellas y con menores valores de p para identificar genotipos con haplotipos favorables en los distintos cromosomas (Figura 6 – Anexos). Nueve genotipos tuvieron el haplotipo combinando todos los alelos favorables en el cromosoma 3H y otros nueve en el 7H. El agrupamiento de genotipos por haplotipos para estos cromosomas no sería al azar. La mayoría de los genotipos con haplotipos deseables para el 3H son líneas experimentales desarrolladas en Paysandú (Estación experimental 'Dr Mario A. Cassinoni'), progenitores introducidos desde Australia (Quebracho), Brasil (Mn599) y Argentina (Ana), todos ellos, genotipos con fenología precoz con buena adaptación a la zona norte de producción. Se debe considerar además que esa región es predominante en los ambientes utilizados en el presente estudio (tres de cinco ambientes, y los de mayor potencial) y es la región utilizada para seleccionar en el programa de Facultad de Agronomía. Por otro lado, todos los genotipos con la combinación alélica favorable para el 7H fueron desarrollados por la North Dakota State University (ND10277, ND14016, ND14600, ND15140, Bowman, Logan, Carumbé, Daymán) u obtenidos de cruzas con material de dicho

origen (C9528). El hecho de que muchos de los genotipos con el haplotipo “ideal” para algunas regiones cromosómicas hayan sido desarrollados en el Uruguay no es llamativo. El seleccionar año a año aquellos genotipos sobresalientes en un determinado ambiente sería esperable que favorezca la fijación de ciertas regiones genómicas de buen comportamiento para dicho ambiente.

En otro orden y como era esperable, en los ambientes de alto potencial de rendimiento (Pay07, Pay08a y Pay08b) fue dónde se encontró el mayor número de QTL (53). En condiciones de estrés ambiental de algún tipo, los caracteres complejos reducen su varianza genética y su heredabilidad (van Eeuwijk *et al.*, 2010), por ende nuestra capacidad para detectar diferencias fenotípicas producto de genotipos diferentes. Por el contrario en ambientes de bajo potencial de rendimiento (Col07 y Col08) quizás por el aumento relativo de la variabilidad ambiental sólo 26 QTL fueron detectados. La mitad de estos fueron detectados tanto en condiciones de alto potencial como en bajo y la otra mitad sólo en Col07 y Col08, surgiendo la posibilidad de existencia de QTL ambiente-específicos. Algunos de los QTL sólo detectados en ambientes de estrés (Colonia) pudieron ser ambiente – específicos, como el QTL detectado en el brazo largo del 7H asociado a YLD. Al igual que Comadran *et al.* (2008) reportaron en el brazo largo del 7H un posible QTL – específico asociados a YLD bajo estrés (hídrico), nosotros detectamos en la misma región genómica un QTL para YLD en uno de los ambientes de bajo potencial de rendimiento (Col07) (Tabla 3).

Así como las condiciones ambientales al interactuar de forma diferencial sobre los genotipos modifican la expresión de determinados caracteres, también es esperable que modifiquen las correlaciones fenotípicas entre las variables. Es presumible que algunos genotipos formen su rendimiento de manera diferencial en situaciones de bajo potencial y en situaciones de alto potencial. En este trabajo, al contar con ambientes relativamente contrastantes, muchas de las correlaciones entre componentes de rendimiento siguieron una tendencia en ambientes de alto potencial, siendo otra en ambientes de bajo potencial (Tabla 3). Estos cambios en las correlaciones fenotípicas entre variables debidas al tipo de ambiente podrían estar modificando nuestra capacidad para detectar ciertos QTL en algunos ambientes.

Conocer una parte importante de las bases genéticas de variables de interés en el germoplasma local nos impulsa a emplear a la genómica como una herramienta más en el mejoramiento genético nacional. De todas formas, existe un largo camino entre los resultados de este trabajo y el empleo real de la genómica en nuestros programas de mejoramiento. Los resultados aquí presentados son alentadores, pero aun no son suficientes como para emplearlos directamente en el mejoramiento nacional. A pesar de los grandes avances que ha habido en la tecnología de marcadores moleculares, la selección asistida por ellos (SAM), no ha sido efectiva con caracteres cuantitativos, siendo probablemente la causa más importante, la dificultad en la detección de tales caracteres (Heffner *et al.*, 2009). La SAM ha sido una metodología de alto impacto en el mejoramiento genético sólo cuando los genes involucrados son pocos y de gran efecto (Dekkers and Hospital, 2002).

Por otro lado, el hecho de conocer cuáles serían los haplotipos deseables para cada cromosoma medidos en un determinado ambiente nos muestra cuán cerca o lejos estamos de llegar a ellos. Pero quizás lo más importante, podemos saber dónde está la variabilidad de interés, es decir, qué individuos poseen los alelos que estamos buscando. Sin embargo, tener presente los haplotipos de interés no nos asegura el éxito, ya que no se trata sólo de ir acumulando alelos favorables, los alelos analizados en este trabajo son sólo una pequeña fotografía del germoplasma de cebada cervecera existente. Puede pasar, por ejemplo, que muchas de las regiones mantengan interacciones epistáticas favorables con locus no detectados en este trabajo, por lo que sólo seleccionar algunos alelos no nos garantiza la obtención de un cultivar elite. En otras palabras, creemos que un haplotipo deseable es mucho más que aquellos locus deseables detectados en este análisis. Si además tenemos en cuenta que se analizaron únicamente variables agronómicas, más cuidado tendremos que tener en cómo utilizar los resultados de este trabajo.

En el corto plazo a nuestro estudio se le agregará la información acerca de las bases genéticas que explican variables de calidad maltera (variables clave para la liberación de nuevos cultivares), por lo que se ampliará sustantivamente el set de locus deseados u objetivo para el cultivo. En este escenario y con la continua disminución en los costos unitarios en la elaboración de datos de marcadores, la

selección genómica podría ser una metodología a seguir, levantando alguna de las trabas metodológicas actualmente experimentadas por la clásica SAM sobre caracteres complejos.

Este trabajo creemos que hace un importante aporte al conocimiento de la diversidad alélica con la que contamos para trabajar en nuestros programas de mejoramiento. Si además tenemos en cuenta la inexistencia de este tipo de estudio a nivel nacional, hace un gran aporte para consolidar en el corto y mediano plazo a la genómica como una herramienta clave en los programas de mejoramiento en el Uruguay.

4. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aghnoum, R.; Marcel, T.C.; Johrde, A.; Pecchioni, N.; Schweizer, P. and Nix, R.E. 2010. Basal host resistance of barley to powdery mildew: connecting quantitative trait loci and candidate genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 91–102.
- Abeledo, G.L.; Calderini, D.F. and Slafer, G.A. 2003. Genetic improvement of barley yield potential and its physiological Determinants in Argentina (1944-1998). *Euphytica.* 130: 325-334.
- Abeledo, G.; Calderini, D.F. and Slafer, G.A. 2002. Physiological Changes Associated with Genetic Improvement of Grain Yield. In: Slafer, G.A. Molina-Cano, J.L.; Savin, R.; Araus J.L.; Romagosa, I. (Eds.). *Barley Science, Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality.* Food Product Press, Nueva York, USA. pp. 361-385.
- Agrama, H.A.; Eizenga, G.C. and Yan, W. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol. Breeding.* 19: 341-356.
- Albín, I.J. 2005. Caracterización genética y sanitaria de una colección de germoplasma de cebada por resistencia a mancha borrosa causada por *cochliobolus sativus*. Facultad de Agronomía Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 62 p.
- Arbelbide, M.; Yu, J.; Bernardo, R. 2006. Power of mixed-model QTL mapping from phenotypic, pedigree and marker data in self-pollinated crops. *Theor. Appl. Genet.* 112: 876-884.
- Ardlie, K.J.; Kruglyak, L. and Seielstad, M. 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 3: 299-309.
- Arias, G.; Reiner, L.; Penger, A. and Mangstl, A. 1983. *Directory of Barley cultivars and lines.* Stuttgart, Verlag Eugen. 391 p.
- Asins, M.J. 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding.* 121: 281-291.

- Austin, R.B. 1980 Opportunities for increasing crop yields. In: Hurd, R.G.; Biscoe, P.V.; Dennis, C. (Eds). Physiological limitations to cereal yields and ways of reducing them by breeding. London, Pitman, 3-19.
- Backes, G.; Graner, A.; Foroughi-Wehr B.; Fischbeck G.; Wenzel, G. and Jahoor, A. 1995. Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 90: 294-302.
- Badr, A.; Muller, K.; Schafer-Pregl R.; el Rabey, H.; Effgen, S.; Ibrahim, H.H.; Pozzi, C.; Rohde, W. and Salamini, F. 2000. On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*). Mol Biol Evol. 17: 499-510.
- Balbi, M.; Silveyra, M. and Tojo, C. 1995. Caracterización de la colección nacional de cebada. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 127 p.
- Barret, J.C.; Fry, B.; Maller, J. and Daly, M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 21 (2): 263-265.
- Barua, U.M.; Chalmers, K.J.; Thomas, W.T.B. and Hackett, C.A. 1993. Molecular mapping of genes determining height, time to heading, and growth habit in barley (*Hordeum vulgare*). Genome. 36: 1080-1087.
- Baum, B.R.; Bailey, L.G. and Thompson, B.K. 1985. Barley register. Agric. Canada Publ. 1783B. Ottawa, Canada.
- Beattie, A.D.; Edney, M.J.; Scoles, G.J.; and Rosnagel, B.C. 2010. Association Mapping of Malting Quality Data from Western Canadian Two-row Barley Cooperative Trials. Crop Sci. 50: 1649-1663.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. 57: 149-155.
- Bennett, M.D. and Smith, L.B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Series B. 274: 227-274.

- Bezant, J.; Laurie, D.; Pratchett, N.; Chojecki, J. and Kearsey, M. 1997. Mapping controlling yield components in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. *Mol. Breeding*. 3 (1): 29-38.
- Bezant, J.; Laurie, D.; Pratchett, N.; Chojecki, J. and 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.
- Bingham, I.J.; Blake, J.; Foulkes, M.J. and Spink, J. 2007. Is Barley yield in UK sink limited? I. Post-Anthesis radiation interception, radiation-use efficiency and source-sink balance. *Field Crop. Research*. 101: 198-211.
- Borevitz, J.O. and Chory, J. 2004. Genomics tools for QTL analysis and gene discovery. *Plant Biology*. 7: 132-136.
- Borrás, L.; Slafer, G.A. and Otegui, M.E. 2004. Seed dry weight response to source-sink manipulation in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research*. 86: 131-146.
- Bothmer, R.Von; Jacobsen, N.; Baden, C.; Jørgensen, R.B. and Linde-Laursen, I. 1995. An ecogeographical study of the genus *Hordeum*, 2nd Edn. *Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7*. Rome, IPGRI. 129 pp.
- Bradbury, P.; Parker, T.; Hamblin, M.T. and Jannink, J.L. 2011. Assessment of power and false discovery rate in genome-wide association studies using the Barley CAP germplasm. *Crop Sci*. 51: 52-59.
- Bradbury, P.J.; Zhang, Z.; Kroon, D.E.; Casstevens, T.M.; Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. 2007. Tassel: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatic application note*. 23: 2633-2635.
- Breseghello, F. and Sorrells, M.E. 2006. Association Mapping of Kernel Size and Milling Quality in Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*. 172: 1165–1177.
- Brown, G.R.; Gill, G.P.; Kuntz, R.J.; Langley, C.H. and Neale, D.B. 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 15255–15260.
- Buckler, E.S.; Gaut, B.S. and McMullen, M.D. 2006. Molecular and functional diversity of maize. *Curr. Opin. Plant Biol*. 9: 172–176.

- Capdevielle, F.; Rey, F.; Branda, A. y Germán, S. 1999. Marcadores moleculares para calidad maltera de cebada: dónde obtenerlos y cómo usarlos en programas de mejoramiento. En: Congreso Latinoamericano de Cebada (3°, 1999, Colonia, Uruguay). Resumen. Colonia, Uruguay, INIA-La Estanzuela.
- Caldwell, K.S.; Russell, J.; Langridge, P. and Powell, W. 2006. Extreme population-dependent linkage disequilibrium detected in an inbreeding plant species, *Hordeum vulgare*. *Genetics*. 172: 557–567.
- Castro, A.J.; Benitez, A.; Hayes, P.M.; Viega, L. and Wright, L. 2010. Coincident quantitative trait loci effects for dormancy, water sensitivity and malting quality traits in the BCD47 × Baronesse barley mapping population. *Crop and Pasture Science*. 61: 691–699.
- Castro, A.; Hayes, P.; Viega, L. and Vales, I. 2008. Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breeding*. 127: 561-568.
- Castro A. y Kemanian, A. 1999. Caracterización de una muestra representativa de la colección nacional de cebada cervecera en Paysandú durante 1993. Beratto E. (Ed.). En: Congreso de cebadas malteras (2°, 1996, Temuco, Chile). Congreso. Temuco, Chile, FAO, INIA-Carillán. pp. 131-140.
- Castro, A.; Ernst, O.; Hoffman, E. and Bentancur, O. 1997. Barley germplasm characterization using agronomic and quality traits. *Agrociencia*. 1: 80-87.
- Castro, A. 1995. El norte también existe. Adaptación local y evaluación de cultivares en los cultivos de invierno. *Cangüe* 27:18-23.
- Castro, A. 1994. Caracterización y agrupamiento de la base genética disponible de acuerdo a rendimiento y sus componentes, ciclo, producción de biomasa, curva de crecimiento y calidad física en base a los resultados de 1993. En: Reunión nacional de entidades de cebada cervecera. (5°, 1994, Colonia, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA-La Estanzuela. 184 p.
- Castro, A.; Siri, G. y Hoffman, E. 1994. Uso de características morfo- fisiológicas en la selección en planta aislada (resultados experimentales). En: Reunión

- nacional de entidades de cebada cervecera (5°, 1994, Colonia, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA-La Estanzuela. 184 p.
- Castro, A.; Hoffman, E. y Ernst, O. 1993. Caracterización y agrupamiento de 11 cultivares de cebada cervecera por ciclo, rendimiento en grano, sus componentes y calidad industrial. En: Reunión nacional de entidades de cebada cervecera (4°, 1993, Palmar, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA-La Estanzuela. 101 p.
- Chao, S.; Zhang, W.; Dubcovsky, J. and Sorrells, M. 2007. Evaluation of Genetic Diversity and Genome-wide Linkage Disequilibrium among U.S. Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germplasm Representing Different Market Classes. *Crop Sci.* 47: 1018-1030.
- Chen, Y. and Lübberstedt, T. 2010. Molecular basis of trait correlations. *Trends in Plant Science* 15: 454-461.
- Close, T.J.; Prasanna, R.B.; Bhat, P.R.; Wu, Y.; Rostoks, N.; Ramsay, L.; Druka, A.; Stein, N.; Svensson, J.T.; Wanamaker, S.; Bozdog, S.; Rose, M.L.; Moscou, M.J.; Chao, S.; Varshney, R.K.; Szücs, P.; Sato, K.; Hayes, P.M.; Matthews, D.E.; Kleinhofs, A.; Muehlbauer, G.J.; DeYoung, J.; Marshall, D.F.; Madishetty, K.; Fenton, R.D.; Condamine, P.; Graner, A. and Waugh, R. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics.* 10: 582.
- Cockram, J.; White, J.; Leigh, F.J.; Lea, V.J.; Chiapparino, E.; Laurie, D.A.; Mackay, I.J.; Powell, W. and O'Sullivan, D.M. 2008. Association mapping of partitioning loci in barley. *Genetics.* 9: 9-16.
- Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica.* 142: 169-196.
- Comadran, J.; Thomas, W.T.B.; van Eeuwijk, F.A.; Ceccarelli, S.; Grando, S.; Stanca, A.M.; Pecchioni, N.; Akar, T.; Al-Yassin, A.; Benbelkacem, A.; Ouabbou, H.; Bort, J.; Romagosa, I.; Hackett, C.A. and Russell, J.R. 2009. Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured

- Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. *Theor. Appl. Genet.* 119: 175-187.
- Comadran, J.; Rusell, J.R.; van Eeuwijk, F.A.; Ceccarelli, S.; Grando, S.; Baum, M.; Stanca, A.M.; Pecchioni, N.; Mastrangelo, A.M.; Akar, T.; Al-Yassin, A.; Benbelkacem, A.; Choumane, W.; Ouabbou, H.; Dahan, R.; Bort, J.; Araus, J.L.; Paswarayi, A.; Romagosa, L.; Hackett, C.A. and Thomas, W.T.B. 2008. Mapping adaptation of barley to droughted environment. *Euphytica.* 161: 35-45.
- Condón, F. 2006. Genetic grain, diversity, and marker-trait association in Minnesota barley germplasm. Ph.D dissertation, University of Minnesota St. Paul.
- Dekkers, J.C.M. and Hospital, F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics.* 3: 22-32.
- de la Peña, RC, Smith, K.P.; Capettini, F.; Muehlbauer, G.J.; Gallo-Meagher, M.; Dill-Macky, R.; Somers, D.A. and Rasmusson, D.C. 1999. Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Theor. Appl. Genet.* 99: 561-569.
- Doerge, R.C. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics.* 3: 43-52.
- Dreccer, F.; Grashoff, C. and Rabbinge, R. 1997. Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling: effects on senescence and grain protein concentration. *Field Crop Research.* 49: 269-277.
- Ernst, O.; Hoffmann, E.; Mailhos, M.; y Urruty, F. 1991. Análisis comparativo del crecimiento de trigo y cebada y su efecto sobre la determinación del rendimiento. En: Reunión nacional de investigadores de cebada cervecera (2º, 1991, Colonia, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA- La Estanzuela. 234 p.
- Eeuwijk, F.A. van; Bink, M.C.; Chenu, K. and Chapman, S.C. 2010. Detection and use of QTL for complex traits in multiple environments. *Plant Biology.* 13: 1-13.

- Falush, D.; Stephens, M. and Pritchard, J.K. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*. 164: 1567-1587.
- Fan, J.B.; Gunderson, K.L.; Bibicoba, M.; Yeakley, J.M.; Chen, J.; Wickman-Garcia E.; Lebruska, L.L.; Laurent, M.; Shen, R. and Barker, E. 2006. Illumina universal bead arrays. *Methods Enzymol*. 410: 57-73.
- Fan, J.B.; Olliphant, A.; Shen, R.; Kermani, B.J.; Garcia, F.; Gunderson, K.L.; Hansen, M.; Steemers, F.; Butler, S.L.; Deloukas, P.; Galver, L.; Hunt, S.; McBride, C.; Bibikova, M.; Rubano, T.; Chen, J.; Wickham, T.; Doucet, D.; Chang, W.; Campbell, D.; Zhang, B.; Kruglyak, S.; Bentley, D.; Hass, J.; Rigault, P.; Zhou, L.; Stuelpangel, J. and Chee, M.S. 2003. Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 68: 69-78.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. FAOSTAT. [En línea]. Consultado Julio 2011. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/370/default.aspx>
- Fiil, A.; Lenk, I.; Petersen, K.; Jensen, C.S.; Nielsen, K.K.; Schejbel, B.; Andersen, J.R. and Lübberstedt, T. 2010. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium of nine genes with putative effects on flowering time in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Science*. 180: 228-237.
- Fitzsimmons, R.W. and Wrigley, C.W. 1984. Australian barleys, 2nd Edn. Melbourne, Australia. CSIRO. 82p.
- Flint-García, S.A. 2003. Structure of Linkage Disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 357–374.
- Ford-Lloyd, B.V.; Newbury, H.J.; Jackson, M.T. and Virkš, P.S. 2001 Genetic basis for co-adaptative gene complexes in rice (*Oriza sativa* L.) landraces. *Heredity* 87: 530-536.
- Francia, E.; Tondelli, A.; Rizza, F.; Badeck, F.W.; Li Destri Nicossia, O.; Akkar, T.; Grando, S.; Al-Yassin, A.; Benbelkacem, A.; Thomas, W.T.B.; van Eeuwijk, F.; Romagosa, I.; Stanca, A.M. and Pecchioni, N. 2011. Determinants of barley grain yield in a wide range of Mediterranean environments. *Field Crop Research*. 120: 169-178.

- Fusari, C.M.; Lia, V.V.; Hopp, H.E.; Heinz, R.A. and Paniego, N.B. 2008. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms and analysis of Linkage Disequilibrium in sunflower elite inbred lines using the candidate gene approach. *Plant Biology*. 8:7.
- Gallagher, J.N.; Biscoe, P.J. and Scott, R.K. 1995. Barley and its environment. V. Stability of grain weight. *J. Appl. Ecol.* 12: 319-336.
- Garris, A.J.; McCouch, S.R. and Kresovich, S. 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5* locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics*. 165: 759–769.
- Gaut, B.S. and Long, A.D. 2003. The lowdown on linkage disequilibrium. *Plant Cell*. 15: 1502-1506.
- Gómez, B. 2005. Influencia del alelo de termoestabilidad de la β -amilasa de cebada en la fermentabilidad y en otros parámetros de calidad de malta. Trabajo Especial II. Licenciatura Bioquímica. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 45 p.
- Graner, A.; Jahoor, A.; Sehondelmaier, J.; Siedler, H.; Pillen, K.; Fischbeck, G.; Wenzel, G. and Herrmann, R.G. 1991. Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* 83: 250-256.
- Gupta, P.K.; Rustgi, S. and Kulwal, P.L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in high plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*. 57: 461-485.
- Gyenis, L.; Yun, S.J.; Smith, K.P.; Steffenson, B.J.; Bossolini, E.; Sanguineti, M.C. and Muelbahuer, 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.
- Hamblin, M.; Close, T.; Bhat, P.; Chao, S.; Abraham, K.; Blake, T.; Brooks, W.S.; Cooper, B.; Griffey, C.A.; Hayes, P.M.; Hole, D.J.; Horsley, L.D.; Obert, D.E.; Smith, K.P.; Ullrich, S.E.; Muehlbauer, G.J.; Jannink, J.L. 2010. Population structure and linkage disequilibrium in US barley germplasm: implications for association mapping. *Crop Sci.* 50: 556-566.

- Hamblin, M.T.; Mitchell, S.E.; White, G.M.; Gallego, J.; Kukatla, R.; Wing, R.A.; Peterson, A.H.; Kresovich, S. 2004. Comparative population genetics of the Panicoid grasses: Sequence polymorphism, linkage disequilibrium and selection in a diverse sample of *Sorghum bicolor*. *Genetics*. 167: 471–483.
- Han, F.; Ullrich, S.E.; Chirat, S.; Menteur, S.; Jestin, L.; Sarrafi, A.; Hayes, P.M.; Jones, B.L.; Blacke, T.K.; Wesenberg, D.M.; Kleinhofs, A. and Kilian, A. 1995. Mapping of β glucan content and β glucanase activity loci in barley grain and malt. *Theor. Appl. Genet.* 91 (6-7) 921-927.
- Hayes, P.M.; Liu, B.H.; Knapp, S.J.; Chen, F.; Jones, B.; Blake, T.; Franckoviak, J.; Rasmusson, D.; Sorrells, M.; Ullrich, S.E.; Wesenberg, D. and Kleinhofs, A. 1993. Quantitative trait locus and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 87: 392-401.
- Heffner, E.L.; Sorrells, M.E. and Jannink, J.L. 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49: 1-12.
- Heun, M.; Kennedy, A.E.; Anderson, J.A.; Lapitan, N.L.V.; Sorrells, M.E. and Tanksely, S.D. 1991. Construction of a restriction fragments length polymorphism map of barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*. 34: 437-447.
- Hoffman, E.; Ernst, O. y Castro, A. 1993a. Rendimiento en grano y sus componentes. I.- Bases fisiológicas y evolución histórica a nivel mundial. En: Reunión Nacional de investigadores de cebada (4°, 1993, Palmar, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA-La Estanzuela. 101 p.
- Hoffman, E.; Ernst, O.; Brassetti, D. y Bentancur O. 1993b. Analisis y caracterización de patrones de crecimiento inicial en 11 variedades de cebada cervecera. En: Reunión Nacional de investigadores de cebada. (4°, 1993, Palmar, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA-La Estanzuela. 101 p.
- Hoffman, E.; Ernst, O.; Brassetti, D.; Siri, G. y Espasandin, A. 1992. Modificación por manejo de la curva de crecimiento, su influencia sobre rendimiento, componentes y calidad industrial de cebada cervecera. En: Reunión Nacional de investigadores de cebada (3°, 1992, Minas, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA-La Estanzuela. 133 p.

- Jones, N.; Ougham, H. and Thomas, H. 1997. Markers and mapping: We are all geneticist now. *New Phytol.* 137: 165-177.
- Jorde, L.B. 2000. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res.* 10: 1435-1444.
- Kemarian, A.R.; Stöckle, C.O.; Huggins, D.R. and Viega, L.M. 2007. A simple method to estimate harvest index in grain crops. *Field Crops Research.* 103: 208-216.
- Kjaer, B. and Jensen, J. 1996. Quantitative trait loci for grain yield and yield components in a cross between a six-rowed and two-rowed barley. *Euphytica.* 90: 39-48.
- Kleinhofs, A. and Graner, A. 2001. An integrated of the barley genome. In: Philips R.L. and Vasil, I.K. (Eds). *DNA-based markers in plants.* 2nd Edn. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic. pp. 187-200.
- Kleinhofs, A.; Kilian, A.; Saghai Maroof, M.A.; Biyashev, R.M.; Hayes, P.M.; Chen, F.Q.; Lapitan, N.; Fenwick, A.; Blake, T.K.; Kanazin, V.; Ananiev, E.; Dahleen, L.; Kudrna, D.; Bollinger, J.; Knapp, S.J.; Liu, B.; Sorrells, M.; Heun, M.; Franckowiak, J.D.; Hoffman, D.; Skadsen, R. and Steffenson, B.J. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.* 86: 705–712.
- Kleinhofs, A.; Chao, S. and Sharp, P.J. 1988. Mapping of nitrate reductase genes in barley and wheat. In: Miller, T.E. and Koebner, R.M.D. (Eds). *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.* Bath. USA. Bath Press. pp. 541-546.
- Kolkman, J.M.; Berry, S.T.; Leon, A.J.; Slabaugh, M.B.; Tang, S.; Gao, W.; Shintani, D.K.; Burke, J.M. and Knapp, S.J. 2007. Single Nucleotide Polymorphisms and Linkage Disequilibrium in Sunflower. *Genetics.* 177: 457-468.
- Kraakman, A.T.W.; Martinez, F.; Mussiraliev, B.; van Eeuwijk, F.A. and Niks, R.E. 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol. Breeding.* 17: 41-58.

- Kraakman, A.T.W.; Niks, R.E.; Van den Berg, M.M.M.; Stam, P. and van Eeuwijk, F.A. 2004. Linkage Disequilibrium Mapping of Yield and Yield Stability in Modern Spring Barley Cultivars. *Genetics*. 168: 435-446.
- Langridge, P.; Karakousis, A.; Kretschmer, J. and Manning, S. 1995. A consensus linkage map of barley. *Mol. Breeding*. 1: 389-395.
- Laurie, D.A.; Pratchett, N.; Bezant, J.H. and 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*) cross. *Genome*. 38: 575-585.
- Li, J.Z.; Huang, X.Q.; Heinrichs, F.; Ganai, M.W. and Röder, M.S. 2006. Analysis of QTL for yield components, agronomic traits, and disease resistance in a advanced backcross population of spring barley. *Genome*. 49: 454-466.
- Loss, S.P. and Siddique, K.H.M. 1994. *Advances in Agronomy*. 52: 229-276.
- Luizzi, D. y Castro, A. 1992. Variabilidad genética: su contribución al desarrollo del cultivo de cebada en el Uruguay. En: Resúmenes de la Reunión Nacional de investigación en Cebada cervecera (2º, 1991, Colonia, Uruguay). Reunión. Montevideo, Uruguay, INIA- La Estanzuela. pp. 234.
- Maccaferri, M.; Sanguineti, M.C.; Noli, E. and Tuberosa, R. 2005. Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol. Breeding*. 15: 271-279.
- Malecot, A. 1949. *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson & Cie. Paris.
- Malysheva-Otto, L.V.; Ganai, M.W. and Röder, M.S. 2006. Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germoplas (*Hordeum vulgare L.*). *BMC Genetics*. 7:6.
- McMullen, M.D.; Kresovich, S.; Sanchez Villeda H.; Bradbury, P.; Li, H.; Sun, Q.; Flint-Garcia, S.; Thornsberry, J.; Acharya, C.; Bottoms, C.; Brown, P.; Browne, C.; Eller, M.; Guill, K.; Harjes, C.; Kroon, D.; Lepak, N.; Mitchell, S.E.; Peterson, B.; Pressoir, G.; Romero, S.; Oropeza Rosas, M.; Salvo, S.; Yates, H.; Hanson, M.; Jones, E.; Smith, S.; Glaubitz, J.C.; Goodman, M.; Ware, D.; Holland, J.B. and Buckler, E.S. 2009. Genetic Properties of the Maize Nested Association Mapping Population. *Science*. 325: 737-740.

- Manly, B.F.J. 1988. The comparison and scaling of student assessment marks in several subjects. *Appl. Statist.* 37 (3): 385-395.
- Marquez-Cedillo, L.A.; Hayes, P.M.; Jones, B.L.; Kleinhofs, A.; Legge, W.G.; Rossangel, B.G.; Sato, K.; Ullrich, E. And Wesenberg, D.M. 2000. QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite North American carieties representing different germplasm group. *Theor. Appl. Genet.* 101: 173-184.
- Massman, J.; Cooper, B.; Horsley, R.; Neate, S.; Dill-Macky, R.; Chao, S.; Dong, Y.; Schwarz, P.; Muelhbauser, G.J. and Smith, K.P. 2011. Genome-wide association mapping og Fusarium head blight resistance in contemporary barley breeding germplasm. *Mol. Breeding.* 27: 439-454.
- Mather, D.E.; Tinker, N.A.; LaBerge, D.E.; Edney, M.; Jones, B.L.; Rossnagel, B.G.; Legge, W.G.; Briggs, K.G.; Irvine, R.B.; Falk, D.E. and Kasha, K.J. 1997. Regions of the genome that affect grain and malt quality in a North American two-row barley cross. *Crop Sci.* 37: 544-554.
- Melchinger, A.E.; Utz, H.F. and Schon, C.C. 1998. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics.* 149: 383–403.
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Uruguay. Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias. Anuario Estadístico Agropecuario 2010. (En línea). Consultado Julio 2011. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/>
- Miralles, D.J. and Slafer, G.A. 1999. Wheat development. In: Satorre, E.H. and Slafer, G.A. (Eds). *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination.* Food Product Press, New York. pp. 13–43.
- Morrell, P.L.; Toleno, D.M.; Lundy, K.E. and Clegg, M.T. 2005. Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 2442-2447.

- Muñoz, P.; Voltas, J.; Araus, J.L.; Igartua, E. and Romagosa, I. 1998. Changes over time in the adaptation of barley releases in northeastern Spain. *Plant Breeding*. 117: 531–535.
- Nordborg, M.; Borevitz, J.O.; Bergelson, J.; Berry, C.C.; Chory, J.; Hagenblad, J.; Kreitman, M.; Maloof, J.N.; Noyes, T.; Oefner, P.; Stahl, E.A. and Weigel, D. 2002. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 30: 190-193.
- Olliphant, A.; Barker, D.L.; Stuelpangel, J.R. and Chee, M.S. 2002. BeadArray technology: enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotech Suppl.* 5: 6-58.
- Ordóñez Jr, S.A.; Silva, J. and Oard, J.H. 2010. Association mapping of grain quality and flowering time in elite japonica rice germplasm. *Journal of Cereal Science*. 51: 337-343.
- Pallota, M.A.; Warner, P.; Fox, R.L.; Kuchel, H.; Jefferies, S.J. and Langridge, P. 2003. Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. In: Pogna, N.E.; Romano, M.; Pogna, E.A. and Galterio, Z. (Eds). *Proceeding of the 10th International Wheat Genetics Symposium, Paestum*. pp. 789-791.
- Parisseaux, B. and Bernardo, R. 2004. *In silico* mapping of quantitative trait loci in maize. *Theor. Appl. Genet.* 109: 508-514.
- Philips, R.L. and Vasil, I.K. 2001. *DNA-based markers in plants*. 2nd Edn. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic.
- Powell, W.; Thomas, W.T.B.; Baird, E.; Lawrence, P.; Booth, A.; Harrower, B.; McNicol, J.W. and Waugh, R. 1997. Analysis of quantitative trait in barley by the use of amplified fragment length polymorphism. *Heredity*. 79: 48-59.
- Price, A.L.; Patterson, N.J.; Plenge, R.M.; Weinblatt, M.E.; Shadick, N.A. and Reich, D. 2006. Principal component analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38: 904-909.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Pswarayi, A.; van Eeuwijk, F.A.; Ceccarelli, S.; Grando, S.; Comadran, J.; Russell, J.R.; Pecchioni, N.; Tondelli, A.; Akar, T.; Al-yassin, A.; Benbelkacem, A.;

- Ouabbou, H.; Thomas, W.T.V. and Romagosa, I. 2008. Changes in alleles frequencies in landraces, old and modern barley cultivars of marker loci close to QTL for grain yield under high and low input conditions. *Euphytica*. 163: 435-447.
- Qi, X.; Stam, P. and Lindhout, P. 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 376-384.
- Qi, X.; Stam, P. and Lindhout, P. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome*. 39: 379-394.
- Remington, D.L.; Thornsberry, J.M.; Matsuoka, Y.; Wilson, L.M.; Whitt, S.R.; Doebley, J.; Kresovich, S.; Goodman, M.M. and Buckler, E.S. .2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic association in the maize genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 11479–11484.
- Riggs, T.; Hanson, P.R.; Start, N.; Miles, D.; Morgan, C.Y. and Ford, M. 1981. Comparison of spring barley varieties grown in England and Wales between 1880 and 1980. *Journal Agric. Science*. 97 (3): 599-610.
- Rostocks, N.; Ramsay, L.; MacKenzie, K.; Cardle, L.; Bhat, P.R.; Roose, M.L.; Svensson, J.T.; Stein, N.; Varshney, R.K.; Marshall, D.F.; Graner, A.; Close, T.J. and Waugh, R. 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 18656-18661.
- Roy, J.K.; Smith, K.P.; Muelbahuer, G.J.; Chao, S.; Close, T.J. and Steffenson, B.J. 2010. Association mapping of spot blotch resistance in wild barley *Mol. Breeding*. 26: 243-256.
- SAS Inst. 2004. *Statistical Analysis System Online documentation*. SAS. Cary. N.C.
- Sherman, J.D.; Fenwick, A.L. and Namath, D.M. 1995. A barley RFLP map: alignment of three barley maps and comparisons to Gramineae species. *Theor. Appl. Genet.* 91: 681-690.
- Shin, J.S.; Corpuz, L.; Chao, S. and Blake, T.K. 1990. A partial map of the barley genome. *Genome*. 33: 803-808.

- Simko, I.; Costanzo, S.; Haynes, K.G.; Chris, B.J. and Jones, R.W. 2004. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theor. Appl. Genet.* 108: 217–224.
- Skøt, L.; Humphreys, M.O.; Armstead, I.; Heywood, S.; Skøt, K.P.; Sanderson, R.; Thomas, I.D.; Chorlton, K.H. and Hamilton, N.R.S. 2005. An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne*(L.). *Mol. Breeding.* 15: 233–245.
- Slafer, G.A. and Savin, R. 1994. Source-sink relationship and grain mass at different positions within the spike in wheat. *Field Crops Research.* 37: 39-49.
- Spaner, D.; Rossmagel, B.G.; Legge, W.G.; Scoles, G.J.; Eckstein, P.E.; Penner, G.A.; Tinker, N.A.; Briggs, K.G.; Falk, D.E.; Afele, J.C.; Hayes, P.M. and Mather, D.E. 1999. Verification of a Quantitative Trait Locus Affecting Agronomic Trait in Two-Row Barley. *Crop Sci.* 39 (1): 248-252.
- Stracke, S.; Haseneyer, G.; Veyrieras, J.B.; Geiger, H.H.; Sauer, S.; Graner, A. and Piepho, H.P. 2009. Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of Flowering time in barley. *Theor. Appl. Genet.* 118: 259-273.
- Szűcs, P.; Blake, V.C.; Bhat, P.R.; Chao, S.; Close, T.J.; Cuesta-Marcos, A.; Muehlbauer, G.J.; Ramsay, L.; Waugh, R. and Hayes, P.M. 2009. An Integrated Resource for Barley Linkage Map and Malting Quality QTL Alignment. *Plant Gen.* 2:134-140.
- Tenaillon, M.I.; Sawkins, M.C.; Long, A.D.; Gaut, R.L.; Doebley, J.F. and Gaut, B.S. 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays ssp. mays L.*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9161-9166.
- Teulat, B.; Merah, O.; Souyris, I. and This, D. 2001. QTLs for agronomic traits from a Mediterranean barley progeny grown in several environments. *Theor. Appl. Genet.* 103: 774–787.
- Thomas, W.T.B.; Powell, W.; Swanston, J.S.; Ellis, R.P.; Chalmers, K.J.; Barua, U.M.; Jack, P.; Lea, V.; Forster, B.P.; Waugh, R. and Smith, D.A. 1996.

- Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. *Crop Sci.* 36: 265-276.
- 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. and Lance, R.C.M. 1995. detection of quantitative trait loci agronomic, yield, grain, and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theor. Appl. Genet.* 91: 1037-1047.
- Thornsberry, J.M.; Goodman, M.M.; Doebley, J.; Kresovich, S.; Nielsen, D. and Buckler, E.S. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature.* 28: 286-289.
- Tinker, N.A.; Mather, D.E.; Rossangel, B.G.; Kasha, K.J.; Kleinhofs, A.; Hayes, P.M.; Falk, D.E.; Ferguson, T.; Shugar, L.P.; Legge, W.G.; Irvine, R.B.; Choo, T.M.; Briggs, K.G.; Ullrich, S.E.; Franckowiak, J.D.; Blake, R.J.; Graf, R.J.; Dofing, S.M.; Saghai, Maroof, M.A.; Scoles, G.J.; Hoffman, D.; Dahleen, L.S.; Kilian, A.; Chen, F.; Biyashev, R.M.; Kudrna, D.A. and Steffenson, B.J. 1996. Regions of the Genome that Affect Agronomic Performance in Two-Row Barley. *Crop Sci.* 36: 1053-1062.
- Tommasini, L.; Schnurbusch, T.; Fossati, D.; Mascher, F. and Keller, B. 2007. Association mapping of *Stagonospora nodorum* blotch resistance in modern European winter wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 115: 697–708.
- 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. and Hayes, P.M. 2005. Effect of population size on the estimation of QTL: a test using resistance to barley rust. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1260-1270.
- Varshney, R.K.; Prasad, M. and Graner, A. 2004. Molecular Marker Maps of Barley: A Resource for intra-and interespecific Genomics. In: Nagata, T.; Lörz, H. and Widholm, J.M. (Eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Berlin, Springer-Verlag. 55: 229-243.
- Volis, S.; Verhoeven, K.J.F.; Mendlinger, S. and Ward, D. 2004. Phenotypic selection and regulation of reproduction in different environments in wild barley. *J. Evol. Biol.* 17: 1121-1131.

- Ward, J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Statist. Assoc.* 58: 236-244.
- Waugh, R.; Jannink, J.L.; Muller, K. and Ramsay, L. 2009. The emergence of whole genome association scans in barley. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 1-5.
- Wilson, L.M.; Whitt, S.R.; Ibáñez, A.M.; Rocheford, T.R.; Goodman, M.M. and Buckler, E.S. 2004. Dissection of Maize Kernel Composition and Starch Production by Candidate Gene Association. *The Plant Cell.* 16: 2719-2733.
- Winter, P. and Khal, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World journal of Microbiology and Biotechnology.* 11: 438-448.
- Wright, S. 1968. *Evolution and the genetics of population. Vol. 1. Genetics and Biometrical foundations.* University of Chicago Press, Chicago.
- Yin, X.; Chasalow, S.D.; Stam, P.; Kropff, M.J.; Dourleijn, C.J.; Bos, I. and Bindraban, P.S. 2002. Use of component analysis in QTL mapping of complex crop traits: a case study on yield in barley. *Plant Breeding.* 121: 314- 319.
- Yin, X.; Stam, P.; Dourleijn, C.J. and Kropff, M.J. 1999. AFLP mapping of quantitative trait loci for yield-determining physiological characters in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 99: 244-253.
- Yu, J.; Pressoir, G. and Briggs, W.H. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 38: 203-208.
- Zhang, L.Y.; Marchand, S.; Tinker, N.A. and Belzile, F. 2009. Population structure and linkage disequilibrium in barley assessed by DArT markers. *Theor. Appl. Genet.* 119: 43-52.
- Zhao, K.; Aranzana, M.J.; Kim, S.; Lister, C.; Shindo, C.; Tang, C.; Toomajian, C.; Zheng, H.; Dean, C.; Marjoram, P. and Nordborg, M. 2007. An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PloS Genet* 3(1): e4. doi:10.1371/journal.pgen.0030004.
- Zhu, C.; Yu, J. 2009. Nonmetric multidimensional scaling corrects for population structure in association mapping with different sample types. *Genetics.* 182 (3): 875-888.

- Zhu, Y.L.; Song, Q.J.; Hyten, D.L.; Van Tassell, C.P.; Matukumalli, L.K.; Grimm, D.R.; Hyatt, S.M.; Fickus, E.W.; Young, N.D. and Cregan, P.B. 2003. Single-Nucleotide Polymorphisms in Soybean. *Genetics*. 163: 1123-1134.
- Zhu, H.; Gilchrist, L.; Hayes, P.; Kleinhofs, A.; Kudrna, D.; Lui, Z.; Prom, L.; Steffenson, B.; Toojinda, T. and Vivar, H. 1999. Does function follow form? QTLs for Fusarium head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence trait and plant height in a doubled haploid population of barley. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1221-1232.
- Zitzewitz, J. von; Cuesta-Marcos, A.; Condón, F.; Castro, A.J.; Chao, S.; Coorey, A.; Filichkin, T.; Fisk, S.P.; Gutiérrez, L.; Haggard, K.; Karsai, I.; Muelhbauer, G.J.; Smith, K.P.; Veisz, O. and Hayes, P.M. 2011. The genetics of winterhardiness in Barley: perspectives from genome-wide association mapping. *The Plant Genome*. 4: 76-91.