

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**FACTORES GENÉTICOS QUE AFECTAN LAS SUB-FASES DE LA
FENOLOGÍA DE UNA POBLACIÓN DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.) EN
URUGUAY**

por

Lic. María Pía GRIGNOLA MARTIN

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

PAYSANDÚ

URUGUAY

2018

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Guillermo Galván, Silvia Germán y Luis Viega el 13 de diciembre de 2018. Autor: María Pía Grignola. Director Ariel Castro.

Dedico este trabajo a mi familia, las personas
que siempre han estado a mi lado y especialmente
a mi hija Ma. Francisca, dejándole un mensaje:
si se propone un objetivo, que luche para alcanzarlo,
no importa las circunstancias del camino,
cueste lo que cueste,
con esfuerzo y perseverancia se puede lograr.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia y amigos de la EEMAC por su apoyo emocional constante durante el desarrollo del trabajo y los consejos que me han ayudado mucho para finalizar la tesis.

Agradezco a mi tutor Ariel Castro por su orientación y su paciencia, a Luis Viega y Andrés Locatelli por sus aportes y por el tiempo destinado para la realización de este trabajo.

A los compañeros del grupo de Cebada de la EEMAC: Juan Mosqueira, Sebastián Bartaburu, Andrés Ferraz y Santiago Manaliski, quienes de alguna forma u otra hicieron posible llevar a cabo este trabajo.

A Cristina Mazzella por sus consejos en los momentos justos, y por valorar mi esfuerzo.

TABLA DE CONTENIDO

página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1. EL CULTIVO DE CEBADA.....	1
1.2. CICLO DEL CULTIVO Y PROCESOS FISIOLÓGICOS DEL DESARROLLO.....	2
1.3. IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO DE LAS SUB-FASES DE LA FENOLOGÍA.....	5
1.3.1. <u>Influencia de factores ambientales</u>	6
1.4. CONTROL GENÉTICO DE LA RESPUESTA AL FOTOPERÍODO Y ACUMULACIÓN TÉRMICA.....	8
1.5. ANÁLISIS GENÓMICO.....	9
1.5.1. <u>Mapas de ligamiento y marcadores genéticos</u>	10
1.5.2. <u>Análisis de QTL</u>	11
1.5.3. <u>Estudios genómicos de cebada en Uruguay</u>	13
2. <u>Ppd-H1 y denso AFECTAN LAS SUB-FASES PRE-ANTESIS DE UNA POBLACIÓN DE CEBADA EN URUGUAY</u>	16
2.1. RESUMEN.....	16
2.2. SUMMARY.....	17
2.3. INTRODUCCIÓN.....	18
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.4.1. <u>Material genético</u>	21
2.4.2. <u>Caracterización fenotípica</u>	21
2.4.3. <u>Caracterización genotípica</u>	22
2.4.3.1. Extracción de ADN.....	22
2.4.3.2. Selección de marcadores.....	22
2.4.3.3. Mapa de ligamiento.....	23

2.4.4. <u>Análisis de QTL</u>	23
2.5. RESULTADOS.....	24
2.5.1. <u>Condición ambiental</u>	24
2.5.2. <u>Rangos y distribución fenotípica de las RILs</u>	27
2.5.3. <u>Mapa de ligamiento</u>	31
2.5.4. <u>Análisis de QTL</u>	33
2.6. DISCUSIÓN.....	36
2.7. BIBLIOGRAFÍA.....	39
3. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</u>	45
3.1. COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO.....	45
3.2. CARACTERIZACION GENOTÍPICA Y MAPA DE LIGAMIENTO.....	46
3.3. REGIONES CON EFECTO SOBRE VARIABLES FENOLÓGICAS.....	47
3.4. REGIONES CON EFECTO SOBRE VARIABLES AGRONÓMICAS.....	48
3.5. CONCLUSIONES.....	49
4. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	50
5. <u>ANEXO</u>	62

FACTORES GENÉTICOS QUE AFECTAN LAS SUB-FASES DE LA FENOLOGÍA DE UNA POBLACIÓN DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.) EN URUGUAY

RESUMEN

Los requerimientos de la industria por genotipos de cebada que cubran las demandas de calidad maltera y de buen comportamiento agronómico imponen desafíos al mejoramiento genético nacional. La fenología es un factor importante ya que determina la adaptación, comportamiento agronómico y rendimiento del cultivo en las condiciones de producción locales, lo que hace de suma importancia la comprensión de su control genético. Con el objetivo de avanzar en la comprensión genética, se estudió una población de líneas endocriadas recombinantes (RIL) derivada del cruzamiento de dos variedades adaptadas con fenología contrastante: “CLE 202-INIA Ceibo” (I. Ceibo, variedad de ciclo largo con sensibilidad al fotoperíodo) y “Norteña Carumbé” (ciclo corto y con menor sensibilidad al fotoperíodo). La población se caracterizó fenotípicamente (comportamiento fenológico y agronómico) en ensayos de campo en tres años, con fechas de siembra contrastantes. Se midió la duración y la respuesta al fotoperíodo de las sub-fases fenológicas. La población fue genotipada con marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) y de secuencias simples repetidas (SSR), distribuidos por todo el genoma (excepto en el cromosoma 4H para el que no se encontraron marcadores polimórficos). La duración de las sub-fases fenológicas en nuestras condiciones, estuvo explicada por dos QTL mayores: uno en el cromosoma 2H (con el gen de respuesta al fotoperíodo *PpdH1* como candidato) y otro en el cromosoma 3H (con el gen de enanismo *denso* como candidato). El cultivar I. Ceibo aportó el alelo de sensibilidad al fotoperíodo en el tiempo a antesis y el alelo de *denso* con efecto pleiotrópico y aditivo sobre mayor duración la sub-fase Z20-Z30. El locus de *Ppd-H1* tuvo efecto sobre la variable agronómica, peso de grano, probablemente explicada por la aceleración de la floración, que produce una reducción en el número de granos por espiga y mayor peso final de granos. La población biparental derivada de I. Ceibo y N. Carumbé es una población adecuada para el estudio de las bases genéticas que explican la respuesta al fotoperíodo, que hasta el momento no se habían identificado en las condiciones locales.

Palabras claves: cebada, fenología, fotoperíodo, QTL.

GENETIC FACTORS THAT AFFECT THE SUB-PHASES OF THE PHENOLOGY OF A BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) POPULATION IN URUGUAY

SUMMARY

The requirements of the industry for barley genotypes that fulfill the need for malting quality and good agronomic behavior impose challenges to local plant breeding programs. Phenology is an important factor since it determines the adaptation, agronomic behavior and yield of the crop under the local production conditions, which makes the understanding of its genetic control highly important. With the objective of increasing the understanding of the genetics of the trait, a recombinant inbred lines (RIL) population derived from the cross of two adapted varieties with contrasting phenology: “CLE 202-INIA Ceibo” (I. Ceibo, late flowering and photoperiod sensitivity) and “Norteña Carumbé” (early flowering with low photoperiod sensitivity) was studied. The population was characterized phenotypically (phenological and agronomic behavior) in field trials during three years, with contrasting planting dates. The duration and photoperiod response of the phenological sub-phases were measured. The population was genotyped with, single nucleotide polymorphism (SNPs) and simple sequence repeats (SSR) markers, distributed throughout the genome (except on chromosome 4H for which no polymorphic markers were found). The length of phenologic sub-phases was explained by two major QTL; one on chromosome 2H (with the photoperiod response gene *PpdH1* as candidate), and another on chromosome 3H (with the dwarfing gene *denso* as candidate). The cultivar I. Ceibo contributed with the alleles for photoperiod sensitivity in time to heading and the allele of *denso* with pleiotropic and additive effect on longer Z20-Z30 sub-phase. The *Ppd-H1* locus had an effect on the agronomic variable grain weight, probably explained by the acceleration of flowering, which produces a reduction in the number of grains per spike and higher grain weight. The biparental population derived from I. Ceibo and N. Carumbé is suitable for the study of the genetic bases which explain photoperiod response, which had not been identified under local conditions until now.

Key words: barley, phenology, photoperiod, QTL.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. EL CULTIVO DE CEBADA

La cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.) es una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia Poaceae. Se trata de una especie autógama con un genoma diploide con $2n=2x=14$ y un tamaño genómico haploide de 5,1 Gb (International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). La cebada es el quinto cultivo en términos de producción total en el mundo y el segundo cultivo de invierno en importancia en Uruguay (MGAP, 2015).

Sus principales destinos en el mundo son la alimentación animal y humana y la producción de cebada malteada o malta con destino a la producción de cerveza. En Uruguay se utiliza para ese último destino, lo que impone varias restricciones en términos de requisitos de calidad. La industria maltera uruguaya tiene un buen posicionamiento en el mercado regional como proveedor de materia prima de las industrias malteras-cerveceras, lo que da a la producción un fuerte carácter industrial-exportador y define en el cultivo una alta integración vertical. El área sembrada, al igual que las variedades que la integran, se encuentran reguladas por las malterías a través de contratos de siembra que se ajustan a sus requerimientos de cantidad y calidad de grano. De esta manera las malterías, a través de la elección de variedades de cebada cervecera y de tecnologías de manejo del cultivo, procuran cumplir con las necesidades de calidad de malta que demanda la industria cervecera moderna. Las malterías tienen exigencias de parámetros de calidad como granos sanos, libres de manchas, con humedad de entre 13 y 18% con secado, con contenido proteico menor o igual a 12%, con una clasificación mayor a 80% en el tamiz de 2,5 mm y menor a 5% en el de 2,2 mm y con un proceso de germinación homogéneo (Donato y Sayas, 2017). El objetivo de la investigación nacional (y por tanto del mejoramiento genético nacional) es mejorar el rendimiento y la eficiencia de la producción de grano con calidad maltera.

Las exigencias de la industria por genotipos de cebada capaces de satisfacer las demandas de calidad maltera, y a su vez adaptados a las condiciones ambientales locales, imponen un desafío al mejoramiento genético nacional. Para esto, es de suma importancia la comprensión del control genético responsable de la fenología, que se ha definido como el factor

más relevante por determinar la adaptación del cultivo a las distintas condiciones de producción.

1.2. CICLO DEL CULTIVO Y PROCESOS FISIOLÓGICOS DEL DESARROLLO

Durante el ciclo del cultivo se producen cambios visibles en la morfología externa de las plantas, como en la actividad de los tejidos (desarrollo), no siempre perceptibles. La descripción de los diferentes estados externos e internos por los que atraviesa el cultivo de cebada puede ser realizada mediante el uso de diferentes escalas que permiten tener una referencia precisa de las diferentes etapas o estados de desarrollo. La escala decimal Zadoks (Z0.0 a Z9.9) (Zadoks et al., 1974) es la más utilizada para describir estados de desarrollo de la planta.

El ciclo de la cebada puede dividirse en cinco fases del desarrollo, 1) Emergencia, Z10, 2) Pre macollaje (Z10-Z22) entre emergencia e inicio de macollaje, 3) Macollaje (Z22-Z30), entre inicio de macollaje e inicio de encañazón, 4) Encañazón (Z30-Z49) entre inicio de encañazón e inicio de espigazón y 5) Llenado de grano (Z49-Z90) entre antesis y madurez fisiológica.

En la primera fase, una vez que la semilla se siembra, absorbe agua del suelo, aparece la radícula y es un determinante del inicio de la germinación. La primer hoja verdadera se elonga dentro del coleoptile y emerge en la superficie. Una vez que se produce la emergencia de la primera hoja, las plántulas continúan emitiendo hojas a un ritmo constante (Miralles, 2014).

Aproximadamente al mismo tiempo en que tiene lugar la formación y crecimiento de macollos o tallos secundarios, comienza a desarrollarse la espiga del tallo principal (Z21-Z29). Cada macollo tiene la misma capacidad que el tallo principal para producir espigas. El final del macollaje suele coincidir con la fase en que se alcanza el número máximo de primordios de espiguillas (Z30).

La fase de encañazón (Z30-Z49) comienza cuando se detecta el primer nudo en la base de la planta y se caracteriza por la elongación de los entrenudos que dan forma al tallo y posterior elongación de los tallos secundarios. Algunos de ellos no culminarán el crecimiento.

Una vez que la hoja bandera se ha extendido completamente, comienza el embuche y crecimiento de la espiga. El comienzo de la aparición de las aristas por encima de la vaina de la hoja bandera (embuche), es un indicador de que las flores han alcanzado el estado de flor fértil y la antesis está ocurriendo. La emergencia de la espiga y la antesis son generalmente sincrónicas.

Por último, durante la primera etapa de la fase de llenado de grano, etapa de cuaje o fase lag, es cuando se termina de definir cuántas flores fecundadas se establecen como grano a cosecha. Por su activa división celular se define el número de células endospermáticas y por ende el peso potencial del grano. La fase de llenado efectivo comienza con la finalización de la fase lag y termina en madurez fisiológica, alcanzando el máximo peso seco del grano.

En el desarrollo del cultivo, los estados internos observables en el ápice meristemático (Waddington et al., 1983), se relacionan con fases externas de la escala Zadoks.

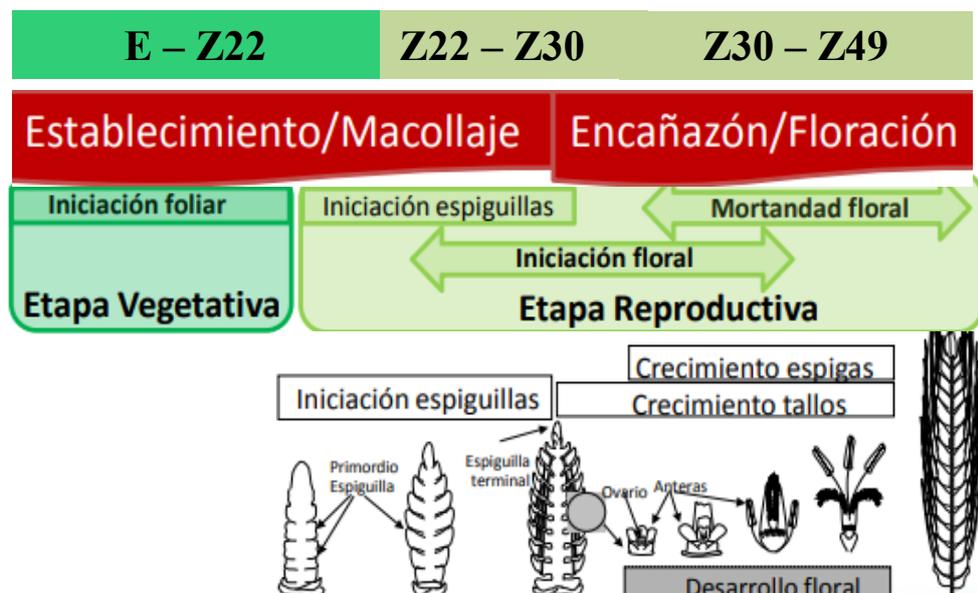


Figura 1: Desarrollo del cultivo de cebada esquematizado con escala Zadoks y Waddington. Adaptado de García, 2012.

Waddington et al. (1983) presentan una escala cuantitativa para el desarrollo comenzando en la transición del ápice y continuando a través de la morfogénesis de la flor y pistilo hasta la polinización, sin involucrar atributos de crecimiento y tamaño de la planta o sus

órganos. Durante la fase vegetativa (desde la germinación de la semilla hasta el momento de inducción floral), el meristemo apical del tallo principal solo produce primordios foliares, y en consecuencia determina el número de hojas de dicho tallo.

A partir de la inducción se produce la transformación del ápice de vegetativo a reproductivo por lo que en ese momento comienza la diferenciación de los primordios florales, y futuros granos. La inducción floral es un proceso fisiológico que implica cambios metabólicos como resultado de las señales percibidas desde el ambiente. La primera evidencia morfológica a nivel del ápice es la aparición de la doble arruga (posee primordios florales y foliares). Bonnett (1966) y Kitchen et al. (1983), reportaron que la aparición de la doble arruga en el ápice meristemático es el primer indicador del final de la fase de iniciación de hojas (IH) y el comienzo de la fase de iniciación de espiguillas (IE). Este momento (Figura 1) coincide con la aparición de la 5ta a 6ta hoja del tallo principal (Z21-Z22 en la escala Zadoks) (González y Xavier, 2000). Al mismo tiempo que transcurre el proceso de macollaje, en el ápice de cada tallo sigue ocurriendo la diferenciación de nuevas espiguillas y en cada una de ellas las distintas estructuras florales a partir del estado de triple lomo (Waddington et al., 1983). Sobre las espiguillas centrales, se distinguen la aparición de glumas y de lemmas. Durante esta fase, el ápice del tallo continúa aun produciendo primordios de espiguillas.

La diferenciación de la estructura de cada espiguilla comienza en la parte media de la inflorescencia, prosiguiendo hacia el ápice y la base de la espiga. El estado de iniciación de los estambres en los primordios indica que la diferenciación de las espiguillas casi se ha completado.

Con el estado de iniciación de las aristas en la lemma de las espiguillas centrales, el meristemo apical deja de producir primordios, por lo que en este estado, se alcanza el número máximo de primordios florales (NMP). Este estado se alcanza entre los estados Z32-Z33 (Zadok, 2 o 3 nudos palpables en el tallo principal por sobre el suelo) (Figura 1). O sea, que la diferenciación de primordios de espiguillas continua una vez finalizado el macollaje y cesa cuando en el tallo principal ya se han elongado los primeros dos a tres entrenudos (González y Xavier, 2000).

Desde este momento hasta la antesis se evidencia una pérdida de estructuras por aborto principalmente de los primordios apicales. La completa diferenciación y crecimiento de las primeras espiguillas iniciadas comienza pocos días después de doble arruga y continúa hasta el momento de antesis, (crecimiento de espiguillas, CE).

1.3. IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO DE LAS SUB-FASES DE LA FENOLOGÍA

El ciclo de desarrollo desde la siembra hasta antesis se divide en tres sub-fases: iniciación de hojas (IH), iniciación de espiguillas (IE) y crecimiento de espiguillas (CE). Durante estas sub-fases se determina: el número potencial de tallos a partir del número de hojas en el tallo principal (durante la sub-fase IH), el número potencial de espiguillas por espiga (durante la sub-fase IE), y la sobrevivencia de tallos y primordios de espiguilla, quienes determinan el número de granos por unidad de área (durante la sub-fase CE) (Appleyard et al., 1982).

La evolución del número de primordios de espiguillas comienza con la transformación del ápice meristemático de vegetativo a reproductivo (doble arruga), donde se dejan de diferenciar primordios foliares para comenzar a diferenciarse primordios florales (espiguillas). Estas etapas transcurren al inicio del desarrollo de la planta cuando la misma posee uno o dos macollos y se prolonga en cada uno de los tallos hasta que alcanza el número máximo de primordios (NMP). Sin embargo, solo una porción de estas estructuras logra sobrevivir dando como resultado un número de espiguillas finales al momento de antesis (NEF) inferior al valor de NMP. Por lo dicho, NEF se puede expresar como el producto entre NMP y el porcentaje de espiguillas fértiles (PEF) (Viega et al., 2005).

Las espiguillas de cebada son unifloras por lo que el resultado de los procesos de diferenciación y crecimiento o aborto de primordios de estructuras florales determinan el número de granos al momento de antesis. Es posible aumentar el número de espiguillas fértiles al momento de antesis tanto a través de un mayor NMP como de un mayor PEF (Viega et al., 2000, 2001). Según Appleyard et al. (1982), García Del Moral y Ramos (1989), un mayor NMP está determinado por una mayor duración de la sub-fase IE.

Teniendo en cuenta que los abortos de espiguillas ocurren desde Z33 hasta antesis, estos resultados establecen una ventana crítica en la definición del rendimiento por espiga en

dicho periodo. Se reafirma además la importancia de establecer altas tasas de crecimiento del cultivo durante el encañado (CE), no solo porque de ello depende la sobrevivencia de los tallos, sino también porque con ello se logra aumentar el tamaño de la espiga. Es por tanto una etapa crítica en cuanto a la concreción del potencial de rendimiento (Viega et al., 2005).

1.3.1. Influencia de factores ambientales

Los mecanismos fisiológicos que gobiernan la transición de una fase a otra en el desarrollo del cultivo están fuertemente influenciados por el ambiente. Estos factores ambientales son: (i) la respuesta a la vernalización (Takahashi y Yasuda, 1970), (ii) la respuesta al fotoperíodo (Roberts et al., 1988) y (iii) la acumulación térmica (Gallagher et al., 1991).

Los genotipos que necesitan una señal externa como acumulación de horas frío o vernalización para inducir el paso a la fase reproductiva, se los conoce como genotipos invernales (Limin y Fowler, 2002). Los invernales precisan de este periodo de exposición a bajas temperaturas (-5°C hasta 16°C, con un efecto máximo entre 0 y 8°C (Roberts et al., 1988) para inducir la floración, ya que el represor de la floración deja de actuar cuando se ha acumulado un número suficiente de horas de frío (Yan et al., 2004). Existe respuesta variable a este factor, genotipos sensibles en mayor o menor grado, o con un requisito indispensable (Roberts et al., 1988). En Uruguay se utilizan genotipos de primavera (sin requerimientos de vernalización) debido al régimen de temperatura predominante.

El fotoperíodo es uno de los factores más importantes que influyen en la tasa y duración del desarrollo de las plantas. En las plantas de día largo, como la cebada, el proceso de floración se acelera en respuesta a incrementos en la duración del día, en la medida que éste exceda las horas críticas o fotoperíodo crítico. Según Laurie et al. (1997), la respuesta al fotoperíodo al incremento o disminución de la longitud del día es cuantitativa, una vez que el valor crítico ha sido alcanzado. Cuando las condiciones del medio no son óptimas, la respuesta al fotoperíodo es uno de los mecanismos que tienen las plantas para impedir o acelerar la floración. En la cebada existe un umbral inferior de fotoperíodo, por debajo del cual la floración no ocurre de ninguna manera (8-10 h) y un umbral superior por encima del cual un incremento en el fotoperíodo no supone un cambio en la tasa de desarrollo (13-18h) (Roberts et al. 1988). Entre ambos límites, Boyd et al. (2003) propusieron diferentes grupos según el grado de

respuesta de los genotipos de cebada al fotoperíodo. Los genotipos insensibles al fotoperíodo (photoperiod insensitive o PI) (Gallagher et al., 1991), no responden, o lo hacen mínimamente al incremento en el fotoperíodo. Otros genotipos poseen grado de sensibilidad al fotoperíodo variable a lo largo del desarrollo, siendo insensibles en periodo vegetativo y después de antesis, pero con un periodo de sensibilidad en el intervalo entre ambos periodos de insensibilidad (PSP, photoperiod sensitive, periodo de sensibilidad al fotoperíodo Major, 1980).

Jones y Allen (1986), Wright y Hughes (1987) y Cao y Moss (1989b) encontraron que la respuesta al fotoperíodo afecta el número final de hojas y la tasa de aparición de las mismas. Los genotipos sensibles a fotoperíodo, en condiciones de fotoperíodo corto, favorecen la producción de hojas (IH) aumentando su número, porque alargan el periodo vegetativo de iniciación de las mismas y retrasan la inducción floral (Roberts et al., 1988, García Del Moral y Ramos, 1989). Kernich et al. (1997) demostraron que la fase IE es más sensible que IH. Cuando los genotipos sensibles pasan a su fase reproductiva, aceleran su floración en condiciones de fotoperíodo largo (Mahfoozi et al., 2001). Los fotoperíodos largos aceleran la floración y estimulan la velocidad de producción de primordios florales pero acortan su duración, por lo que reducen el número de granos por espiga (Roberts et al., 1988, García Del Moral y Ramos, 1989). Miralles et al. (2000), demostraron que variaciones en el fotoperíodo durante la fase de iniciación floral podían suponer un incremento del número de flores fértiles. Si se aumenta la duración de la fase de elongación del tallo (encañazón), se aumenta el número de flores fértiles, y por consiguiente, el número de granos.

El tercer factor que influencia la fenología es la temperatura post-emergencia de las plantas. Según Baker et al. (1986) y Cao y Moss (1989a y 1989b), el número de hojas del tallo principal y la tasa de aparición de hojas (diferenciación de primordios foliares a nivel de ápice meristemático) estarían relacionadas con factores inherentes del ambiente, como la temperatura, en unidades térmicas acumuladas. Hay y Ellis (1998) propusieron que la variación en el carácter de precocidad intrínseca de los genotipos era controlado por genes reguladores de la tasa de desarrollo y número de hojas iniciadas en el tallo principal, directamente relacionado con la duración del periodo preinductivo propuesto por Roberts et al. (1988), sumado a la influencia de la temperatura. Guitard (1960) encontró una reducción del número de flores por espiga cuando se acumula una temperatura por encima de 24 °C, debido a una

disminución en el número de macollos y disminución del tamaño de la espiga. A nivel nacional, Ernst et al. (1993) y Benítez y Lecuona (1996) determinaron que una mayor temperatura en épocas tardías de siembra conlleva a un acortamiento del ciclo a espigazón de cebada, disminuyendo el número de granos por espiga.

1.4. CONTROL GENÉTICO DE LA RESPUESTA AL FOTOPERÍODO Y ACUMULACIÓN TÉRMICA

El conocimiento de la localización y el número de regiones genómicas asociadas a variables de interés como el desarrollo fenológico, puede ser una herramienta significativa para la mejora de la eficiencia en un programa de mejoramiento.

Los loci responsables de la sensibilidad al fotoperíodo han sido ampliamente estudiados en cebada (Hayes et al., 1993, Laurie et al., 1994, 1995, Read et al., 2003, Boyd et al., 2003, Turner et al., 2005, Borrás et al., 2010, 2012, Alqudah et al., 2014, Maurer et al., 2015, 2016). Laurie et al. (1994, 1995) encontraron dos genes mayores responsables de la respuesta al fotoperíodo, denominados *Ppd-H1* y *Ppd-H2*. El locus *Ppd-H1* está situado en el brazo corto del cromosoma 2H y regula la respuesta a floración bajo fotoperíodos largos (mayor a 14 h de luz) (Turner et al., 2005) de tal manera que el alelo sensible provoca el adelanto de la floración a medida que el fotoperíodo crece, mientras que la variación no es significativa en condiciones de fotoperíodo corto. El gen *Ppd-H2*, situado en el brazo largo del cromosoma 1H, tiene un efecto significativo sobre la floración solamente en condiciones de fotoperíodo corto (Casao et al., 2011). No existe evidencia de interacciones epistáticas entre ambos genes (Laurie et al., 1995).

Los genes implicados en la acumulación térmica, cuyos efectos no son directamente atribuibles a la vernalización o fotoperíodo, se han denominado en general *earliness per se* (*eps*). Laurie et al. (1995), trabajando con una población derivada de la cruce Igri x Triumph, identificaron 8 loci *eps*: *eps2S* próximo al centrómero del brazo corto del cromosoma 2H; *eps3L*, en el brazo largo del cromosoma 3H; *eps4L*, en el brazo largo del cromosoma 4H; *eps5L* en el brazo largo del cromosoma 5H; *eps6L.1* y *eps6L.2*, en el brazo largo del cromosoma 6H; *eps7S* en el brazo corto del cromosoma 7H y *eps7L* en el brazo largo del cromosoma 7H. Además, se han identificado otros loci causantes de precocidad denominados *early maturity* o

Eam (Franckowiak 2003 y 2004), algunos de los cuales son sinónimos de los *eps*, (*eam6* es *eps2S*, por ejemplo) o de los genes de respuesta al fotoperíodo (*Eam1* es *Ppd-H1*). Los *Eam* que causan diferencias en la fecha de floración en condiciones de fotoperíodo corto son *eam7* en el brazo corto del cromosoma 6H (Stracke y Borner, 1998), *eam8* en el brazo largo del cromosoma 1H (Franckowiak, 1997), *eam9* en el brazo largo del cromosoma 4H (Franckowiak, 1997, Lundqvist et al., 1997) y *eam10* en el brazo largo del cromosoma 3H (Borner et al., 2002).

Los loci reportados para tiempo a floración usualmente tienen efecto sobre características agronómicas como rendimiento, altura, resistencia a enfermedades, etc (Hayes et al., 1993, Bezant et al., 1996, Tinker et al., 1996, Li et al., 2006). A su vez, se ha reportado un gen de enanismo llamado *denso* (ubicado en el brazo largo del cromosoma 3H), posee efecto pleiotrópico sobre la fenología (Laurie et al., 1993, Castro et al., 2008), afectando la fase de macollaje (Z20-Z30) (Castro et al., 2017).

1.5. ANÁLISIS GENÓMICO

La cebada posee características que la hacen muy apropiada para estudios genómicos. Se trata de un cultivo con características biológicas (especie diploide con cromosomas citológicamente bien diferenciados, genoma de tamaño medio, ciclo relativamente corto y buena adaptación para su desarrollo en condiciones controladas) que lo hacen un excelente candidato para estudios básicos; cuenta con la posibilidad de desarrollar diferentes líneas recombinantes, dobles haploides, etc. La incorporación de herramientas genómicas en esquemas de mejoramiento nacional para la obtención de genotipos mejorados y el estudio de bases genómicas de variables importantes para el cultivo en los últimos años ha crecido sustancialmente. La identificación de las regiones del genoma que afectan variables de importancia es esencial para la caracterización y utilización de la variabilidad genética de cualquier especie. El desarrollo de marcadores moleculares, mapas de ligamiento, localización de loci de efecto cuantitativo (QTL) y estudios de diversidad genética han contribuido en ese sentido.

1.5.1. Mapas de ligamiento y marcadores genéticos

Un mapa de ligamiento representa la posición y distancia genética relativa entre marcadores o genes a lo largo de los cromosomas. Estos mapas se basan principalmente en que los genes o marcadores segregan vía recombinación cromosómica en meiosis al formarse los gametos. Se asume que los marcadores que tienen una frecuencia de recombinación igual o mayor a 50% se asume que segregan en forma independiente (no están ligados), o están localizados en cromosomas diferentes. Si la frecuencia de recombinación entre dos marcadores es muy baja, se utiliza como estimador de la distancia entre marcadores ligados. La unidad de distancia utilizada en estos mapas es centiMorgan (cM) o frecuencia de recombinación. Para la construcción de un mapa se necesitan tres pasos: producir o contar con una población de mapeo (población segregante que difiera en una o más características de interés), identificar marcadores polimórficos y realizar el análisis de ligamiento de los marcadores (Collard et al., 2005).

Un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma. Un marcador puede ser un gen, o una secuencia de ADN no codificante que puede variar entre individuos. Los polimorfismos explican la variación entre los individuos y pueden estar localizados en el gen de interés o en zonas cercanas al mismo. Los mapas están contruidos en base a polimorfismos con marcadores morfológicos, bioquímicos y/o moleculares. Los marcadores morfológicos son caracteres o rasgos fenotípicos observables y los marcadores bioquímicos se basan en las variantes alélicas de enzimas (isoenzimas). Estos dos tipos de marcadores son influenciados por factores ambientales o por el estado de desarrollo de los individuos. En cambio, los marcadores moleculares, basados en el ADN, revelan las variantes en el ADN en determinados sitios del cromosoma (Jones et al., 1997). Estos últimos se han convertido en los más usados, debido a su abundancia y ausencia de interacción con factores ambientales y estado fenológico de la planta (Winter y Kahl, 1995). Los marcadores son polimórficos si se observan diferencias entre los genotipos, y monomórficos si no hay variación entre los genotipos en estudio. También se pueden clasificar como codominantes o dominantes si el marcador discrimina entre individuos homocigotos y heterocigotos para ese marcador. Dentro de los marcadores codominantes se cuenta con polimorfismos en una sola base (SNP, por su sigla en inglés, Single Nucleotide Polymorphism),

microsatélites (SSR, Simple Sequence Repeat), polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). El abordaje de marcadores moleculares por genes candidatos toma en cuenta que los genes deben estar ubicados en regiones del genoma que afecten el carácter de interés y que a su vez deben cumplir un rol fisiológico en la determinación del fenotipo (Collard et al., 2005).

El primer reporte de un mapa de marcadores moleculares en cebada 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 por Shin et al. (1990). Heun (1991), Kleinhofs et al. (1993), Sherman et al. (1995), Qi et al. (1996, 1998) desarrollaron mapas integrados con el objetivo básico de tener mayor cobertura y resolución del genoma. Últimamente se utilizan cromosomas artificiales bacterianos (BACs), completamente secuenciados y conservados para contextualizar el genoma de cebada (International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Recientemente Mascher et al. (2017), generaron un mapa de cebada de excelente calidad, integrando conjuntos de BACs individuales reportados por Beier et al. (2016), Ounit et al. (2015), Ariyadasa (2014), Mascher et al. (2013) y Lam et al. (2012). El ensamblaje final a escala cromosómica del genoma de la cebada consiste en 6.347 super-scaffolds ordenados, compuestos de conjuntos combinados de BAC individuales, que representan 4.79 Gb (~ 95%) del contenido de la secuencia genómica, de los cuales 4.54 Gb se asignaron a una ubicación cromosómica precisa en el mapa de captura de conformación cromosómica (Hi-C) (Mascher et al., 2017).

1.5.2. Análisis de QTL

El desarrollo de marcadores moleculares abundantes y procedimientos de análisis y detección de QTL (revisados por Doerge, 2002) ha permitido avanzar en la identificación, localización y evaluación del efecto de los factores genéticos determinantes de fenotipos. Uno de los abordajes más utilizados ha sido la utilización de poblaciones desarrolladas a partir de cruzamientos entre dos genotipos (mapeo de QTL tradicional en base a poblaciones biparentales) que se basa en la construcción de poblaciones balanceadas, sobre las que se conoce la historia de recombinación. Luego se busca una asociación (estadística) entre los marcadores ordenados en un mapa de ligamiento y las variables fenotípicas de las líneas RIL

(Hartl y Clark, 2007) que se supone relacionada con un ligamiento físico (marcador se encuentra físicamente cerca al QTL) debido a que estimado en base a las distancias genéticas (cM). A su vez se pueden estimar efectos de QTL en los intervalos entre marcadores a partir del cálculo de las probabilidades condicionales de los QTL. El análisis de QTL de poblaciones biparentales presenta la ventaja de maximizar la recombinación de fragmentos del genoma de los dos padres, particularmente si se utilizan líneas recombinantes endocriadas (RILs), pero con la principal limitante que se asocia a los sesgos en la estimación de los QTL (Jansen y Stam, 1994). El uso de poblaciones pequeñas para la detección de QTL conduce teóricamente a una sobreestimación de los efectos de los QTL y una subestimación del número y las interacciones entre QTL (Melchinger et al., 1998). Sin embargo, la comparación entre distintos tamaños de población en base a datos reales indica que los QTL de mayor importancia pueden ser detectados aún con poblaciones de tamaño relativamente reducido (Vales et al., 2005).

Para la realización del análisis de QTL se utilizan en general tres métodos: mapeo por intervalo simple (simple interval mapping o SIM, por su sigla en inglés, Lander y Botstein, 1989), mapeo por intervalos compuesto (composite interval mapping o CIM, por su sigla en inglés, Zeng, 1994) y mapeo por intervalo múltiple (multiple interval mapping o MIM, por su sigla en inglés, Kao et al., 1999). El SIM utiliza el mapa de ligamiento y analiza intervalos entre pares de marcadores ligados a lo largo de los cromosomas (Lander y Botstein, 1989), mientras que el CIM combina mapeo por intervalo compuesto con regresión lineal e incluye marcadores genéticos adyacentes adicionales en el modelo estadístico (Jansen, 1993, Jansen y Stam, 1994, Zeng, 1993, 1994). El MIM es el método más efectivo ya que evalúa las interacciones epistáticas entre los QTL.

En el caso de la cebada, los primeros trabajos internacionales de análisis de QTL se basaron en mapas de ligamiento de baja densidad de marcadores que fueron asociados con características de fácil medición (días a floración, altura de planta) (Kleinhofs et al., 1988, Barua et al., 1993, Laurie et al., 1995). Luego se realizaron análisis de QTL para variables más complejas como componentes del rendimiento y rendimiento en sí (Hayes et al., 1993, Backes et al., 1995, Mather et al., 1997, Yin et al., 1999, Zhu et al., 1999, Teulat et al., 2001, Read et al., 2003, Yin et al., 2005, Li et al., 2006, Gynesis et al., 2007).

1.5.3. Estudios genómicos de cebada en Uruguay

El primer estudio de diversidad a nivel molecular fue realizado para estudiar la diversidad de una colección nacional de germoplasma, utilizando una muestra de materiales caracterizados mediante marcadores moleculares del tipo RAPDs (Balbi et al., 1995). Posteriormente se han reportado marcadores asociados a porcentaje de extracto utilizando líneas avanzadas de la población Defra x Estanzuela Quebracho (Capdevielle et al, 1999). Se caracterizaron genotipos con diferentes niveles de resistencia a mancha borrosa (enfermedad relevante en cebada) utilizando RAPDs y SSRs (Albín et al., 2005) y se utilizaron líneas avanzadas de los programas de mejoramiento nacional y variedades en evaluación oficial para estudiar la diversidad alélica de un gen que codifica beta-amilasa (*Bmy1*) (Gómez, 2005). Utilizando mapeo de QTL en una población bi-parental (Full Pint/Baronesse), se identificaron QTL asociados a calidad maltera y dormición de semilla (Castro et al., 2010) y resistencia a enfermedades (Castro et al., 2012).

Se ha avanzado mucho en estudios genómicos asociados a fenología. La fecha de espigazón de un genotipo es fundamental para determinar su potencial de rendimiento en Uruguay (Castro et al., 1997) en gran medida porque determina el momento del llenado de grano. Los cultivares utilizados en el país son de hábito primaveral, sin requerimientos de vernalización y con distintos grados de respuesta al fotoperíodo. Cuando un cultivo alcanza la antesis a fines de setiembre o principios de octubre su llenado de grano se da en las mejores condiciones climáticas ya que antesis más tardías significan llenado de grano a fines de octubre y noviembre, con mayor temperatura promedio, lo que reduce el rendimiento y la calidad del grano (Kemanian y Viega, 1998). La caracterización de una amplia muestra de germoplasma ha mostrado que la combinación de ciclo corto a antesis y período de llenado de grano largo se asociaron a mayor potencial de rendimiento y mayor estabilidad de dicho rendimiento (Castro y Kemanian, 1999; Castro et al., 1997). Estudiando la fenología de la población Full Pint/Baronesse, Castro *et al.* (2008) reportaron efectos significativos y completamente aditivos de *eps2S* y *denso* para la fecha de antesis. Existe una clara asociación entre momento de floración y tamaño y peso de grano, siendo los mismos alelos los que determinaban floración

temprana y mayor peso de grano (Castro et al., 2008). Castro et al. (2017) reportaron que dichos efectos eran específicos para dos sub-fases diferenciadas (*eps2S* afectaba la fase de encañazón y *denso* la fase de macollaje) lo que explicaba la completa aditividad de los efectos para fecha de antesis. Utilizando una colección de germoplasma representativo del mejoramiento regional, Locatelli et al. (2013) reportaron la asociación significativa de varios marcadores con rasgos fenológicos (tiempo a floración y llenado de grano). Encontraron dos QTL para tiempo a floración, en el cromosoma 2H y 7H y cuatro QTL para período de llenado de grano (cromosomas 2H, 4H, 5H y 7H). Las regiones genómicas que afectaron la fenología también presentaron efectos significativos para numerosas variables agronómicas, como componentes del rendimiento, espiga por metro cuadrado e índice de cosecha (Locatelli et al., 2013). Considerando todos los factores, el genotipo ideal para la cebada en Uruguay debería tener respuesta al fotoperíodo, antesis temprana y período de llenado de grano largo (Castro y Kemanian, 1999; Germán et al., 2000).

En función de los antecedentes mencionados, el objetivo de este trabajo es la profundización en el estudio de los factores genéticos (y sus combinaciones) que controlan la fenología de cebada en las condiciones ambientales de Uruguay, con énfasis en la incorporación de la respuesta al fotoperíodo y su impacto en la adaptación del cultivo. Para ello se utilizó el análisis de QTL en base a una población de líneas F7 (87 líneas) obtenidas de la cruce de padres con fenología contrastante y muy bien caracterizadas a nivel nacional. La población segregante fue obtenida a partir de la cruce de CLE 202-INIA Ceibo (material nacional de ciclo largo con sensibilidad al fotoperíodo) y Norteña Carumbé (cultivar de ciclo corto, originario de North Dakota, con baja sensibilidad al fotoperíodo). Se caracterizó genótipicamente la población mediante marcadores moleculares (SSR y SNPs) dispersos por el genoma y se caracterizó en forma extensiva el comportamiento fenológico y agronómico mediante experimentos a campo.

2. “*Ppd-H1* y *denso* AFECTAN LAS SUB-FASES PRE-ANTESIS DE UNA POBLACIÓN BIPARENTAL DE CEBADA EN URUGUAY”¹

Grignola María Pía¹, Locatelli Andrés¹, Bartaburu Sebastián¹, Ferraz Andrés¹, Mosqueira Juan¹, Viega, Luis², Castro, Ariel¹.

¹Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

²Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
piagrignola@gmail.com

2.1. RESUMEN

El control genético de las fases pre-antesis de cebada, es determinante para entender la adaptación y comportamiento agronómico del cultivo. Con el fin de identificar dichos determinantes genéticos se estudió una población de líneas endocriadas recombinantes (RIL) derivada del cruzamiento de dos variedades adaptadas: “INIA (I.) Ceibo” (variedad de ciclo largo con sensibilidad al fotoperíodo) y “Norteña (N.) Carumbé” (ciclo corto y con menor sensibilidad al fotoperíodo). La población se caracterizó fenotípicamente durante tres años, con fechas de siembra contrastantes donde se midieron la duración y respuesta al fotoperíodo de las sub-fases pre-antesis. La población fue genotipada con marcadores moleculares distribuidos por el genoma. La duración de las sub-fases hasta antesis estuvo explicada por dos QTL mayores: en el 2H (con *PpdH1* como gen candidato) y otro en el 3H (con *denso* como gen candidato), el cultivar I. Ceibo aportó el alelo de sensibilidad al fotoperíodo en el tiempo a antesis en el 2H y el alelo de baja altura con efecto peliotrópico de larga duración de la sub-fase Z20-Z30 en el 3H. El alelo de I. Ceibo de *Ppd-H1* fue sensible al fotoperíodo, aceleró la floración en días largos acortando la duración de la sub-fase Z30-Z49. La población derivada de la cruce de I. Ceibo y N. Carumbé fue una herramienta adecuada para el estudio de las bases genéticas que explican la respuesta al fotoperíodo. Este es el primer reporte de QTL que afectan la respuesta al fotoperíodo bajo condiciones locales.

Palabras claves: cebada, fenología, fotoperíodo, RILs, QTL.

¹ Artículo científico a ser presentado en revista Agrociencia Uruguay.

"*Ppd-H1* and *denso* AFFECT THE SUB-PHASES PRE-ANTHESIS IN A BIPARENTAL BARLEY POPULATION IN URUGUAY"

2.2. SUMMARY

The genetic control of barley pre-anthesis phases is a key factor for the understanding of adaptation and agronomic behavior of the crop. In order to identify these genetic determinants, a recombinant inbred lines (RIL) population derived from two adapted varieties with contrasting phenology: "INIA (I.) Ceibo" (late flowering variety with photoperiod sensitivity) and "Norteña (N.) Carumbé" (early flowering variety with low sensitivity to photoperiod) was studied. The population was phenotypically characterized during three years, in contrasting planting dates where duration and photoperiod response of the pre-anthesis sub-phases were measured. The population was genotyped with molecular markers distributed throughout the genome. The length of sub-phases a anthesis was explained by two QTL; in 2H (with *PpdH1* as candidate gene) and another in 3H (with *denso* as candidate gene). The cultivar I. Ceibo contributed with the alleles of photoperiod sensitivity in 2H and longer Z20-Z30 sub-phase in 3H. The allele from I. Ceibo on *Ppd-H1* was sensitive to photoperiod, accelerated flowering under long days and shortening the duration of the Z30-Z49 sub-phase. The I. Ceibo x N. Carumbé population was an adequate tool to study the genetic bases explaining the photoperiod response. This is the first report of QTL affecting photoperiod response under local conditions.

Key words: Barley, Phenology, Photoperiod, RILs, QTL.

2.3. INTRODUCCIÓN

La fenología es importante ya que condiciona el potencial de rendimiento y la adaptación de los cultivos a condiciones ambientales particulares (Richards, 1991). La fenología determina la duración y el momento de ocurrencia de las fases del desarrollo del cultivo lo que define las condiciones ambientales para cada una de ellas. En cebada (*Hordeum vulgare*), si bien la determinación del rendimiento ocurre durante todo el ciclo del cultivo, no todas las fases tienen la misma importancia para la definición del mismo. El ciclo de desarrollo desde la siembra hasta antesis se puede dividir en tres sub-fases: iniciación de hojas (IH), iniciación de espiguillas (IE) y crecimiento de espiguillas (CE) (Appleyard et al., 1982). Las tres fases se corresponden con la denominación Z10-Z22, Z22-Z30 y Z30-Z49 (Zadoks et al., 1974), respectivamente. Durante estas sub-fases se determina el número potencial de tallos a partir del número de hojas en el tallo principal (durante la sub-fase IH), el número potencial de espiguillas por espiga (durante la sub-fase IE), y la sobrevivencia de tallos y primordios de espiguilla, quienes determinan el número de granos por unidad de área (durante la sub-fase CE) (Appleyard et al., 1982).

Existen mecanismos fisiológicos que gobiernan la transición de una fase a otra en el desarrollo del cultivo que están fuertemente influenciados por el ambiente. Estos factores ambientales son: (i) la respuesta a la vernalización (Takahashi y Yasuda, 1970), (ii) la respuesta al fotoperíodo (Roberts et al., 1988) y (iii) la acumulación térmica (Gallagher et al., 1991). El fotoperíodo afecta solamente a la tasa de desarrollo de determinadas fases fenológicas mientras que la acumulación térmica afecta a todas las fases y todos los cultivares son sensibles a este factor (García Del Moral et al., 2002). Jones y Allen (1986), Wright y Hughes (1987) y Cao y Moss (1989) encontraron asociación del fotoperíodo con el número final de hojas y la tasa de aparición de las mismas. Roberts et al. (1988) y García Del Moral y Ramos (1989) encontraron que en condiciones de fotoperíodo corto los genotipos sensibles a fotoperíodos incrementan la producción de hojas (IE), porque alargan el período vegetativo. Kernich et al. (1997) observaron que la duración de IH e IE decrecieron con aumentos de fotoperíodos largos porque incrementaron la tasa de desarrollo. Durante IE se alcanza el número máximo de primordios florales (NMP) y queda fijado el número máximo potencial de granos por espiga (citado por González y Xavier, 2000, Waddington et al., 1983). Seguidamente comienza la fase de CE, durante la cual, cualquier cambio como estimular la velocidad de

producción de espiguillas durante esta fase, puede interrumpir su desarrollo y conducir a esterilidad floral y por ende, disminuir el número de granos formados por espiga (García Del Moral y Ramos, 1989). Teniendo en cuenta que el número máximo de primordios florales (NMP) se alcanza entre los estados Z32-Z33, es de suma importancia establecer altas tasas de crecimiento del cultivo durante el encañado (Z30-Z49) no solo porque de ello depende la sobrevivencia de los tallos, sino también porque con ello se logra aumentar el tamaño de la espiga y por tanto es una etapa crítica en cuanto a la concreción del potencial de rendimiento (Viega et al., 2005).

El ciclo del cultivo de cebada en Uruguay comienza con la siembra en otoño y principios de invierno (mayo/junio/julio) y finaliza con la cosecha en primavera (noviembre) (Castro et al., 2008). En los inviernos la temperatura mínima es normalmente superior a 0 °C, y las temperaturas en primavera promedian 15-20 °C. Por estas condiciones ambientales predominantes, en Uruguay se utilizan genotipos de primavera (sin requerimientos de vernalización). De acuerdo a la información nacional, el genotipo más adaptado tendría que tener un llenado de grano en condiciones óptimas (temperaturas moderadas) para lo cual la antesis tiene que ocurrir a fines de setiembre o principios de octubre. Si sucede más tarde, el llenado de grano ocurrirá a altas temperaturas, acortando la duración del llenado y el rendimiento se verá amenazado (Castro et al., 1997). Si ocurre más temprano existe el riesgo de daño por heladas tardías (Castro et al., 2008).

Según Laurie et al. (1997) la respuesta al fotoperíodo varía con el incremento o disminución de la longitud del día, una vez que el valor crítico ha sido alcanzado. Según Roberts et al. (1988) en la cebada existe un umbral inferior de fotoperíodo, por debajo del cual la floración no ocurre de ninguna manera (8-10 h) y un umbral superior por encima del cual un incremento en el fotoperíodo no supone un cambio en la tasa de desarrollo (13-18 h). Entre ambos límites, Boyd et al. (2003) propusieron diferentes grupos varietales según el grado de respuesta de los genotipos de cebada al fotoperíodo. Por un lado, genotipos insensibles al fotoperíodo (Gallagher et al., 1991) no responden al incremento en el fotoperíodo o que lo hacen mínimamente y en otro grupo, aquellos que sí responden al fotoperíodo (sensibles). En otro grupo existen los genotipos cuyo grado de sensibilidad al fotoperíodo varía a lo largo del desarrollo, siendo insensibles en la fase vegetativa y durante la fase que precede a la antesis.

El intervalo entre ambos períodos de insensibilidad se denomina periodo de sensibilidad al fotoperíodo (Major, 1980). En este período se produce una relación lineal entre el incremento en el fotoperíodo y el adelanto en la espigazón, siendo la tasa de crecimiento variable en función de los genotipos y la temperatura (Ellis et al., 1988, revisado por Cuesta Marcos 2007).

Los loci responsables de la sensibilidad al fotoperíodo han sido ampliamente estudiados en cebada (Hayes et al., 1993; Laurie et al., 1994; Laurie et al., 1995; Read et al., 2003; Boyd et al., 2003; Turner et al., 2005; Borrás et al., 2010; Borrás et al., 2012; Alqudah et al., 2014; Maurer et al., 2015, 2016). Laurie et al. (1994,1995), encontraron dos genes mayores responsables de la respuesta al fotoperíodo. El gen *Ppd-H1* está situado en el brazo corto del cromosoma 2H y regula la duración de la antesis bajo fotoperíodos largos (mayor a 14 h luz) (Turner et al., 2005) de tal manera que el alelo sensible provoca el adelanto de la floración a medida que el fotoperíodo crece, mientras que la variación no es significativa en condiciones de fotoperíodo corto. El gen *Ppd-H2*, situado en el brazo largo del cromosoma 1H, tiene un efecto significativo en la variación de la floración solamente en condiciones de fotoperíodo corto (Casao et al., 2011). No existe evidencia de interacciones epistáticas entre ambos genes (Laurie et al., 1995).

El gen de enanismo *denso*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 3H posee efecto pleiotrópico sobre la fenología (Laurie et al., 1993). Estudiando la fenología de la población Full Pint/Baronesse en las condiciones ambientales de Uruguay, Castro et al. (2008) reportaron efectos significativos y completamente aditivos de genes implicados en la acumulación térmica, *earliness per se (eps2S)* y *denso* para la fecha de antesis. En un trabajo posterior (Castro et al., 2017) reportaron que dichos efectos eran específicos para dos sub-fases diferenciadas (*eps2S* afectaba la encañazón y *denso* la fase de macollaje) lo que explicaba la completa aditividad de los efectos para fecha de antesis. En Uruguay, en ningún caso hasta el momento, se lograron detectar efectos de los genes reportados que determinan respuesta a fotoperíodo.

El conocimiento de los factores genéticos, así como la posibilidad de controlar la duración de las distintas sub-fases del ciclo del desarrollo, sin afectar el tiempo total hasta antesis (Slafer, 2003) puede ser un insumo importante para el desarrollo de estrategias eficientes como apoyo en los programas de mejoramiento. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es avanzar en el

estudio de las bases genéticas de las sub-fases de fenología de la cebada en Uruguay, complementando el estudio de Castro et al. (2017) con énfasis en el control de la respuesta a fotoperíodo y su impacto en la adaptación del cultivo. Para ello, se utilizó el análisis de QTL y una población de líneas F7 obtenidas de la cruce de padres con fenología contrastante: “CLE 202-INIA (I) Ceibo” (cultivar de ciclo largo con sensibilidad al fotoperíodo) y “Norteña (N) Carumbé” (cultivar de ciclo corto con baja sensibilidad al fotoperíodo). La población se caracterizó genótipicamente mediante marcadores moleculares distribuidos por el genoma y se fenotipó en forma extensa el comportamiento fenológico y agronómico mediante experimentos a campo.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material genético

Se utilizó una población de 87 líneas recombinantes (Recombinat Inbred Lines, RIL) de cebada en filial 7 (F7), descendientes del cruzamiento de “I. Ceibo” (un cultivar con ciclo largo y sensibilidad al fotoperíodo) y “N. Carumbé” (un cultivar de ciclo corto y menor sensibilidad al fotoperíodo).

2.4.2. Caracterización fenotípica

Se caracterizó el comportamiento fenológico en siete ensayos sembrados en el campo experimental de la estación experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC), en Paysandú, (58°C 03’W, 32°C 55’S). En todos los experimentos se utilizó un diseño con cuatro bloques incompletos con seis testigos repetidos (N. Carumbé, I. Ceibo, Clipper, Daymán, Estanzuela (E) Quebracho, Perún)

Los siete ensayos fueron sembrados en tres años y en diferentes épocas de siembra. En el 2013 los ensayos se sembraron el 28 de mayo (13EA), 13 de junio (13E1) y el 9 de agosto (13E2). En el 2014, los ensayos se sembraron en dos épocas, 24 de junio (14E1) y 11 de agosto 2014 (14E2). En tanto, las fechas de siembra de 2015 fueron el 6 de junio (15E1) y 1 de setiembre (15E2). El ensayo 13EA tuvo un tamaño de parcela de 1 m de largo con dos surcos separados a 0,20 m, mientras que 13E1 y 13E2 tuvieron un tamaño de parcela de 3 m

de largo con tres surcos separados 0,20 m. Los ensayos de 2014 y 2015 tuvieron un tamaño de parcelas de 4 m de largo con seis surcos separados 0,17 m.

En los siete ensayos se determinó la duración de las diferentes fases del desarrollo en base a la escala de Zadoks (Zadoks et al., 1974): tiempo a macollaje, (Z10-Z22); macollaje (Z22-Z30); encañado (Z30-Z49) y tiempo a antesis (Z10-Z49). En seis ensayos, se determinó la duración del llenado de grano (Z49-Z90) y tiempo a madurez fisiológica (Z10-Z90), mientras que en 2014 en la época tardía, se determinó Z10-Z60. Todas las variables se registraron en grados días (°Cd), utilizando la temperatura promedio diaria y una temperatura base de 0 °C hasta antesis y 5 °C para llenado de grano.

La respuesta al fotoperíodo (RF) se determinó como la diferencia en la duración en tiempo térmico de una fase determinada entre fechas contrastantes de siembra (diferencia entre la duración de dicha fase entre una siembra temprana y una tardía). Menores valores en la diferencia indican una duración similar en fechas de siembra contrastantes, y por tanto una menor sensibilidad al fotoperíodo (Yin et al., 2005). Se utilizó dos cultivares como testigos para alta y baja sensibilidad al fotoperíodo, E. Quebracho y Perún, respectivamente.

2.4.3. Caracterización genotípica

2.4.3.1. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de material vegetal de cada genotipo de la población RIL con ISOLATE Plant DNA Mini Kit (www.bioline.com/isolate). La calidad y cantidad de ADN fue verificada mediante NanoDrop®.

2.4.3.2. Selección de marcadores

La población se genotipó con un panel de ADN con el método de next generation genomics (NGG) de Eureka Genomics que consiste en un set de 426 iSelect SNPs (Castro et al., 2017) de los cuales, 126 marcadores fueron polimórficos para nuestra población. Se realizó una búsqueda de marcadores moleculares previamente publicados en otras poblaciones de cebada y en base de datos como *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) y *GrainGenes* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>). De un total de 54 marcadores del tipo microsatélites (SSR) candidatos, solo 14 fueron polimórficos para los padres de la población

derivada de I. Ceibo y N. Carumbé. El genotipado de la población de 87 RILs se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ajustando las condiciones óptimas de amplificación para cada par de cebadores, y posterior electroforesis en gel de agarosa.

2.4.3.3. Mapa de ligamiento

Para la construcción del mapa de ligamiento se utilizó GMendel 3.0 y se utilizó un valor mínimo de LOD (minlod) de 3,0 y recombinación máxima (rmax) de 0,25. El orden más probable de los marcadores se obtuvo mediante análisis de máxima verosimilitud y las frecuencias de recombinación calculadas usando la función de Kosambi se utilizaron para inferir las distancias de recombinación en cM.

2.4.4. Análisis de QTL

El análisis de QTL se realizó mediante el procedimiento de mapeo por intervalo compuesto (CIM) (Zeng, 1994) implementado en el software de Windows QTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2005). El método de regresión seleccionado fue el forward-backward con un umbral de significación de 0,10. El número máximo de cofactores fue 5 con un tamaño de ventana de 10 cM. El umbral se determinó utilizando 500 permutaciones con un nivel de significación de 0,05 en todo el genoma.

Por cada QTL significativo, se calculó r^2 (proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL individual) y los valores de efecto aditivo. Las interacciones epistáticas entre QTL se evaluaron con el mapeo de intervalo múltiple (MIM, Kao et al., 1999) utilizando 1000 permutaciones, herramienta implementada en Windows QTL Cartographer 2.5 usando Criterio de Información Bayesiano (BIC-M0).

Para llevar a cabo este análisis se tuvieron en cuenta los 87 individuos, los 142 marcadores y las 20 variables fenotípicas (Z10-Z22, Z22-Z30, Z10-Z30, Z30-Z49, Z10-Z49, Z49-Z90, Z10-Z90 y sus respectivas respuestas al fotoperíodo; A su vez, se agregaron datos de siete variables agronómicas para cada genotipo: rendimiento en grano (Rend, kg/ha), peso de mil granos (PMG, g), granos por metro cuadrado (granos/m²), espiga por metro cuadrado (espigas/m²), granos por espiga (granos/espiga), porcentaje de grano con diámetro mayor a

2,5 mm (P1 (%)), porcentaje de grano con diámetro mayor a 2,8 mm (P2 (%)) y altura de planta (cm). En todas las variables se utilizaron las medias corregidas.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales para los tres años mostraron variaciones tanto en temperatura como en precipitación (Figura 1 y 2). En 2013, 2014 y 2015 existió un déficit de precipitaciones en comparación con el promedio histórico, excepto lluvias específicas en agosto 2015 que superaron la media histórica. Las temperaturas durante 2013 y 2014 fueron más bajas que el promedio histórico (2002-2012 de la estación climatológica EEMAC, Paysandú, Uruguay), excepto en el mes de octubre que fue mayor en los dos años. En 2015 las temperaturas generalmente no variaron con respecto al promedio histórico, salvo que se registraron temperaturas más bajas en el mes de julio.

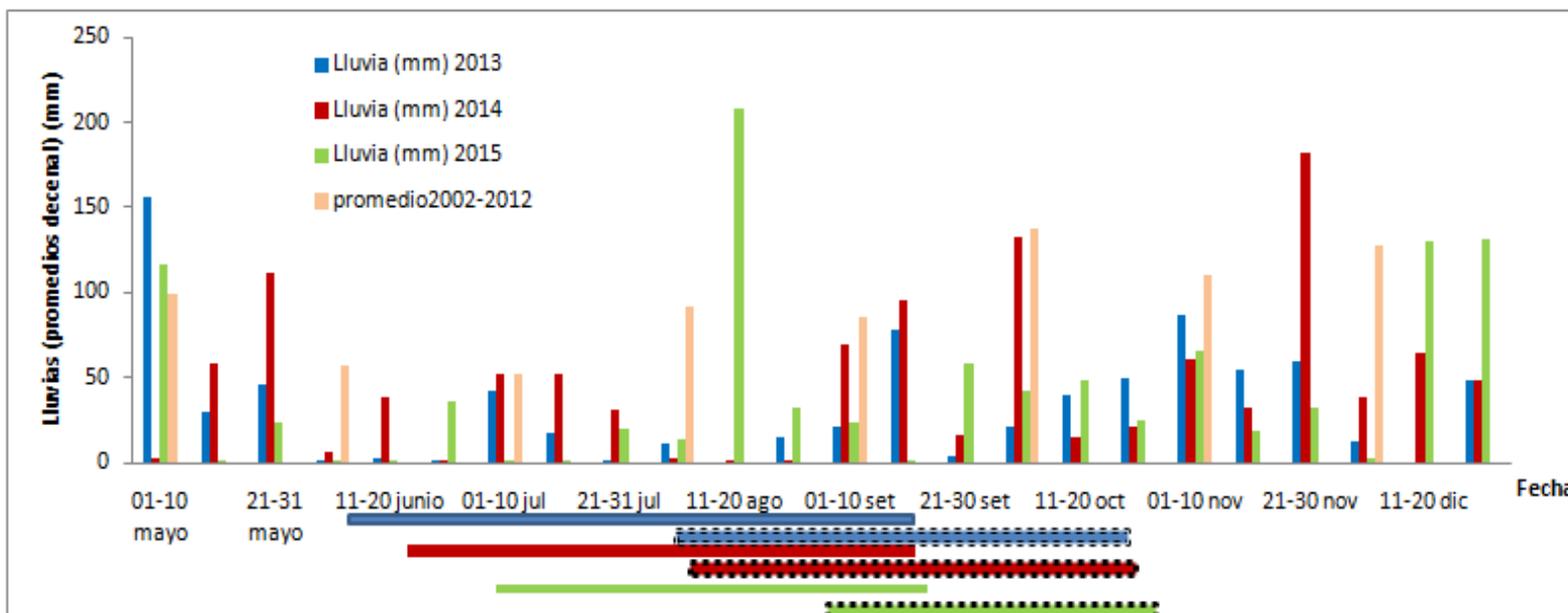


Figura 1: Lluvias promedio de diez días de tres años y promedio de 10 años en milímetros (mm) de la estación climatológica EEMAC, Paysandú, Uruguay (58° 03'W, 32°55'S) a lo largo del desarrollo del ciclo del cultivo hasta anthesis. Barras horizontales enteras indican tiempo promedio a anthesis de la época 1 (azul 2013, bordó 2014 y verde 2015). Barras horizontales punteadas, indican tiempo promedio a anthesis de la época 2 (azul 2013, bordó 2014 y verde 2015).

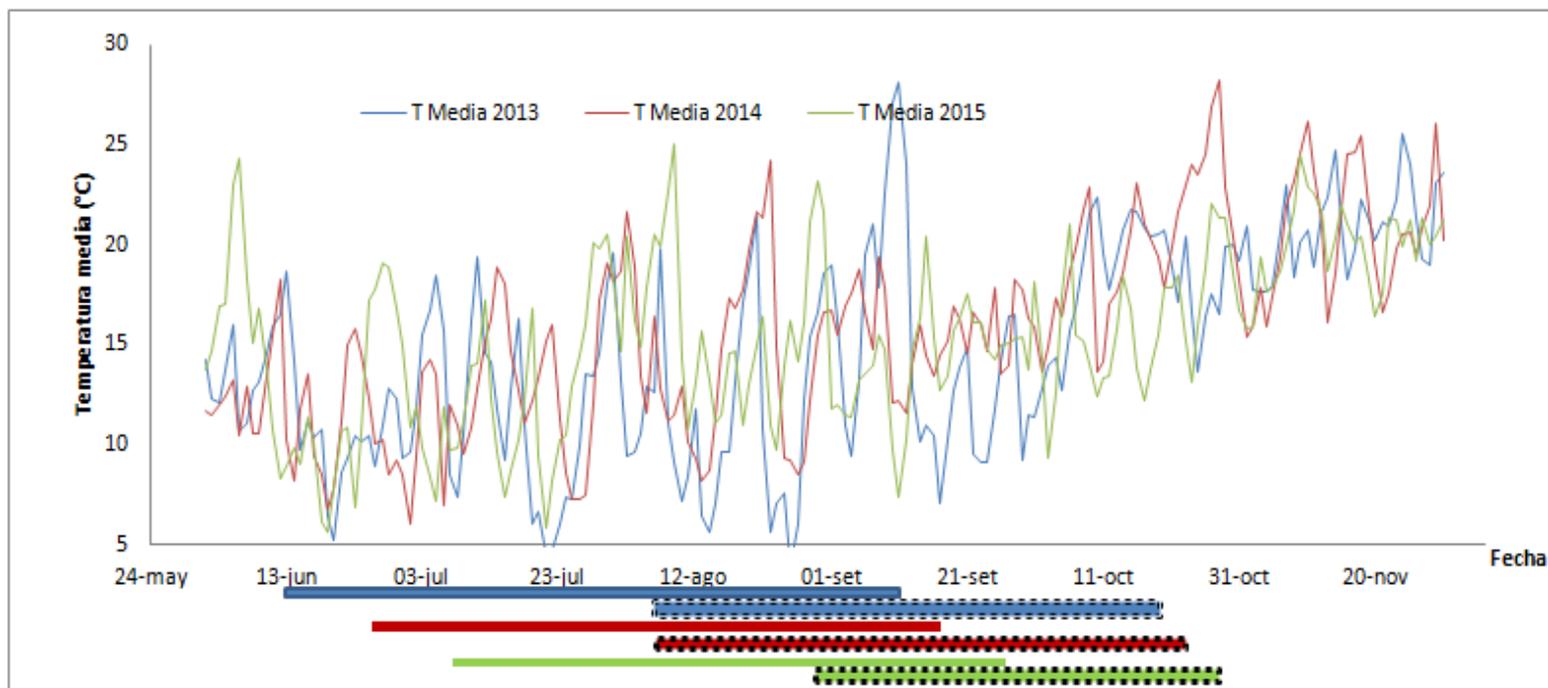


Figura 2: Temperaturas medias diarias en °C de la estación climatológica EEMAC, Paysandú, Uruguay (58° 03'W, 32°55'S) a lo largo del desarrollo del ciclo del cultivo hasta anthesis. Barras horizontales enteras indican tiempo promedio a anthesis de la época 1 (azul 2013, bordó 2014 y verde 2015). Barras horizontales punteadas, indican tiempo promedio a anthesis de la época 2 (azul 2013, bordó 2014 y verde 2015).

2.5.2. RANGOS Y DISTRIBUCIÓN FENOTÍPICA DE LAS RILS

Los cultivares I. Ceibo y N. Carumbé presentaron diferencias en su comportamiento fenológico en las condiciones de los experimentos. En las zafras 2013 y 2015, I. Ceibo presentó mayor duración tanto del ciclo a antesis como de sus sub-fases (Z10-Z30 y Z30-Z49) que N. Carumbé. Esas diferencias fueron menores en las épocas de siembra tardías. Ambos padres tienden a reducir la duración de ciclo y sub-fases en la época tardía. En general, I. Ceibo es quien presentó la mayor reducción. En 2014, el comportamiento de los padres fue diferente, mientras I. Ceibo presentó menor duración de Z10-Z30, Z30-Z49 y Z10-Z49 en época tardía, N. Carumbé tuvo mayor duración en relación a los valores de la época de siembra temprana.

La duración de la sub-fase Z10-Z30 (Cuadro 1), fue significativamente mayor en I. Ceibo que en N. Carumbé para cinco de los siete ambientes (no presentó diferencias significativas en las épocas tardías de 2014 y 2015). En 2013 las diferencias en duración entre épocas para cada padre fueron comparativamente menores. En 2014 y 2015 I. Ceibo tuvo menor duración de la fase en la época tardía que en la época temprana, mientras que N. Carumbé fue menor en menor medida (2015) o no la reduce (2014).

Para la sub-fase Z30-Z49 hay diferencias significativas entre los padres en cuatro de los siete experimentos. En 2013, en E1 I. Ceibo tuvo una duración de dicha sub-fase mayor a N. Carumbé mientras que en las otras dos sub-fases no hay diferencias significativas. En 2014 y 2015, I. Ceibo presentó valores iguales o menores a N. Carumbé y presentó una tendencia a una diferencia mayor entre la duración de la época temprana y la época tardía (Cuadro 1).

Para Z10-Z49, I. Ceibo tuvo un ciclo más largo o igual que N. Carumbé en todos los experimentos de época temprana y en la época tardía en 2013. A su vez, dicho cultivar tuvo menor duración total a antesis con el retraso de la época de siembra en los tres años. En cambio, N. Carumbé, en épocas tardías redujo la duración del ciclo a antesis en 2013 y 2015, pero en 2014 presentó un ciclo más largo (Cuadro 1).

En general la media de la población se encontró en el intervalo entre I. Ceibo y N. Carumbé para todas las sub-fases y años (Cuadro 1).

Cuadro 1: Tiempo térmico promedio (°Cd) a antesis (Z10-Z49) y de sus sub-fases (Z10-30, Z22-Z30, Z30-Z49, Z10-Z49 para la población de mapeo y sus padres, incluye los valores de significancia (p-valor con $\alpha=0,05$) para todos los ambientes. Ns, no es significativo y ND, no hay datos. .

Sub-fase		13EA	13E1	13E2	14E1	14E2	15E1	15E2
Z10-Z30	I. Ceibo	647	694	660	775	646	805	584
	N. Carumbé	529	533	590	571	652	635	539
	p-valor	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	Ns	0,0001	Ns
	Media de la población	576	597	618	702	641	768	530
Z22-Z30	I. Ceibo	363	438	290	474	ND	ND	ND
	N. Carumbé	253	303	243	299	ND	ND	ND
	p-valor	0,0001	0,0002	0,0008	0,0001			
	Media de la población	307	376	278	408	ND	ND	ND
Z30-Z49	I. Ceibo	565	396	298	365	358	375	259
	N. Carumbé	514	369	318	463	548	499	331
	p-valor	Ns	0,0155	0,3839	0,0016	Ns	0,0001	0,0071
	Media de la población	528	351	261	374	359	381	264
Z10-Z49	I. Ceibo	1212	1090	963	1168	986	1223	843
	N. Carumbé	1043	927	903	1034	1197	1134	870
	p-valor	0,0001	0,0001	0,0014	0,0001	Ns	0,0001	0,0056
	Media de la población	1104	948	879	1076	1000	1149	794

En general, la distribución de los valores de la población para Z10-Z30, Z30-Z49 y Z10-Z49 para todos los ambientes (Figura 3, a modo de ejemplo) mostró una menor longitud de las fases a medida que se atrasó la fecha de siembra. Sin embargo, en 2013 la población presentó una distribución similar para la sub-fase Z10-Z30 en las dos épocas extremas (13EA y 13E2). En el 2014, las distribuciones de las tres variables se superpusieron entre épocas de siembra, en particular Z30-Z49, mientras que en 2015 existió una clara disminución de los valores de las tres variables con el atraso de la fecha de siembra (Figura 3).

Respecto a la respuesta al fotoperíodo (Cuadro 2) en todos los ambientes el testigo E. Quebracho presentó alta sensibilidad al fotoperíodo, mientras que el testigo Perún presentó una baja sensibilidad como se esperaba, excepto en el 2013 que presentó sensibilidad en Z30-Z49 y Z10-Z49.

El cultivar I. Ceibo, presentó una moderada a alta respuesta al fotoperíodo, en diferentes combinaciones sub-fase/año, mientras que N. Carumbé presentó baja sensibilidad en la mayoría de las sub-fase.

La media de la población presentó sensibilidad al fotoperíodo en la mayoría de los ambientes, asemejándose a la respuesta de I. Ceibo. En el 2013, la media de la población para la sub-fase Z10-Z30, presentó una baja sensibilidad al fotoperíodo.

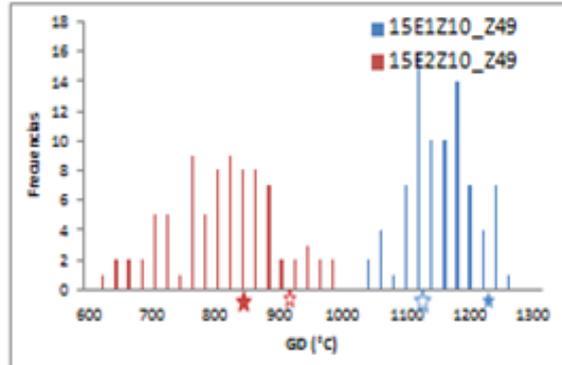
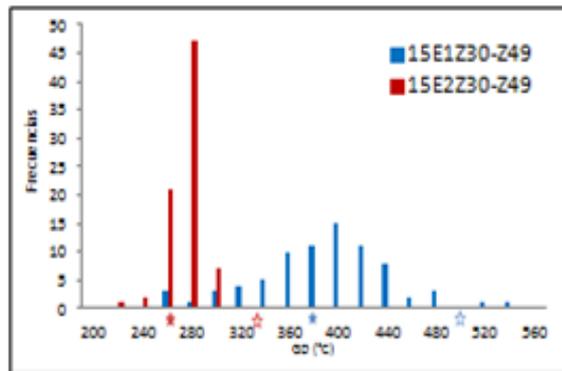
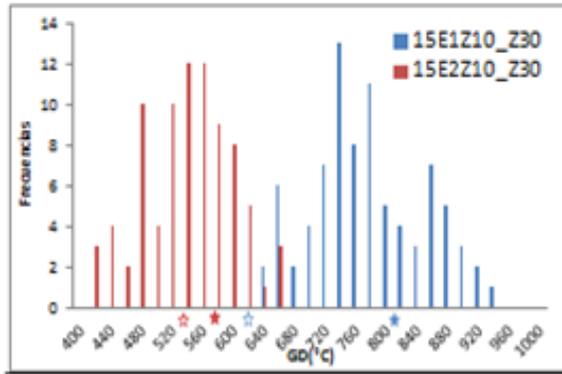


Figura 3: Rangos y distribución fenotípica de las líneas RILs para la duración ($^{\circ}\text{Cd}$) de las fases Z10-Z30, Z30-Z49 y Z10-Z49 para el año 2015 en cada época (E1 y E2). En el eje x se representan los $^{\circ}\text{Cd}$ de los padres en estrellas con los colores según ambiente (I. Ceibo estrella sólida y N. Carumbé sin relleno).

Cuadro 2: Respuesta al fotoperíodo para los días a antesis (Z10-Z49) y sus sub-fases (Z10-30, Z30-Z49) para I. Ceibo, N. Carumbé, testigos con alta sensibilidad al fotoperíodo (Estanzuela Quebracho) y con baja sensibilidad al fotoperíodo (Perún) y la media de la población de mapeo (Xm). Todos los valores están expresados en grados días (°Cd).

RF	I. Ceibo	N. Carumbé	Quebracho	Perún	Xm
Z10-Z30					
2013 (EA-E2)	13	-61	14,5	-38	-42
2014	129	-81	36	-0,9	61
2015	221	96	135	ND	235
Z30-Z49					
2013(EA-E2)	267	196	98	37	268
2014	7	-85	123	-55	17
2015	116	168	157	ND	113
Z10-Z49					
2013(EA-E2)	249	140	229	203	227
2014	182	-163	160	-56	78
2015	379	230	292	ND	342

2.5.3. MAPA DE LIGAMIENTO

Se construyó el mapa de ligamiento con 142 marcadores moleculares, 14 SSR y 128 SNPs distribuidos en 22 grupos de ligamiento. Dichos grupos de ligamiento fueron asignados a los 7 cromosomas de cebada (Figura 3) utilizando como referencia la localización de los marcadores en el mapa consenso (Alqudah et al., 2014 y Muñoz-Amatriaín et al., 2011). El mapa de ligamiento abarca 729 cM con un valor mínimo de LOD (minlod) de 3,0 y recombinación máxima (rmax) de 0,25. Cuando la distancia entre marcadores es mayor a 10 cM se le asigna a otro grupo de ligamiento; El cromosoma 4H posee escasos marcadores moleculares y a una distancia superior a 10 cM queda disgregado en cuatro grupos de ligamiento. El resto de los cromosomas poseen 2 o 3 grupos de ligamiento y algunos de ellos presentaron un número de marcadores moleculares considerable.

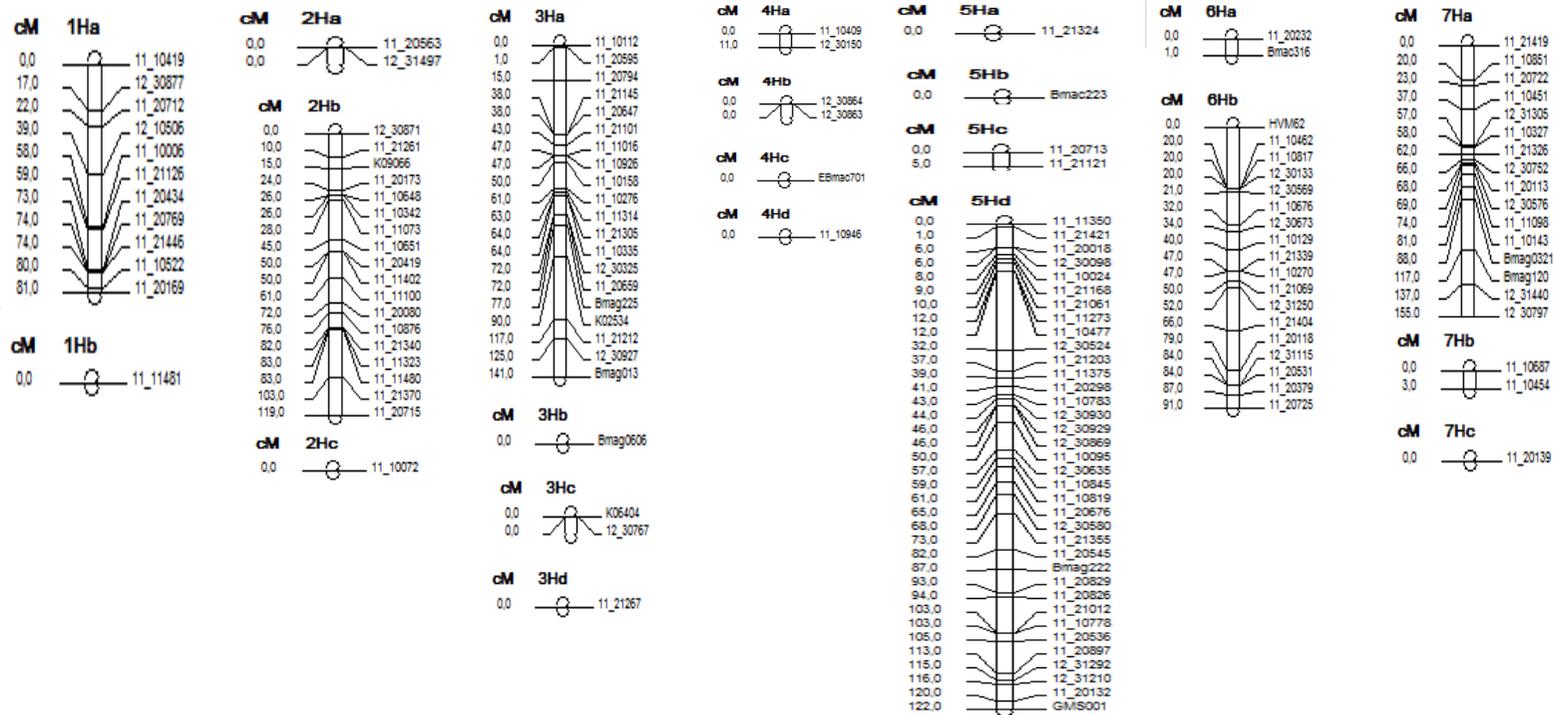


Figura 6: Mapa de ligamiento de población de RILs derivada de INIA Ceibo x Norteña Carumbé (n=87) construido en GMendel 3.0. Las distancias son en cM.

2.5.4. ANÁLISIS DE QTL

El análisis mediante MIM detectó cuatro QTL para distintas combinaciones fases/ambientes: dos QTL ubicados en el cromosoma 2H, un QTL en el 3H y un QTL en el 5H (Cuadro 3). Una región en el cromosoma 2H, localizada entre los marcadores *12_30871* y *11_21261* presentó efectos significativos para Z10-Z30 (15E2), Z30-Z49 (13E2 y 15E2), Z10-Z49 (13EA, 13E1 y 15E2), Z49-Z90 (13E1), Z10-Z60 (14E2) y Z10-Z90 (13EA, 13E2, 14E2 y 15E2). En la mayor parte de los casos, N. Carumbé contribuyó el alelo con mayor valor de duración de las sub-fases, mientras que para las variables Z10-Z49 (13EA), Z10-Z49 (13E1) y Z10-Z90 (13EA), el alelo de mayor valor fue aportado por I. Ceibo. La región en el cromosoma 3H localizada entre los marcadores *SSR K02534* y *11_21212*, presentó efectos significativos para Z10-Z30 (13EA), Z22-Z32/Z22-Z30 (13EA), Z32-Z49 (13EA) y Z10-Z49 (13E1). El alelo de I. Ceibo es el que aportó mayor valor para dichas variables. Otros dos QTL, localizados en 2H (con el marcador flanqueante *11_11073*) y en el cromosoma 5H (*11_11350*) fueron significativos para Z30-Z49 sólo en un experimento cada uno (Cuadro 3). Al no presentar efectos significativos para Z10-Z49, no se consideró en el resto de este estudio. En los ambientes 14E1, 14E2 y 15E1 no se detectó ningún QTL para ninguna variable.

En relación a la respuesta al fotoperíodo se detectó dos QTL coincidentes con los mencionados anteriormente para la mayoría de las variables (sobre los cromosomas 2H y 3H) (Cuadro 4). El QTL en el cromosoma 2H tuvo efecto significativo para la sensibilidad al fotoperíodo para Z10-Z30, Z30-Z49 y Z10-49. El QTL en 3H tuvo efecto significativo para la sensibilidad al fotoperíodo en la sub-fase Z22-Z32. El alelo proveniente de I. Ceibo aportó el alelo de mayor valor en todos los casos.

Cuadro 3: Resumen de los efectos de los QTL detectados para las distintas fases fenológicas (Z10-Z90 y las sub-fases Z10-Z30, Z22-Z30/Z22/Z30, Z30-Z49/Z32-Z49, Z10-Z49, Z49/Z90, Z10-Z60, Z10/Z90) en la población I. Ceibo x N. Carumbé en cada experimento (definidos en el texto) mostrando la ubicación genómica (grupo de ligamiento (GL), cromosoma (crom), el marcador más cercano al QTL (ID M) y posición, el r² (en %) explicado por cada QTL, el LOD del pico del QTL y el efecto de sustitución alélica (efecto A) (en °Cd). Un valor positivo de sustitución alélica indica que “I. Ceibo” contribuye con el alelo de mayor valor, mientras que un número negativo indica que N. Carumbé contribuye con el alelo de mayor valor. La ausencia de datos indica

Variable ^a	GL	Crom	ID M	posición	13 EA	13 E1	13 E2	15 E2
Z10-Z30	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD			2,60
					Efecto A.			-24,09
					r ² (%)			12,9
Z22-Z32/ Z22-Z30	6	3H	K02534	100 cM	LOD	2,27		
					Efecto A.	14,82		
					r ² (%)	26,4		
Z30-Z49	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD		3,40	2,24
					Efecto A.		-25,45	-4,93
					r ² (%)		16,9	11,3
Z30-Z49	17	5H	11_11350	0,10 cM	LOD	4,66		
					Efecto A.	15,07		
					r ² (%)	22,9		
Z30-Z49	17	5H	11_11350	0,10 cM	LOD		2,55	
					Efecto A		-18,67	
					r ² (%)		14,6	

Continuación cuadro 3.....

Variable ^a	GL	Crom	ID MM	posición	13 EA	13 E1	13 E2	15 E2
Z32-Z49	6	3H	K02534	100 cM	LOD	2,12		
					Efecto A.	-.37,76		
					r ² (%)	21,7		
	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD		3,64	
					Efecto A.		-.7,60	
					r ² (%)		18	
Z10-Z49	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD	2,16	3,77	3,41
					Efecto A.	24,01	28,98	-37,75
					r ² (%)	13,4	20,4	14,8
	6	3H	K02534	100 cM	LOD		2,31	
					Efecto A.		28,59	
					r ² (%)		24,2	

Cuadro 4: Respuesta al fotoperíodo de las sub-fases fenológicas en la población I. Ceibo x N. Carumbé en cada experimento (definidos en el texto) mostrando la ubicación genómica (grupo de ligamiento (GL), cromosoma (crom), el marcador más cercano al QTL (ID M) y posición, el r^2 (en %) explicado por cada QTL, el LOD del pico del QTL y el efecto de sustitución alélica (en °Cd). Un valor positivo de sustitución alélica indica que "I. Ceibo" contribuye con el alelo de mayor valor, mientras que un número negativo que N. Carumbé contribuye con el alelo de mayor valor. La ausencia de datos indica que no se detectó ningún QTL.

Variable ^b	GL	Crom	ID M	posición	2013	2014	2015	
RFZ10-Z30	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD		4,75	
					Efecto A.		37,02	
					r^2 (%)		21,3	
RF-Z22-Z32	6	3H	K02534	100 cM	LOD	2,96		
					Efecto A.	58,38		
					r^2 (%)	31,2		
RF-Z30-Z49	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD	7,54	2,77	
					Efecto A.	31,84	25,76	
					r^2 (%)	31,4	12,8	
RFZ10-Z49	4	2H	12_30871	0,10 cM	LOD	10,83	5,64	8,07
					Efecto A.	47,58	42,17	45,79
					r^2 (%)	46,5	26,6	36,3

2.6. DISCUSIÓN

Nuestro estudio caracterizó en forma extensa la fenología de una población derivada de la cruce I. Ceibo/N. Carumbé como base para de identificar los componentes genéticos que explican estas variables. Los parentales presentaron diferencias en su comportamiento fenológico en las condiciones de los experimentos. Como era de esperar, en la mayor parte de los casos I. Ceibo presentó mayor duración del ciclo a antesis que N. Carumbé y la progenie reflejó el polimorfismo dentro del rango detectado de los padres. Ambos padres tienden a reducir la duración en tiempo térmico para las distintas sub-fases de la fenología a medida que la época de siembra se atrasa, acelerando la transición de una fase a otra por influencia del ambiente. En general, I. Ceibo acorta el ciclo en mayor magnitud debido al efecto del fotoperíodo. Los testigos respondieron al fotoperíodo con moderada y baja sensibilidad (Quebracho y Perún respectivamente). El cultivar I. Ceibo presentó alta sensibilidad, mientras

que N. Carumbé mostró baja sensibilidad (Cuadro 2), concordante con lo reportado en la evaluación de cultivares de cebada cervecera (Hoffman et al., 1999 y 2001).

En 2013 y 2015 (Figura 3) la población respondió del mismo modo al efecto del fotoperíodo mostrando un comportamiento fenológico ubicado dentro del rango de los padres. Los resultados en el año 2014 presentaron diferencias con los otros dos años. En este ensayo, las lluvias y la mala implantación de la época tardía perjudicaron las mediciones dando resultados confusos, por lo que dicha controversia probablemente proviene de una baja calidad de los datos de la segunda época.

En nuestro estudio la variación en el largo de las diferentes sub-fases fenológicas está explicada fundamentalmente por dos QTL con efectos mayores (detectados mediante análisis MIM). Las regiones detectadas se ubican en los cromosomas 2H y 3H. El QTL en la región del cromosoma 2H fue significativo para la sub-fase Z10-Z30 y Z30-Z49 en la época tardía (Cuadro 3) y con respuesta al fotoperíodo (Cuadro 4) para todas las sub-fase. Dicha región se encuentra localizada en nuestro mapa entre los marcadores *12_30871* en la posición 0,0cM y el marcador *11_21261* a 10cM. El marcador *12_30871* se encontró en el mapa de la población Barke x HEB-25 con Dataset de iSelect_9K_Infinium (posición 19,9 cM) de Maurer et al. (2015). Estos autores confirmaron que dicho marcador está directamente localizado dentro del gen *Ppd-H1*, responsable de la respuesta al fotoperíodo (Laurie et al. 1994 y 1995). Usualmente, *Ppd-H1* tiene efectos significativos afectando el tiempo a antesis en cebada bajo condiciones de fotoperíodos largos de 13h luz o más (Laurie et al., 1994, Boyd et al., 2003, Turner et al., 2005) de tal manera que el alelo sensible provoca el adelanto de la floración a medida que el fotoperíodo crece. En cambio, la variación no es significativa en condiciones de fotoperíodo más corto (12 h) a lo largo de todo el desarrollo del cultivo (Borrás et al., 2012). En nuestro estudio, dicho efecto se detectó en la sub-fase Z30-Z49 cuando los días alcanzaron más de 13h 11min y 13h 17min de luz en el 2013 y 2014 respectivamente, mientras que en 2015 se detectó en la sub-fase Z10-Z30 (comprende la fase Z20-Z30) cuando se alcanzó 12h 56min de fotoperíodo. Este efecto se observa claramente en las distribuciones fenóticas de las frecuencias de las RILs (Figura 3 y 5) donde la reducción de longitud de duración de encañado entre épocas depende del fotoperíodo. De acuerdo a los resultados obtenidos *Ppd-H1* es el gen candidato para el QTL. La variedad I. Ceibo presenta el alelo de sensibilidad al fotoperíodo,

lo que explica que N. Carumbé aporte los mayores valores en la duración de las sub-fases y en la duración del ciclo a antesis en las épocas tardías en las sub-fases.

El QTL en el 3H detectado mediante MIM (Cuadro 3) tuvo efectos significativos para la época más temprana únicamente en el primer año de análisis, para tiempo a encañado (Z10-Z30), macollaje (Z22-Z30/2) y Z10-Z49. Con análisis CIM, el QTL en 3H tuvo efectos menores en la sub-fase Z22-Z30 en tres ambientes y en Z10-Z30 en cinco ambientes. Dicha región está localizada en la región de 27 cM entre los marcadores SSR *K02534* y *11_21212*. El marcador *11_21212* está localizado a 24 cM del SSR *Bmag013* (Figura 6), presente en el mapa utilizado por Castro et al. (2017). Utilizando ese marcador común como referencia, el QTL reportado por los autores citados, tiene su pico a 17 cM de *Bmag013*. Si bien la región no es exactamente coincidente, las gráficas del análisis de QTL muestra un pico en aproximadamente 12_30927, que se ubica a 16 cM de *Bmag013*, lo que implicaría una coincidencia entre ambos reportes. La razón por la que el análisis de MIM elimina ese pico y ubica al QTL en la localización 100 cM es posible que sea un artefacto del análisis provocado por las limitaciones del mapa utilizado (mencionadas más adelante). La similitud de los efectos reportados, y la coincidencia en cuanto a la región (con las imprecisiones discutidas) sugiere que el QTL en el brazo largo del cromosoma 3H podría deberse a la segregación de alelos de *denso* en la población I. Ceibo/N. Carumbé. Laurie et al. (1993) y posteriormente Castro et al. (2008) reportaron que el gen de enanismo o semienanismo (*denso*) tiene efecto pleiotrópico sobre la fenología. Kuczynska et al. (2013) y Laurie et al. (1995) demostraron que el gen *denso* disminuye la longitud de los entrenudos y aumenta el número de tallos. Los efectos de *denso* encontrados en nuestro estudio en la sub-fase Z22/Z32 coinciden con lo reportado por Castro et al. (2017) demostrando que el efecto de *denso* es sobre la fase de macollaje y que el alelo de I. Ceibo aporta los mayores valores de duración de dicha sub-fase.

Nuestros resultados proporcionan información útil para avanzar en la comprensión sobre el control genético de las sub-fases del cultivo de cebada hasta antesis (Z10-Z49). Los dos QTL detectados con mayores efectos actúan en diferentes sub-fases y ambientes. El efecto del QTL en el 3H coincidente con el locus del gen *denso* es independiente de la fecha de siembra y actúa en la sub-fase Z20-Z30. El efecto del QTL del 2H coincidente con el locus de *Ppd-H1* depende de la fecha de siembra, actuando en épocas tardías. En la medida que las sub-fases

están bajo control genético independiente (Borrás et al., 2010; Castro et al.; 2008) se abre la alternativa de acumulación de alelos favorables en un mismo genotipo con efectos aditivos para lograr fenotipos novedosos y de mayor potencial.

Nuestros resultados muestran que la población derivada del cruzamiento entre I. Ceibo y N. Carumbé fue una herramienta adecuada para profundizar el estudio de las bases genéticas que controlan la fenología en las condiciones ambientales de Uruguay, particularmente la respuesta al fotoperíodo. Hasta el momento, no se había podido detectar el polimorfismo para respuesta al fotoperíodo en nuestras condiciones lumínicas. Se pudo caracterizar genéticamente el gen *Ppd-H1* con marcadores alelos específicos, aunque nuestro mapa de ligamiento presentó limitaciones al momento de designar QTL a genes candidatos por su baja densidad de marcadores en comparación con los mapas revisados por Muñoz-Amatriaín et al. (2011) y por su alto número de grupos de ligamiento (Figura 6).

2.7. BIBLIOGRAFÍA

Alqudah AM, Sharma R, Pasam RK, Graner A, Kilian B, Schnurbusch T. 2014. Genetic dissection of photoperiod response based on GWAS of pre-anthesis phase duration in spring barley. PLoS ONE, 9 (11): 1-27.

Appleyard M, Kirby EJM, Fellowes G. 1982. Relationships between the Duration of Phases in the Pre-Anthesis Life Cycle of Spring Barley. Australian Journal of Agricultural Research, 33: 917-25.

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.

Borrás G, Denti M, Thomas WTB, Romagosa I. 2012. Genetic control of pre-heading phases in the Steptoe x Morex barley population under different conditions of photoperiod and temperature. Euphytica 183, 303–321.

- BorrásG, Slafer GA, Casas AM, van EeuwijkF, Romagosa, I. 2010. Genetic control of pre-heading phases and other traits related to development in a double-haploid barley (*Hordeum vulgare L.*) population. *Field Crops Research*, 119, 36 –47.
- Boyd WJR, Li CD, Grime CR, Cakir M, Potipibool S, Kaveeta L, Men S, Kamali MRJ, Barr AR, Moody DB, Lance RCM, Logue SJ, Raman H, Read BJ. 2003. Conventional and molecular genetic analysis of factors contributing to variation in timing of heading among spring barley (*Hordeum vulgare L.*) genotypes grown over a mild winter growing season. *Australian Journal Agricultural Research* 54:1277-1301.
- Cao W, Moss DN. 1989b. Daylength effect on leaf emergence and phyllochron in wheat and barley. *Crop Science* 29, 1021-1024.
- Casao MC, Karsai I, Igartua E, Gracia MP, Veisz O, Casas A. 2011. Adaptation of barley to mild winters: A role for *PPDH2*. *BMC Plant Biology* 11: 164.
- Castro A, Cuesta-Marcos A, Hayes PM, Locatelli A, Macaulay M, Mastandrea N, Silveira M, Thomas W, Viega L. 2017. The completely additive effects of two barley phenology-related genes (*eps2S* and *sdw1*) are explained by specific effects at different periods within the crop growth cycle. *Plant Breed.* 2017; 00: 1–8.
- Castro A, Hayes P M, Viega L, Vales I. 2008. Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles. *Plant Breeding*, 127, 561–568.
- Castro A, Ernst O, Hoffman E, Bentancur O. 1997. Barley germplasm characterization using agronomic and quality traits. *Agrociencia*, 1, 80 –87.
- Cuesta Marcos, A. 2007. Control genético de la floración en cebada: caracterización de los principales loci y relación de patrones de espigado con el rendimiento. Tesis Doctoral Ingeniero Agrónomo. Universitat de Lleida. Zaragoza. 208pp.
- Ellis R H; Summerfield R J, Roberts E H, Cooper JP. 1989. Environmental control of flowering in barley. III. Analysis of potential vernalization responses, and methods of screening germoplasm for sensitivity to photoperiod and temperature. *Annals of Botany*, 63, 687- 704.

Gallagher L W, Solliman K M, Vivar H. 1991. Interactions among loci conferring photoperiod insensitivity for heading time in spring barley. *Crop Science*, 31, 256–261.

García Del Moral LF, Miralles DJ, Slafer GA. 2002. Initiation and appearance of vegetative and reproductive structures throughout barley development. 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*. The Harworth Press Inc., New York, pp. 243-268.

García Del Moral L F, Ramos J M. 1989. V. Fisiología de la producción de grano. En: *La cebada. Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales*. Madrid, ediciones Mundi-Prensa. pp 137-178.

González S, Xavier A. 2000. Definición del número de hojas por tallo y del número de granos por espiga en cebada cervecera (*Hordeum vulgare L.*). Tesis de graduación Ing. Agr. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. 69 pp.

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 germplasm. *Theor Appl Genet* 87:392–401.

Hoffman E, Benítez A, Cadenazzi M. 2001. Caracterización del crecimiento inicial de nuevas variedades de cebada cervecera (NCL 94088 y NE 5993-13, NE 1695, CLE 202, Q. Ayelén, Q. Palomar, Reg.936, Reg. 16). In: *Informe a la Mesa Nacional de Cebada, EEMAC, Facultad de Agronomía*.

Hoffman E, Benítez A. 1999. Caracterización de cultivares de Cebada Cervecera. Caracterización de Norteña Carumbé, Perún y Norteña Cangue. En *Informe de resultados a CYMPY SA. Facultad de Agronomía*.

Jones JL, Allen EJ. 1986. Development in barley (*Hordeum sativum*). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 107, 187-213.

Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.

Kernich G, Halloran G, Flood R. 1997. Variation in duration of pre-anthesis phases of development in barley (*Hordeum vulgare*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, 59-66.

Kuczynska A, Surma M, Adamski T, Mikołajczak K, Krystkowiak K, Ogródowicz P. 2013. Effects of the semi-dwarfing *sdw1/denso* gene in barley. *Journal of Applied Genetics*, 54, 381–390.

Laurie DA. 1997. Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* 35: 167-177.

Laurie DA, Pratchett N, Bezant J H, Snape J W. 1995. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L) cross. *Genome*, 38, 575–585.

Laurie DA, Pratchett N, Bezant JH, Snape JW. 1994. Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare* (barley). *Heredity* 72: 619-627.

Laurie DA, Pratchett N, Romero C, Simpson E. and Snape JW. 1993. Assignment of the *denso* dwarfing gene to the long arm of chromosome 3 (3H) of barley by use of RFLP markers. *Plant Breeding* 111: 198-203.

Li JZ, Huang XQ, Heinrichs F, Ganai MW, Roder MS. 2006. Analysis of QTL for yield components, agronomic traits, and disease resistance in a advanced backcross population of spring barley. *Genome* 49:454–466.

Locatelli A, Cuesta-Marcos A, Gutiérrez L, Hayes PM, Smith K, Castro A. 2013. Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germoplasm in Uruguay. *Molecular Breeding*, 31, 631–654.

Major DJ. 1980. Photoperiod response characteristics controlling flowering of nine crop species. *Can J Plant Sci* 60: 777-784.

Maurer A, Draba V, Pillen K. 2016. Genomic dissection of plant development and its impact on thousand grain weight in barley through nested association mapping. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2507–2518.

- Maurer A, Draba V, Jiang Y, Schnaithmann F, Sharma R, Schumann E, Kilian B, Reif JC, Pillen K. 2015. Modelling the genetic architecture of flowering time control in barley through nested association mapping. *BMC Genomics* 16, 290.
- Muñoz-Amatriaín M, Moscou MJ, Bhat PR, Svensson JT, Bartos J, Suchankova P,Close TJ. 2011. An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and single nucleotide polymorphism markers. *Plant Genome*, 4, 238–249.
- Read BJ, Raman H, McMichael G, Chalmers KJ, Ablett GA, Platz GJ, Raman R, Genger, RK, Boyd WJR, Li CD, Grime CR, Park RF, Wallwork H, Prangell R,
- Richards RA. 1991. Crop improvement for temperate Australia: Future opportunities. *Field Crops Research*, 26, 141–169.
- Roberts EH, Summerfeld RJ, Cooper J P, Ellis RH. 1988. Environmental control of flowering in barley (*H. vulgare* L.) I. Photoperiod limits to long day responses, photoperiod-insensitivity phases and the effect of low temperature and short day vernalization. *Annual of Botany*, 62, 127–144.
- Slafer GA. 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Annals of Applied Biology*, 142, 117–128.
- Takahashi R, Yasuda S. 1970. Genetics of earliness of growth habit in barley. In R. Nilan (Ed.), *Barley Genetics II* (pp. 388–408). Pullman: Washington State University Press.
- Tinker NA, Mather DE, Rossangel BG, Kasha KJ, Kleinhofs A, Hayes PM, Falk DE, Ferguson, T, Shugar LP, Legge WG, Irvine RB, Choo TM, Briggs KG, Ullrich SE, Franckowiak JD, Blake, RJ, Graf RJ, Dofing SM, Saghai Maroof MA, Scoles GJ, Hoffman D, Dahleen LS, Kilian A, Chen F, Biyashev RM, Kudrna DA and Steffenson, BJ. 1996. Regions of the Genome that Affect Agronomic Performance in Two Row Barley. *Crop Sci.* 36: 1053-1062.
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA. 2005. The pseudo response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031-1034.

- Viega L, Hoffman E, González S, Olivo N. 2005. Potencial de producción de cebada cervecera en Uruguay. Definición del número de granos por espiga. Facultad de Agronomía. Nota Técnica N°52, 20p.
- Wang S, Basten CJ, Zeng Z-B. 2005. Windows QTL Cartographer 2.5. Raleigh, NC: North Carolina State University.
- Wright D, Hughes LLG. 1987. Relationship between time, temperature, daylength and development in spring barley. *Journal Agricultural Science, Cambridge*, 109, 365-373.
- Yin X, Struik PC, van Eeuwijk FA, Stam P, Tang, J. 2005. QTL analysis and QTL based prediction of flowering phenology in recombinant inbred lines of barley. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 413, 967–976.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.
- Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.

3. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

3.1. COMPORTAMIENTO FENOTÍPICO

Se caracterizó detalladamente la fenología de los cultivares I. Ceibo y N. Carumbé y de la población de RILs derivada de su cruzamiento como forma de identificar, en combinación con su caracterización genotípica y a partir de la variación detectada, los componentes genéticos que explican su fenología. Los parentales presentaron diferencias en su comportamiento fenológico. En la mayor parte de los casos, I. Ceibo presentó mayor duración del ciclo a antesis que N. Carumbé y la progenie reflejó el polimorfismo detectado entre los padres.

Ambos padres tendieron a reducir la duración en tiempo térmico del ciclo a medida que la época de siembra se atrasa, acelerando la transición de una fase a otra por influencia del ambiente más estival. Entre los factores ambientales involucrados en nuestras condiciones, la acumulación térmica (Gallagher et al., 1991) y el efecto del fotoperíodo (Roberts et al., 1988), que afecta la tasa de desarrollo de todas las fases fenológicas y todos los cultivares son sensibles a este factor (García Del Moral et al., 2002). En cambio, el efecto del fotoperíodo afecta en mayor magnitud la duración del ciclo del cultivar I. Ceibo, mientras que N. Carumbé posee una baja sensibilidad (Cuadro 2) concordante con lo reportado por Hoffman et al. (1999 y 2001) en la caracterización de cultivares de cebada cervecera.

El fotoperíodo es uno de los factores más importantes que influyen en la tasa y duración del desarrollo de las plantas. En cebada, el proceso de floración se acelera en respuesta a incrementos en la duración del día una vez que el valor crítico ha sido alcanzado. Usualmente, el fotoperíodo tiene efectos significativos afectando el tiempo a antesis en cebada bajo condiciones de fotoperíodos largos de 13 h luz o más (Laurie et al., 1994, Boyd et al., 2003, Turner et al., 2005). En cambio, la variación no es significativa en condiciones de fotoperíodo más corto (12 h) a lo largo de todo el desarrollo del cultivo (Borrás et al., 2012). En nuestro estudio dicho efecto se detectó en la sub-fase Z30-Z49 en condiciones de fotoperíodo de más de 13 h 11 min y 13 h 17 min de luz en 2013 y 2014, respectivamente. Mientras que en 2015 se detectó en la sub-fase Z10-Z30 cuando los días alcanzaron 12 h 56 min de luz. Estas dos sub-fases en que se encontró respuesta a fotoperíodo concuerdan con el período de sensibilidad

reportado por Major (1980), ya que la sub-fase Z10-Z30 comprende la sub-fase Z20-Z30. Este efecto se observa claramente en las distribuciones donde la reducción de longitud entre épocas depende del fotoperíodo (Figura 3 y 5).

3.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y MAPA DE LIGAMIENTO

El enfoque de combinar la disección de las sub-fases del desarrollo de la fenología con un mapa de ligamiento con marcadores provee una oportunidad para entender mejor la genética básica para tiempo a antesis en cebada. En nuestro estudio, los 142 marcadores polimórficos fueron asignados a 22 grupos de ligamiento por presentar una frecuencia de recombinación mayor al 10 % entre grupos. El alto número de grupos de ligamientos se debe a la baja cobertura alcanzada con los 142 marcadores en relación a otros mapas reportados en la literatura. Por ejemplo, 1215 marcadores localizados en el mapa de Steptoe x Morex 1 reportado por Kleinhofs et al. (1993) revisado por Muñoz-Amatriain et al., (2011). El mapa de ligamiento en nuestro trabajo abarca 729 cM con aproximadamente 100 cM cada cromosoma excepto el cromosoma 4 que está disgregado en cuatro grupos de ligamiento con uno o dos marcadores cada grupo. La baja cobertura de marcadores trae como consecuencia la dificultad de detectar QTL con efectos menores, y del mismo modo, dificultad para asociar exactamente regiones cromosómicas con genes ya reportados por otros autores. Esto último, ocurrió con los efectos asignados al gen *denso* (cromosoma 3H) para el cual el pico se ubicó en una región entre los marcadores *K02534* y *11_21212* que no coincide exactamente con marcadores flanqueantes a la región reportada por Castro et al. (2017), pero con asociaciones de ligamiento entre otros marcadores obtenidos de nuestro mapa (discutido en capítulo 2). En cambio, en el cromosoma 2 se pudo caracterizar genéticamente el gen de fotoperíodo (*Ppd-H1*) con marcadores alelo específicos (*12_30871* y *11_21261*), coincidiendo que el marcador *12_30871* se encontró en el mapa de la población Barke x HEB-25 publicado por Maurer et al. (2015).

La descendencia de I. Ceibo y N. Carumbé resultó un recurso adecuado para el análisis de la respuesta al fotoperíodo, ya que previamente no se había detectado el polimorfismo para respuesta al fotoperíodo en nuestras condiciones fotoperiódicas. Con un mapa de ligamiento con mayor número de marcadores moleculares se podría ampliar la potencialidad del recurso.

3.3. REGIONES CON EFECTO SOBRE VARIABLES FENOLÓGICAS.

La variación en el largo de las diferentes sub-fases de fenología en la población derivada de la cruce I. Ceibo/N. Carumbé estuvo explicada por dos QTL mayores detectados por MIM, mencionados anteriormente y discutidos en el capítulo 2, siendo los alelos de I. Ceibo los que aportan sensibilidad al fotoperíodo (*Ppd-H1*) en el tiempo a antesis y los alelos de *denso* con efecto pleiotrópico y aditivo sobre la sub-fase Z20-Z30. Jia et al. (2009) sugirieron que *denso* participa en la biosíntesis del ácido giberélico (GA), lo que puede explicar su efecto sobre la altura de planta. Su efecto pleiotrópico sobre la fenología se puede explicar por el efecto reportado del GA en la vía de floración a través de la activación de genes como FT en el modelo propuesto para *Arabidopsis* (Mutasa-Gottgens y Hedden, 2009). El gen *denso* disminuye la longitud de los entrenudos y aumenta el número de tallos (Kuczynska et al., 2013; Laurie et al., 1995) lo que concuerda con nuestros resultados que indican que este QTL tiene efecto sobre altura (no se muestra), siendo el alelo de I. Ceibo el que aporta los mayores valores en el tiempo a encañado y más precisamente en macollaje (Z20-Z30) coincidente con lo reportado por Castro et al. (2017).

Mediante análisis CIM, se detectó una mayor cantidad de QTL con efectos menores para distintas sub-fases/ambiente en todos los cromosomas (excepto en el cromosoma 4H) (anexo Cuadro 6). Algunas de las regiones de los cromosomas coinciden con genes reportados con efecto en la fenología de cebada. Algunos de ellos se detectaron en un único ambiente como la región del 1H coincidente con locus del gen *Ppd-H2* (Alqudah et al., 2014), una región en el 5H, 6H y 7H coincidente con genes de *precocidad per se* (*eps5L*, *Eam7* y *eps7S* respectivamente) (Laurie et al., 1995, Boyd et al., 2003, Borrás et al., 2010, Alqudah et al., 2014). En el 2H se detectó una segunda región responsable de variables fenológicas, coincidente con la ubicación del gen *eps2S* (Alqudah et al., 2014). Castro et al. (2017) reportaron que el efecto aditivo del alelo del gen *eps2S* aumenta la longitud de la sub-fase Z30-Z49 en forma independiente de la fecha de siembra. En nuestro análisis, tuvo efecto para Z30-Z49 en dos ambientes y Z10-Z49 en tres ambientes independientes de la época de siembra. El cultivar I. Ceibo aporta el alelo de mayor duración en la sub-fase Z30-Z49, pero cuando existe respuesta al fotoperíodo en épocas tardías, N. Carumbé es quien aporta el alelo con alto valor. Es posible que la cercanía con *Ppd-H1* y las limitaciones de resolución de la población confundan los efectos y limite la capacidad de separar los efectos individuales.

3.4. REGIONES CON EFECTO SOBRE VARIABLES AGRONÓMICAS

Algunos de los QTL que se detallan seguidamente tienen efecto sobre la fenología y con efecto pleiotrópico sobre características agronómicas, lo que concuerda con reportes de diferentes autores que encontraron efectos de estos QTL sobre rendimiento, altura de planta, resistencia a enfermedades, etc (Hayes et al., 1993, Bezant et al., 1996, Tinker et al., 1996, Li et al., 2006, Locatelli et al., 2013). En nuestro estudio se detectaron QTL (mediante CIM) con bajo efecto sobre distintas variables agronómicas para distintos ambientes en todos los cromosomas (excepto en el cromosoma 4H) (anexo Cuadro 6). En el cromosoma 1H se detectó una región con efecto sobre espigas/planta; también se encontró efecto en dos regiones del cromosoma 3H, en el brazo corto tuvo efecto para porcentaje de grano con diámetro mayor a 2,5 mm (P1 (%)) y en el brazo largo (coincidente con el gen *denso*) para rendimiento, número de granos por m² y P1. En el 5H, se detectó una región con efecto para rendimiento, número de granos por m², peso de mil granos (PMG), P1 y porcentaje de grano con diámetro mayor a 2,8 mm (P2 (%)) y una segunda región cromosómica significativa para el número de granos por espiga. El cromosoma 6H reveló un QTL asociado a PMG, P1 y en el cromosoma 7H un QTL significativo para el número de espigas por m². El locus del gen candidato *eps2S* en el cromosoma 2H mostró efecto sobre rendimiento, PMG, el número de espigas por m², P1 y el número de granos por espiga. En *Ppd-H1* (cromosoma 2H) se detectaron efectos mayores de QTL coincidentes para PMG en la época tardía en dos años de los tres años. Con los resultados obtenidos (mediante análisis CIM y MIM), se encontró evidencia de que el control de las fases pre-antesis puede ser determinante en la adaptación y comportamiento agronómico del cultivo. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros autores que durante la sub-fase Z20-Z30 se determina el número potencial de espiguillas por espiga y en la sub-fase Z30-Z49 se determinan el número de granos por unidad de área por la sobrevivencia de tallos y primordios de espiguillas unifloras.

3.5. CONCLUSIONES

La herramienta de análisis genético (análisis de QTL sobre una población biparental) utilizada para llevar a cabo este trabajo fue adecuada, ya que se pudieron detectar los componentes principales de la base genética del efecto de fotoperíodo, objetivo del trabajo.

Los resultados obtenidos del mapeo de QTL de la población RIL derivada de I. Ceibo/N. Carumbé aportan información para comprender las bases genéticas asociadas a la fenología del cultivo de cebada en condiciones de producción de Uruguay, principalmente en respuesta al fotoperíodo y su impacto en el potencial de rendimiento.

Los dos QTL detectados con mayores efectos actuaron en diferentes sub-fases y ambientes. Los efectos de *denso* son independientes de la fecha de siembra y actúa en la sub-fase Z20-Z30, mientras que el efecto del locus de *Ppd-H1* depende de la fecha de siembra, actuando en épocas tardías. Para superar las limitaciones de detección de efectos menores, se debería contar con una población mayor y un mapa con mayor cantidad de marcadores.

4. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Albín, IJ. 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.

Alqudah AM, Sharma R, Pasam RK, Graner A, Kilian B, Schnurbusch T. 2014. Genetic dissection of photoperiod response based on GWAS of pre-anthesis phase duration in spring barley. PLoS ONE, 9, e113120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113120>.

Appleyard M, Kirby EJM, Fellowes G. 1982. Relationships between the Duration of Phases in the Pre-Anthesis Life Cycle of Spring Barley. Aust. J. Agric. Res., 33, 917-25.

Ariyadasa R, Mascher M, Nussbaumer T, Schulte D, Frenkel Z, Poursarebani N, Zhou R, Steuernagel B, Gundlach H, Taudien S, Felder M, Platzer M....., Stein, N. 2014. A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms. Plant Physiol. 164, 412–423.

Backes G, Graner A, ForoughiWehr B, Fischbeck G, Wenzel G, 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.

Baker JT, Pinter PJ, JR, Reginato RJ, Kanemasu ET. 1986. Effect of temperature on leaf appearance in spring and winter wheat cultivars. Agronomy Journal, 78, 605-613.

Balbi M, Silveyra M, Tojo, C. 1995. Caracterización de la colección nacional de cebada. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 127 p.

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.

Beier S, Himmelbach A, Schmutzer T, Felder M, Taudien S, Mayer K, Platzer M, Stein N, Scholz U, Mascher M. 2016. Multiplex sequencing of bacterial artificial chromosomes for assembling complex plant genomes. Plant Biotechnol. J. 14, 1511–1522.

- Benítez A, Lecuona H. 1996. Efecto de la época de siembra, población y manejo de la fertilización nitrogenada sobre un cultivo de cebada cervecera en siembra directa. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 90p.
- 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.
- Bonnett OT. 1966. Inflorescences of Maize, Wheat, Rye, Barley and Oats: Their Initiation and Development. University of Illinois College of Agriculture, Agriculture Experiment Station, Urbana – Champaign, E.U.A., Bulletin 721.
- Borner A, Buck-Sorlin GH, Hayes PM, Malyshev S, Korzun V. 2002. Molecular mapping of major genes and quantitative trait loci determining flowering time in response to photoperiod in barley. *Plant Breed* 121: 129-132.
- Borrás G, Denti M, Thomas, WTB, Romagosa, I. 2012. Genetic control of pre-heading phases in the Steptoe x Morex barley population under different conditions of photoperiod and temperature. *Euphytica* 183, 303–321.
- Borrás G, Slafer G A, Casas AM, van Eeuwijk F, Romagosa I 2010. Genetic control of pre-heading phases and other traits related to development in a double-haploid barley (*Hordeum vulgare L.*) population. *Field Crops Research*, 119, 36 –47.
- Boyd WJR, Li CD, Grime CR, Cakir M, Potipibool S, Kaveeta L, Men S, Kamali MRJ, Barr AR, Moody DB, Lance RCM, Logue SJ, Raman H, Read BJ. 2003. Conventional and molecular genetic analysis of factors contributing to variation in timing of heading among spring barley (*Hordeum vulgare L.*) genotypes grown over a mild winter growing season. *Australian Journal Agricultural Research* 54:1277-1301.
- Cao W, Moss DN. 1989a. Temperature effect on leaf emergence and phyllochron in wheat and barley. *Crop Science* 29, 1018-1021.

Cao W, Moss DN. 1989b. Daylength effect on leaf emergence and phyllochron in wheat and barley. *Crop Science* 29, 1021-1024.

Capdevielle F, Rey F, Branda A, 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.

Casao MC, Karsai I, Igartua E, Gracia MP, Veisz O, Casas A. 2011. Adaptation of barley to mild winters: A role for *PPDH2*. *BMC Plant Biology* 11: 164.

Castro AJ, Cuesta-Marcos A, Hayes PM, et al. 2017. The completely additive effects of two barley phenology-related genes (*eps2S* and *sdw1*) are explained by specific effects at different periods within the crop growth cycle. *Plant Breed.* 2017; 00: 1–8.

Castro AJ, Gamba F, Germán S, González S, Hayes PM, Pereyra S, Pérez C. 2012. Quantitative trait locus analysis of spot blotch and leaf rust resistance in the BCD47 baronesse barley mapping population. *Plant Breed* 131: 258-266.

Castro AJ, Benitez A, Hayes PM, Viega L, 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 PM, Viega L, Vales I. 2008. Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles. *Plant Breeding*, 127, 561–568.

Castro A, 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, Bentancur O. 1997. Barley germoplasm characterization using agronomic and quality traits. *Agrociencia*, 1, 80 –87.

- Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Doerge RC. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics*. 3: 43-52.
- Donato G, Sayas M. 2017. Desde la Industria: Importancia de la calidad de la cebada cervecera. *Cangué*. Número 38 ISSN 0797 – 8480. Pp. 30-38.
- Ernst O, Hoffman E, Brassetti D, Siri G. 1993. Efecto de la época de siembra en el ciclo de cebada cervecera. In: Reunión Nacional de Investigadores de Cebada. Mesa Nacional de Entidades de Cebada Cervecera (4ta., 1995, Montevideo, Uruguay) pp. 49-51.
- Franckowiak JD, Krasheninnik N, Yu G. 2004. Identifying genes controlling heading date in spring barley. J. Spunar and J. Janikova (eds.), *Barley Genetics IX. Book of Abstracts, proc Ninth Int. Barley Genet, Symp. Brno, Czech Republic, June 20-26, 2004. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 40:44.
- Franckowiak JD, Yu G, Krasheninnik N. 2003. Genetic control of photoperiod responses in spring barley. P.98 In Proc.....
- Franckowiak JD. 1997. Revised linkage maps morphological markers in barley, *Hordeum vulgare*. *Barley Genet Newsl* 26: 9-21.
- Gallagher LW, Solliman KM, Vivar H. 1991. Interactions among loci conferring photoperiod insensitivity for heading time in spring barley. *Crop Science*, 31, 256–261.
- García G. 2012. Curso Internacional - Red METRICE. Presentación oral. Ecofisiología de Cereales de Invierno desarrollo fenológico en trigo y cebada: principales etapas y generación de hojas, espiguillas y flores. EEMAC-UdelaR.
- García Del Moral LF, Miralles DJ, Slafer GA. 2002. Initiation and appearance of vegetative and reproductive structures throughout barley development. 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. The Harworth Press Inc., New York, pp. 243-268.

García Del Moral LF, Ramos JM. 1989. V. Fisiología de la producción de grano. En: La cebada. Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales. Madrid, ediciones Mundi-Prensa. pp 137-178.

Germán S, Arbelbide M, Abadie T, Romero R, Peculio, A. 2000. Characterization of photoperiod response of barley genotypes from diverse origin. In: S. Logue (ed), Barley Genetics VIII, Vol III- Contributed papers, 212-214.

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.

González S; Xavier A. 2000. Definición del número de hojas por tallo y del número de granos por espiga en cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.). Tesis de graduación Ing. Agr. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. 69 pp.

Guitard AA. 1960. The influence of variety, temperature and stage of growth on the response of spring barley to photoperiod. Canadian Journal of Plant Science 40, 65-80.

Gynesis L, Yun SJ, Smith KP, Steffenson BJ, Bossolini E, Sanguineti MC, Muelbahuer GJ 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.

Hartl DL, Clark, A.G. 2007 Principles of population genetics. Sunderland (MA). Sinauer Associates.

Hay RKM, Ellis, RP. 1998. The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. Ann Bot 82: 541:554.

Hayes PM, Liu BH, Knapp SJ, Chen F, Jones B, Blake T, Franckowiak J, Rasmusson D, Sorrells M, Ullrich SE, Wesenberg D, Kleinohfs A .1993. Quantitative trait locus and environmental interaction in a sample of North American barley germplasm. Theor Appl Genet 87:392-401.

Heun M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrells ME, Tanksley SD. 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.

International Barley Genome Sequencing Consortium. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* volume 491: 711–716.

Jia Q, Zhang J, Westcott S, Zhang XQ, Bellgard M, Lance R, Li C. 2009. GA-20 oxidase as a candidate for the semidwarf gene *sdw1/denso* in barley. *Functional, Integrative Genomics*, 9, 255–262.

Jansen R, Stam P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.

Jansen R. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205-211.

Jones N, Ougham H, Thomas H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol* 137: 165-177.

Jones JL, Allen EJ. 1986. Development in barley (*Hordeum sativum*). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 107, 187-213.

Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.

Kemarian A, Viega, L. 1998. Concreción del peso y concentración de nitrógeno del grano de cebada cervecera. *Actas VII Reunión de investigadores de cebada. Minas. Uruguay.*

Kernich G, Halloran G, Flood R. 1997. Variation in duration of pre-anthesis phases of development in barley (*Hordeum vulgare*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, 59-66.

Kuczynska A, Surma M, Adamski T, Mikołajczak K, Krystkowiak K, Ogrodowicz P. 2013. Effects of the semi-dwarfing *sdw1/denso* gene in barley. *Journal of Applied Genetics*, 54, 381–390.

Kitchen BM, Rasmusson DC. 1983. Duration and inheritance of leaf initiation, spike initiation and spike growth in barley. *Crop Science* 23: 939-943.

Kleinhofs A, Graner A. 2001. An integrated of the barley genome. In: Philips RL, Vasil IK (eds) *DNA-based markers in plants*, 2nd edn. Kluwer, Dordrecht, pp 187–199.

Kleinhofs A, Kilian A, Saghai-Maroo MA, Biyashev RM, Hayes PM, Chen FQ, Lapitan N, Fenwick A, Blake T, Kanazin T, Ananiev E, Dahleen L, Kudrna D, Bollinger J, Knapp SJ, Liu B, Sorrells M, Heun M, Franckowiak JD, Hoffman D, Skadsen R, Steffenson BJ. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 705-712.

Kleinhofs A, Chao S, Sharp, PJ. 1988. Mapping of nitrate reductase genes in barley and wheat. In: Miller, T.E. and Koebner, RMD. (Eds). *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Bath. USA. Bath Press.* pp. 541-546.

Lam ET. et al. 2012. Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly. *Nat. Biotechnol.* 30, 771–776.

Lander E, Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.

Laurie DA. 1997. Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* 35: 167-177.

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* L) cross. *Genome*, 38, 575–585.

Laurie DA, Pratchett N, Bezant JH, Snape JW. 1994. Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare* (barley). *Heredity* 72: 619-627.

Laurie DA, Pratchett N, Romero C, Simpson E, Snape JW. 1993. Assignment of the *denso* dwarfing gene to the long arm of chromosome 3 (3H) of barley by use of RFLP markers. *Plant Breeding* 111: 198-203.

- Li JZ, Huang XQ, Heinrichs F, Ganai MW, Roder MS. 2006. Analysis of QTL for yield components, agronomic traits, and disease resistance in advanced backcross population of spring barley. *Genome* 49:454–466.
- Limin AE, Fowler DB. 2002. Developmental traits affecting low temperature tolerance response in near isogenic lines for the vernalization locus VRN-A1 in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Ann Bot* 89: 579-585.
- Locatelli A, Cuesta-Marcos A, Gutiérrez L, Hayes PM, Smith K, Castro A. 2013. Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germoplasm in Uruguay. *Molecular Breeding*, 31, 631–654.
- Lundqvist U, Franckowiak JD, Konishi T. 1997. New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genet Newsl* 26: 22-516.
- Mahfozi S, Limin AE, Fowler DB. 2001. Developmental regulation of low temperature tolerance in winter wheat. *Ann Bot* 87: 751:757.
- Major DJ. 1980. Photoperiod response characteristics controlling flowering of nine crop species. *Can J Plant Sci* 60: 777-784.
- Mascher M, Gundlach H, Himmelbach A, Beier S, et al. 2017. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, vol 544, 427-433.
- Mascher M, Muehlbauer GJ, Rokhsar DS, Chapman J, Schmutz J, et al. 2013. Anchoring and ordering NGS contig assemblies by population sequencing (POPSEQ). *The Plant Journal* 76: 718–727.
- Mather DE, Tinker NA, LaBerge DE, Edney M, Jones BL, Rosnagel BG, Legge WG, Briggs KG, Irvine RG, Falk DE, Kasha KJ. 1997. Regions of the genome that affect grain and malt quality in North American two-row barley cross. *Crop Science* 37:544–554.
- Maurer A, Draba V, Pillen K. 2016. Genomic dissection of plant development and its impact on thousand grain weight in barley through nested association mapping. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2507–2518.

Maurer A, Draba V, Jiang Y, Schnaithmann F, Sharma R, Schumann E, Kilian B, Reif JC, Pillen K. 2015. Modelling the genetic architecture of flowering time control in barley through nested association mapping. *BMC Genomics*; 16:290.

Melchinger AE, Utz HF, Schon, C.C. 1998. Quantitative trait locus (QTL) mapping different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large biases in estimates of QTL effects. *Genetics* 149: 383-403.

MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 18 noviembre 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2006/capitulo2/Mapa2.htm>.

Miralles DJ, González FG, Abeledo LG, Serrago RA, Alzueta I, García GA, de San Celedonio, R, lo Valvo P. 2014. Manual de trigo y cebada para el cono sur: procesos fisiológicos y bases de manejo. 1a ed-Buenos Aires: Orientación Grafica Editora, 2014. 56p ISBN 978-987-1922-07-9.

Miralles DJ, Richards RA, Slafer GA. 2000. Duration of the stem elongation period influences the number of fertile florets in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 27; 931-940.

Muñoz-Amatriaín M, Moscou M J, Bhat PR, Svensson JT, Bartos J, Suchankova P,Close TJ. 2011. An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and single nucleotide polymorphism markers. *Plant Genome*, 4, 238–249.

Mutasa-Gottgens E, Hedden P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1979–1989.

Ounit R, Wanamaker S, Close TJ, Lonardi S. 2015. CLARK: fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers. *BMC Genomics* 16, 236
2015. CLARK: fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers. *BMC Genomics* 16, 236.

Qi X, Niks RE, Stam P, Lindhout P. 1998. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor Appl Genet* 96:1205-1215.

Qi X, Stam P, Lindhout P. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome*. 39: 379-394.

Read BJ, Raman H, McMichael G, Chalmers KJ, Ablett GA, Platz GJ, Raman R, Genger, RK, Boyd WJR, Li CD, Grime CR, Park RF, Wallwork H, Prangell R, Richards RA. 1991. Crop improvement for temperate Australia: Future opportunities. *Field Crops Research*, 26, 141–169.

Roberts E H, Summerfeld RJ, Cooper JP, Ellis RH. 1988. Environmental control of flowering in barley (*H. vulgare* L.) I. Photoperiod limits to long day responses, photoperiod-insensitivity phases and the effect of low temperature and short day vernalization. *Annual of Botany*, 62, 127–144.

Sherman JD, Fenwick AL, Namath DM. 1995. A barley RFLP map: alignment of three barley maps and comparisons to Gramineae species. *Theor. Appl. Genet.* 91: 681-690.

Shin JS, Corpuz L, Chao S, Blake TK. 1990. A partial map of the barley genome. *Genome*. 33: 803-808.

Stracke S, Borner A. 1998. Molecular mapping of the photoperiod response gene *ea7* in barley. *Theor Appl Genet* 97: 797-800.

Takahashi R, Yasuda S. 1970. Genetics of earliness of growth habit in barley. In R. Nilan (Ed.), *Barley Genetics II* (pp. 388–408). Pullman: Washington State University Press.

Teulat B, Merah O, Souyris I, This D. 2001. QTLs for agronomic traits from a Mediterranean barley progeny grown in several environments. *Theor. Appl. Genet.* 103: 774–787.

Tinker NA, Mather DE, Rossangel BG, Kasha KJ, Kleinhofs A, Hayes PM, Falk DE, Ferguson, T, Shugar LP, Legge WG, Irvine RB, Choo TM, Briggs KG, Ullrich SE, Franckowiak JD, Blake, RJ, Graf RJ, Dofing SM, Saghai Maroof MA, Scoles GJ, Hoffman D, Dahleen LS, Kilian A, Chen F, Biyashev RM, Kudrna DA, Steffenson BJ. 1996. Regions of the Genome that Affect Agronomic Performance in Two-Row Barley. *Crop Sci.* 36: 1053-1062.

Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA. 2005. The pseudo response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031-1034.

- Vales MI, Schon 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 1260–1270.
- Viega L, Hoffman E, González S, Olivo N. 2005. Potencial de producción de cebada cervecera en Uruguay. Definición del número de granos por espiga. Facultad de Agronomía. Nota Técnica N°52, 20p.
- Viega L, Kemanian A, González S, Olivo N, Meroni G. 2001. Factores que afectan el número de granos por espiga en cebada cervecera. *Actas XXI Reunión Anual de Pesquisa de Cevada. Guarapuava. Brasil.* pp. 173 – 180.
- Viega L, Kemanian A, González S, Meroni G, Olivo N. 2000. Determinación del número de granos por espiga en cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.). En: *Actas XXIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Rio Cuarto, Argentina.* pp.78 -79.
- Waddington SR, Cartwright PM, Wall PC. 1983. A Quantitative Scale Initial and Pistil Development in Barley and Wheat. *Ann. Bot.* 51, 119-130.
- Winter P, Khal G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World journal of Microbiology and Biotechnology.* 11: 438-448.
- Wright D, Hughes LLG. 1987. Relationship between time, temperature, daylength and development in spring barley. *Journal Agricultural Science, Cambridge*, 109, 365-373.
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J. 2004. The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303:1640–1644.
- Yin X, Struik PC, van Eeuwijk FA, Stam P, Tang J. 2005. QTL analysis and QTL-based prediction of flowering phenology in recombinant inbred lines of barley. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 413, pp. 967–976.
- 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.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468

Zeng ZB. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl acad Sci USA* 90: 10972-10976.

Zhu H, Gilchrist L, Hayes P, Kleinhofs A, Kudrna D, Lui Z, Prom L, Steffenson B, Toojinda T, 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.

5. ANEXOS

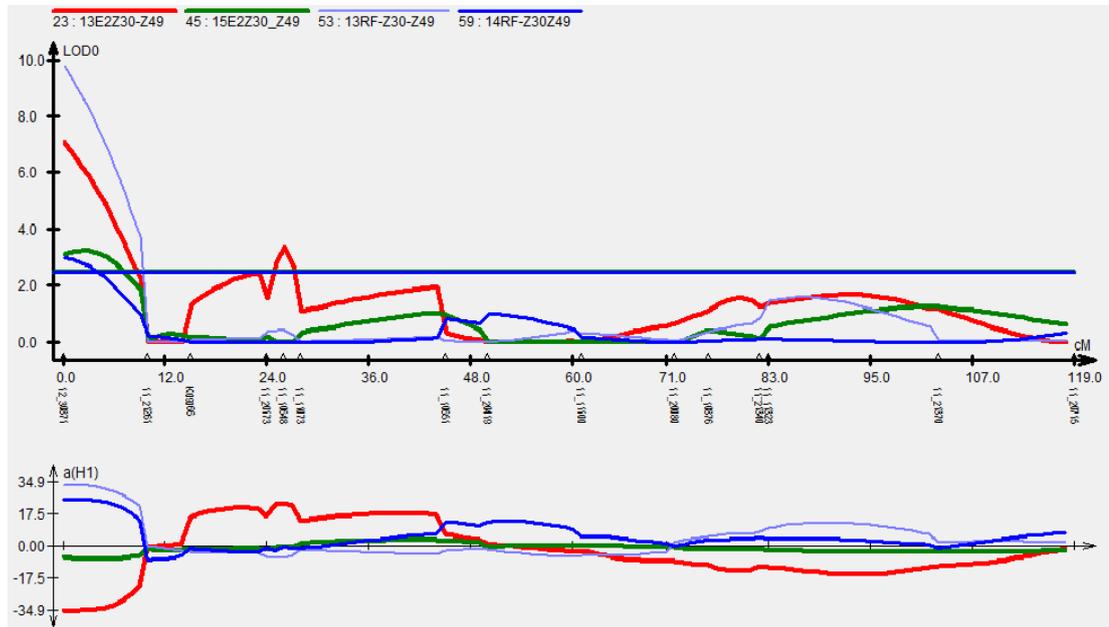


Figura 7: Salida del QTL Cartographer (CIM) para el cromosoma 2H, Figura superior QTL asociado a: la variable 13E2Z30-Z49, 15E2Z30-Z49 en dos experimentos (13E2 y 15E2) y 13RFZ30-Z49 y 14RFZ30-Z49 (en 2013 y 2014) con LOD de 7,09, 3,13, 9,77 y 3,06 respectivamente mediante análisis CIM con los marcadores moleculares flanqueantes. Los LOD mostrados son más altos que los informados en el Cuadro 3 y 4 porque provienen de análisis CIM. Valores positivos indican el efecto del alelo de I. Ceibo mientras que valores negativos indican el efecto del alelo de N. Carumbé (Figura inferior).

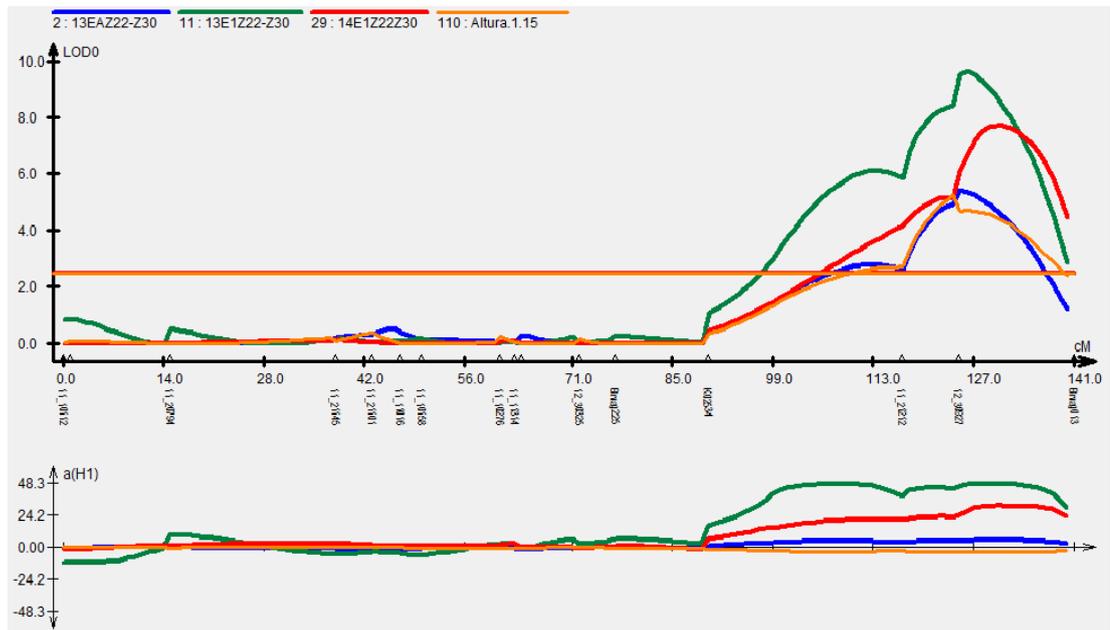


Figura 8: Salida del QTL Cartographer (CIM) para el cromosoma 3H, Figura superior: QTL asociado a la variable Z22-Z30 en tres experimentos (13EA, 13E1 y 14E1) y Altura en E12015 con los marcadores moleculares flanqueantes. Los LOD mostrados son más altos que los informados en el Cuadro 3 y 4 porque provienen de análisis CIM. Valores positivos indican que el alelo I. Ceibo es el responsable del efecto aditivo mientras que valores negativos indican el efecto del alelo de N. Carumbé (Figura inferior).

Cuadro 6: QTL detectados mediante CIM para distintas variables fenológicas en la población I. Ceibo x N. Carumbé mostrando la ubicación genómica, marcador más cercano, tamaño y número de ambientes en los que fueron detectados.

Variable	Crom	MM	cM	ambientes
Z10-Z22	1H	12_30877	17,0	1
	2H	11_10651	45,0	2
	6H	11_20379	87,0	1
Z22-Z30	3H	K02534	90,0	3
Z10-Z30	2H	12_30871	0,0	1
	2H	11_10651	45,0	1
	3H	K02534	90,0	5
	6H	11_10817	20,0	2
Z30-Z49	2H	12_30871	0,0	2
	2H	11_10651	45,0	2
	6H	12_30673	34,0	1
	7H	11_10851	20,0	1
Z10-Z49	2H	12_30871	0,0	2
	2H	11_10651	45,0	4
	3H	11_11016	47,0	1
	6H	11_10817	20,0	1
	7H	11_10851	20,0	1
Z49-Z90	2H	11_10651	45,0	4
	5H	11_21061	12,0	1
	6H	12_31250	52,0	1
	7H	11_20113	66,0	2

Z10-Z90	2H	11_10651	45,0	3
	3H	K02534	90,0	3
	5H	11_21421	1,0	1
	5H	12_30635	57,0	1
	6H	11_10817	20,0	3
Rend	2H	11_10651	45,0	1
	3H	K02534	90,0	1
	5H	12_30635	57,0	1
PMG	2H	12_30871	0,0	1
	2H	11_10651	45,0	3
	5H	12_30635	57,0	1
	6H	12_31250	52,0	2
Espigas/m2	2H	11_10651	45,0	1
	7H	11_20113	66,0	1
Granos/espiga	2H	11_10651	45,0	1
Granos/m2	3H	K02534	90,0	1
	5H	11_21061	12,0	1
	5H	12_30635	57,0	2
P1	2H	12_30871	0,0	1
	2H	11_10651	45,0	2
	3H	11_11016	47,0	1
	3H	K02534	90,0	1
	5H	12_30635	57,0	1
	6H	12_31250	52,0	1