



DETERMINACIÓN DE COMPONENTES GENÉTICOS QUE
AFECTAN LA CALIDAD MALTERA EN GERMOPLASMA ELITE
DE CEBADA (*Hordeum vulgare L.*)

por

Lorena CAMMAROTA RICCO

DICIEMBRE DEL 2021

MONTEVIDEO

URUGUAY

Determinación de componentes genéticos que afectan la calidad maltera en germoplasma elite de cebada (*Hordeum vulgare L.*)

Autora: Lorena Cammarota Ricco

Tutor: Ariel Julio Castro Tabó

Palabras Claves: Cebada, Calidad Maltera, QTL, GWAS

AGRADECIMIENTOS

En primer instancia agradecer a mi tutor, Ariel Castro, por haberme aceptado y guiado en este camino de aprendizaje y de intercambios. Sus aportes fueron enriquecedores y fundamentales en todo momento.

A Gastón Quero por el apoyo continuo y su disponibilidad para enseñar durante todo el proceso de análisis de datos. Sin su apoyo y sus aportes hubiera sido imposible culminar este trabajo.

A Maximiliano Verocai, gran compañero de tesis, siempre abierto a brindar sus conocimientos y experiencia, e inyectar ese aliento positivo en todo momento que fue fundamental para superar las piedras del camino.

A las compañeras del Departamento de Cereales del LATU, Valeria Lanaro y Tania de León, por haberme abierto las puertas del laboratorio y haber dedicado tiempo y energía en la generación de datos fenotípicos de excelente calidad. A Andrés Locatelli y Gustavo Donato por brindar sus conocimientos y ayudar a pulir la discusión de este trabajo

Agradecer a todas las personas de la Estación Experimental 'Dr. Mario A. Cassinoni' (Fagro, UDELAR), La Estanzuela (INIA) y Malteria Oriental S.A. vinculadas de una forma u otra a la realización de los ensayos del año 2015 (siembra, seguimiento y cosecha de los mismos). Sin su trabajo hubiera sido imposible contar con la semilla para la realización de los análisis.

A Blanca Gómez, Valeria Correa y Cecilia Abreu por su invaluable amistad y apoyo incondicional, brindadoras de cariño y motivación continua. A Leticia Gómez, gracias por su compromiso y su enorme apoyo.

Por último, pero claramente lo más importante para poder llevar a cabo este trabajo, el enorme agradecimiento a toda mi familia, y amigos que recargaron las energías y potenciaron las motivaciones día a día. A Marcel y Olivia por su apoyo, su aliento y amor incondicional y entender mis ausencias en los tiempos de dedicación a mi carrera. A mi padre, hermano, cuñada y sobrinas (Giulianna y Antonella) por el apoyo continuo. Y en particular y especialmente a mi madre, Lilián, por su luz y soporte eterno que trasciende estados y tiempo.

RESUMEN

La cebada (*Hordeum vulgare*) es el segundo cultivo de invierno más importante en el Uruguay. La calidad maltera es un determinante crucial del valor del grano usado con fines de producción de malta para la industria cervecera. El conocimiento de las regiones genómicas que controlan los caracteres que determinan la calidad de malta es una contribución relevante para el desarrollo eficiente de nuevos cultivares. La información disponible al respecto en el germoplasma utilizado en nuestra región es limitada. El objetivo de este estudio fue la detección de componentes genéticos que afectan la calidad maltera mediante mapeo asociativo del genoma completo (GWAS) utilizando una población de 145 dobles haploides obtenidos a partir de cuatro cruces realizadas con cinco parentales de cebada elite, muy representativos de las cruces del mejoramiento regional. La semilla obtenida en ensayos en tres localidades fue micromalteada y analizada para medir los parámetros de extracto de malta, nitrógeno soluble, contenido de proteína en grano y contenido de β -glucanos en mosto. La población fue genotipada utilizando la plataforma Illumina iSelect de 50K SNP con un total de 6220 marcadores polimórficos. Por medio del análisis de GWAS, utilizando un modelo de efectos mixtos que incluye la estructura poblacional como efecto aleatorio (eigenstrat) se detectaron 248 asociaciones carácter/marcador que definieron un total de 24 QTLs. Trece de estos QTLs se encontraron en dos zonas hotspot en los cromosomas 2H y 5H. Varios de los QTLs se detectaron en más de un ambiente y afectaron a más de una variable. Los resultados de este trabajo aportan los primeros conocimientos sobre las bases genéticas de los parámetros más relevantes de la calidad maltera en el germoplasma en uso en el mejoramiento local, pudiendo ser aplicados rápidamente por los programas de mejoramiento de la región.

ÍNDICE

1-	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1-CEBADA EN URUGUAY Y EL MUNDO	1
	1.2-CALIDAD DE MALTA	3
	1.3-MEJORAMIENTO DE CEBADA EN EL URUGUAY	7
	1.4-HERRAMIENTAS GENÓMICAS.....	9
	1.4.1- MARCADORES MOLECULARES Y GENOTIPADO	9
	1.4.2- MAPAS DE LIGAMIENTO	11
	1.4.3- MAPA FÍSICO	15
	1.5- DETECCIÓN DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A VARIABLES CUANTITATIVAS (MAPEO DE QTL)	18
	1.5.1- CARACTERES CUANTITATIVOS - QUANTITATIVE TRAIT LOCUS (QTL)	18
	1.5.2- ANALISIS DE QTL EN POBLACIONES BIPARENTALES	19
	1.5.3- GWAS Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	20
	1.6- ANTECEDENTES DE QTL EN CALIDAD DE MALTA.....	22
2-	MATERIALES Y METODOS.....	29
	2.1-MATERIAL GENÉTICO	29
	2.2-FENOTIPADO.....	29
	2.3- ANALISIS FENOTIPICO	30
	2.4- GENOTIPADO Y ESTRUCTURA DE LA POBLACION	31
	2.5- GWAS Y CAÍDA DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	31
3-	RESULTADOS	33
	3.1-ANÁLISIS DESCRIPTIVO PARA VARIABLES FENOTÍPICAS	33
	3.2-ANÁLISIS GENOTÍPICO.....	36
	3.3-ESTRUCTURA POBLACIONAL	37
	3.4-GWAS Y CAÍDA DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	39
	3.5-ASOCIACIONES DETECTADAS (QTLs)	41
	3.6-HAPLOTIPOS CROMOSÓMICOS	43
4-	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	46

5- BIBLIOGRAFÍA.....	59
6- MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	87

1- INTRODUCCIÓN

1.1-CEBADA EN URUGUAY Y EL MUNDO

El género *Hordeum*, junto a *Triticum* (ej. trigo) y *Secale* (ej. centeno), pertenece a la tribu Triticeae, familia Poaceae. Consiste en 33 especies y 45 taxones incluyendo citotipos diploides ($2n=2x=14$), tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$) (Blattner, 2009). La mayoría de las especies pertenecientes del género son perennes y dentro del género las diferentes especies tienen diferentes sistemas reproductivos (Bothmer *et al.*, 2003).

La cebada domesticada (*H. vulgare ssp. vulgare* L.) y su progenitor salvaje (*H. vulgare ssp. spontaneum* C. Koch), pertenecen a una sola especie biológica, que es anual y diploide (Pourkheirandish y Komatsudal, 2007; Bothmer *et al.*, 1995; Linde-Laursen *et al.*, 1997).

La cebada (*H. vulgare*) es la especie económicamente más importante del género, utilizada para alimentación animal y utilizada como cebada malteada para la producción de cerveza o whisky, así como para alimentación humana (Blattner, 2009). Aunque la dieta humana no es un uso primario, la cebada ofrece una gran cantidad de beneficios potenciales para la salud (Baik y Ullrich, 2008) y sigue siendo la principal fuente de calorías en varias partes del mundo (Grando y Macpherson, 2005).

La producción de cebada a nivel mundial en 2020 fue de 157,2 millones de toneladas (<http://e-malt.com/>, mayo 2021), En Uruguay es el segundo cultivo de invierno, alcanzando un área de 185.500 hectáreas en la zafra 2020 (Anuario Estadístico de DIEA 2021). La producción de cebada cervecera correspondiente al mismo año fue de 888.800 toneladas, 47% por encima de las 607.000 toneladas del ciclo previo y 31% por encima del mayor volumen histórico del cultivo en el país, obtenido en la zafra 2016/17.

La producción de cebada se ha destinado fundamentalmente a la producción de malta para exportación con destino a Brasil, Paraguay, República Dominicana, Bolivia y otros. Uruguay es uno de los 10 mayores exportadores de malta a nivel mundial (<http://e-malt.com/>, mayo 2021) llegando en el 2019/20 a un total de 379.949 toneladas de malta (OPYPA 2020).

El volumen cosechado en el 2020 permitió colmar en su totalidad, con materia prima nacional, la capacidad de procesamiento instalada en el país (Firma American Beverage (AMBEV) con dos malterías, Cervecería y Maltería Paysandú (CYMPAY) en Paysandú y Maltería Uruguay S.A. (MUSA) en Colonia; y la Firma Maltería Oriental S.A. (MOSA) en Montevideo). Dicha capacidad se ha incrementado a 384 mil toneladas anuales de malta desde el año 2016, equivalente a unas 560 mil toneladas de cebada cervecera en condiciones de “chacra” (OPYPA 2020).

Además de su importancia económica a nivel nacional y mundial, la cebada se ha considerado tradicionalmente como un modelo para la investigación fitogenética para las Triticeae. Las principales ventajas que hacen a la cebada un modelo para la investigación genética son:

- Su naturaleza diploide y de reproducción autógama.
- Bajo número de cromosomas ($2n=14$).
- Cromosomas relativamente grandes (6-8 μ de longitud) que permiten la detección de varios tipos de aberraciones cromosómicas y numerosos caracteres hereditarios fácilmente clasificables (Nilan, 1974). Se estima que su genoma comprende aproximadamente 5.3×10^9 pb (Bennett y Smith, 1976), con más de un 80% de ADN repetido (Monat *et al.*, 2019).
- Procedimiento sencillo para hibridar (Kleinhofs y Graner, 2001).
- Colecciones de germoplasma que contienen variedades geográficamente diversas, variedades locales y accesiones silvestres que están fácilmente disponibles (Bockelman y Valkoun, 2011). Al acceder a la obtención de mutantes de forma relativamente sencilla, permitió contar con colecciones mutantes bien caracterizadas que incrementaron la variabilidad del germoplasma disponible (Mayer *et al.*, 2012).
- Sistemas de duplicación de haploides eficientes y protocolizados (Dwivedi *et al.*, 2015).

1.2-CALIDAD DE MALTA

El malteo es la germinación limitada de los granos de cebada bajo condiciones controladas. Los cambios son el resultado neto de la degradación de las sustancias de reserva contenidas en el grano de cebada gracias a procesos iniciados por la actividad del embrión. Su objetivo principal es la modificación del grano y la producción de enzimas necesarias para la producción de cerveza. Las etapas en el proceso de malteo de la cebada generalmente se dan como remojo, germinación y secado (Briggs, 1998), aunque hoy en día con las diferentes tecnologías desarrolladas esta separación ya no está tan clara. En el remojo se busca que el grano absorba agua hasta llegar a una humedad de entre 40-44% alternando entre períodos húmedos (período de inmersión en agua) y secos (extracción y cambio de agua). Durante esta fase los principales objetivos son la limpieza y la hidratación del grano, junto con el comienzo de la germinación. En el remojo el grano se hincha y se ablanda, mientras que los tejidos vivos reanudan su metabolismo, que cesó cuando el grano maduró y se secó. Durante la etapa de germinación se continúa con el proceso de germinación controlada del grano a una humedad cercana al 42%. Para ello una capa de grano es extendida sobre una plataforma perforada y ventilada de continuo por aire acondicionado humidificado a una temperatura y humedad tal que permita su respiración (actividad indispensable en esta fase). Para lograr una germinación racional, es necesario regular el contenido de agua, la aireación (suministro de oxígeno y buena extracción de dióxido de carbono), la temperatura y homogeneizar la capa de grano moviendo ininterrumpidamente de forma que las raicillas de los granos no se enreden y apelmacen. Y por último en el secado, la denominada “malta verde”, con una humedad de entre 40-45%, es secada y curada en un flujo forzado de aire caliente deteniendo la germinación y dando un producto quebradizo y 'friable' (en comparación con la cebada, que es dura). Las raicillas también se vuelven quebradizas y pueden ser separadas con facilidad. En crucial en esta etapa preservar la actividad enzimática presente en el grano tanto como lograr en la malta el color, aroma y sabor deseado.

El grano de cebada tiene características particulares que lo hacen especial para la fabricación de cerveza. Durante el proceso de malteo, las enzimas hidrolíticas se sintetizan o activan para descomponer las paredes celulares del endosperma, lo que permite una mayor hidrólisis enzimática de las estructuras complejas del almidón, las proteínas y los lípidos almacenados en las células (Bamforth, 2009). La malta resultante proporciona una fuente de azúcares simples,

aminoácidos, ácidos grasos y enzimas necesarios para la fermentación en los procesos de elaboración posteriores. En general, una buena calidad de malteado requiere una alta conversión de almidón en azúcares fermentables, alto valores de extracto fino, contenido óptimo de proteína y bajo contenido de β -glucanos (compuestos presentes en las paredes celulares del endosperma) (Bamforth, 2009).

La calidad de la malta es el término utilizado para describir un conjunto de características consideradas factores clave para producir malta de alta calidad para la industria cervecera. Contenido de proteínas, actividad enzimática (α -amilasa y poder diastásico), nitrógeno soluble, cantidad de aminoácidos libres, atenuación límite, friabilidad, contenido de β -glucanos y el extracto fino son algunos de los parámetros que influyen en la calidad (Beattie *et al.*, 2010).

Se utilizan 2 conjuntos de métodos de análisis estándar a nivel internacional para referirse a la calidad de malta. Uno de ellos, aplicado en este estudio, es el Analytica- European Brewery Convention (EBC, 1987) y el otro el Método de análisis de la American Society of Brewing Chemists (ASBC, 1992) utilizado principalmente en América del Norte.

Este trabajo se centrará en los siguientes parámetros: proteína en grano (PG), extracto fino (EX), nitrógeno soluble en el mosto (NS) y contenido de β -glucanos (BG). La PG es un parámetro de calidad de los granos sin maltear, mientras que los otros 3 caracteres de calidad solo se pueden medir después de realizado el malteo.

El contenido de PG es un determinante de calidad importante en los cultivos de cereales, y más aún en la cebada dado su utilización en la fabricación de cerveza. Un mayor contenido de proteína es favorable cuando la cebada se usa para alimentación, mientras que se espera un contenido de proteína más bajo o moderado (9 – 12,5%) para la cebada con fines de malteo (Mather *et al.*, 1997). La PG afecta la calidad del malteo de muchas maneras, incluida la nutrición de la levadura, la formación de turbidez en la cerveza y las actividades enzimáticas (See *et al.*, 2002; Clancy *et al.*, 2003).

Las cebadas ricas en proteínas se procesan en forma más dificultosa, siendo muy difícil su modificación y con una mayor merma de malteado. Por tal razón es un parámetro esencial en los contratos de suministro de cebada para las malterías (Kunze, 2014). Cabe destacar, que el término “modificación”, antes mencionado, es utilizado para referirse a los cambios físicos y

químicos que ocurren en los granos durante el malteado, en particular la degradación parcial del endosperma almidonado y los cambios bioquímicos asociados (Briggs, 1998).

Dentro del contenido de proteínas, están incluidas las enzimas que son las encargadas de las modificaciones experimentadas por el grano durante el malteo. La cebada contiene una serie de enzimas en cantidades reducidas. La mayoría se forma durante el proceso de germinación en el malteo. Las enzimas de mayor importancia son las amilasas, encargadas de degradar el almidón (α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa límite), las citolíticas (β -glucanasas, xilanasas) y las proteolíticas (proteinasas y peptidasas) (Cu *et al.*, 2016).

Los parámetros de calidad de malta estiman el comportamiento de la malta en condiciones de producción de cerveza. Para ellos es necesario simular dichas condiciones en el laboratorio. Con este objetivo se elabora un mosto a partir del proceso de maceración de la malta. La maceración comienza con la molienda de la malta y su inmersión en agua siguiendo una rampa de tiempo y temperatura controlada bajo agitación continua. El mosto producido en condiciones estandarizadas, denominado mosto congreso, es el utilizado para estimar los parámetros descriptivos de la malta.

Uno de los parámetros de mayor importancia es el contenido de EX que se determina por densímetro digital y se expresa en porcentaje en base seca (Kunze, 2014). El EX incluye las materias solubles producidas por la malta y la hidrólisis enzimática durante la sacarificación, que refleja el grado de disolución de la malta y la cantidad de formación de enzimas en el proceso de malteo (Fang *et al.*, 2019). Cuanto mejor modificación tenga la malta, mayor será el rendimiento de extracto.

Es un dato de importancia económica para el cervecero, ya que es un indicador de los potenciales hectolitros de cerveza que pueden ser fabricados con una tonelada de malta. El contenido del extracto de la malta se reduce en casi la misma cantidad (0,7 vs 1%) como crece el contenido de proteína en la cebada (Kunze, 2014).

Otro parámetro importante es NS, que refiere al contenido de compuestos nitrogenados que fueron disueltos durante el proceso de maceración. En los métodos EBC y ASBC, los valores de nitrógeno generalmente se multiplican por el factor arbitrario 6.25 para obtener estimaciones de

cantidad de proteína soluble dado que se considera que 16 % del N son proteínas (100:16) (Briggs, 1998).

Los compuestos solubles nitrogenados en el mosto tienen diferentes propósitos. Los polipéptidos poco degradados y de alto peso molecular se precipitan parcialmente en la etapa del hervido, mientras que los de peso molecular medio son los responsables de la estabilidad de la espuma, así como del cuerpo de la cerveza. Una degradación demasiado extrema de los polipéptidos de peso molecular alto y medio en el mosto puede cambiar el producto de modo que la cerveza tenga una baja retención de espuma (estabilidad de la espuma) y favorecer la formación de partículas de turbidez por la unión de proteína- taninos durante el almacenamiento (inestabilidad coloidal). Por otro lado, los compuestos de bajo peso molecular, en particular iones amonio y aminoácidos libres (medidos a través del FAN; Free Amino Nitrogen) sirven como fuente de nitrógeno para el crecimiento de las levaduras en la fermentación (Fang *et al.*, 2019). Se ha detectado un alto coeficiente de correlación positiva entre el contenido de proteína soluble y el valor de FAN (Wang *et al.*, 2015; Cu *et al.*, 2016).

Para lograr una buena modificación, además de la proteólisis antes mencionada, la malta también debe tener una buena disolución citolítica, es decir de las paredes celulares. Aquí juegan un rol especial los carbohidratos denominados BG, sustancias gomosas que, junto con celulosa y proteínas, forman las paredes celulares del endosperma (y en menor medida en la capa de aleurona). Los BG son largas cadenas de glucosa unidas entre sí con enlaces β -1,3 y β -1,4 que representan 75% de la composición de la pared celular del endosperma (Jamar *et al.*, 2011). En el proceso de malteo la degradación incompleta de la pared celular del endosperma provoca niveles altos de BG, afectando la difusión de enzimas (amilasas y proteasas) en el grano germinado y disminuyendo así el valor de EX (Bamforth, 2003; Li *et al.*, 2010; Bamforth, 2017). Altos niveles de BG en la malta conducirá a un aumento en la viscosidad del mosto (VIS), que no favorece su filtración y la de la cerveza, dando como resultado una menor calidad de la cerveza y afectando la eficiencia del proceso cervecero (Bamforth, 2003).

Las enzimas encargadas de la ruptura de los BG son las β -glucanasas (endo- β -1,3; endo- β -1,4; exo- β) y la β -glucano solubilasa. Son producidas al inicio de la germinación, luego de una buena hidratación del endosperma, salvo la exo- β -glucanasa que está preformada en el grano (Kunze, 2014). Es por eso que la citólisis debe ser impulsada correctamente en las malterías

hasta el grado deseado para la fabricación de cerveza, ya que una corrección posterior es muy complicada y costosa para el cervecero.

Para el mejoramiento la obtención de una variedad con calidad maltera superior es un desafío dado que muchos de los parámetros antes mencionados no se miden normalmente hasta el final del ciclo de mejoramiento, cuando se pueden obtener muestras de grano suficientemente grandes y uniformes para realizar los análisis de calidad a escala de micromalteo y malteo (Gutierrez *et al.*, 2011; Beattie *et al.*, 2010).

El fenotipo de la calidad de la malta es costoso y exigente en recursos y tiempo para su medición. A su vez, al existir muchos componentes interrelacionados (y en algún caso contradictorios) que conducen a una malta de alta calidad (Hayes y Jones, 2000) es complejo de incorporar en el proceso de selección. La determinación de los componentes genéticos que lo explican puede colaborar a facilitar el proceso de selección. El examen de un conjunto de líneas de cebada maltera de élite ofrece la oportunidad de identificar loci de calidad de maltera que pueden diferenciar entre líneas de calidad de malta “buena” y “muy buena”.

1.3-MEJORAMIENTO DE CEBADA EN EL URUGUAY

El mejoramiento de cebada comenzó en Uruguay en 1914, a partir de la selección de materiales introducidos y diversos materiales heterogéneos utilizados por productores locales, y se afianzó en 1968 con la realización de los primeros cruzamientos para el cultivo en el Uruguay por parte de Fábrica Nacional de Cerveza (FNC, actualmente MOSA). En la década de los '80 con el comienzo de las actividades de mejoramiento de CYMPAY S.A, Facultad de Agronomía (Fagro) y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), se consolidó el mejoramiento de cebada en el Uruguay (Locatelli, 2011).

Con el propósito de coordinar e intensificar la investigación en la cebada surgió la Mesa Nacional de Entidades de Cebada Cervecera (MNECC) en 1992. Por ese medio se promovió la coordinación e integración de trabajos de INIA y la Fagro junto a la industria. En ese marco CYMPAY S.A., MOSA y MUSA, a través de sus campos experimentales y laboratorios, coordinaron con INIA y Fagro trabajos de investigación en mejoramiento y manejo, y participaron en la definición de prioridades de selección en características productivas y de calidad maltera.

En el marco de esta alianza, Fagro e INIA han desarrollado nuevos cultivares de cebada cervecera y recomendaciones de manejo del cultivo. En 2003 se introdujo al área comercial INIA Ceibo (CLE 202), la primera variedad del programa de mejoramiento de INIA producto de una cruce local (Díaz Lago y Germán, 2005). Le siguió INIA Arrayán (CLE 233) con un mejor tamaño de grano (Díaz Lago *et al.*, 2007). Ambos cultivares considerados con calidad maltera aceptable para las exigencias del momento. Las empresas y, en particular, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) han generado desde la década del 90 información relacionada a la calidad maltera de cultivares y nuevas líneas, que ha sido fundamental para seleccionar líneas con la calidad industrial requerida por los mercados importadores (Castro, 2017).

En los últimos años los programas de mejoramiento genético de cebada, tanto de las empresas malteras (AMBEV- MOSA) como de las instituciones oficiales de investigación (INIA y Fagro) han dedicado sus mayores esfuerzos en liberar cultivares que combinen las mejores características agronómicas (rendimiento, sanidad, adaptabilidad) con la calidad maltera superior requerida por industria. Para cumplir este objetivo AMBEV, INIA, y Fagro tienen como estrategia la generación de cruzamientos propios y el screening de materiales introducidos, mientras que MOSA se concentra en el screening de materiales introducidos en convenios con criaderos externos.

Si bien un porcentaje importante del cultivo ha sido ocupado por cultivares introducidos, en particular cultivares europeos considerados fuentes de calidad, este tipo de material presenta algunas limitaciones en su adaptación a las condiciones ambientales locales, por lo que es relevante el desarrollo de cultivares adaptados que contengan “buena calidad”. En ese marco, el conocimiento de la base genética de las variables claves en términos de calidad maltera en el germoplasma en uso es de gran importancia. La definición de los componentes genéticos que determinan la calidad del malteado habilita al mejorador a conocer la diversidad de su germoplasma, a eliminar materiales en etapas tempranas de su programa, así como apoya en la selección de padres para su plan de cruzamientos. También abre la puerta al uso de estrategias de mejoramiento molecular como ser la selección asistida por marcadores (SAM) y la selección genómica (SG)

1.4-HERRAMIENTAS GENÓMICAS

1.4.1- MARCADORES MOLECULARES Y GENOTIPADO

Los marcadores morfológicos y bioquímicos (básicamente isoenzimas) fueron las primeras herramientas utilizadas para construir mapas de ligamiento de plantas superiores (Sogaar y Wettstein-Knowles, 1987). El número relativamente bajo de dichos marcadores limitó la resolución de dichos mapas. Además, en particular en los marcadores morfológicos, muchas de las variantes alélicas tenían efectos notables en el fenotipo y solo se ubicaban en germoplasma exótico, impidiendo su aplicación en programas de mejoramiento. La disponibilidad de marcadores basados en ADN facilitó la construcción de mapas con una alta densidad de marcadores en casi todas las especies de cultivos (Gupta y Varshney, 2004).

Uno de los primeros tipos de marcadores moleculares basados en ADN fueron los RFLP (Botstein *et al.*, 1980). Se basan en la detección de la variación en la longitud de los fragmentos de restricción detectados por hibridación. Tienen gran consistencia en múltiples poblaciones de mapeo, lo que facilitó la integración de mapas (Collard *et al.*, 2005) pero su uso es un proceso costoso, laborioso y lento.

Gracias a la invención de la tecnología de PCR, los RAPD fueron desarrollados durante las décadas de 1980 y 1990 y son capaces de detectar simultáneamente loci polimórficos en varias regiones de un genoma (Williams *et al.*, 1990). Sin embargo, la dificultad más frecuente con esta técnica es la falta de reproducibilidad y la falta de especificidad de locus, particularmente en especies poliploides como lo es el trigo (Somers, 2004).

Durante la década de 1990, se desarrollaron varios tipos de marcadores considerados de segunda generación basados, al igual que los RAPDs, en la reacción de PCR (Gupta y Varshney, 2002). Entre los más destacados están los SSR, también llamados microsatélites (Litt y Luty, 1989; Salimath *et al.*, 1995) y los AFLP (Vos *et al.*, 1995).

Los AFLP (Becker *et al.*, 1995; Qi y Lindhout, 1997; Waugh *et al.*, 1997) fueron más repetibles que los RAPD y pudieron detectar un mayor número de polimorfismos puntuables por combinación de cebadores (Becker *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 1998). Es por eso que siguen siendo populares en la investigación de genética molecular en cultivos con poca o ninguna secuencia

genómica de referencia disponible (Zhang *et al.*, 2011; De Carvalho *et al.*, 2020; Roncallo *et al.*, 2019).

A partir del desarrollo de los marcadores SSR, fueron considerados como los marcadores de mayor utilidad por la comunidad científica (Powell *et al.*, 1996). Los SSR fueron eficientes para el mapeo genético y los estudios de población debido a su abundancia y alto nivel de polimorfismo (Cregan *et al.*, 1994; Saghai Maroof *et al.*, 1994), el hecho de ser generalmente codominantes, su amplia dispersión en diversos genomas y la alta reproducibilidad entre laboratorio (Liu *et al.*, 1996).

Los marcadores SNP (Lander, 1996) son considerados marcadores de tercera generación. Se definen como una variación en una sola posición en una secuencia de ADN entre individuos dentro de una especie (Molher y Schwarz, 2004). Descubiertos por primera vez en el genoma humano, los SNP demostraron ser universales, así como las formas más abundantes de variación genética entre los individuos de la misma especie (Ghosh *et al.*, 2002). En general, se sabe que los SNP ocurren en frecuencias de uno por cada 100-500 pb en los genomas de las plantas y que varían entre las diferentes especies.

Además, los SNP se distribuyen homogéneamente por todo el genoma, tienen bajas tasas de mutación y muestran una alta heredabilidad, lo que los convierte en marcadores ideales. Dependiendo del tipo de mutación que ocurra, los SNP se pueden clasificar en: (i) transversiones, con cambios en los nucleótidos C/G, A/T, C/A y T/G; (ii) transiciones, apareciendo cambios C/T o G/A; y (iii) indeles, producidos por inserciones o deleciones de un solo nucleótido (Garrido y Cardenas, 2017).

El alto costo de desarrollo inicial, tanto de los SNP como de los SSR, bajó considerablemente con el avance de nuevas técnicas de secuenciación masiva. Los datos de secuencia acumulados proporcionaron información sobre la variación de secuencia entre diferentes accesiones de la misma especie (Wenzl *et al.*, 2004). Las EST (secuencia de ADN de un clon de ADNc que corresponde a un ARNm o una parte del mismo) constituyeron una nueva fuente de marcadores que estaban físicamente asociados con las regiones codificantes del genoma, y esto mejoró el papel de los marcadores genéticos en la evaluación de germoplasma al permitir que se analice la variación en los genes de función transcritos y conocidos (Nicot *et al.*, 2004). Los SSR y los SNP

derivados de EST (EST- SSR y EST- SNP respectivamente) son subproductos gratuitos de las bases de datos EST en continua expansión (Varshney *et al.*, 2006).

La detección de SNP se vio incrementada con las plataformas de secuenciación masiva NGS (Next Generation Sequencing) o de alto rendimiento (High Throughput Sequencing Methods). Debido a esto los SNP se han convertido en marcadores de elección para los cultivos debido a su densidad en el genoma, a su relativa facilidad de descubrimiento en los datos de secuenciación de alto rendimiento (Bundock *et al.*, 2009; Thomson, 2014), la baja tasa de error, los costos por punto de datos (Bayer *et al.*, 2017) y la evaluación inequívoca de la dosis alélica (You *et al.*, 2018).

El genotipado de alto rendimiento en cebada se introdujo por primera vez en 2006 con el desarrollo de dos ensayos de Illumina GoldenGate (Fan *et al.*, 2003) que presentaron 1,572 marcadores SNP cada uno (Close *et al.*, 2009). Basados en el descubrimiento de SNP utilizando NGS se creó la plataforma 9K Illumina Infinium iSelect Custom Genotyping BeadChip (Comadran *et al.*, 2012), la cual adicionó 5.010 marcadores SNP más a los del chip anterior y más recientemente se creó la nueva matriz de genotipado Illumina Infinium iSelect de 50k la que incluye la mayoría de los marcadores de las plataformas de genotipado de cebada anteriores y presenta 42,316 nuevos SNP derivados de datos de captura de exoma (Beier *et al.*, 2017; Mascher *et al.*, 2017; Bayer *et al.*, 2017).

1.4.2- MAPAS DE LIGAMIENTO

Los mapas de ligamiento indican la posición de los diferentes tipos de marcadores a lo largo de los cromosomas y las distancias genéticas relativas medidas en unidades conocidas como centiMorgans (cM). Este valor se basa en la frecuencia de recombinación entre marcadores genéticos (Paterson, 1996). Cuando las distancias son pequeñas (<10 cM), la distancia del mapa es igual a la frecuencia de recombinación (1cM =1% recombinación), mientras que a distancias mayores aumenta la frecuencia de dobles o triples crossing-overs. A los efectos de mantener la aditividad de las distancias de ligamiento se emplean funciones de mapeo para hacer la conversión. Las dos más utilizadas son la función de mapeo Kosambi, que asume que los eventos de recombinación influyen en la ocurrencia de eventos de recombinación adyacentes, y la función de mapeo de Haldane, que asume que no hay interferencia entre eventos de

entrecruzamiento (Hartl y Jones, 2001; Kearsley y Pooni, 1996). Para poder generar un mapa de ligamiento es necesario contar con el análisis de segregación de un determinado grupo de marcadores. Los tres pasos para la construcción de un mapa son: (1) producción de una población de mapeo; (2) identificación de polimorfismos de los marcadores seleccionados y (3) análisis de ligamiento entre los marcadores (Collard *et al.*, 2005).

Un uso importante de los mapas de ligamiento es identificar la ubicación genómica de genes y “Quantitative Trait Locus” (QTL) asociados con caracteres de interés. Los mapas de ligamiento densos en marcadores contribuyeron a la clonación posicional de genes importantes y proporcionan una herramienta para estudios evolutivos. También demostraron ser muy útiles para la caracterización de colecciones de germoplasma (Jain y Ahluwalia, 2002). Son utilizados ampliamente para estudios genómicos comparativo y aportan sobre la organización del genoma de los cultivos (Mayer *et al.*, 2012). Además, los mapas de ligamiento de alta densidad ayudan en la construcción de mapas físicos, en el ensamblaje de contigs (orden contiguo, sin espacios, de clones superpuestos que reflejan la secuencia de nucleótidos en un cromosoma) de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) y contigs de secuencia de escopeta en el estudio de genomas completos (Zhou *et al.*, 2015). Los mapas de ligamiento han demostrado ser útiles para descubrir, diseccionar y manipular los genes que determinan caracteres simples y complejos en plantas de cultivo (Yao *et al.*, 2018). Es de destacar que la correlación de los mapas de ligamiento y físicos proporciona información sobre la organización del genoma de la cebada en términos de frecuencia de recombinación y distribución de genes a lo largo de los cromosomas individuales.

En el caso de la cebada, en 1987 se construye un primer mapa genómico utilizando sólo isoenzimas y marcadores morfológicos (Sogaar y Wettstein-Knowles, 1987). El primer mapa incompleto de RFLP para el cromosoma 6 en cebada se publicó en 1988 (Kleinhofs *et al.*, 1988). Más tarde, surgió el primer mapa de ligamiento usando 17 marcadores RFLP en cebada (Shin *et al.*, 1990). Al año siguiente surgieron cinco mapas moleculares en base en RFLP más extensos que cubren todo el genoma mediante el uso de cinco poblaciones haploides dobles independientes (Qi *et al.*, 1996) 'Proctor' * 'Nudinka' (Heun *et al.*, 1991), 'Igrí' * 'Franka' y 'Vada' * *Hordeum spontaneum* C. Koch (Graner *et al.*, 1991), 'Steptoe' * 'Morex' (Kleinhofs *et al.*, 1993) y 'Harrington' * TR306 (Kasha y Kleinhofs., 1994). Muchas otras poblaciones

segregantes también se utilizaron para construir mapas parciales y para el mapeo de caracteres agronómicos cualitativos y cuantitativos importantes (Hinze *et al.*, 1991; Leitch y Heslop-Harrison, 1993; Laurie *et al.*, 1993 Laurie *et al.*, 1994) y los loci cuantitativos para rendimiento, calidad de malteado y resistencia a enfermedades (Hayes *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1995; Kjær *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996). Paralelamente se trabajó en construir mapas consenso de cebada que incorporaran marcadores de mapas publicados previamente para permitir la alineación de los mismos (Langridge *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 1996; Sherman *et al.*, 1995).

Un paso posterior fue la incorporación de los marcadores AFLP a mapas ya existentes (Becker *et al.*, 1995; Waugh *et al.*, 1997) y de los SSR para estudios genéticos y como una herramienta para el mejoramiento de cebada (Saghai Maroof *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Becker, 1995). En 2000 se publica un mapa de ligamiento de cebada de segunda generación que usaba solo marcadores microsatélites basados en PCR (Ramsay *et al.*, 2000). Además de los microsatélites derivados de clones genómicos, también se crearon mapas con los EST –SSR (Li *et al.*, 2003). Costa *et al.* (2001) construyeron un mapa de ligamiento utilizando diferentes tipos de marcadores (morfológicos, RFLP, RAPD, SSR y AFLP entre otros) que abarcó 1,387 cM con una densidad promedio de un marcador cada 1.9 cM.

Gracias al desarrollo de los marcadores SNP, en particular los SNP derivados de EST y de los amplicones de PCR secuenciados, hubo un aumento en la densidad de marcadores y la convergencia hacia mapas de consenso para la cebada donde se utilizaba la combinación de los diferentes tipos de marcadores antes mencionados (Francia *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2007; Hearnden *et al.*, 2007; Varshney *et al.*, 2007; Potokina *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2009).

Rostoks *et al.* (2005) desarrollaron un mapa de consenso con 1230 marcadores (RFLP, AFLP, SSR, SNP), Wenzl *et al.* (2006) combinaron DArT con RFLP, SSR y STS utilizando 9 poblaciones de mapeo de DH, creando un mapa de consenso conteniendo 2935 marcadores. Marcel *et al.* (2007) compilaron información de RFLP, AFLP y SSR a partir de 6 poblaciones de mapeo de DH para producir un mapa de consenso determinado por 3458 marcadores. Sato *et al.* (2009) publicaron un mapa con 2890 SNP y STS de la población Haruno Nijo × OUH602. Se desarrolló un mapa de enlace de 2383 marcadores (SNP, DArT, SSR, RFLP y STS) utilizando la población de mapeo Oregon Wolfe Barley (OWB; Szucs *et al.*, 2009). Gracias al desarrollo de la

plataforma de SNP Golden Gate de Illumina se construyó un mapa de consenso de alta densidad definido por 2943 loci SNP (Close *et al.*, 2009). Islamovic *et al.* (2013) presentó un mapa con marcadores SNP, DArt y SSR de enlace molecular que abarca 832,1 cM (conteniendo 297 marcadores), mientras que el mapa de consenso derivado por Close *et al.* (2009) tiene 1099 cM de longitud total. Wang *et al.* (2014) generó un mapa de ligamiento de alta densidad a partir de 75 marcadores SSR y 551 marcadores DArT que cubren una distancia total del mapa de 1081,2 cM en siete grupos de ligamiento, con una distancia media entre marcadores de 1,7 cM.

Ha sido una práctica común y necesaria asociar marcadores genéticos mapeados con recursos de secuencia basados en la similitud de secuencia para vincular mapas de ligamiento y físicos (Chen *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2012). Tanto los EST- SSR como los EST- SNP proporcionaron una forma directa de asignar sistemáticamente genes a mapas de ligamiento, ya que los loci mapeados se basaron en SSR y SNP identificados en EST. Con el avance de la tecnología de las NGS fue posible tanto la identificación de numerosos marcadores moleculares (GrainGenes; <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Barley/>) así como la secuenciación de contigs, contigs de BACs y genomas completos. Esto hizo posible que la vinculación entre los mapas creciera exponencialmente ayudando a crear un ensamblaje de secuencia física, genética y funcional del genoma de la cebada.

Haciendo uso de la metodología de “Genotyping by Sequencing” (GBS), Poland *et al.* (2012) utilizó dos enzimas para reducir la complejidad del genotipo de la población DH biparental y ancló más de 34.000 SNP en un mapa de ligamiento de referencia de la población de mapeo OWB (Poland *et al.*, 2012). Este trabajo de representación reducida fue fundamental para anclar el mapa físico de la cebada a un mapa de ligamiento (Mayer *et al.*, 2012). Por otro lado, utilizando el poder de la segregación genética (método POPSEQ) y a partir de la secuenciación de una población segregante se logró ensamblar la producción *de novo* de contigs de secuenciación de escopeta y anclarlos genéticamente. Los resultados obtenidos fueron congruentes con el ensamblaje de secuencias realizado por el “International Barley Sequencing Consortium” (IBSC; Mayer *et al.*, 2012) y se logró desarrollar un mapa de ligamiento que triplicó la cantidad de secuencias de contigs ancladas genéticamente (Mascher *et al.*, 2013). Con el objetivo de mapear el color púrpura de la cubierta de la semilla en la cebada sin cáscara se construyó un mapa con 3662 marcadores SNP con un largo de 645.56 cM (Yao *et al.*, 2018).

Otra tecnología desarrollada para construir mapas de ligamiento de alta densidad, dirigida a producir datos de polimorfismo, es la tecnología de secuenciación “Restriction site associated DNA” (RAD, ADN asociado al sitio de restricción) basada en NGS para permitir el genotipado de muestras basado en secuencias individuales (Baird et al., 2008). De esta forma se logró detectar la variación genética adyacente a los sitios de escisión de las enzimas de restricción en un genoma (Miller *et al.*, 2007). Con ese enfoque Chutimanitsakun *et al.* (2011) construyeron un mapa de marcadores RAD utilizando la población OWB como un recurso de mapeo. Para comparar y evaluar la calidad mapa de ligamiento entre SNP basados en RAD y EST se utilizó el mapa creado por Szücs *et al.* (2009), confirmándose la alta calidad de los RAD tanto en el orden de los marcadores, como en la longitud de los mapas de los datos obtenidos. Además, los contigs de BACs de cebada (cv. Morex) se anclaron al mapa de ligamiento de alta resolución basándose en su homología de secuencia, contribuyendo así a la construcción del mapa físico de la cebada (Zhou *et al.*, 2015). Ren *et al.* (2016) utilizando 1894 marcadores SNP de alta calidad y 68 marcadores SSR desarrollaron un mapa con una longitud genética total de 1375,8 cM y un promedio de 0,7 cM entre loci adyacentes.

Utilizando la secuenciación del genoma de fragmentos de ADN digerido previamente por enzimas de restricción se desarrolló una nueva técnica denominada secuenciación de fragmentos amplificados de locus específico (Specific locus amplified fragment sequencing; SLAF-seq). Esta se aplica principalmente en la construcción de mapas genéticos de alta densidad y el mapeo de genes en muchas especies (Zhang et al., 2013; Yu et al., 2019; Zhao et al., 2019). Se construyó un mapa de ligamiento utilizando una población RIL con un total de 12,635 marcadores SLAF con 26,693 SNPs. La distancia genética total del mapa de ligamiento fue de 896,74 cM con una distancia media de 0,07 cM entre marcadores adyacentes (Fang *et al.*, 2020).

1.4.3- MAPA FÍSICO

A diferencia de los mapas de ligamiento, que se basan en frecuencias de recombinación, los mapas físicos se basan en estimaciones de ubicación en la secuencia, determinados mediante análisis microscópico o secuenciación de ADN. Mediante la hibridación *in situ* se logró la localización de genes específicos (Lehfer *et al.*, 1993; Leitch y Heslop-Harrison, 1993; Fukui *et al.*, 1994) y se investigó la relación entre las distancias físicas y genéticas en loci de interés (Pedersen y Linde-Laursen, 1995).

En lo que concierne a cebada, Künzel *et al.* (2000) publicaron un mapa físico de los 7 cromosomas de la cebada que permitió relacionar las distancias genéticas y físicas haciendo uso de los mapas genéticos existentes hasta ese momento (Sorokin *et al.*, 1994; Künzel *et al.*, 1995; Künzel *et al.*, 1996). Este artículo brindó información sobre la diferencia en la tasa de recombinación a lo largo de los cromosomas del cultivo. Las regiones de recombinación alta o media se limitan principalmente a unas pocas áreas relativamente pequeñas ubicadas en las partes teloméricas de los cromosomas, mientras que en las regiones proximales la recombinación se suprime notoriamente. Esto apoyó la hipótesis de que hay un "espacio genético", que se caracteriza por altas frecuencias de recombinación, mientras que las regiones pobres en genes se caracterizan por bajas frecuencias de recombinación (Künzel *et al.*, 2000; Künzel y Waugh, 2002; Li *et al.*, 2003).

Con el propósito de crear un mapa físico del genoma completo como plataforma para la secuenciación del genoma, se formó el IBSC (<http://barleygenome.org>; Schulte *et al.*, 2009). Las tecnologías de NGS proporcionaron opciones útiles para la obtención de secuencias del genoma de la cebada (Shendure y Ji, 2008). Mientras que el número de contigs de BAC en un mapa físico es del orden de miles, la tecnología de NGS produce cientos de miles de contigs de secuencia.

La estructura altamente repetitiva de la cebada ha sido un desafío importante en la secuenciación de la especie. Tramos de secuencia genómica de hasta varios cientos de kilobases pueden estar completamente compuestos de elementos transponibles anidados (Wicker *et al.*, 2005), resultando en más de un 80% de ADN repetido (Ariyadasa *et al.*, 2014).

En 2012, utilizando las 6 bibliotecas BAC de Morex existentes junto con los datos de secuenciación disponible (Lonardi *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2011) se publicó un mapa físico de todo el genoma del cultivar Morex (Mayer *et al.*, 2012). En un tamaño del genoma de 5.1 Gb, más del 95% del genoma de la cebada está representado en el mapa físico (4.98Gb). La mitad de los contigs físicos se posicionaron genéticamente (Mayer *et al.*, 2012).

Posteriormente esta información fue ampliada y mejorada gracias a la aplicación del método POPSEQ (Mascher *et al.*, 2013) y a las huellas dactilares de alto contenido de información de casi 600.000 clones de BACs procedentes de las bibliotecas de Morex. El mapa físico resultante con un tamaño acumulativo de 4,9 Gb representa el 96% de la longitud física del genoma de la

cebada. La alta densidad de marcadores proporcionada por la permitió el anclaje genético a una escala clon por clon mucho mayor que la estrategia de jerarquías del 2012 (Ariyadasa *et al.*, 2014).

Apuntando a las porciones del genoma rica en genes, se desarrolló una ruta mínima de mosaico (MTP) de BAC “portadores de genes” de la biblioteca (Yu *et al.*, 2000) donde se secuenciaron y anclaron la mayoría de los clones. Esto generó aproximadamente 1,7 Gb de secuencia genómica que contiene aproximadamente 2/3 de todos los genes de cebada Morex. La exploración de estos BAC secuenciados reveló que, aunque los extremos distales de los cromosomas contienen la mayoría de los BAC enriquecidos en genes y se caracterizan por altas tasas de recombinación, también hay regiones densas en genes con recombinación suprimida (Muñoz *et al.*, 2015). Por otro lado, y con el fin de conocer las zonas con muy reducida frecuencia de recombinación meiótica se presentó una secuencia de referencia basada en un mapa del genoma de la cebada que incluyó el primer ensamblaje ordenado de las regiones pericentroméricas. El ensamblaje final representó 4,79 Gb (~ 95%) del contenido de la secuencia genómica, de los cuales 4,54 Gb se asignaron a la ubicación cromosómica precisa (Mascher *et al.*, 2017).

En 2019 se completó una segunda versión de referencia del genoma completo del cultivar de cebada Morex (Morex v2). Recientemente fue realizado el primer ensamblaje de secuenciación de longitud completa en un cultivar europeo de 2 hileras (Golden Promise). La comparación general con Morex v2 (Monat *et al.*, 2019) muestra resultados muy similares que enfatizan la alta calidad de ambos genomas de cebada (Schreiber *et al.*, 2020).

El crecimiento de la información disponible ha transformado al uso eficiente de la enorme cantidad de datos generados en el principal desafío para los usuarios de información genómica para fines aplicados. Para ayudar en ese aspecto se han desarrollado varias herramientas y bases de datos (ver revisión en Sreenivasulu *et al.*, 2008; Schulte *et al.*, 2009 y Cantalapiedra *et al.*, 2015), incluido HarvEST (Close *et al.*, 2007), la caja de herramientas T3 (<http://triticeaetoolbox.org>), Genome Zippers (Mayer *et al.*, 2011), Barleymap (Cantalapiedra *et al.*, 2015) y BARLEX (Beier *et al.*, 2017).

1.5- DETECCIÓN DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A VARIABLES CUANTITATIVAS (MAPEO DE QTL)

1.5.1- CARACTERES CUANTITATIVOS - QUANTITATIVE TRAIT LOCUS (QTL)

Para los caracteres afectados por genes mayores, los procedimientos de mejoramiento convencionales basados en la selección fenotípica han sido efectivos debido a que los genotipos deseables pueden identificarse mediante evaluación fenotípica (Xu, 1997). Sin embargo, la mayoría de las variables de mayor importancia agrícola, como el rendimiento, algunas formas de resistencia a enfermedades y la calidad, están influenciadas por muchos genes (poligénicos). De ese modo, los caracteres de una población no caen en clases discretas, sino que muestran un rango continuo de fenotipos. La variación cuantitativa en el fenotipo según la teoría clásica puede explicarse por la acción combinada de muchos factores genéticos discretos, cada uno de los cuales tiene un efecto bastante pequeño sobre el fenotipo general y muestra la influencia de los ambientes (Falconer, 1981; Mather y Jinks, 1971).

Las regiones dentro de los genomas que contienen genes asociados con un carácter cuantitativo particular se conocen como loci de caracteres cuantitativos (“multifactoriales” o “caracteres complejos”) o QTL (Quantitative trait locus; Collard *et al.*, 2005). Dicho término y su abreviatura apareció por primera vez en la literatura en 1975 por Geldermann, aunque otros científicos ya habían manejado el concepto tiempo antes (Castle, 1903; East, 1916; Sax, 1923 entre otros). Utilizando marcadores y técnicas más avanzadas Paterson *et al.* (1988) reportan el primer mapa de ligamiento completo construido con RFLP para resolver caracteres cuantitativos.

El propósito del mapeo de QTLs es determinar la base genética de la variación fenotípica cuantitativa. Por lo tanto, cualquier análisis de QTLs supone que el fenotipo a evaluar es variable dentro de la población en estudio. Los análisis basados en el ligamiento, que se centran en individuos para los que se conocen los estados alélicos, buscan identificar marcadores genéticos segregantes que predicen el fenotipo de la población. Los marcadores predictivos están cerca (ligados a) loci de interés, por lo que los marcadores predictivos y los loci tienden a segregar juntos. Esta situación es interrumpida por la recombinación, y la probabilidad de recombinación aumenta con la distancia física. Por lo tanto, los marcadores más predictivos se ubican cerca del locus causal (Mackay *et al.*, 2009).

Los marcadores pueden utilizarse para dividir la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos en función de la presencia o ausencia de un locus marcador particular y para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos con respecto al carácter que se está midiendo (Tanksley, 1993; Young, 1996). El análisis para la detección de un QTL se basa en el principio de detectar una asociación entre el fenotipo y el genotipo de los marcadores. Una diferencia significativa entre las medias fenotípicas de los grupos en que se dividió la población sugiere que el marcador que se utiliza para dividir la población de mapeo está vinculado a un QTL que controla el carácter (Collard *et al.*, 2005).

Es crucial la elección del proceso a aplicar para la identificación de las asociaciones de marcador-carácter, en particular la definición del objetivo, la elección de la población de mapeo, la construcción de un mapa de ligamiento, genotipado y evaluaciones fenotípicas (Kumar *et al.*, 2017). Durante los últimos años, se han utilizado diferentes enfoques para mapear QTLs para caracteres complejos. Estos enfoques de mapeo de QTLs involucran poblaciones de mapeo basadas en familias, tales como poblaciones biparentales y multiparentales o mapeo basado en poblaciones naturales de individuos no relacionados (Xu *et al.*, 2016).

1.5.2- ANALISIS DE QTL EN POBLACIONES BIPARENTALES

El objetivo de identificar todas las regiones que están asociadas con un fenotipo complejo específico es difícil de cumplir debido a la gran cantidad de QTLs que pueden afectar el carácter, los posibles efectos de epistasis o interacciones entre QTLs, y a las fuentes adicionales de variación que afectan al carácter (Doerge, 2002).

Para llevar a cabo el análisis de QTL es necesario comenzar a partir del análisis de segregación de muchos marcadores dentro de una población específica. Los cuatro pasos principales de la construcción de esta clase de estudios son: (1) producción de una población de mapeo; (2) identificación de marcadores polimórficos entre los individuos; (3) construcción de un mapa de ligamiento de dicha población y (4) análisis estadístico para la detección de QTL (Mackay *et al.*, 2009).

Los QTL para las variables de interés se mapean en una población desarrollada por cruzamiento entre padres que presentan polimorfismo en la dicha variable (Kumar *et al.*, 2017). Generalmente en especies autofecundas como la cebada, las poblaciones de mapeo se originan de padres que

son altamente homocigotos. Una vez que se recopilan los datos del genotipado de cada individuo, se establecen asociaciones estadísticas entre los marcadores y la variable cuantitativa a través de enfoques estadísticos que van desde técnicas simples, como el análisis de varianza (ANOVA), hasta modelos que incluyen múltiples marcadores e interacciones, para la localización de posibles QTLs (Doerge, 2002).

A medida que disminuye el tamaño del intervalo en el que deseamos localizar el QTL, aumenta el número de individuos necesarios para detectar al menos un recombinante en la región de interés por lo que algunos análisis de QTL realizados pueden tener poca precisión debido al pequeño tamaño de la población de mapeo (Dekkers, 2002; Yu y Buckler, 2006; Castro *et al.*, 2012).

1.5.3- GWAS Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Las limitaciones de muchos estudios de QTL basados en el Análisis de QTL ayudaron al surgimiento de otra técnica para mapear loci de caracteres complejos denominada estudio de asociación del genoma completo (GWAS; genome-wide association study). Esta técnica en lugar de utilizar los eventos de recombinación ocurridos en la población de mapeo, aprovecha eventos que crearon una asociación en el pasado relativamente lejano, ya que utiliza colecciones de genotipos para capturar eventos meióticos históricos (Risch y Merikangas, 1996). Suponiendo que han transcurrido muchas generaciones, y por lo tanto meiosis, la recombinación habrá eliminado la asociación entre un QTL y cualquier marcador que no esté estrechamente relacionado con él. El mapeo asociativo, por lo tanto, permitiría potencialmente un mapeo mucho más fino que el análisis basado en poblaciones biparentales, que utilizan solo la recombinación que ocurre desde el establecimiento de la población de mapeo (Jannink y Walsh, 2002). Las poblaciones para realizar este tipo de estudios pueden estar compuestas por líneas de uso comercial, líneas elite desarrolladas en programas de mejoramiento, individuos de múltiples poblaciones biparentales y / o poblaciones desarrolladas por cruzamiento de múltiples padres (Gupta *et al.*, 2014).

La genética del desequilibrio de ligamiento (DL) se ha estudiado en poblaciones de humanos, donde tuvo sus inicios en 1947 (Fisher, 1947), siendo una valiosa herramienta para identificar loci que contribuyen a los caracteres cuantitativos (Alqudah *et al.*, 2020). Esto se debe a que

GWAS facilita el aporte de marcadores a los programas de mejoramiento y proporciona información valiosa que puede incluir una variación genética amplia y representativa de los programas de mejoramiento en los análisis, abarcando un mayor número de alelos. Dado que el estudio se realiza sobre un gran conjunto de meiosis históricas también se puede obtener una mayor resolución de mapeo (Ranna y Slatkin, 2000).

Dado que D' o r^2 son mediciones por pares entre sitios polimórficos, es difícil obtener una estadística resumida de DL en una región (Gupta *et al.*, 2005). Los enfoques comunes para resumir la distribución de DL en la región genómica en estudio son resumir las medidas de DL por pares de marcadores en forma de matriz y graficar r^2 o D' contra la distancia entre sitios (física o genética). Las matrices de desequilibrio son efectivas para visualizar la disposición lineal de DL entre sitios polimórficos a lo largo de un cromosoma, así como el gráfico de caída de DL sirve al investigador para concluir el valor de r^2 elegido que determina el valor DL para detectar asociaciones con caracteres complejos (Zhu *et al.*, 2008). Al estimar la tasa de caída de DL con distancia física o genética obtenida a partir de información recopilada de una pequeña colección de loci muestreados, se puede extrapolar a todo el genoma investigado (Stich y Melching, 2010). El conocimiento de la caída del DL puede usarse para determinar la densidad de marcadores requerida para escanear regiones del genoma, así como la resolución máxima que se puede lograr para las asociaciones de marcador-fenotipo en la población bajo estudio.

La restricción más importante para el uso del GWAS para especies cultivadas es la subestructura y mezcla de la población no identificada debido a factores como la adaptación, la domesticación (Thornsberry *et al.*, 2001; Wright y Gaut, 2005) entre otros. Una población se describe como estructurada, cuando las frecuencias de una variable varían según las subpoblaciones que la forman, lo que aumenta la probabilidad de muestrear un carácter de una subpoblación en relación con el muestreo de otra (Price *et al.*, 2006). La estructura de la población crea desequilibrios de ligamiento entre loci no ligados.

En los conjuntos de germoplasma de fitomejoramiento, podemos esperar la presencia tanto de estructura de la población como de relación familiar (Yu y Buckler, 2006), lo que influirá significativamente en los resultados de un estudio de asociación y causará asociaciones espurias marcador/carácter. Varios métodos estadísticos se han propuesto para tener en cuenta estos falsos positivos generados por la estructura de la población y la relación familiar. Los primeros análisis

de GWAS realizados en plantas recomendaron corregir las asociaciones espurias causadas por la estructura de la población utilizando inferencia de estructura basada en modelos como los obtenidos con el software STRUCTURE (matriz de probabilidades Q; Pritchard *et al.*, 2000). Parisseaux y Bernardo (2004) integraron la matriz de relacionamiento como efectos aleatorios en un modelo mixto. Yu *et al.* (2006) propusieron el uso de un enfoque de modelos mixtos unificados para corregir las asociaciones espurias causadas no solo por la estructura de la población sino también por el relacionamiento entre los individuos (y alelos idénticos por descendencia) utilizando el modelo mixto, incluyendo la matriz de parentesco (K). Propusieron el uso del modelo de asociación estructurada denominado comúnmente modelo Q+K que explicaría los efectos fijos de la estructura de la población (Q) y los efectos aleatorios de la relación de parentesco (K). El uso de la matriz de efectos fijos Q en este modelo fue cuestionado por Price *et al.* (2006), quienes propusieron el uso de la matriz de efectos fijos del análisis de componentes principales (P) para tener en cuenta la estructura de la población en lugar de la matriz Q (Gutierrez *et al.*, 2011). Otros modelos le sucedieron en el correr de los años, combinando matrices y adaptando conceptos de los ya existentes, sólo se mencionan estos cuatro dado que no es el foco del presente trabajo.

En el caso particular del GWAS aplicado al cultivo de cebada y basados en la base de datos Web of Science™, se puede constatar que desde 1991 se enumeran alrededor de 1300 estudios de QTL que utilizan poblaciones parentales en comparación con solo 90 publicaciones de GWAS en cebada (Alqudah *et al.*, 2020). EL GWAS se ha aplicado a una amplia gama de caracteres en el mejoramiento de la cebada y más específicamente en caracteres agronómicos, morfológicos y resistencia a enfermedades (Cockram *et al.*, 2008; Cuesta-Marcos *et al.*, 2010; Von Zitzewitz *et al.*, 2011; Stracke *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2010; Massman *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Kraakman *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2015). Sin embargo, son pocos los estudios de MA centrados en el mapeo de características complejas como el rendimiento y la calidad maltera (Comadran *et al.*, 2008; Kraakman *et al.*, 2004; Locatelli *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2012).

1.6- ANTECEDENTES DE QTL EN CALIDAD DE MALTA

Como se mencionó anteriormente los caracteres de calidad de malta son complejos, dependen de una variedad de procesos fisiológicos que ocurren durante el desarrollo del cultivo, llenado de

grano, maduración y durante el proceso de malteo. Existen complejas relaciones inhibitorias entre los diferentes parámetros que dificultan la localización y clonación de los genes relacionados con la calidad de la malta (Fang *et al.*, 2019). Un ejemplo es el contenido de PG que se correlaciona negativamente con el EX y se correlaciona positivamente con el poder diastásico (Eagles *et al.*, 1995; Mather *et al.*, 1997). Además, las influencias ambientales pueden tener efectos significativos sobre los parámetros clave de calidad de malta (Eagles *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Kangor *et al.*, 2017), por lo que es importante incorporar el factor ambiental en el análisis (Looseley *et al.*, 2020).

Gracias a las metodologías de detección de QTLs antes mencionadas y a la disponibilidad de la secuencia del genoma de la cebada, muchos QTLs que regulan los caracteres calidad de malta se han localizado con mayor resolución utilizando varios marcadores genéticos, y se han clonado algunos genes esenciales. Al momento se han reportado más de 260 genes / QTLs de calidad de malta (Wei *et al.*, 2009; Cu *et al.*, 2016; Looseley *et al.*, 2020), pero solo un pequeño número de genes / QTLs se han aplicado con éxito en el mejoramiento molecular (Han *et al.*, 1997; Igartua *et al.*, 2000; Thomas, 2003; Rae *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018). Los QTLs que explican una menor variación fenotípica se ven fácilmente afectados por factores ambientales, que pueden ser un inconveniente para la selección en los programas de mejoramiento.

La mayoría de los estudios genéticos y la detección de QTLs en calidad de malta se han basado en cruces entre dos progenitores diversos (Szűcs *et al.*, 2009), como las variedades de 2 hileras * 6 hileras (Harrington * Morex) o una variedad forrajera * una variedad maltera (Chebec * Harrington, Galleon * Haruna Nijo) (Barr *et al.*, 2003; Karakousis *et al.*, 2003; Márquez-Cedillo *et al.*, 2000). Los resultados de estos estudios han sido difíciles de aplicar directamente al desarrollo de cultivares por varias razones. La variabilidad genética presente en la población segregante está limitada a la diferencia que posean los padres elegidos para originar dicha población. Las poblaciones de mapeo utilizadas no reflejaron el germoplasma presente en los programas de mejoramiento y los alelos favorables en la calidad de malta pueden estar ya fijados en el germoplasma avanzando (Castro *et al.*, 2012). Más recientemente también se han mapeado QTLs en cruces de variedades malteras elite de 2 hileras (Navigator * Admiral) obteniéndose resultados sobre los QTLs mapeados con mayor potencial de aplicación (Cu *et al.*, 2016). Con respecto al uso de GWAS para la detección de QTLs en calidad maltera, si bien fueron pocos al

comienzo (Laidó *et al.*, 2009; Beattie *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2012) han ido aumentando (Matthies *et al.*, 2014; Mohammadi *et al.*, 2015; Looseley *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018; Looseley *et al.*, 2020) aunque siguen teniendo la limitante del costo del fenotipado.

En cada trabajo publicado de mapeo de QTLs son muchas las asociaciones marcador/ carácter que se detectan, pero no siempre son reproducibles en otros estudios. También hay situaciones donde los QTLs reportados explican una baja proporción de la variabilidad fenotípica. Por esa razón se mencionarán los QTLs reportados de mayor trascendencia para los parámetros en estudio.

El EX es un carácter cuantitativo controlado por múltiples genes, los cuales varían entre las diferentes variedades. Se han identificado y localizado una serie de QTLs en los cromosomas 1H, 2H, 4H, 5H y 7H relacionados con este parámetro. Estudios con diferentes poblaciones coincidieron en la detección de un QTL en 1H. Laidó *et al.* (2009) en una población de DH provenientes de la cruce de una cebada de primavera y una invernal (Nure * Tremois) detectó un QTL Qme1.1 ubicado a los 60.3 cM del 1H que explicó el 21% de la variabilidad fenotípica. Panozzo *et al.* (2007) utilizando una población de DH obtenidas de la cruce de dos variedades de buena calidad maltera (Arapiles * Franklin) detectó el marcador *Bmag0345*, ubicado cerca del centrómero del cromosoma 1H, con alta asociación a EX. Matthies *et al.* (2014) también verifica un QTL mayor para EX analizando 174 cultivares europeos por GWAS cerca de Qme1.1. En una población de DH a partir de la cruce entre una variedad maltera japonesa y una variedad forrajera china Wang *et al.* (2015) identificaron el QTL denominado QMe.NaTx-2H en el cromosoma 2H en la región entre 24-35 cM y explicó el 48,4% de la variabilidad fenotípica. Elía *et al.* (2010) utilizando una población segregante entre un cultivar europeo de 2 hileras y uno norteamericano de 6 hileras (Triumph * Morex) mapeó un QTL en el brazo corto del 2H (marcador más cercano vrs1) explicando una variación del 34.8%.

En la región telomérica del brazo corto del 4H Singh *et al.* (2017) clonaron una proteína cerca de que actúa sobre los BG y afecta al EX. Este QTL denominado QTL2 se localiza en 15,8 cM (Hayes *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2004) y se reportó con una contribución de 29-38% a la variación del contenido de BG y EX (Han *et al.*, 1997). Walker *et al.* (2013) también detectaron dos QTLs cercanos en el 4H asociados a EX y explicando entre el 4-13 % de la varianza. En el 5H, se identificaron dos QTLs para EX, y uno representó entre el 35.7 – 53.6% de la varianza (Elía *et*

al., 2010; Zhou *et al.*, 2012). En el 7H Elía *et al.* (2010) detectaron un QTL en el 122 cM explicando entre el 14.1-21.7% de la varianza fenotípica. En el caso de germoplasma uruguayo Castro *et al.* (2012) detectaron asociaciones significativas entre el marcador 11_21443 y el EX en 4 entornos de los 5 estudiados.

El contenido de PG es extremadamente susceptible a los factores ambientales. Si bien se han mapeado QTLs en los 7 cromosomas, solo se han reportado unos pocos en el cromosoma 1H, 2H, 6H y 7H que han explicado un alto valor de variación fenotípica en los diferentes ensayos (Marquez-Cedillo *et al.*, 2000; Marquez-Cedillo *et al.*, 2001; See *et al.*, 2002; Mickelson *et al.*, 2003; Emebiri *et al.*, 2003; Emebiri *et al.*, 2005; Abdel-Haleem *et al.*, 2010; Abdel-Haleem *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2017). Laidò *et al.* (2009) localizaron un QTL en el 1H (108.7 cM) explicando el 29,1% de la variación fenotípica. Elía *et al.* (2010) mapearon siete QTLs en 1H, 2H, 3H, 5H y 7H, pero solo se identificaron tres en más de dos condiciones ambientales, y particularmente un QTL en 2H (82 cM, marcador franqueante *vrs1*) en todos los ambientes lo que explica un promedio del 54% de la varianza. Cai *et al.* (2013) reveló 2 genes HvNAM como genes candidatos para controlar el nivel de proteína en grano (HvNAM -1 en el 6H y HvNAM-2 en el 2H), ambos ya secuenciados (Distelfeld *et al.* 2008). Estudios posteriores coincidieron con este reporte (Matthies *et al.*, 2014; Pauli *et al.*, 2015). Beattie *et al.* (2010) haciendo uso de datos históricos para el análisis de GWAS con una colección elite de cebadas de 2 hileras de los 3 QTLs mapeados para el carácter de PG, 1 encontrado en el 7H (74cM) fue lo asociado a un gen candidato que codifica para un transportador de aminoácido.

Un punto interesante a destacar es que, aunque no existe una diferencia significativa entre el contenido total de PG en cebada y en la malta, si bien la proporción de componentes proteicos se altera después de la germinación, se detectan más QTLs para PG en cebada que en malta (Fan *et al.*, 2017). En un análisis exploratorio Castro *et al.* (2012) detectó marcadores significativos en los cromosomas 1H, 3H, 4H y 5H para este carácter, donde sólo el 11_10620 presente en el 3H se detectó en 2 localidades, el resto sólo en una.

El contenido de proteína soluble (SP) en el mosto afecta la composición nutricional, los sabores, la espuma y la estabilidad de la cerveza en el proceso de elaboración. Se han identificado varios QTLs para SP en todos los cromosomas utilizando diferentes poblaciones genéticas, y los QTLs que explican mayor variación fenotípica se detectaron en 1H, 2H, 3H, 5H y 7H. Matthies *et al.*

(2014) analizaron un set de cebadas europeos por GWAS identificando dos QTLs, uno de ellos ubicado en 1H (94.9 cM). EL QTL en 1H se lo detectó en diferentes condiciones ambientales, y al marcador no solo se lo vinculó a los caracteres que controlan SP, sino que también se relacionó con el contenido de FAN. Cu *et al.* (2016) coinciden que esta región debería ser un sitio crítico para la calidad del malteado. Kochevenko *et al.* (2018) utilizando una población de DH de materiales elite de la cruce Victoriana * Sofiara detectaron un QTL en el 3H (60.96 cM) que explicó el 27.31% de la varianza genotípica. Zhou *et al.* (2016) con el uso de una población de DH de la cruce Baudin *AC Metcalfe identificaron un QTL en el 5H (117.9 cM) atribuyéndose el 33.6% de la varianza. Matthies *et al.* (2014) también identificaron un QTL en el mismo cromosoma en 184.4 cM. Elía *et al.* (2010) mapearon cuatro QTLs en el análisis de NS cada uno en un ambiente único y diferente (1H, 2H, 4H y 5H) y explicando entre 12,4-13,4 % de la variación fenotípica. Cu *et al.* (2016) y Mather *et al.* (1997) localizaron QTLs en el 7H, localizados a los 62.8-66.16 cM y 236 cM y explicando 12.41-14.37% y 29%, respectivamente. Castro *et al.* (2012) detectaron en genotipos elite de cebada uruguayo 3 marcadores significativos en los cromosomas 2 (1) y 5 (2), cada uno en localidades diferentes y únicas.

A pesar de que los BG son afectados tanto por factores genéticos como ambientales, la influencia genética es más significativa (Jamar *et al.*, 2011). El contenido de BG ha sido asociado a reportes de QTLs en todos los cromosomas y como en caso de los otros parámetros, sólo mencionaremos los de mayor trascendencia. Panozzo *et al.* (2007) localizaron un QTL en el 1H (59 cM) contabilizando entre 36.0-52.8% de la varianza. Cu *et al.* (2016) también en el mismo cromosoma a los 50.56 cM detectaron un QTL explicando un 13.92% de la varianza. Mohammadi *et al.* (2015) utilizando líneas avanzadas de ocho programas de mejoramiento de Estados Unidos reportaron un QTL a los 58 cM. La cercanía de los 3 QTLs antes mencionados hace suponer que se trata del mismo QTL.

Otros dos QTLs que afectan el contenido de BG fueron reportados en regiones cercanas en el 2H, a 65.6 cM explicando entre 11.4-35.2% de la varianza y a 58.0-69.4 cM explicando el 19% de la varianza fenotípica por parte de Panozzo *et al.* (2007) y Han *et al.* (1995), respectivamente. Mohammadi *et al.* (2015) también mapeo un QTL en el 5H a 187 cM explicando un 36% de la varianza. Utilizando una población biparental de la cruce de una variedad japonesa y otra norteamericana (Mikamo * Harrington), Zhou *et al.* (2012) identificaron un QTL en 6H (35-55

cM) contabilizando entre 13.8-17.2% de varianza. Kim *et al.* (2011) detectaron dos QTLs en 7H (a 52.3 y a 71.0 cM) utilizando una población de líneas derivadas de una F5 (Yonezawa Mochi * Neulssalbori) que explicaron cada uno ellos entre el 30-40% de la varianza fenotípica. Se han clonado varios genes como el grupo de genes *CslF* en 2H y *HvCslF6* en 7H, que participan en la síntesis de BG (Han *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 2006; Taketa *et al.*, 2011). La pérdida de función de los genes *CslF* puede disminuir significativamente el contenido de BG (Fang *et al.*, 2019). La β -glucanasa es la encargada de la degradación de los BG durante el proceso de malteo (McCleary y Shameer, 1987; Han *et al.*, 1995). Dos genes de β -glucanasa (Glb 1 y Glb 2) localizados 1H y 7H respectivamente, fueron clonados (Han *et al.*, 1995; GrainGenes 3,02). Otros QTLs relacionados a la β -glucanasa fueron reportados en el 4H a 22.9 cM y a 79.5 cM por Panozzo *et al.* (2007) y Han *et al.* (1995), respectivamente. Los principales QTLs en el 4H se detectaron en diferentes ambientes, lo que hace indicar que el efecto ambiente sobre estos QTLs era relativamente bajo. Castro *et al.* (2012) detectaron asociaciones significativas en los cromosomas 2H, 3H, 5H y 7H, donde solo en un caso el marcador (11_21377) en el 2H mostró asociaciones en 2 localidades, mientras que el resto fue sólo en un ambiente.

Hasta el momento el desarrollo de estudios en genómica de cebada en Uruguay, con énfasis en el germoplasma utilizado en mejoramiento y sobre las variables de calidad maltera, ha sido muy reducido. Capdevielle (1999) identificó marcadores asociados a calidad maltera (Extracto) utilizando líneas avanzadas de la población Defra * Quebracho. Gómez (2005) estudió la diversidad alélica para el gen *Bmy1*, que codifica β -amilasa, en líneas avanzadas de los programas nacionales de mejoramiento y variedades en evaluación oficial. Castro *et al.* (2010) utilizando una población biparental (BCD47* Baronesse) encontraron regiones con efectos de QTLs coincidentes para dormancia de la semilla, sensibilidad al agua y caracteres de calidad maltera (Locatelli, 2011). Castro *et al.* (2012) realizaron el primer estudio de GWAS en Uruguay sobre calidad maltera utilizando germoplasma de diferentes orígenes, incluidos materiales de uso comercial y presentes en los programas de mejoramiento del momento.

La generación de conocimientos sobre las bases genéticas de las variables de calidad maltera en las condiciones ambientales del Uruguay es un insumo crucial para el desarrollo de estrategias que ayuden a acelerar la obtención de cultivares de calidad superior. Con ese objetivo, el presente estudio busca ubicar regiones cromosómicas y posibles genes candidatos asociados a los

parámetros de EX, NS, PG y BG en germoplasma elite de cebada. Para ello se instalaron 3 ensayos en las localidades de Colonia (INIA), Soriano (MOSA) y Paysandú (EEMAC) en el año 2015. El germoplasma estudiado fue una población conformada por 145 líneas doble haploides, desarrollada a partir de 4 cruzas entre 5 cultivares modernos elite que combinan alto potencial de rendimiento y buena calidad maltera con adaptación local.

2- MATERIALES Y METODOS

2.1-MATERIAL GENÉTICO

Se utilizó una población de 145 líneas dobles haploides derivadas del cruce de 5 materiales elite de cebada de 2 hileras (CLE 267, CLE 268, Kalena, Conchita y Livia) desarrollada en INIA. Dicha población está conformada por 33 líneas del grupo INNO1 (CLE268 * Kalena); 39 de INNO2 (Kalena * CLE267); 45 de INNO3 (Kalena * Conchita) y 28 de INNO4 (Livia * CLE268). El objetivo de estas cruces fue el de combinar la calidad maltera y el buen rendimiento de grano proveniente de los materiales europeos como Conchita, Livia (ambas del criadero KWS Lochow) y Kalena (propiedad de Ackermann Saatzucht), con la adaptabilidad agronómica a las condiciones locales de CLE 267 (INIA Arrayán* ND17380) y CLE 268 (INIA Arrayán* Norteña Carumbé) provenientes del programa de mejoramiento de INIA.

Estos 145 genotipos son una subpoblación tomada al azar de una población mayor de 980 dobles haploides originarios de las mismas 4 cruces mencionadas en el párrafo anterior (Bhatta *et al.*, 2020). Dentro del proyecto de Innovagro FSA_1_2013_1_12977 el conjunto de 145 individuos es considerada la población de entrenamiento y el resto de los 980 son considerados la población de selección en el marco del estudio de aplicación de selección genómica para la predicción de la performance de los genotipos con el objetivo de acelerar la selección de materiales superiores en los programas de mejoramiento.

Los ensayos se sembraron en el 2015 en 3 localidades, en la Estación Experimental La Estanzuela de INIA, Departamento de Colonia (EELE -57 42'W, 30 20'S), en la Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni", Departamento de Paysandú (EEMAC-58 03'W, 32 22'S) y en el campo experimental de MOSA, Departamento de Soriano (MOSA-58 02'W, 33 16'S). Todos los ensayos tuvieron un diseño experimental parcialmente repetido (Cullis *et al.*, 2006) con ocho testigos repetidos en cada experimento en un diseño de bloques completos al azar.

2.2-FENOTIPADO

Las muestras de las 145 líneas obtenidas en los experimentos mencionados, líneas parentales y testigos fueron evaluadas por 4 parámetros de calidad maltera, contenido de PG (%), EX (% base seca), contenido de NS (mg por 100 g) y contenido de BG (ppm). El micromalteado se realizó en

el LATU en la micromaltería Automatic Micromalting Systems de Phoenix Systems. Se maltearon muestras de 150 gramos, por lo que los malteos se realizaron en tandas de 40 materiales (39 genotipos + testigo analítico). El programa de malteo utilizado fue el siguiente:

ETAPA	Horas	Minutos	Rodillos%	Temp.°C	Spray%	F aire %
Lavado	10	100
Enjuague	15	100
Remojo 1	4	0	25	18
Germinación 1	12	0	20	18	100	10
Remojo 2	4	0	25	18
Germinación 2	43	0	20	18	100	10
Germinación 3	10	0	25	14	100	10
Germinación 4	43	0	25	15	100	10

SECADO	Horas	Minutos	Rodillos%	F. aire %	T. inic.°C	T. Seteo	T.fin.°C	T. Seteo	D. Inic%	D. final %
Secado 1	14	0	100	90	50	55	50	55	90	90
Secado 2	1	0	100	90	60	65	60	65	80	80
Secado 3	1	0	100	90	70	75	70	75	80	80
Secado 4	8	0	100	90	80	80	80	80	80	80
Secado 5	1	0	100	90	20	20	20	20	80	80

Los análisis de EX (PEC.CEMIC.MIM.010 basado en norma EBC 4.5.1) y NS por el método de (PEC.CEMIC.MIM.014 basado en Norma EBC 4.9.1), se realizaron en el LATU. El contenido de PG se detectó por método infrarrojo en equipo Infatec (Foss) en la estación experimental de MUSA, Ombués de Lavalle. El contenido de BG se realizó por determinación fotométrica con el equipamiento Skalar modelo SAN++ (con módulo para medir BG, sampler SA1000, fluorímetro SA6310) en MOSA a partir del mismo mosto congreso realizado en el LATU para medir EX y NS.

2.3- ANALISIS FENOTIPICO

La estimación de las mejores estimaciones lineales insesgadas genotípicas (Best Linear Unbiased Estimates (BLUEs)) se obtuvo a partir del siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + E_i + B_{j(i)} + G_k + GE_{ik} + e_{ijkl}$$

donde y_{ijkl} es la variable de respuesta del carácter de interés; μ es la media general; E_i es el efecto del i -ésimo ambiente; $B_j(i)$ es el efecto del j -ésimo bloque anidado dentro del i -ésimo ambiente; G_k es el efecto del k -ésimo genotipo; GE_{jk} es el efecto de la interacción genotipo por medio ambiente; y e_{ijkl} es el error residual. Se asumió el genotipo como un efecto fijo, mientras que el

ambiente, el bloque anidado dentro del ambiente y las interacciones genotipo por ambiente (GE_i) se asumieron como efectos aleatorios. Para experimentos individuales, los BLUEs se estimaron utilizando el modelo mencionado anteriormente, excluyendo los efectos ambientales (E) y GE_i . Estos análisis se realizaron utilizando PROC MIXED en SAS 9.4 (SAS Institute 2018) utilizando estimaciones de máxima verosimilitud restringida para efectos aleatorios (ya publicados en Bhatta *et al.*, 2020)

2.4- GENOTIPADO Y ESTRUCTURA DE LA POBLACION

El genotipado se realizó utilizando la matriz de SNP iSelect 50K de cebada Illumina (Bayer *et al.*, 2017) en Cereal Crops Research, Fargo, ND, Estados Unidos. La extracción de ADN, los SNP detectados y el control de calidad se describieron previamente en Bhatta *et al.* (2020). En el presente estudio solo se utilizaron 6340 SNP con posición genética conocida obtenidos en la plataforma de Barleymap (Cantalapiedra *et al.*, 2015). También se excluyeron todos los marcadores con una Frecuencia de Alelos Menores (MAF) inferior al 5 %. Por lo tanto, finalmente se utilizaron 6220 marcadores en este estudio.

Se utilizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para determinar la estructura de la población. El PCA se incluyó como un efecto aleatorio en el modelo de Price, incluidos todos los ejes significativos, según Patterson *et al.* (2006). Estos análisis se realizaron en el software estadístico R (R Development Core Team 2020) utilizando el paquete *lmem.gwaser* (Gutierrez *et al.*, 2016).

2.5- GWAS Y CAÍDA DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El análisis de asociación se realizó utilizando los siguiente modelos: 1) Naive; una prueba simple de asociación sin corrección para la estructura de la población; 2) Kinship ; modelo mixto que incluye la matriz de coancestría entre genotipos como efecto aleatorio (Parisseaux y Bernardo, 2004); 3) Q + K ; modelo de efectos mixtos que incluye tanto la estructura de la población como la coancestría entre genotipos (Yu *et al.*, 2006 a,b); 4) Eigenstrat; modelo de efectos mixtos que incluye estructura poblacional como efecto aleatorio (Price *et al.*, 2006; Malosetti *et al.*, 2007). Estos análisis se realizaron con el software estadístico R utilizando el paquete *lmem.gwaser*

(Gutierrez *et al.*, 2016). Se consideró una asociación carácter/marcador significativa en aquellos marcadores con un LOD mayor a 3.

Los cuatro modelos descritos anteriormente se compararon mediante gráficos Q – Q asumiendo una distribución uniforme de los p -valores. Para realizar estos gráficos se utilizó software estadístico R utilizando el paquete *qqman* (Turner, 2018).

Para analizar la caída del desequilibrio de ligamiento se calculó y graficó el coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) entre pares de marcadores para todos los SNPs a lo largo de cada cromosoma y se ajustó una ecuación cuadrática para poder trazar una línea de tendencia que acompaña la dispersión de puntos. Para realizar los gráficos de dispersión se utilizó software estadístico R utilizando el paquete *LDheatmap* (Shin *et al.*, 2006). Para cada cromosoma se definió una región determinada en base a la intersección de la curva de suavizado con LD basal de pares de marcadores de $r = 0,20$, la cual fue utilizada para determinar la longitud de los QTLs (Verocai, 2021). Los QTLs se ubicaron colocando al marcador con más alto valor de LOD equidistante de los extremos de la región antes determinada y se le asignaron los marcadores significativos localizados en dicha región.

La varianza fenotípica explicada por cada QTL se calculó ajustando un modelo multilocus considerando todos los marcadores significativos para cada carácter con la función *relmatLmer* del paquete *lme4QTL* R (Ziyatdinov *et al.*, 2018). Los efectos fijos fueron todos SNP significativos y los efectos aleatorios fueron los genotipos. La matriz de relación aditiva realizada se calculó con la función *A.mat* del paquete *rrBLUP* del software estadístico R y se especificó en el modelo como una matriz de covarianza para efectos aleatorios.

Los haplotipos de los QTLs presentes en la población fueron determinados al considerar los estados alélicos de los marcadores más significativos que lo conformaban (resaltados en color en la Tabla S 1). Las medias de mínimos cuadrados para los diferentes haplotipos de los QTLs se estimaron con el paquete *emmeans* (Russell *et al.*, 2020) del software estadístico R.

3- RESULTADOS

3.1-ANÁLISIS DESCRIPTIVO PARA VARIABLES FENOTÍPICAS

Los datos fenotípicos (obtenidos en los micromalteos y análisis de malta de las muestras experimentales) mostraron variabilidad dentro de la población para los 4 parámetros en todas las localidades (Figura 1), con una distribución cercana a la normal alrededor del valor medio (Tabla 1). Se observó segregación transgresiva para la mayoría de los parámetros (hay que señalar que por problemas de semilla no fue posible la caracterización fenotípica de uno de los padres, Cle 268) (Tabla 1).

Si bien hubo diferencias entre las medias de los parámetros, no se detectaron diferencias importantes entre localidades (Tabla 1). Es posible que esto se asocie a las condiciones óptimas en las que se realizaron los ensayos en las 3 localidades incluidas (Verocai, 2021). Los promedios de los parámetros se ubicaron cercanos a los valores de malta aceptables para la industria salvo en el caso de los BG en que estuvieron por arriba de los deseables.

Tabla 1. Mejor estimador lineal insesgado (best linear unbiased estimator, BLUEs), desviación estándar (DE), Valor mínimo (Min) y valor máximo (Máx) de los datos fenotípicos y medias de los padres por carácter de interés como EX, extracto de malta (%); PG, contenido de proteína en grano (%); NS, Nitrógeno Soluble (mg en 100 grs) y BG, contenido de β -glucanos (ppm).

Variable	Localidad	BLUEs	D.E.	Min	Máx	Media de los padres			
						Conchita	Cle 267	Kalena	Livia
EX	EEMAC	81,06	0,83	78,71	82,85	81,35	81,13	81,50	81,58
	INIA	81,22	1,02	78,60	83,50	82,00	80,75	82,01	82,00
	MOSA	80,17	1,10	76,21	82,05	80,38	80,90	80,85	80,60
PG	EEMAC	10,90	0,72	9,10	12,60	10,65	11,10	11,10	10,04
	INIA	10,57	0,65	9,08	12,21	10,00	11,00	10,56	10,25
	MOSA	10,75	0,66	9,10	12,40	10,50	10,45	10,85	10,43
NS	EEMAC	596,24	50,44	487,00	734,00	570,00	673,00	571,25	615,67
	INIA	612,67	58,39	502,02	779,05	559,50	723,00	602,80	607,50
	MOSA	671,08	54,97	564,07	807,07	668,00	748,00	654,00	664,50
BG	EEMAC	379,75	153,71	85,44	753,97	482,25	298,50	323,25	85,44
	INIA	168,13	86,05	39,00	443,00	194,25	182,50	126,25	39,00
	MOSA	253,65	107,22	77,50	613,02	292,67	203,25	240,00	77,50

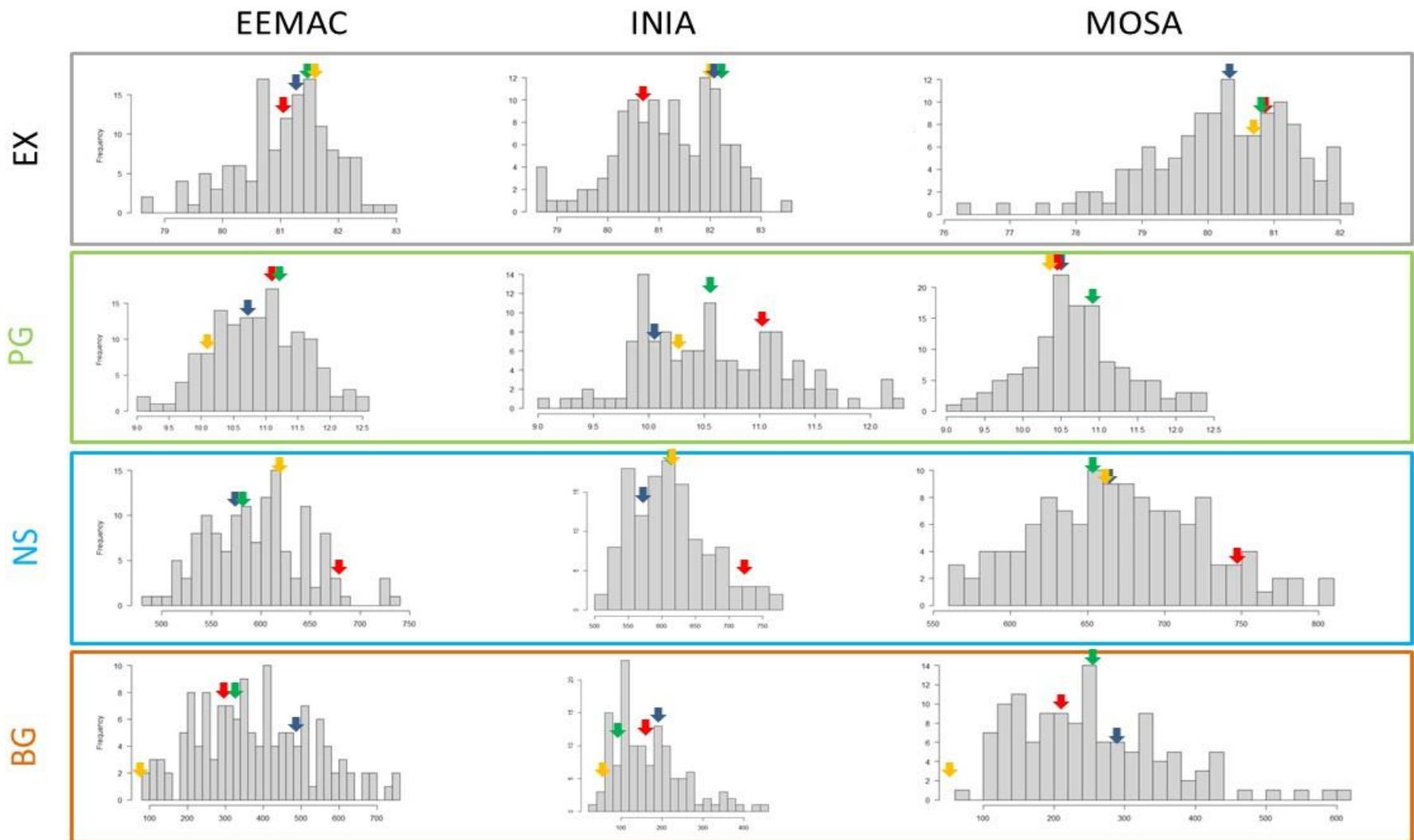


Figura 1. Histograma de los valores fenotípicos por localidad (EEMAC, INIA y MOSA) y parámetros evaluados: EX, extracto de malta; PG, proteína en grano; NS, nitrógeno soluble; BG, contenido de β-glucanos. Los valores parentales están indicados con flechas; Flecha azul: Conchita; Flecha roja: Cle 267; Flecha verde: Kalena; Flecha amarilla: Livia.

En términos generales los valores promedio de EX, NS y PG fueron similares entre experimentos. En cuanto a BG, el ensayo de la EEMAC (Paysandú, el ubicado más al norte) presentó valores claramente superiores, con más del doble del ensayo en INIA (y MOSA con valores intermedios). MOSA presenta por su parte valores inferiores en EX (1% por encima de los otros ensayos) y superiores en NS.

Las correlaciones entre las variables (Tabla 2) fueron relativamente bajas y similares entre ensayos. EX se correlacionó negativamente con PG (la correlación más alta de todas) y en menor medida con BG pero no presentó correlación con NS. El contenido de PG se correlacionó moderada y positivamente con el NS y poco con BG. El NS se correlacionó en forma moderada y negativa con los BG.

Tabla 2. Matriz de correlación fenotípica por localidad utilizando las mejores estimaciones lineales insesgadas (BLUEs) de los caracteres analizados. EX, extracto de malta; PG, contenido de proteína en grano; NS, nitrógeno soluble; BG, contenido de β -glucanos

Caracteres	Localidades	PG	NS	BG
EX	EEMAC	-0,42	0,18	-0,33
	INIA	-0,46	-0,13	-0,38
	MOSA	-0,41	-0,06	-0,17
PG	EEMAC	1	0,32	0,24
	INIA	1	0,47	0,19
	MOSA	1	0,42	0,28
NS	EEMAC		1	-0,47
	INIA		1	-0,29
	MOSA		1	-0,31

En el PCA, los dos primeros componentes principales (PC) explicaron el 75,18% de la variación total (Figura 2). El PC1 se explica principalmente por los parámetros de EX y contenido de PG mientras que el PC2 se explica principalmente por el contenido de BG y el NS. En ambos casos, y consistente con lo reportado en la matriz de correlaciones los vectores de las variables más relevantes fueron contrastantes.

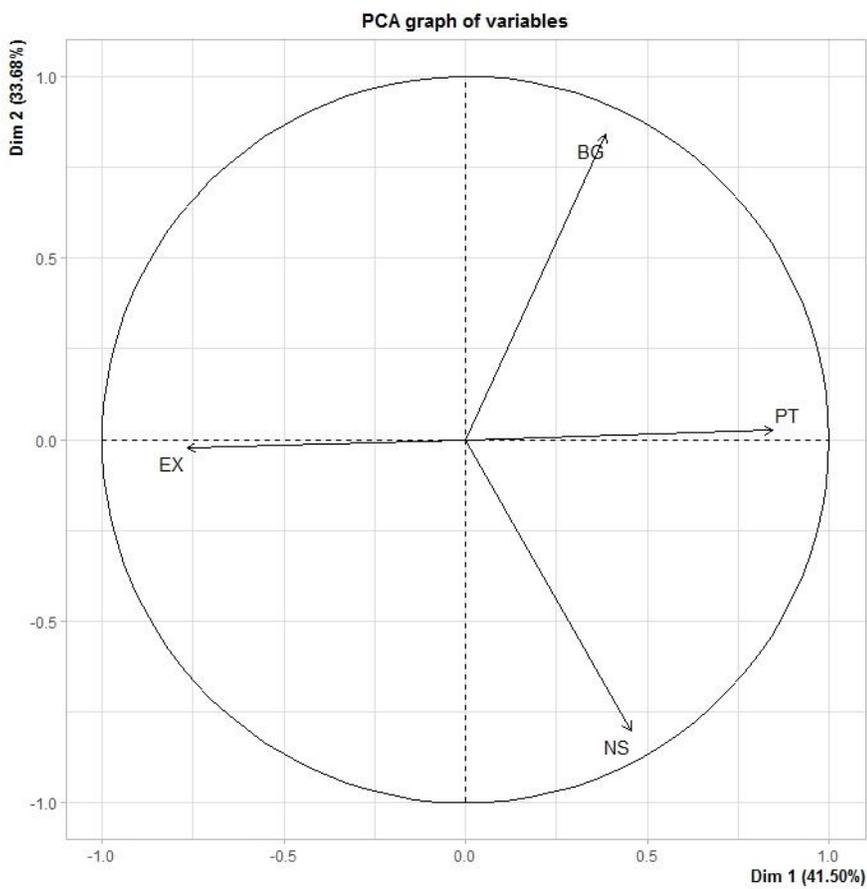


Figura 2. El PCA que muestra la asociación entre parámetros de calidad de malta. EX, extracto de malta; PG, contenido de proteína en grano; NS, nitrógeno soluble; BG, contenido de β -glucanos.

3.2-ANÁLISIS GENOTÍPICO

Luego de filtrar la base de datos de aquellos marcadores que presentaron un $MAF < 0.05$, se obtuvo un conjunto de 6220 marcadores SNPs a partir del cual se realizó el análisis. La cantidad de SNPs varió por cromosoma (Tabla 3), siendo el cromosoma con mayor número de SNPs el 5H (1127 marcadores), mientras el cromosoma con menos marcadores fue el 1H (519 marcadores). El grupo de ligamiento de mayor longitud es el 5H (169.4 cM) y el de menor el 4H (116.7 cM).

Tabla 3. Cobertura de marcadores del genoma resumido por cromosoma utilizado para el análisis de GWAS. Expresado en distancia genética (cM) y en distancia física (pb)

Cromosoma	Marcadores	Mapa genético (cM)			Mapa físico (pb)		
		Longitud	Distancia media entre marcadores	Máximo espacio entre marcadores	Longitud	Distancia media entre marcadores	Máximo espacio entre marcadores
1H	519	132,8	0,3	7,9	558.370.023	1.002.460	104.901.125
2H	1074	149,2	0,1	12,7	767.688.877	681.179	84.282.225
3H	1035	154,9	0,1	7,5	696.092.284	643.934	48.755.439
4H	643	116,7	0,2	13,5	646.176.125	901.222	48.105.629
5H	1127	169,4	0,2	9	669.229.145	551.260	27.129.599
6H	759	126,5	0,2	7,3	582.901.167	649.834	18.427.909
7H	1063	141,3	0,2	4,4	656.809.362	588.012	31.167.167

En el 1H, 2H y 4H los marcadores presentaron una mayor concentración en las zonas teloméricas de los cromosomas mientras que en el resto la distribución fue más uniforme (Figura 3-B). Al comparar los mapas genéticos y físicos (Figura 3) de estos cromosomas se evidencia la mayor tasa de recombinación en las zonas teloméricas antes mencionadas. En el cromosoma 1H el mayor gap entre marcadores fue de casi 105MB, mientras que en el 2H fue de 84 y 4H de 48 Mb.

3.3-ESTRUCTURA POBLACIONAL

La estructura genética de la población se analizó mediante PCA (Figura 4). Los dos componentes más importantes del PCA explicaron el 24,7% de la variación total. Si bien los agrupamientos de las cuatro cruces no se visualizan tan claramente al tener los 145 genotipos (INNO1-TP, INNO2-TP, INNO3-TP, INNO4-TP), si se detecta al hacer el análisis para toda la población original donde se tienen en cuenta los 980 genotipos (INNO1, INNO2, INNO3, INNO4) (Bhatta *et al.* 2020). Esto muestra el agrupamiento según la relación de las líneas parentales que dieron origen a las 4 familias descendentes de las 4 cruces.

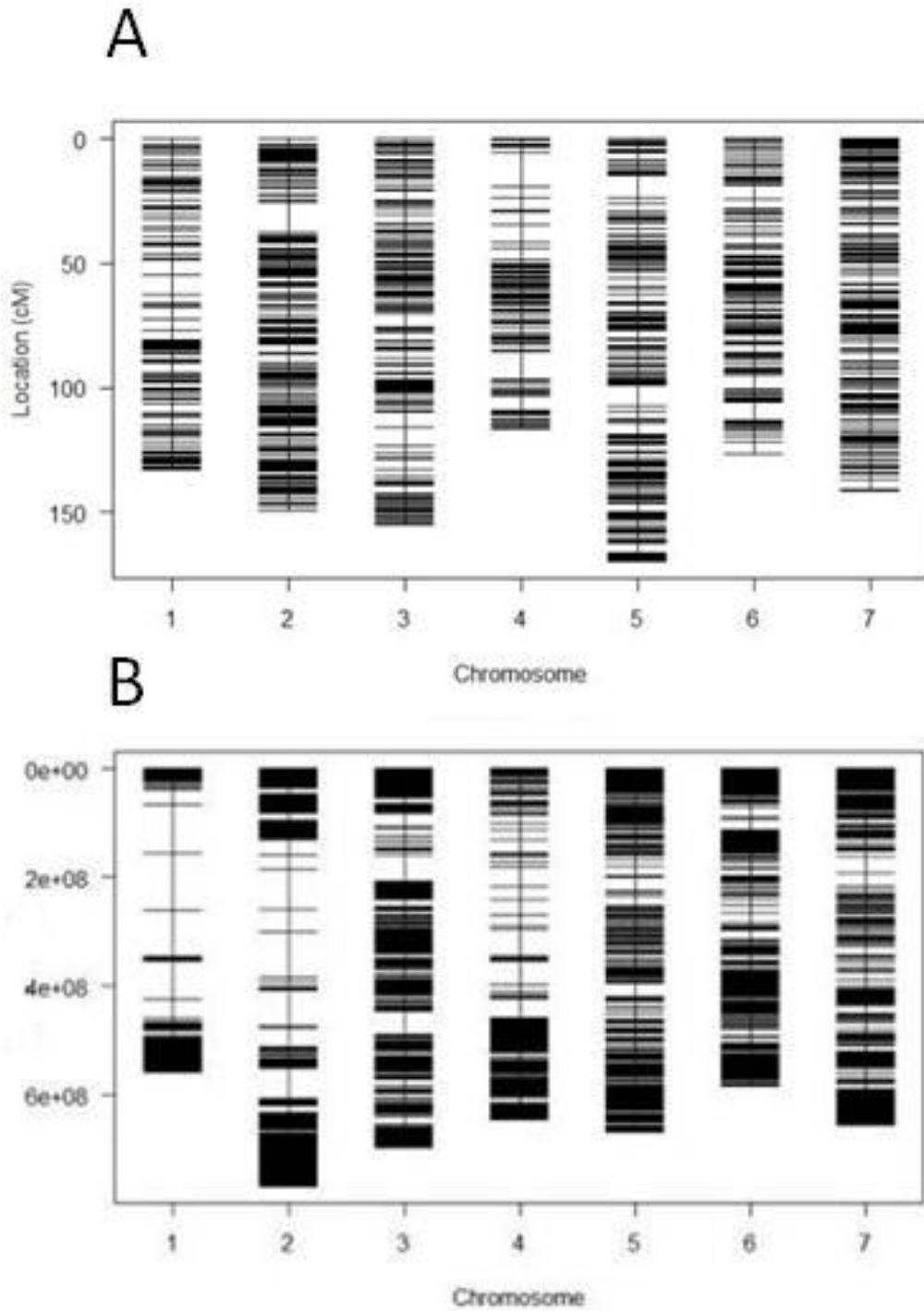


Figura 3. Cobertura del genoma de los marcadores en cada cromosoma: A)- Mapa genético (cM); B)- Mapa físico (pb).

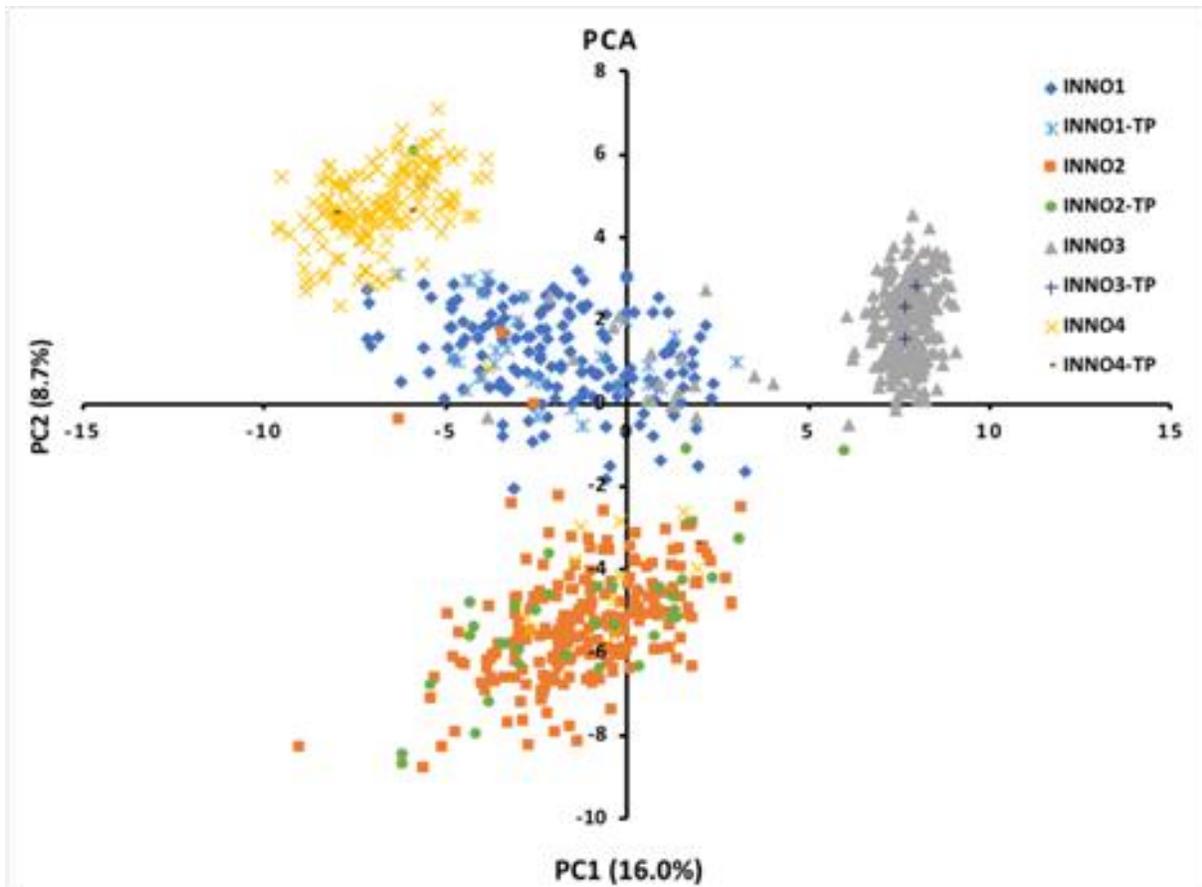


Figura 4. PCA utilizando diferente calidad de genotipos: Población completa de 980 líneas DH originarias de los 4 cruzamientos (Inno1, Inno2, Inno3, e Inno4); Subpoblación de 145 genotipos utilizada para el análisis de GWAS realizado en este trabajo (INNO1-TP, INNO2-TP, INNO3-TP, INNO4-TP)

3.4-GWAS Y CAÍDA DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El modelo que se determinó como más adecuado y que fue seleccionado para llevar a cabo el análisis de GWAS fue el Eigenstrat dado que fue el que mejor acompañó la línea 1-1 (p -valores observados = p -valores esperados (Figura S 1).

La caída del DL por cromosoma (Figura 5) mostró, en general para todos los cromosomas, una evolución lenta que probablemente refleje la baja tasa de recombinación atribuible a un solo evento de recombinación, fenómeno propio del proceso de obtención de las líneas haploides duplicadas. En la población utilizada la caída DL varió entre 9,9 cM en el cromosoma 6H y 16,4 cM en el cromosoma 3H, con una media entre los 7 cromosomas de 13,3cM (Verocai, 2021).

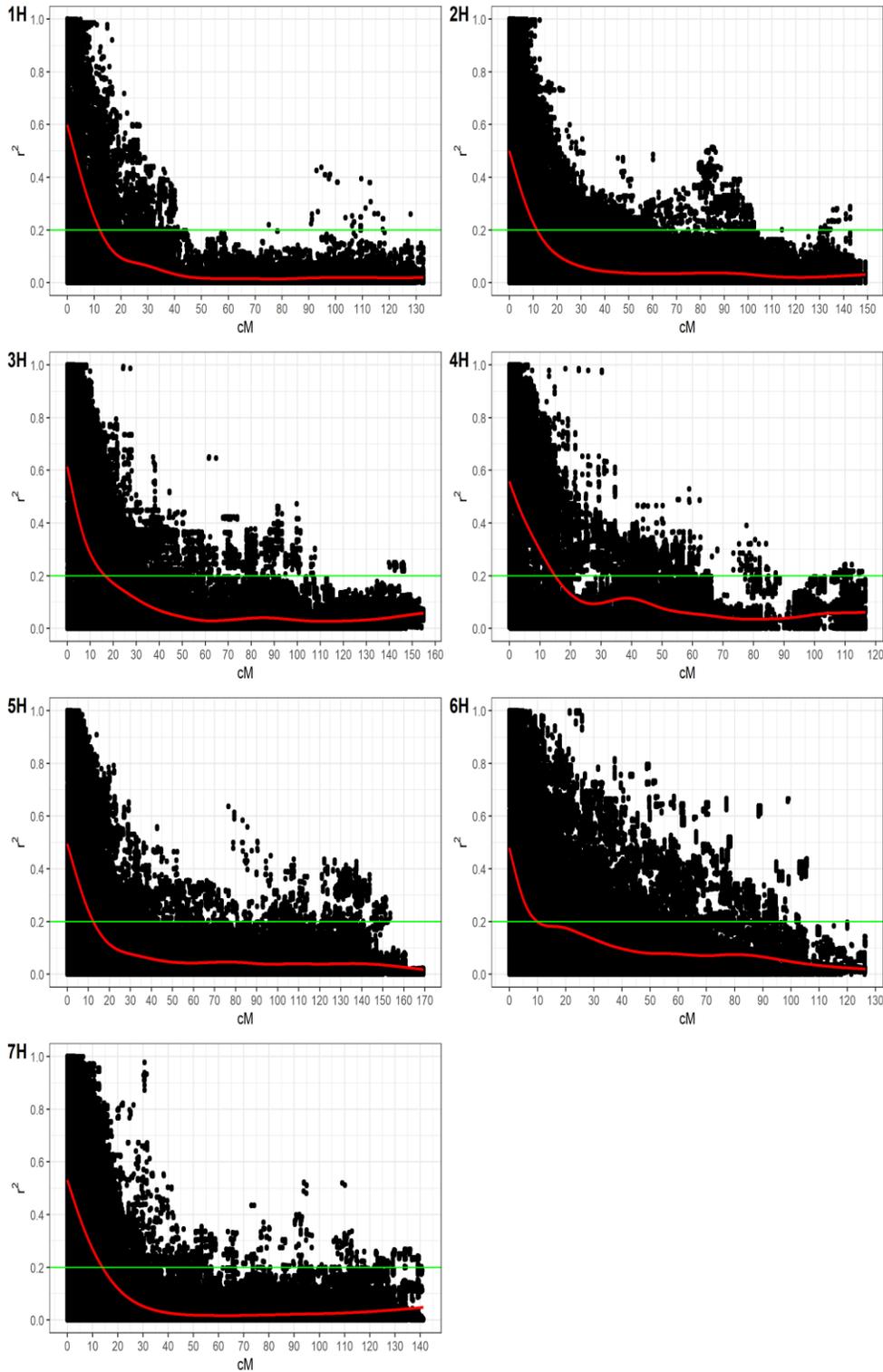


Figura 5. Gráfico de dispersión mostrando la caída del DL en cada cromosoma. La distancia genética (cM) graficada en función del DL estimado (r^2) entre par de marcadores.

3.5-ASOCIACIONES DETECTADAS (QTLs)

Se encontraron asociaciones significativas con marcadores para todos los caracteres analizados. Se detectaron un total de 148 asociaciones significativas marcador/carácter en los análisis realizados por localidad para los caracteres analizados (Tabla S 1) considerando las asociaciones con significancia $p < 0.001$. El p -valor para las pruebas de asociación de marcadores varió de 0.000998 (JHI-Hv50k-2016-78132, cromosoma 2H) para NS en INIA a 0.000021 (JHI-Hv50k-2016-110405, cromosoma 2H) para PG también INIA. Cuando se realizó el análisis en conjunto de todas las localidades se detectaron 100 asociaciones significativas con significancia $p < 0.001$ para todos los caracteres excepto para PG (Tabla S 1). El p -valor varió desde 0.000914 (JHI-Hv50k-2016-10336) para EX a 0.00000976 para NS (JHI-Hv50k-2016-305809).

En base a las asociaciones significativas y la combinación de asociaciones significativas con alta cercanía en el mapa de ligamiento se definieron un total de 19 QTLs (Tabla 4) para todas las combinaciones de carácter/ensayo en los análisis realizados por localidad y 5 QTLs en el análisis de todas las localidades. La mayoría de los QTLs fueron detectados en un solo ambiente (16 de 19). La localidad con más QTLs detectados fue INIA (9), seguida por MOSA (8) y EEMAC (2). El carácter con más QTLs fue NS (7), luego BG (6), PG (4) y EX (2). En el análisis conjunto de las tres localidades se detectaron 2 QTLs para EX, 2 para NS, 1 para BG y ninguno para PG.

Independiente del hecho de que la mayoría de las asociaciones fueron específicas por ensayo, algunas regiones genómicas mostraron coincidencia en sus efectos en diferentes ambientes. En el caso particular de NS el marcador JHI-Hv50k-2016-305809 (5H) fue el más significativo en los 3 ambientes estudiados y en el análisis en conjunto de todas las localidades (en adelante definido como TODAS). Para BG el mismo marcador también fue significativo en las localidades de la EEMAC y en TODAS (Tabla 4).

Por otra parte, se detectaron QTLs que fueron coincidentes en sus ubicaciones genéticas y que compartieron marcadores significativos si bien el marcador más significativo del QTL no fue el mismo. En el caso del EX los 3 marcadores presentes dentro del QTL ubicado a los 15.08 cM del 1H detectado en TODAS, forman parte de los 7 marcadores dentro del QTL ubicado a los 9.92 cM detectado en la localidad de MOSA (QTLs 1 y 2 en Tabla 4). Lo mismo sucede con el NS, donde el QTL detectado en MOSA y en TODAS comparten la ubicación en el 2H (80.08 cM) y

además los 2 marcadores dentro del QTL de MOSA forman parte de los 53 dentro del QTL de TODAS (QTLs 7 y 8 en Tabla 4).

Tabla 4. Ubicación de los QTLs detectados y la variación fenotípica explicada por cada uno de ellos

Car. ^a	Cro. ^b	cM ^c	Marcador ^d	N°del QTL ^e	% DE VARIACIÓN FENOTÍPICA EXPLICADA ^f			
					EEMAC	INIA	MOSA	TODAS
EX	1H	9,92	2016-8325	1			13.04 (7)**	
	1H	15,08	2016-10365	2				8.39 (3)*
	2H	142,63	2016-141795	3		7.49 (4)*		
	5H	41,74	2016-287830	4				10.82 (1)*
NS	2H	24,50	2016-74681	5		10.78 (18)*		
	2H	40,08	2016-78167	6		10.89 (17)*		
	2H	80,03	2016-107816	7			13.78 (2)*	
	2H	80,03	2016-107449	8				18.39 (53)**
	2H	92,78	2016-112096	9		11.07 (4)*		
	5H	50,00	2016-305809	10/11/12/13	9.41 (1)*	9.46 (1)*	13.41 (1)*	14.87 (9)***
PG	2H	80,03	2016-107749	14		19.12 (5)*		
	2H	89,80	2016-110405	15		19.32 (14)**		
	5H	139,24	2016-345420	16			13.94 (4)*	
	7H	108,78	2016-500871	17			10.00 (1)*	
BG	4H	24,38	2016-229394	18		7.27 (1)*		
	5H	44,17	2016-292121	19			11.13 (1)*	
	5H	44,17	2016-293507	20		10.64 (28)*		
	5H	50,00	2016-305809	21/22	14.62 (9)**			15.94 (34)*
	5H	135,95	2016-343384	23			11.60 (10)*	
	5H	151,25	2016-351372	24			17.56 (20)*	

a- Carácter estudiado.

b- Cromosoma donde fue detectado el QTL

c- Posición en el cromosoma (en cM) del marcador más significativo del QTL

d- Marcador con asociación más significativa del QTL. Se eliminó la nomenclatura JHI-Hv50k que precede al marcador

e- Número de QTL asignado en forma consecutiva. En los casos que el QTL fue detectado en diferentes localidades, el número se asigna en el orden de izquierda a derecha que aparece en la tabla.

f- % de la variación fenotípica explicada por el QTL. Entre paréntesis se indica la cantidad de marcadores significativos que forman parte del QTL, seguido del valor de significancia del marcador más significativo,* p -valor <0.001, ** p -valor <0.0001 y *** p -valor <0.00001.

En el caso de BG se presenta una situación similar, donde el marcador JHI-Hv50k-2016-392121, ubicado en el 5H a 44.17 cM, es el más significativo y el único que forma parte del QTL en MOSA y también fue detectado dentro de los 28 marcadores del QTL encontrado en INIA (misma ubicación) y de los 34 marcadores dentro del QTL en TODAS (ubicado a los 50.00 cM), a pesar de no ser el más significativo en estos últimos dos (QTLs 19, 20 y 22 respectivamente en Tabla 4). Al mismo tiempo los 28 marcadores del QTL de INIA forman parte de los 34 marcadores del QTL en TODAS. El QTL detectado en la EEMAC a los 50.00 cM además de compartir el pico del QTL, comparte 6 de los 9 marcadores significativos restantes con el QTL en TODAS (QTLs 21 y 22 en Tabla 4).

La proporción de variación total explicada por cada QTL no fueron muy altas, variando entre 7.27 % (QTL para BG en 4H en INIA) y 19.32 % (QTL para PG en 2H en INIA).

3.6-HAPLOTIPOS CROMOSÓMICOS

Para cada uno de los QTLs encontrados se determinó la cantidad de haplotipos presentes en la población y su porcentaje de participación en la misma (Tabla 5). Para cada haplotipo se calculó la sustitución alélica teniendo en cuenta la dispersión de la media del haplotipo en función de la media del ensayo para el carácter de interés. Para poder evaluar la procedencia de la combinación alélica favorable para cada carácter se indicó el haplotipo al que corresponde cada padre para cada QTL.

Tabla 5. Resumen de los porcentajes de haplotipos presentes en la población para todos los QTLs detectados. Para cada QTL se indica los haplotipos parentales y la sustitución alélica.

Car ^a	N° QTL ^b	Cro ^c	Ubicación (cM) ^d	Marcador más significativo ^e	Marcadores Haplotipos ^f	Haplotipos % ^g	Sustitución Alélica ^h	Haplotipo de los padres ⁱ				
								Conchita	Cle 267	Kalena	Livia	Cle 268
EX	1	1H	9,92	2016-8325	2	57.85	-0.32	*		*	*	
						28.10	+0.64		*			
						13.22	+0.06				*	
						1 Recomb.	-					
	2	1H	15,08	2016-10365	2	60.90	-0.18	*		*	*	
						38.35	+0.33		*			
								1 Recomb.	-			
3	2H	142,63	2016-141795	3	77.12	-0.14		*	*	*		
					22.88	+0.57	*				*	

Car ^a	N ^o QTL ^b	Cro ^c	Ubicación (cM) ^d	Marcador más significativo ^e	Marcadores Haplotipos ^f	Haplotipos % ^g	Sustitución Alélica ^h	Haplotipo de los padres ⁱ				
								Conchita	Cle 267	Kalena	Livia	Cle 268
	4	5H	41,74	2016-287830	2	50.39 49.61	+0.30 -0.25	*	*	*	*	*
						60.98	-15.67	*	*	*	*	*
NS	5	2H	24,50	2016-74681	2	29.27 8.13	+28.33 +7.33	*	*	*	*	*
						1 Recomb.	-					
	6	2H	40,08	2016-78167	2	84.07 15.93	-8,67 +43.33	*	*	*	*	*
	7	2H	80,03	2016-107816	2	62.83 37.17	-17.08 +26.92	*	*	*	*	*
	8	2H	80,03	2016-107449	2	61.72 35.94	-15.13 +25.87	*	*	*	*	*
						1 Recomb.	-					
	9	2H	92,78	2016-112096	2	85.83 14.17	-8.67 +45.33	*	*	*	*	*
	10	5H	50,00	2016-305809	1	75.57 24.43	+9.76 -31.24	*	*	*	*	*
	11	5H	50,00	2016-305809	1	74.59 25.41	+11.33 -34.67	*	*	*	*	*
	12	5H	50,00	2016-305809	1	74.17 25.83	+11.92 -36.08	*	*	*	*	*
	13	5H	50,00	2016-305809	1	75.19 24.81	+10.87 -33.13	*	*	*	*	*
PG	14	2H	80,03	2016-107749	2	62.93 37.07	-0.23 +0.30	*	*	*	*	*
	15	2H	89,80	2016-110405	2	77.31 22.69	-0.14 +0.45	*	*	*	*	*
	16	5H	139,24	2016-345420	2	66.10 19.49 13.56	+0.16 -0.40 -0.07	*	*	*	*	*
						1 Recomb.	-					
	17	7H	108,78	2016-500871	1	83.05 16.95	+0.13 -0.55	*	*	*	*	*
BG	18	4H	24,38	2016-229394	1	82.65 17.35	-11.13 +57.87	*	*	*	*	*
	19	5H	44,17	2016-292121	1	81.36 18.64	-15.65 +78.35	SD	SD	SD	SD	SD
	20	5H	44,17	2016-293507	9	82.93 17.07	-14.13 +71.87	SD	SD	SD	SD	SD
	21	5H	50,00	2016-305809	2	74.81 23.66	-33.75 +104.25	*	*	*	*	*
						2 Recomb.	-					
	22	5H	50,00	2016-305809	1	75.19 24.81	-22.96 +67.04	*	*	*	*	*

Car ^a	N° QTL ^b	Cro ^c	Ubicación (cM) ^d	Marcador más significativo ^e	Marcadores Haplotipos ^f	Haplotipos % ^g	Sustitución Alélica ^h	Haplotipo de los padres ⁱ				
								Conchita	Cle 267	Kalena	Livia	Cle 268
	23	5H	135,95	2016-343384	3	88.43 11.57	+108.35 -13.65	SD	SD	SD	SD	SD
	24	5H	151,25	2016-351372	2	73.55 26.45	+23.35 -61.65	*	*	*	*	*

a- Carácter en estudio

b- Número de QTL asignado en la Tabla N°4

c- Cromosoma donde fue detectado el QTL

d- Posición en el cromosoma (en cM) del marcador más significativo del QTL

e- Marcador con asociación más significativa del QTL. Se eliminó la nomenclatura JHI-Hv50k que precede al marcador

f- Cantidad de marcadores considerados para determinar el haplotipo del QTL

g- % de los haplotipos encontrados en la población según cada QTL

h- Desvío de la media del haplotipo en función de la media del ensayo para el de interés

i- Haplotipo parental para cada QTL detectado

SD: Sin datos; Recomb.: Recombinantes.

4- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los valores de correlación entre los parámetros de calidad de malta si bien fueron relativamente bajos fueron consistentes entre localidades y similares a los encontrados en la bibliografía. Esto confirmó que tanto el proceso de malteo como los análisis para la determinación de la calidad maltera fueron de buen nivel y consistentes entre localidades. El EX se correlacionó negativamente con la PG lo cual es coincidente con reportes anteriores (Mather *et al.*, 1997; Emebiri *et al.*, 2004; Mohammadi *et al.*, 2015; Kochevenko *et al.*, 2018; Cammarota *et al.*, 2019; Looseley *et al.*, 2020). El EX está influenciado por una serie de componentes de diferentes parámetros, incluida la PG, la actividad de varias enzimas clave necesarias para las actividades citolíticas, amilolíticas y proteolíticas. En las células del endosperma los gránulos de almidón están embebidos en una matriz proteica, que constituye aproximadamente el 9% del endosperma con almidón. La fuerza con la que la proteína se adhiere al almidón y las paredes celulares varía en diferentes granos. Donde la proteína es dura y su adherencia es fuerte puede ser responsable de la dureza de la malta. Si bien gran parte de esta proteína sirve como reserva de aminoácidos y parte de ella se deposita como pequeños cuerpos proteicos en el endosperma, la cebada con un alto contenido de nitrógeno puede tardar en absorber agua y en modificarse durante el malteado (Briggs, 1998). De esta forma las enzimas amilolíticas tienen el acceso restringido al almidón por lo que el extracto disminuye su contenido de azúcares fermentables. Por la misma razón el EX se relaciona también negativamente con el contenido de BG. Los BG son el componente mayoritario de las paredes celulares de las células del endosperma juntos con proteínas de mayor peso molecular y pentosanos. Si estos no son debidamente degradados durante el proceso de malteo, impiden la correcta modificación de la malta y el acceso a los gránulos de almidón por parte de las enzimas. Si bien esta correlación negativa entre el EX y los BG es consistente con otras publicaciones previas (Mather *et al.*, 1997; Mohammadi *et al.*, 2015; Kochevenko *et al.*, 2018; Cammarota *et al.*, 2019; Looseley *et al.*, 2020), en los casos donde se analiza la actividad del β -glucanasa en lugar del contenido de BG, se puede ver que el EX mantiene una correlación positiva con el contenido de esta enzima, lo cual tiene sentido dado que su actividad ayuda a liberar el almidón de la célula del endosperma al romper la pared celular (Emebiri *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2016). Por otro lado, el contenido de PG se correlacionó positivamente con el NS lo cual era esperable (Mather *et al.*, 1997; Kochevenko *et al.*, 2018; Cammarota *et al.*, 2019;

Looseley *et al.*, 2020). En la germinación del proceso de malteo entre el 38-46 % del total de las moléculas nitrogenadas son degradadas a solubles, formándose compuestos de alto, medio y bajo peso molecular (proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos) debido al funcionamiento de las peptidasas (proteólisis), por lo que cuanto mayor sea el contenido de PG mayor contenido de NS se esperaría. El NS se correlacionó negativamente con el contenido de BG, lo que también coincide con publicaciones previas (Mather *et al.*, 1997; Looseley *et al.*, 2020; Kochevenko *et al.*, 2018). Emebiri *et al.* (2004) y Mohammadi *et al.* (2015) si bien no incluyeron en su estudio el contenido de NS, los BG se correlacionaron negativamente con el contenido de FAN presente en mosto. FAN es considerada un valor proporcional al de NS, incluso a nivel nacional en situaciones donde se imposibilita el realizar los análisis de FAN se lo estima considerando que corresponde al 21% del valor de NS, por lo que tiene sentido que también se correlacione negativamente con FAN (com. pers Valeria Lanaro, LATU). El nivel de NS es un indicador de la modificación proteolítica de la malta y los BG de la modificación citolítica. Cuanto mayor sea la disgregación proteolítica más BG de alto peso molecular se liberan a través de la ruptura de los enlaces carboxílicos que une a los BG con las proteínas (β -glucan-solubilasa). Estos BG son degradados por las endobetaglucanasas presentes haciendo que la concentración de BG sea menor en el mosto.

En general las poblaciones pequeñas tienen limitaciones en el estudio de QTLs debido a que no tienen suficiente potencia para encontrar asociaciones marcador/carácter significativas o también tiene la posibilidad de producir muchos falsos positivos (Gutierrez *et al.*, 2011). En el caso particular del mapeo asociativo el tamaño de la población a utilizar depende del parentesco de los individuos, de la caída del DL y del tipo de estudio a realizar (genes candidatos o genoma completo) y también del número de marcadores utilizados en el genotipado (Zhu *et al.*, 2008). En el caso de trabajar con una especie autógama como la cebada también limita la posibilidad de generar poblaciones de gran tamaño y más aún que sean representativas del germoplasma existente en los programas de mejoramiento. A esto se suma que los análisis de fenotipado de calidad de malta son muy caros, requieren tiempo y cantidades importantes de semilla para llevarlos a cabo, con lo que se debe marcar un equilibrio entre el tamaño de la población y los ambientes donde son evaluados. Varios estudios de GWAS se han llevado a cabo con poblaciones menores a 150 individuos (como en este caso) con resultados exitosos de detección de QTLs, incluso con menos cantidad de marcadores en el análisis que los utilizados en este

trabajo (Gutierrez *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2012; Cu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018), por lo que las consideraciones antes mencionadas no fueron una limitación para la detección de QTLs dentro del germoplasma estudiado.

La estructura de la población determinada por el PCA marca una agrupación de los genotipos según la cruce a la que pertenecen conformando 4 grupos claramente definidos, lo cual es un resultado esperable e indica el rol de la cruce en la estructura de la población estudiada (Figura 4).). A su vez las cuatro familias se agruparon según la relación entre las líneas parentales. Por otro lado, los datos de SNP indican un grado medio - alto de similitud genética entre las líneas parentales, que van del 36 al 74% (Verocai, 2021). El mapa genético y físico mostraron una adecuada cobertura del genoma con una densidad promedio marcadores de 6.3 marcadores/cM. La caída del DL estuvo dentro de lo esperable en función de las características de la población utilizada. Es una caída lenta, pero al igual que la estructura de la población, se consideraron adecuadas y suficientes para la detección de regiones genómicas vinculadas a los caracteres estudiados.

La definición de alelo o haplotipo (en el caso de considerar varios marcadores) favorable considera las definiciones por parte de la industria. En el caso de BG valores bajos son los deseables. Para EX el objetivo es maximizar el valor por lo que los valores altos son los favorables. En el caso del NS, es una variable donde los valores deseados por la industria se encuentran en un rango acotado, es decir que los extremos son indeseables. A nivel de Uruguay, en base a los índices definidos para la evaluación de cultivares (con participación de la industria) (<https://www.inase.uy/EvaluacionRegistro/>), los valores deseables se encuentran entre 650 y 870mg/100g. Valores por fuera de ese rango son no aceptables y el óptimo corresponde a 760 mg/100g. Esto se debe a que se desea una disgregación proteolítica moderada, pero no extrema. En el caso de PG, los valores deseados por de la industria (e incluidos en los contratos con los productores) se encuentran entre 9 y 12.5 %. En función de lo anterior y teniendo en cuenta que los BLUEs de los 4 padres fenotipados tiene valores medio-bajo para PG y bajos para NS (Tabla 1) se considera como deseables los haplotipos que aumenten el valor de la media de ambos parámetros.

Para la discusión, los QTLs detectados en las diferentes localidades y para diferentes caracteres se agruparon en función de la posición de su marcador más significativo y para facilitar la

discusión la ubicación del QTL será referida a la de dicho marcador (Tabla 6). Para la comparación entre los QTLs detectados en el presente análisis y los ya reportados en trabajos previos se utilizó el mapa POPSEQ_2017 disponible en Barleymap (<http://floresta.eead.csic.es/barleymap/>) como referencia. En los casos donde los marcadores reportados no se encontraron en dicho mapa las posiciones relativas de estos QTLs (como sucedió con las siguientes publicaciones: Panozzo *et al.*, 2007, Szucs, *et al.*, 2009, Laidó *et al.*, 2009, Beattie *et al.*, 2010, Elía *et al.*, 2010, Gutierrez *et al.*, 2011, Zhou *et al.*, 2012, Matthies *et al.*, 2014 y Mohammadi *et al.*, 2015) se determinaron alineando sus marcador/es asociado/s con algún mapa consenso que estableciera ligamiento físico entre el marcador detectado y algún marcador ancla que pudiese también estar presente en mapas consenso genéticos con SNPs como el desarrollado por Muñoz-Amatriaín *et al.* (2011). Para esto se empleó la base de datos genómicos disponible en la plataforma GrainGenes (<http://www.Graingen.es>). Luego se usó la posición aproximada de los marcadores del mapa de Muñoz-Amatriaín *et al.* (2011) para resaltar las regiones genómicas que especifican estos QTLs (Tabla 6). Los genes o QTLs reportados previamente que estén asociados con calidad de malta o de la cerveza y que se ubiquen dentro de la ventana definida por la caída de LD para cada cromosoma (Figura 5) fueron considerados.

En la agrupación de los QTLs se pudo determinar dos zonas hotspot, una en el cromosoma 2H y la otra en el 5H (Tabla 6). En el cromosoma 2H entre los 80.03 y los 92.78 cM se detectaron QTLs asociados a NS y a PG, coincidiendo tres QTLs (2 para NS y 1 para PG) a los 80.03 cM y otros dos con picos que distan en casi 3 cM (89.80 cM para PG y 92.78 cM para NS) por lo que dichos QTLs se encuentran solapados. En los QTLs ubicados a los 80.03 cM (asociados a los marcadores JHI-Hv50k-2016-107816, JHI-Hv50k-2016-107449 y JHI-Hv50k-2016-107749) el haplotipo favorable proviene de Cle 267, Cle 268 y Livia. En el QTL ubicado en el 89.80 cM (JHI-Hv50k-2016-110405) para PG el haplotipo favorable proviene de Cle 267 y Cle 268 mientras que para el QTL a los 92.78 cM (JHI-Hv50k-2016-112096) para NS los alelos favorables son aportados por Cle 267. Estos QTLs fueron coincidentes con reportes anteriores. Elía *et al.* (2010) encontraron que el marcador con mayor asociación significativa al carácter de PG fue *vrs1* (80.88 cM), explicando un promedio de 54% de la variación fenotípica. En el mismo estudio encontraron que el mismo marcador se asoció tanto para NS como para el IK (relación entre el nitrógeno soluble y el nitrógeno total presente en el mosto). Kochevenko *et al.* (2018), por otro lado, detectaron un QTL para proteína soluble asociado al marcador BOPA1_11591-265

Tabla 6. Resumen de los QTLs detectados y su comparación con reportes previos de QTLs en la misma región cromosómica

QTLs detectados en el presente estudio					QTLs reportados previamente				
Cro. ^a	cM ^b	Marcador ^c	Carácter ^d	N° QTL ^e	Marcador ^f	SNP ligado ^g	cM ^h	Carácter ⁱ	Referencias ^j
1H	9.92	2016-8325	EX	1	Hor2 11_21226	1_0410	4.96 8.43	EX EX, FR	Szücs et al., 2009 Castro et al., 2012
	15.08	2016-10365	EX	2	Hor1 SCRI_RS_205669 12_30948	3_0588	15.09 17.78 17.85	EX IK EX	Szücs et al., 2009 Kochevenko et al., 2018 Mohammadi et al., 2015
	24.50	2016-74681	NS	5	GBMS229	11_21015	23.16	PM	Li et al.,2005
2H	40.08	2016-78167	NS	6	11_10987 Pox	11_21049	39.21 40.09	PD PG	Castro et al.,2012 Szücs et al., 2009
	80.03	2016-107816	NS	7	vrs1	11_11533	80.88	EX, IK, NS	Elía et al., 2010
		2016-107449		8					
		2016-107749		14					
	89.80	2016-110405	PG	15	11_10214 SCRI_RS_170162		86.61 92.78	AA PG	Belcher et al., 2018 Fan et al., 2017
	92.78	2016-112096	NS	9	BOPA1_11591-265		88.53	PS	Kochevenko et al., 2018
142.63	2016-141795	EX	3						
4H	24.38	2016-229394	BG	18	BOPA2_12_30540		19.66	BG, VIS, FR	Kochevenko et al., 2018
5H	41.74	2016-287830	EX	4	bPb-9163		44.10	PG	Matthies et al., 2014
	44.17	2016-292121	BG	19	bPb-9163		44.10	FR	Matthies et al., 2014
		2016-293507		11_21318	44.51	BG	Castro et al.,2012		
				JHI-Hv50k-2016-304397	47.37	VIS	Looseley et al.,2020		
	50.00	2016-305809	NS	10/11/12/13	11_21318		44.51	NS	Castro et al.,2012
			BG	21/22	GBM1039	11_11221	48.26	PD	Wang et al., 2015
	135.95	2016-343384	BG	23	2906-1177	SCRI_RS_205235	55.56	BG	Islamovic et al., 2014
	139.24	2016-345420	PG	16	12_30062		139.10	BG, NS	Gutierrez et al., 2011
bPb-1494					3_0795	139.10	PG	Matthies et al., 2014	
bPb-0171					2_0317	143.68	NS	Elía et al., 2010	
151.25	2016-351372	BG	24	E38M50-215	11_10582	144.65	VIS	Laidó et al.,2009	
7H	108.78	2016-500871	PG	17	bPb_1669	3_0362	104.82	VIS	Matthies et al., 2014

- a- Cromosoma donde fue detectado el QTL
 - b- Posición en el cromosoma (en cM) del marcador más significativo del QTL
 - c- SNP más significativa del QTL. Se eliminó la nomenclatura JHI-Hv50k que precede al marcador
 - d- Carácter en estudio
 - e- Numero de QTL asignado en la Tabla 4
 - f- Marcador reportado ubicado dentro del QTL detectado en el corriente estudio
 - g- SNP ligado al Marcador^f según el POPSEQ 2017 en Barleymap
 - h- Ubicación del SNP ligado^g según el POPSEQ 2017 en Barleymap
 - i- Carácter para el que fue reportado el Marcador^f
 - j- Referencia Bibliográfica
- EX, extracto de malta; FR, friabilidad; PG, proteína en grano; IK, índice de Kolbatch; PM, proteína en malta; PD, poder distásico; NS, nitrógeno soluble; AA, alfa amilasa; PS, proteína soluble; BG, β -glucanos; VIS, viscosidad

(88,53 cM) que explicó el 1% de la variación fenotípica, mientras que Fan *et al.*, 2017 detectaron un QTL asociado al marcador SCRI_RS_170162 (92.78 cM) para PG. Los componentes nitrogenados varían según la variedad, el clima, el tipo de suelo y la cantidad de fertilizante aplicada por el productor. El nivel de degradación proteolítica de esos componentes está sujeto al esquema de malteo utilizado y sus productos finales causarán efectos diferentes en el crecimiento de la levadura, en la filtración del mosto, estabilidad de espuma y en la composición de metabolitos que determinarán el sabor de la cerveza (Fang *et al.*, 2019). Como mencionamos antes el NS y el contenido de PG están estrechamente relacionados y mantienen una correlación positiva (Cai *et al.*, 2013).

En la misma región genómica (86.61 cM del cromosoma 2H) Belcher *et al.* (2018) detectaron efectos significativos en el marcador 11_10214 para la actividad de la enzima α -amilasa (AA). Ese marcador está ubicado a 3.19 cM del marcador JHI-Hv50k-2016-110405 asociado a PG y a 6.17 cM del marcador JHI-Hv50k-2016-112096 asociado a NS en este estudio. Belcher *et al.* (2018) proponen como gen candidato a AK376058, que codifica para la enzima glucósido hidrolasas, familia 28. La AA es una enzima que cataliza la hidrólisis al azar de los enlaces alfa- glucosídicos (1-4) de las cadenas de almidón del endosperma. Al ser la AA una endoenzima, su acción origina la generación de dextrinas. La acción combinada de esta enzima con otras (como beta-amilasa, dextrinasa límite, maltasa, etc.) son capaces de degradar almidón en una mezcla compleja de azúcares (glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa, oligosacáridos y dextrinas). Las glucósido hidrolasas, en especial la familia 28, son las encargadas, de degradar la pectina (<1%) presente en las paredes celulares del endosperma (Briggs, 1998). La degradación de las paredes celulares gracias a las glucósido hidrolasas (entre otras) ayuda al ingreso y actividad de las enzimas amilolíticas al interior de las células del endosperma por lo que la relación entre estas dos enzimas es esperable dado

que contribuyen a la modificación de la malta. A su vez, como vimos anteriormente, una malta bien modificada, con buena modificación proteolítica conlleva a tener valores de NS deseados por la industria. Esto también se puede corroborar viendo los valores de correlación positiva existentes entre los valores fenotípicos del NS (o IK) y AA (IK vs AA es de 0.80, 0.85 y 0.49 según Mohammadi *et al.* (2015), Pauli *et al.* (2015) y Cu *et al.* (2016) respectivamente, y en el caso de NS vs AA es de 0.47 y 0.59 según Cu *et al.* (2016) y Zhou *et al.* (2016) respectivamente). El hecho de que estos caracteres correlacionados tengan efectos de QTL coincidentes sugiere la posibilidad de estar ante una región con efectos pleiotrópicos sobre tales variables, aunque la evidencia no permite concluir al respecto.

La otra zona hotspot detectada fue en el cromosoma 5H entre 41.74 y 50.00 cM, donde se encontraron QTLs para EX, NS y BG. El QTL detectado para EX se ubica en 41.74 cM (JHI-Hv50k-2016-287830) y el haplotipo favorable es dado por Kalena. Los QTLs encontrados para NS se ubican a 44.17cM (JHI-Hv50k-2016-292121, JHI-Hv50k-2016-293507) pero por problemas con el genotipado de los padres no podemos identificar la fuente de los alelos favorables. En 50.00 cM se encontraron 6 QTLs coincidentes, cuatro para NS y otros dos para BG asociados al mismo marcador JHI-Hv50k-2016-305809 y en todos los casos los alelos favorables son aportados por Conchita, Cle 267, Kalena y Livia. Matthies *et al.* (2014) utilizando información fenotípica acumulada durante 25 años en 174 cultivares europeos de cebada de primavera e invierno detectó el marcador bPb-9163 ubicado a los 44.10 cM para los caracteres de PG y friabilidad (FR, método rápido para evaluar la disgregación citolítica de la malta). Este marcador se ubica a 2.36 cM del marcador JHI-Hv50k-2016-287830 asociado a EX y a 0.07 cM de los marcadores JHI-Hv50k-2016-292121 y JHI-Hv50k-2016-293507 asociados a BG en el presente estudio. Como ya se mencionó antes, PG y EX presentan una alta correlación negativa, siendo el mismo caso entre BG y FR (-0.92 y -0.58 según Kochevenko *et al.* (2018) y Looseley *et al.* (2020) respectivamente) dado que ambos miden la modificación citolítica de la malta. Cuanto menor es el contenido de BG en el mosto, más friable (mejor modificada) está la malta. En el primer estudio de GWAS sobre calidad maltera realizado en Uruguay utilizando germoplasma de diferentes orígenes, Castro *et al.* (2012) detectaron el marcador 11_21318 (44.51 cM) vinculado a BG y NS. Looseley *et al.* (2020) utilizando la información generada en un set histórico de datos del Reino Unido de ensayos nacionales (1988 -2016) detectó el marcador JHI-Hv50k-2016-304397 vinculado al carácter de viscosidad (VIS). Este marcador se ubica a 3.20 cM de los marcadores JHI-Hv50k-2016-292121 y JHI-Hv50k-2016-293507 y a 2.63 cM del marcador JHI-Hv50k-2016-

305809, los tres asociados al carácter de BG en este estudio. La VIS está altamente relacionada al contenido de BG (0.86 y 0.56 según Kochevenko *et al.* (2018) y Looseley *et al.* (2020) respectivamente). Los BG junto con los arabinosilanos (pentosanos) son los principales componentes de la pared celular del endosperma que pueden formar soluciones muy viscosas, reduciendo la tasa de lixiviación de EX, la tasa de filtración y la calidad de la cerveza terminada (Jamar *et al.*, 2011). Por lo tanto, una baja VIS en la malta es necesaria para una alta calidad de malta. Aunque el BG es uno de los componentes principales de la pared celular, no es el único parámetro que controla la VIS.

Wang *et al.* (2015) utilizando una población biparental (TX9425 × Naso Nijo) detectaron un QTL (QDp.NaTx-5H) para el carácter poder diastásico (PD) asociado al marcador GBM1039 (48.26 cM), que explicó el 20,9% de la varianza fenotípica. Si bien el PD no fue una variable medida en este estudio, es un parámetro crítico de calidad de malta. Representa la actividad colectiva de 4 enzimas disgregadoras del almidón como son la alfa-amilasa (AA), beta-amilasa, dextrinasa límite y alfa-glucosidasa. Antiguamente y de manera general, las variedades con extracto muy alto, como las cebadas europeas, solían tener bajo poder diastásico y las de elevado poder diastásico, como las de Estados Unidos o Canadá, tendían a extractos más bajos. Sin embargo, el uso de germoplasma de los diferentes continentes en el mejoramiento, esa asociación entre origen y extracto/poder diastásico fue reduciéndose. En la misma región genómica, Islamovic *et al.* (2014) detectaron un QTL para BG asociado al marcador 2906-1177 a los 55.56 cM, ubicado a 5.49cM del marcador JHI-Hv50k-2016-305809 asociado tanto a BG, como a NS en este estudio. El marcador 2906-1177 es homólogo del marcador Os09g23650 de arroz, ubicado en el cromosoma 9 asociados a un gen de la familia A de la celulosa sintasa (CesA9; Os09g25490) y al gen de la familia C similar a la celulosa sintasa (CslC2; Os09g25900) que participan en la síntesis de fibras. Con la información aportada por el presente estudio como por la bibliografía se observa que es una región genómica que tiene un alto impacto (9 de los 24 QTls detectados) en los parámetros malteados estudiados, sobre todo en los vinculados a la modificación citolíticas de la malta. Si bien no hay suficiente información para concluir si se trata de uno o más QTls afectando diferentes parámetros relacionados, es una zona de interés para continuar investigando, dado que parte de esta región genómica fue consistentes en cada una de las 3 localidades analizadas y en el análisis en conjunto de todas las localidades (específicamente marcador JHI-Hv50k-2016-305809).

En el caso de EX, otros dos QTLs se encuentran solapados en el 1H, uno de ellos con el pico en el marcador JHI-Hv50k-2016-8325 (9.92 cM) encontrado en MOSA y el otro con el pico en el marcador JHI-Hv50k-2016-10365 (15.08 cM) en TODAS. En el caso del primero los alelos favorables provienen de Cle 267 y en el segundo tanto de Cle 267, como de Cle 268. Szücs *et al.*, (2009) detectaron el marcador Hor2 (4.96 cM) el cual es significativo para el QTL QMe.StMo-1H.1 y el marcador Hor1 (15.09) significativo para el QTL QMe.StMo-1H.2, ambos QTL detectados para EX. En esta región del 1H se encuentran los genes que codifican para las hordeínas (uno de los cuatro tipos de proteína que forman parte del grano de cebada) y se encontraron asociaciones significativas con el PD y el EX en varias poblaciones de cebada (Hayes *et al.*, 1993; Mather *et al.*, 1997; Márquez -Cedillo *et al.*, 2000). La relación de los diferentes tipos de hordeínas con el EX es controversial y discutida (Qi *et al.*, 2005). Castro *et al.* (2012) detectaron efectos significativos para EX y FR asociados al marcador 11_21226 (8.43 cM) mientras que Mohammadi *et al.* (2015) detectaron el marcador 12_30948 (17.85 cM) asociado a PG. Kochevenko *et al.* (2018) encontraron efectos significativos en el marcador SCRI_RS_205669 (17.78 cM) para IK. Como se explicó anteriormente estos parámetros están estrechamente relacionados, el EX y la FR mantienen una correlación positiva (0.57, 0.63 y 0.81 Kochevenko *et al.* (2018), Looseley *et al.* (2020) y Matthies *et al.* (2014) respectivamente) dado que cuanto mayor sea la modificación citolítica mayor va a ser explosión de los gránulos de almidón, y con ello el aumento del valor del EX. Cabe destacar que entre 90 y 92% del extracto soluble en el mosto está constituido por carbohidratos y el restante 8 a 10% consiste en proteínas, péptidos, aminoácidos, y en menor proporción, lípidos, vitaminas y minerales (Arias, 1991). El IK es un indicador de la modificación proteolítica de la malta por lo que está altamente correlacionado con PG, NS y FAN (Cu *et al.*, 2016).

El restante QTL detectado para EX fue localizado en 142 cM del 2H asociado con el marcador JHI-Hv50k-2016-141795. Los alelos favorables provienen de Conchita y Cle 267 (Tabla 5). En esta región genómica no se encontraron reportes de asociación con variables de calidad maltera en la bibliografía revisada.

Con respecto a NS se detectaron dos QTLs más en el 2H, uno ligado al marcador JHI-Hv50k-2016-74681 (24.50 cM) y el otro al marcador JHI-Hv50k-2016-78167 (40.08 cM). En ambos casos los alelos favorables provienen de Cle 267 (Tabla 5). Li *et al.* (2005) detectaron al marcador GBMS229 ligado al QTL denominado *Qpc2.1* ubicado 23.16 cM asociado al contenido de proteínas. Castro *et al.* (2012) detectaron el marcador 11_10987 (39.21 cM)

asociado a PD. Szúcks *et al.* (2009) detectaron el marcador Pox (40.09 cM) ligado al QTL denominado *QGpc.StMo-2H.1* asociado a PG. Si bien como ya fue mencionado la correlación entre PG y NS es altamente positiva no lo es tanto entre NS y PD (Matthies *et al.*, 2014; Looseley *et al.*, 2020) si bien es suficiente para detectarla.

Otros QTLs se detectaron asociados al contenido de BG. En INIA se detectó el marcador JHI-Hv50k-2016-229394 ubicado a los 24.38 cM del 4H, donde los alelos favorables provienen de Conchita, Cle 267, Livia y Kalena (Tabla 5). Esta información fue coincidente con la encontrada por Kochevenko *et al.* (2018), quienes identificaron un QTL para VIS, FR y BG en el brazo corto del cromosoma 4H ligado al marcador BOPA2_12_30540 ubicado a 4.72 cM del marcador en este reporte. Anteriormente, un locus que controla la viscosidad y ubicado en el cromosoma 4H fue reportado en la población VB9524 * ND11231_12 (Emebiri *et al.*, 2004), sin embargo, su ubicación precisa no pudo ser aclarada debido a la falta de marcadores comunes en los mapas utilizados. Otros dos QTLs fueron detectados en este estudio, uno ligado al marcador JHI-Hv50k-2016-343384 (135.95 cM) y el otro al marcador JHI-Hv50k-2016-351372 (151.25 cM) del 5H en MOSA (Tabla 4). Si bien no se pudo detectar el origen de los alelos favorables del primero por pérdida de información, se determinó que en el segundo QTL los alelos favorables provienen de Cle 267 y de Livia. Estos dos QTLs fueron coincidentes con reportes previos donde Gutierrez *et al.* (2011) detectaron un el marcador 12_30062 (139.10 cM) asociado a BG y Laidó *et al.* (2009) detectaron el marcador E38M50-215 (144.65cM) asociado a VIS.

En lo que refiere a PG otros dos QTLs fueron detectados, uno de ellos ligado al marcador JHI-Hv50k-2016-345420 a los 139.24 cM del 5H y el otro ligado al marcador JHI-Hv50k-2016-500871 a los 108.78 cM del 7H, ambos detectados en la localidad de MOSA (Tabla 4). Para el primer QTL los alelos favorables provienen de Conchita, Kalena y Livia mientras que para el segundo QTL los alelos favorables provienen de Cle 267, Kalena y Cle 268 (Tabla 5). Matthies *et al.* (2014) detectaron el marcador bPb-1494 a los 139.10 cM asociado a PG mientras que Elía *et al.* (2010) detectaron bPb-0171 los 143.68 del 5H asociado a NS, coincidiendo con lo encontrado en este estudio no solo en la región genómica sino también con el parámetro de asociación. Por otro lado, Matthies *et al.* (2014) detectaron el marcador bPb_1669 ubicado a los 104.82cM del 7H asociado a la VIS, que se encuentra a 3.96 cM del marcador JHI-Hv50k-2016-500871 detectado en el presente estudio. PG y VIS presentan correlación positiva. El valor excesivo de PG se asocia a un aumento de la viscosidad del mosto y a la disminución de la estabilidad de la cerveza (Cu *et al.*, 2016).

No se ha detectado efectos de asociados en fase de repulsión, lo que significa que los alelos asociados con valores favorables para un carácter no se asociaron con valores negativos para otro. Por ejemplo, el marcador JHI-Hv50k-2016-305809 detectado en todas las localidades asociado a NS y también asociado a BG en EEMAC y en TODAS (Tabla 4) presenta que los alelos asociados a valores de NS altos también están asociados a valores de BG bajos (Tabla 5) lo que permite una perspectiva bastante optimista para la mejora simultánea de los diferentes caracteres sin el riesgo de respuestas negativas asociadas.

Otro tema de particular interés para el mejoramiento es la relación entre los marcadores asociados a los caracteres de calidad de la malta y los asociados a los caracteres agronómicos. La mayoría de las regiones genómicas asociadas con la calidad no mostraron asociaciones con caracteres agronómicos, con algunas excepciones como fueron las detectadas en el 1H, donde Vercocai (2021) detectó una zona denominada “QTL hotspot 1H_01”, localizada entre los marcadores JHI-Hv50k-2016-97 y JHI-Hv50k-2016-8841 y con un largo de 9.81 cM (0.11–9.92 cM) con efecto significativo en el período de llenado de grano (GF), tiempo desde el momento de la emergencia a madurez fisiológica (Z90), rendimiento de granos con diámetro > 2,5 mm (PY), respuesta al fotoperíodo en llenado de grano (PPR_GF), respuesta al fotoperíodo en el período de emergencia a madurez fisiológica (PPR_Z90) y rendimiento de grano (YLD) y la otra zona “QTL hotspot 1H_02” localizada entre los marcadores JHI-Hv50k-2016-10363 y JHI-Hv50k-2016-13004 de un largo total de 12.33 cM (15.08-27.41 cM) con efecto significativo en PPR_GF, PPR_Z90 y YLD, que se solapan con las detectadas en el presente estudio con las regiones asociadas a EX.

El presente estudio contribuye a la comprensión de las bases genéticas de variables malteras relevante de la cebada. La calidad de malta en la cebada es un complejo integral de muchos indicadores, que se ven afectados por elementos tanto genéticos como ambientales (y la interacción entre ambos), y también están presentes interacciones positivas y negativas entre estos indicadores. El uso de técnicas de mejoramiento convencionales para mejorar el conjunto de parámetros de calidad requeridos enfrenta una serie de dificultades, como es la baja eficiencia de selección, los largos ciclos de selección y la dificultad para seleccionar para genes de caracteres cuantitativos. Teniendo en cuenta el alto costo de fenotipado, es necesario mejorar uno o varios caracteres durante el proceso de mejora en forma simultánea para que el progreso en la liberación de nuevos cultivares sea efectivo.

Por medio del mapeo asociativo del genoma completo (con corrección de estructura por modelo Eigenstrat) por modelo realizado en este trabajo se detectaron 24 QTL para los EX, NS, PG y BG de los cuales sólo en uno no se encontraron reportes previos. El carácter con más QTLs fue NS (7), luego BG (6), PG (4) y EX (2). En el análisis conjunto de las tres localidades se detectaron 2 QTLs para EX, 2 para NS, 1 para BG y ninguno para PG. Los cromosomas con mayor cantidad de QTLs fueron el 5H y el 2H, con 12 y 8 respectivamente. En estos dos cromosomas se detectaron dos zonas hotspot, en el cromosoma 2H entre los 80.03 y los 92.78 cM y en el cromosoma 5H entre los 41.74 y 50.00 cM.

La población utilizada estuvo conformada por 145 individuos doble haploides originados a partir de cruzamientos entre cultivares europeos de alto rendimiento y alta calidad maltera, y cultivares adaptados a las condiciones ambientales locales. Los cinco padres utilizados para realizar las cuatro cruzas que dieron origen a la población en estudio son representativos del material genético utilizado para los cruzamientos en los programas de mejoramiento nacionales. Debido a que se trata de una población de dobles haploides generada a partir de la F1 (solo un evento de recombinación) obtenida de cruzamientos entre cultivares modernos elite, es esperable que entre los individuos de la población provenientes de materiales elite exista una baja diferencia genética dado que es posible que gran parte de los alelos favorables ya se encuentren fijados y presenten grandes regiones conservadas como consecuencia de los sucesivos procesos de selección. Por otro lado, los dos parentales locales utilizados en las cruzas (CLE 267 y Cle 268) comparten el cultivar Arrayán como padre y mantienen una similitud genética de 74% mientras que el máximo de similitud entre parentales europeos fue de 69% (Conchita y Kalena). La menor similitud genética entre los parentales se observó entre los cultivares CLE268 y Kalena con un 36%. (Verocai, 2021). Lo antes mencionado fundamenta la baja caída de DL ($r^2=0,20$) calculada en la población, con un valor máximo de 16,4 cM en el cromosoma 3H y un mínimo de 9,9 cM en el cromosoma 6H. La baja caída de desequilibrio presente en la población (en conjunto con el tamaño de la población) limitó la resolución del análisis, marcando la presencia de grandes bloques de ligamiento y por lo tanto que los QTL detectados fueran de gran longitud. Apesar de lo antes mencionado y gracias a la alta cantidad de marcadores utilizados que lograron una amplia cobertura (promedio de 6.3 marcadores/cM) del genoma completo se logró la detección de regiones cromosómicas responsables de variables malteras de interés que serán útiles para seleccionar genotipos favorables en las en los programas de mejoramiento locales. En el mismo sentido, el haber utilizado parentales elite para la creación de la población tiene como principal ventaja la

rápida utilización de los conocimientos generados ya que dichos resultados fueron generados a partir de individuos representativos de los materiales presentes en programas de mejoramiento nacionales, y así mejorar la eficiencia y acelerar el desarrollo de nuevos cultivares.

La SAM presenta potencial para el mejoramiento de cebada para malta y se ha aplicado con éxito (Han *et al.*, 1997; Igartua *et al.*, 2000; Thomas, 2003; Rae *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018). Si bien en este trabajo, donde se utilizó material elite (sin “defectos graves”), parentales donantes con alelos favorables para mejorar la calidad de malta y marcadores polimórficos estrechamente vinculados a dicho alelos, abre la puerta a la posible implementación de SAM para calidad de malta en los programas nacionales también hay que tener en cuenta que este tipo de estudios tienen un poder limitado, por lo que no es posible identificar todos los QTL involucrados en un carácter determinado. Al utilizar material de elite muchas regiones genómicas están fijadas dejando poco espacio para detectar QTLs relevantes y de impacto. Para superar esta limitante es que se propuso alternativas de selección genómica (SG) (Meuwissen *et al.*, 2001) en la que no se hace énfasis en los marcadores que superaran un determinado nivel de significancia, sino que se utilizan todos los marcadores para realizar una predicción del fenotipo que es directamente utilizada en el programa de mejoramiento. La selección genómica es una herramienta que permite la predicción de caracteres complejos basadas en el estado alélico de los marcadores moleculares donde se saltea la etapa de identificación de las bases genéticas asociadas a los caracteres cuantitativos para predecir los fenotipos directamente. Con la complementación de ambos enfoques (SAM y SG) se lograría una visión más amplia donde se contrarrestaría aquellas pérdidas que podrían producir por romper las interacciones epistáticas que sean favorables para la calidad maltera (cruciales al momento de liberar cultivares) y en las cuales la selección genómica aporta grandes ventajas por disminuir los costos asociados a su medición.

5- BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Haleem, H., Bowman, J., Giroux, M., Kanazin, V., Talbert, H., Surber, L. y Blake, T. (2010) Quantitative trait loci of acid detergent fiber and grain chemical composition in hulled × hull-less barley population. *Euphytica*. 172(3):405–18. doi:10.1007/s10681-009-0066-6
- Abdel-Haleem, H., Bowman, J., Surber, L. y Blake, T. (2012) Variation in feed quality traits for beef cattle in Steptoe × Morex barley population. *Molecular Breeding*. 29(2):503–14. doi:10.1007/s11032-011-9567-9
- Alqudah, A. M., Sallam, A., Baenziger, P. S., y Börner, A. (2020). GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate Cereals: lessons from Barley—A review. *Journal of advanced research*, 22, 119-135. doi:10.1016/j.jare.2019.10.013
- Anuario Estadístico de DIEA 2021.
<https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021>
- Arias, G. (1991). Calidad industrial de la cebada cervecera. 54 p. Serie Técnica N° 18. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Montevideo, Uruguay.
- Ariyadasa, R., Mascher, M., Nussbaumer, T., Schulte, D., Frenkel, Z., *et al.* (2014). A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms. *Plant physiology*, 164(1), 412-423. doi:10.1104/pp.113.228213
- Baik, B.K. y Ullrich, S.E. (2008) Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *J Cereal Science*, 48(2):233–42. doi:10.1016/j.jcs.2008.02.002
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selcker, E.U., Cresko, W.A. y Johnson, E.A. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE* 3: e3376. doi:10.1371/journal.pone.0003376 PMID: 18852878
- Bamforth, C.W. (2003). Barley and malt starch in brewing: A general review. *Technical quarterly-Master Brewers Association of the Americas*, 40(2), 89-97.

- Bamforth, C. W. (2009). Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J Cereal Science* 50:353–357. doi:10.1016/j.jcs.2009.03.001
- Bamforth, C. W. (2017). Progress in brewing science and beer production. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 8, 161-176. doi:10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450
- Barr, A., Karakousis, A., Lance, R.C.M., *et al.* (2003) Mapping and QTL analysis of the barley population Chebec × Harrington. *Aust J Agric Res* 54:1125–1130. doi:10.1071/AR02215
- Bayer, M.M., Rapazote-Flores, P., Ganal, M., Hedley, P.E., Macaulay, M., Plieske, J., Ramsay, L., Russell, J., Shaw, P.D., Thomas, W. y Waugh, R. (2017) Development and evaluation of a barley 50k iSelect SNP array. *Front Plant Sci* 8:1792. doi:10.3389/fpls.2017.01792
- Beattie, A.D., Edney, M.J., Scoles, G.J., y Rossnagel, B.C. (2010) Association mapping of malting quality data from western Canadian two-row barley cooperative trials. *Crop Science* 50:1649–1663. doi: 10.2135/cropsci2009.06.0334.
- Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F. y Heun, M. (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 249: 65–73 doi:10.1007/BF00290237
- Beier, S., Himmelbach, A., Colmsee, C., Zhang, X. Q., Barrero, R. A., *et al.* (2017). Construction of a map-based reference genome sequence for barley, *Hordeum vulgare* L. *Scientific Data*, 4(1), 1-24. doi:10.1038/sdata.2017.44
- Belcher, A. R., Cuesta-Marcos, A., Smith, K. P., y Hayes, P. M. (2018). TCAP FAC-WIN6 Elite Barley GWAS Panel QTL. II. Malting Quality QTL in Elite North American Facultative and Winter Six-Rowed Barley Identified via GWAS. *Crop Science*, 58(1), 120-132. doi:10.2135/cropsci2017.03.0204
- Bennett, M. y Smith, J. (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, *Biological Sciences*, 274 (933), 227–274. doi:10.1098/RSTB.1976.0044
- Bhatta M, Gutiérrez L, Cammarota L, *et al* (2020) Multi-trait Genomic Prediction Model Increased the Predictive Ability for Agronomic and Malting Quality Traits in Barley

- (*Hordeum vulgare* L.). *G3 Genes, Genomes, Genetics* 10:1113–1124. doi: 10.1534/g3.119.400968
- Blattner, F. R. (2009) Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus *Hordeum* (Poaceae: Triticeae). *Breeding Science*, 59(5), 471–480. doi:10.1270/jsbbs.59.471
- Bockelman, H. E. y Valkoun, J. (2011) in *Barley: Production, Improvement, and Uses* (ed. S. E. Ullrich) 144–159 Wiley-Blackwell
- Bothmer, R.Von; Jacobsen, N.; Baden, C.; JØrgensen, R.B. y Linde-Laursen, I. (1995) An ecogeographical study of the genus *Hordeum*, 2nd Edn. Systematic and ecogeographic studies on crop genepools 7. Rome, IPGRI. 129 pp.
- Bothmer, R., Von Hintum, T., Van Knüpfper H. y Sato K. (2003). Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. *Diversity in barley (Hordeum vulgare)*, 7, 201.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., y Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314–331. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6247908/>
- Briggs, D. E. (1998). *Malts and malting*. Springer Science y Business Media.
- Bundock, P.C., Elliott, F.G., Ablett, G., Benson, A.D., Casu, R.E., Aitken, K.S., Henry, R.J. (2009) Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploid plant species using 454 sequencing. *Plant Biotechnology Journal*, 7, 347–354. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00401.x
- Burton, R. A., Wilson, S. M., y Hrmova, M. (1). Harvey, AJ, Shirley, NJ, Medhurst, A., Stone, BA, Newbiggin, EJ, Bacic, A. and Fincher, GB (2006) Cellulose synthase-like CslF genes mediate the synthesis of cell wall (1, 3; 1, 4)-β-D-glucans. *Science*, 311(5769), 1940-1942. doi: 10.1126/science.1122975
- Cai, S., Yu, G., Chen, X., Huang, Y., Jiang, X., Zhang, G., y Jin, X. (2013). Grain protein content variation and its association analysis in barley. *BMC plant biology*, 13(1), 1-11. doi:10.1186/1471-2229-13-35

- Cammarota, L., Quero, G., Gómez, B., Motta, L., Locatelli, A., Pieroni, S., Gutiérrez, L., Hayes, P., Castro, A. (2019). Caracterización genómica del germoplasma de cebada por variables de calidad maltera. *II Congreso Nacional de Biociencias 2019*, Montevideo, Uruguay.P
- Cantalapiedra, C. P., Boudiar, R., Casas, A. M., Igartua, E., y Contreras-Moreira, B. (2015). BARLEYMAP: physical and genetic mapping of nucleotide sequences and annotation of surrounding loci in barley. *Molecular breeding*, 35(1), 1-11.doi:10.1007/s11032-015-0253-1
- Capdevielle, F.; Rey, F.; Branda, A. y German, S. (1999) Marcadores moleculares para calidad maltera de cebada: donde obtenerlos y como usarlos en programas de mejoramiento. En: Congreso Latinoamericano de Cebada (3°, 1999, Colonia, Uruguay). Resumen. Colonia, Uruguay, INIA-La Estanzuela.
- Castle, W.E. (1903) Mendel's law of heredity. *Science* 18:396–406 doi: 10.1126/science.18.456.396
- Castro, A.J.; Benitez.; A.; Hayes.; P.M.; Viega, L. any 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. doi:10.1071/CP10085
- Castro, A, Cammarota L, Gomez B, Gutierrez L, Hayes PM, Locatelli A, Motta L, Pieroni S (2013) Genome-wide association mapping of malting quality traits in relevant barley germplasm in uruguay. *Advances in barley sciences*. Springer, New York, pp 37–46. doi:10.1007/978-94-007-4682-4_3
- Castro, A.J., Castro, M.. y Germán, S. (2017) Cambios en la oferta varietal de cebada: desafíos para la producción. *Agrociencia* 38:6–12
- Chen, M., Presting, G., Barbazuk, W.B., Goicoechea, J.L., *et al.* (2002) An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* 14:537–545. doi:10.1105/tpc.010485
- Chen, J., Dai, F., Wei, K., y Zhang, G. P. (2006). Relationship between malt qualities and β -amylase activity and protein content as affected by timing of nitrogen fertilizer application. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 79–84. doi: 10.1631/jzus.2006.B0079

- Chutimanitsakun, Y., Nipper, R. W., Cuesta-Marcos, A., Cistué, L., Corey, A., Filichkina, T., Johnson, E. A. y Hayes, P. M. (2011). Construction and application for QTL analysis of a Restriction Site Associated DNA (RAD) linkage map in barley. *BMC genomics*, 12(1), 1-13. doi:10.1186/1471-2164-12-4
- Clancy, J.A., Han, F. y Ullrich, S.E. (2003) Comparative mapping of -amylase activity QTLs among three barley crosses. North American barley genome project. *Crop Sci*, 43:1043–1052. doi:10.2135/cropsci2003.1043
- Close, T.J., Wanamaker, S., Roose, M.L. y Lyon, M. (2007) HarvEST. *Methods Mol Biol* 406:161–177
- Close, T. J., Bhat, P. R., Lonardi, S., Wu, Y., Rostoks, N., *et al.* (2009). Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics*, 10(1), 582. doi:10.1186/1471-2164-10-582
- Cockram, J.; White, J.; Leigh, F.J.; Lea, V.J.; Chiapparino, E.; Laurie, D.A.; Mackay, I.J.; Powell, W. y O'Sullivan, D.M. 2008. Association mapping of partitioning loci in barley. *Genetics*. 9: 9-16. doi:10.1186/1471-2156-9-16
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. y Pang, E. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142:169-196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Comadran, J.; Rusell, J.R.; van Eeuwijk, F.A *et al.* (2008) Mapping adaptation of barley to droughted environment. *Euphytica*. 161: 35- 45. doi:10.1007/s10681-007-9508-1
- Comadran. J., Kilian, B., Russell, J., *et al.* (2012) Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat Genet* 44:1388–1391. doi: 10.1038/ng.2447
- Costa, J. M., Corey, A., Hayes, P. M., *et al.* (2001). Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(2), 415-424. doi:10.1007/s001220100622

- Cregan, P.B., Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U. y Rongwen, J. (1994) Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. In: Gresshoff PM (ed) *Plant Genome Analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 47–56 doi:10.1201/9781003068907
- Cu, S. T., March, T. J., Stewart, S., *et al.* (2016). Genetic analysis of grain and malt quality in an elite barley population. *Molecular Breeding*, 36(9), 1-16. doi:10.1007/s11032-016-0554-z
- Cuesta-Marcos, A., Szűcs, P., Close, T. J., Filichkin, T., Muehlbauer, G. J., Smith, K. P., y Hayes, P. M. (2010) Genome-wide SNPs and re-sequencing of growth habit and inflorescence genes in barley: implications for association mapping in germplasm arrays varying in size and structure. *BMC Genomics* 11, 707. doi:10.1186/1471-2164-11-707
- De Carvalho, J. A., Hagen, F., Fisher, M. C., de Camargo, Z. P., y Rodrigues, A. M. (2020). Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic *Sporothrix* species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(7), e0008330. doi:10.1371/journal.pntd.0008330
- Dekkers, J.C.M. and Hospital y F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*. 3: 22-32. doi:10.1038/nrg701
- Díaz Lago, J.E.; Germán, S.; Pereyra, S. y Vázquez, D. 2007. Cebada CLE 233, INIA ARRAYAN. Un ciclo largo con alta respuesta al fotoperíodo y buen tamaño de grano. *Revista INIA* 10:24-25.
- Díaz Lago, J.E. y Germán, S. 2005. Cebadas INIA. Primeras variedades de un joven programa de mejoramiento genético. *Revista INIA* 3:12-14.
- Distelfeld, A., Korol, A., Dubcovsky, J., Uauy, C., Blake, T., y Fahima, T. (2008). Colinearity between the barley grain protein content (GPC) QTL on chromosome arm 6HS and the wheat *Gpc-B1* region. *Molecular Breeding*, 22(1), 25-38. doi:10.1007/s11032-007-9153-3
- Doerge, R.C. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics*. 3: 43-52. doi:10.1038/nrg703

- Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D. y Ortiz, R. (2015) Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol. Adv.* 33, 812–829. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.001
- Eagles, H. A., Bedggood, A. G., Panozzo, J. F., y Martin, P. J. (1995). Cultivar and environmental effects on malting quality in barley. *Aust. J. Agric. Res.* 46, 831–844. doi: 101071/AR9950831
- East, E. M. (1916). Studies on Size Inheritance in *Nicotiana*. *Genetics*, 1(2), 164–176. doi:10.1093/genetics/1.2.164
- Elía, M., Swanston, J.S., Moralejo, M., Casas, A., Pérez-Vendrell, A.M., Ciudad, F.J., Thomas, W.T.B., Smith, P.L., Ullrich, S.E. y Molina-Cano, J.L. (2010) A model of the genetic differences in malting quality between European and North American barley cultivars based on a QTL study of the cross Triumph × Morex. *Plant Breed* 129:280–290. doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01694.x
- Emebiri, L.C., Moody, D.B., Panozzo, J.F., Chalmers, K.J., Kretschmer, J.M., y Ablett, G.A. (2003) Identification of QTLs associated with variations in grain protein concentration in two-row barley. *Crop Pasture Sci.* 54:1211–21. doi:10.1071/AR03006
- Emebiri, L. C., Moody, D. B., Panozzo, J. F., y Read, B. J. (2004). Mapping of QTL for malting quality attributes in barley based on a cross of parents with low grain protein concentration. *Field Crops Research*, 87(2-3), 195-205. doi: 10.1016/j.fcr.2003.11.002
- Emebiri, L.C., Moody, D.B., Horsley, R., Panozzo, J. y Read, B.J. (2005) The genetic control of grain protein content variation in a doubled haploid population derived from a cross between Australian and north American two-rowed barley lines. *J Cereal Sci.* 41(1):107–14. doi:10.1016/j.jcs.2004.08.012
- Falconer, D. S. (1981) Introduction to quantitative genetics. Longman, New York.
- Fan, C., Zhai, H., Wang, H., Yue, Y., Zhang, M., Li, J., Wen, S., Guo, G., Zeng, Y., Ni, Z., You, M. (2017) Identification of QTLs controlling grain protein concentration using a high-density SNP and SSR linkage map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol* 17:122e. doi:10.1186/s12870-017-1067-6

- Fan, J. B., Oliphant, A., Shen, R., *et al.* (2003, January). Highly parallel SNP genotyping. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 68, pp. 69-78). Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/sqb.2003.68.69
- Fang, Y., Zhang, X., y Xue, D. (2019). Genetic analysis and molecular breeding applications of malting quality QTLs in Barley. *Frontiers in Genetics*, 10, 352. doi:10.3389/fgene.2019.00352
- Fang, Y., Zhang, X., Zhang, X., *et al.* A High-Density Genetic Linkage Map of SLAFs and QTL Analysis of Grain Size and Weight in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Front Plant Sci.* 2020;11:620922. Published 2020 Dec 17. doi:10.3389/fpls.2020.620922
- Fisher, R. A. (1947). The Rhesus Factor a Study in Scientific Method. *American Scientist*, 35(1), 95-113.
- Francia, E., Barabaschi, D., Tondelli, A., Laidò, G., Rizza, F., Stanca, A.M., Busconi, M., Fogher, C., Stockinger, G. y Pecchioni, N. (2007). Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(8), 1083-1091. doi:10.1007/s00122-007-0634-x
- Fukui, K., Kamisugi, Y., y Sakai, F. (1994) Physical mapping of 5S rDNA loci by direct cloned biotinylated probes in barley chromosomes. *Genome* 37:105–111. doi:10.1139/g94-013
- Gao, W., Clancy, JA., Han, F., Jones, BL., Budde, A., Wesenberg, D.M., Kleinhofs, A., Ullrich, S.E., North American Barley Genome Project (2004) Fine mapping of a malting-quality QTL complex near the chromosome 4H S telomere in barley. *Theor Appl Genet* 109:750–760. doi: 10.1007/s00122-004-1688-7
- Garrido-Cardenas, J. A., Mesa-Valle, C., y Manzano-Agugliaro, F. (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, 247(3), 543-557. doi:10.1007/s00425-017-2829-y
- Ghosh, S., Malhotra, P., Lalitha, P. V., Guha-Mukherjee, S., y Chauhan, V. S. (2002) Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches, *Plant Science*, vol. 162, no. 3, pp. 329–333 doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00587-8

- 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
- Grando, S., y Macpherson, H. G. (2005). Food barley: importance, uses and local knowledge. *ICARDA, Aleppo, Syria*.
- Graner, A.; Jahoor, A.; Sehondelmaier, J.; Siedler, H.; Pillen, K.; Fischbeck, G.; Wenzel, G. y Herrmann, R.G. (1991) Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* 83: 250-256. doi:10.1007/BF00226259
- Gupta, P.K.; Rustgi, S. y Kulwal, P.L. (2005) Linkage disequilibrium and association studies in high plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology.* 57: 461-485. doi:10.1007/s11103-005-0257-z
- Gupta, P. K., Kulwal, P. L., y Jaiswal, V. (2014). Association mapping in crop plants: opportunities and challenges. *Advances in genetics*, 85, 109-147. doi:10.1016/B978-0-12-800271-1.00002-0
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., y Prasad, M. (2002) Molecular Markers: Principles and Methodology. In: Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. (eds) *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-2356-5_2
- Gutiérrez, L., Cuesta- Marcos, A., Castro, A. J., von Zitzewitz, J., Schmitt, M., y Hayes, P. M. (2011). Association mapping of malting quality quantitative trait loci in winter barley: positive signals from small germplasm arrays. *The Plant Genome*, 4(3). doi:10.3835/plantgenome2011.07.0020
- Gutiérrez, L., Germán, S., Pereyra, S., *et al.* (2015) Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(3), 501–516. doi: 10.1007/s00122-014-2448-y
- Gutiérrez, L., Quero, G., Fernandez, S. y Brandariz, S. (2016) lmem.gwaser: Linear mixed effects models for genome-wide association studies. In: R Packag. version 0.1.0. <https://cran.r-project.org/web/packages/lmem.gwaser/index.html>. Accessed 7 Jan 2020

- Han, F.; Ullrich, S.E.; Chirat, S.; Menteur, S.; Jestin, L.; Sarrafi, A.; Hayes, P.M.; Jones, B.L.; Blacke, T.K.; Wesenberg, D.M.; Kleinhofs, A. y Kilian, A. (1995) Mapping of β glucan content and β glucanase activity loci in barley grain and malt. *Theor. Appl. Genet.* 91 (6-7) 921-927. doi:10.1007/BF00223901
- Han, F., Romagosa, I., Ullrich, S. E., Jones, B. L., Hayes, P. M., y Wesenberg, D. M. (1997). Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Molecular Breeding*, 3(6), 427-437. doi:10.1023/A:1009608312385
- Hartl, D. y Jones, E. (2001) *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA
- Hayes, P.M.; Liu, B.H.; Knapp, S.J.; Chen, F.; Jones, B.; Blake, T.; Franckowiak, J.; Rasmusson, D.; Sorrells, M.; Ullrich, S.E.; Wesenberg, D. y Kleinhofs, A. (1993) Quantitative trait locus and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 87: 392-401. doi:10.1007/BF01184929
- Hayes, P.M. y Iyambo, O. (1994) The North American barley genome mapping project. Summary of QTL effects in the Steptoe x Morex population. *Barley Genet Newslett* 23 : 98-133
- Hayes, P.M., y B.L. Jones. (2000) Malting quality from a QTL perspective. In 8th Int. Barley Genet. Symp., Adelaide Convention Centre, Adelaide, South Australia. 22–27 Oct. 2000. 8:99–105.
- Hearnden, P.R., Eckermann, P.J., McMichael, G.L., Hayden, M.J., Eglinton, J.K., y Chalmers, K.J: A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theoretical and Applied Genetics* 2007, 115:383-391. doi:10.1007/s00122-007-0572-7
- Heun, M.; Kennedy, A.E.; Anderson, J.A.; Lapitan, N.L.V.; Sorrells, M.E. y Tanksely, S.D. 1991. Construction of a restriction fragments length polymorphism map of barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*. 34: 437-447. doi:10.1139/g91-066
- Hinze, K., Thompson, R. D., Ritter, E., Salamini, F., y Schulze-Lefert, P. (1991). Restriction fragment length polymorphism-mediated targeting of the ml-o resistance locus in barley (*Hordeum vulgare*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3691-3695. doi:10.1073/pnas.88.9.3691

- IBSC:International Barley Genome Sequencing Consortium (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–716 doi:10.1038/nature11543
- Igartua, E., Edney, M., Rossnagel, B. G., Spaner, D., Legge, W. G., Scoles, G. J., Eckstein, P.E., Penner, G.A., Tinker, N.A. Briggs, K.G., Falk, D.E. y Mather, D. E. (2000). Marker- based selection of QTL affecting grain and malt quality in two-row barley. *Crop Science*, 40(5), 1426-1433. doi:10.2135/cropsci2000.4051426x
- Islamovic, E., Obert, D. E., Oliver, R. E., Marshall, J. M., Miclaus, K. J., Hang, A., Chao, S., Lazo, G.R., Harrison, S. A., Ibrahim, A., Jellen, E. N., Maughan, P. J., Brown, R. H. y Jackson, E. W. (2013). A new genetic linkage map of barley (*Hordeum vulgare* L.) facilitates genetic dissection of height and spike length and angle. *Field Crops Research*, 154, 91–99. doi:10.1016/j.fcr.2013.06.001
- Islamovic, E., Obert, D., Budde, A., Schmitt, M., Brunick, R. II, Kilian, A., Chao, S., Lazo, G., Marshall, J., Jellen, E., Maughan, P., Hu, G., Klos, K., Brown, R. y Jackson, E. (2014) Quantitative trait loci of barley malting quality trait components in the Stellar/01Ab8219 mapping population. *Mol Breed* 34:59–73. doi:10.1007/s11032-014-0017-3
- Jain, S.M., Brar, D.S., y Ahluwalia, B.S. (2002) Molecular techniques in *Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands doi:10.1007/s12892-015-0037-5
- Jamar, C., du Jardin, P., y Fauconnier, M. L. (2011). Cell wall polysaccharides hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.): a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15, 301–313. URL : <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=7566>.
- Jannink, J. L., y Walsh, B. (2002). Association mapping in plant populations. *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*, 59-68. doi: 10.1079/9780851996011.0059
- Kangor T, Sooväli P, Tamm Y, Tamm I, Koppel M. 2017. Malting barley diseases, yield and quality responses to using various agro-technology regimes. *Proc. Latvian Acad. Sci.* 71: 57–62. doi:10.1515/prola s-2017-0010
- Karakousis A, Barr AR, Kretschmer JM, Manning S, Jefferies SP, Chalmers KJ, Islam AKM, Langridge P (2003). Mapping and QTL analysis of the barley population Galleon×

- Haruna Nijo. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(12), 1131-1135.
doi:10.1071/AR02179
- Kasha, K.J., y Kleinhofs, A. (1994) Mapping of barley cross Harrington × TR306. *Barley Genet Newslett* 23:65–69
- Kearsey, M. y Pooni, H. (1996) *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman y Hall, London.
- Kim, H. S., Park, K. G., Baek, S. B., y Kim, J. G. (2011). Inheritance of (1-3)(1-4)- Beta-D-Glucan content in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Crop Sci. Biotechnol.* 14, 239–245.
doi:10.1007/s12892-011-0045-z
- Kjær, B., Jensen, J. y Giese, H. (1995) Quantitative trait loci for heading date and straw characters in barley. *Genome* 38: 1098-1104. doi:10.1139/g95-146
- Kleinhofs, A.; Chao, S. y Sharp, P.J. 1988. Mapping of nitrate reductase genes in barley and wheat. In: Miller, T.E. and Koebner, R.M.D. (Eds). *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.* Bath. USA. Bath Press. pp. 541-546.
- Kleinhofs A, Kilian A, Saghai Maroof MA, *et al.* (1993) A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(6), 705-712 . doi: 10.1007/BF00222660
- Kleinhofs, A. y Graner, A. (2001) An integrated map of the barley genome. In: Phillips R.L., Vasil I.K. (eds) *DNA-Based Markers in Plants. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, vol 6. *Springer*, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-015-9815-6_12
- Kochevenko, A., Jiang, Y., Seiler, C., Surdonja, K., Kollers, S., Reif, J. C., Korzun, V. Graner, A.(2018). Identification of QTL hot spots for malting quality in two elite breeding lines with distinct tolerance to abiotic stress. *BMC plant biology*, 18(1), 1-17. doi:10.1186/s12870 -018-1323-4
- Kraakman, A.T.W, Niks, R.E., Van Den Berg, P.M.M., Stam, P. y Van Eeuwijk. F. (2004). Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics*. doi:10.1534/genetics.104.026831
- Kraakman, A.T.W.; Martinez, F.; Mussiraliev, B.; van Eeuwijk, F.A. y Niks, R.E. (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other

- agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol. Breeding*. 17: 41-58. doi:10.1007/s11032-005-1119-8
- Kumar, J., Gupta, D. S., Gupta, S., Dubey, S., Gupta, P., y Kumar, S. (2017). Quantitative trait loci from identification to exploitation for crop improvement. *Plant cell reports*, 36(8), 1187-1213.. doi:10.1007/s00299-017-2127-y
- Kunze, W. (2014). Technology brewing and malting (5th revised English ed.). *VLB Berlin*.
- Kunzel, G., Sorokin, A., y Marthe, F. (1995). Progress in relating genetic to physical distances of marker sequences on micro-isolated barley chromosomes.
- Kunzel, G. (1996). Physical mapping of cereal chromosomes, with special emphasis on barley. In *Proc. 5th Int. Oat Conf. and 7th Int. Barley Genet. Symp.* (Vol. 1, pp. 197-206).
- Künzel, G., Korzun, L., y Meister, A. (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154:397–412. doi:10.1093/genetics/154.1.397
- Künzel, G., y Waugh, R. (2002) Integration of microsatellite markers into the translocation-based physical RFLP map of barley chromosome 3H. *Theor Appl Genet* 105:660–665. doi:10.1007/s00122-002-0913-5
- Laidò, G., Barabaschi, D., Tondelli, A., Gianinetti, A., Stanca, A. M., Li Destri Nicosia, O. Di Fonzo, N., Francia, E. y Pecchioni, N. (2009). QTL alleles from a winter feed type can improve malting quality in barley. *Plant breeding*, 128(6), 598-605. doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01636.x
- Lander, E. S. (1996). The New Genomics: Global Views of Biology. *Science*, 274(5287), 536–539. doi:10.1126/science.274.5287.536
- Langridge, P.; Karakousis, A.; Kretschmer, J. y Manning, S. (1995) A consensus linkage map of barley. *Mol. Breeding*. 1: 389-395. doi:10.1007/BF01248416
- Laurie, D. A., Pratchett, N., Romero, C., Simpson, E., y Snape, J. W. (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(3), 198-203. doi:10.1111/j.1439-0523.1993.tb00630.x

- Laurie, D.A., Pratchett, N., Bezant, J.H., y Snape, J.W. (1994) Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2(2h) of *Hordeum vulgare* (barley). *Heredity* 72:619–627. doi: 10.1038/hdy.1994.85
- Lehfer, H., Busch, W., Martin, R., y Hermann, R.G. (1993) Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence in situ hybridisation. *Chromosoma* 102:428–432. doi:10.1007/BF00360408
- Leitch, I.J., y Heslop-Harrison, J.S. (1993) Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the α -amylase 2 gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genome* 36:517–523. doi:10.1139/g93-071
- Li, J.Z., Sjakste, T.G., Röder, M.S., y Gana IMW. (2003) Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. *Theor Appl Genet* 107:1021–1027. doi:10.1007/s00122-003-1345-6
- Li, C., Cakir, M., y Lance, R. (2010). Genetic improvement of malting quality through conventional breeding and marker-assisted selection, in *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*, eds G. Zhang and C. Li (Berlin: Springer), 260–292. doi: 10.1007/978-3-642-01279-2_9
- Linde-Laursen, I., Heslop-Harrison, J. S., Shepherd, K. W., y Taketa, S. (1997). The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas*, 126(1), 1-16. doi:10.1111/j.1601-5223.1997.00001.x
- Litt, M., y Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397–401.
- Liu, Z.W., Biyashev, R.M. y Maroof, M.A.S. (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 869–876 . <https://doi.org/10.1007/BF00224088>
- Locatelli, A., Cuesta-Marcos, A., Gutiérrez, L., Hayes, P. M., Smith, K. P., y Castro, A. J. (2013) Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germplasm in Uruguay. *Mol Breed* 31:631–654. doi:10.1007/s11032-012-9820-x

- Locatelli, A., (2011) Bases genéticas de las variables agronómicas de interés local en el germoplasma de cebada (*Hordeum vulgare* L.) utilizado en Uruguay. Tesis de Magister. Paysandú, Facultad de Agronomía, UDELAR, Uruguay.
- Lonardi, S., Duma, D., Alpert, M., Cordero, F., Beccuti, M., Bhat, P. R., Wu, Y., Ciardo, G., Alsaihati, B., Ma, Y., Wanamaker, S., Resnik, J. y Close, T. J. (2011). Barcoding-free BAC pooling enables combinatorial selective sequencing of the barley gene space. arXiv preprint arXiv:1112.4438.
- Looseley, M.E., Bayer, M., Bull, H., Ramsay, L., Thomas, W., Booth, A., De La Fuente Canto, C., Morris, J., Hedley, P.E. and Russell, J. (2017) Association Mapping of Diastatic Power in UK Winter and Spring Barley by Exome Sequencing of Phenotypically Contrasting Variety Sets. *Front. Plant Sci.* 8:1566. doi: 10.3389/fpls.2017.01566
- Looseley, M. E., Ramsay, L., Bull, H., Swanston, J. S., Shaw, P. D., Macaulay, M., Booth, A., Russell, J. R., Waugh, R. y Thomas, W. T. (2020). Association mapping of malting quality traits in UK spring and winter barley cultivar collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(9), 2567-2582. doi:10.1007/s00122-020-03618-9
- Lorenz, A. J., Hamblin, M. T., y Jannink, J. L. (2010). Performance of single nucleotide polymorphisms versus haplotypes for genome-wide association analysis in barley. *PLoS one*, 5(11), e14079. doi:10.1371/journal.pone.0014079
- Mackay, F.C., Stone, E.A. y Ayroles, J.F. (2009) The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. *Nat Rev Genet* 10:565–577. doi: 10.1038/nrg2612
- Malosetti, M. A. R. C. O. S., Ribaut, J. M., Vargas, M., Crossa, J., Boer, M. P., y Van Eeuwijk, F. A. (2007). Multi-trait multi-environment QTL modelling for drought-stress adaptation in maize. *Frontis*, 23-34.
- Marcel, T.C., Varshney, R.K., Barbieri, M., Jafary, H., de Kock, M.J.D., Graner, A, y Niks, R.E. (2007) High-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance of *Puccinia hordei* A and of defence gene homologues. *Theoretical and Applied Genetics*, 114:487-500. doi:10.1007/s00122-006-0448-2
- Marquez-Cedillo, L.A.; Hayes, P.M.; Jones, B.L.; Kleinhofs, A.; Legge, W.G.; Rossangel, B.G.; Sato, K.; Ullrich, E. y Wesenberg, D.M. (2000) QTL analysis of malting quality

- in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theor. Appl. Genet.* 101: 173-184. doi:10.1007/s001220051466
- Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Kleinhofs A, Legge WG, Rossnagel BG, Sato K, Ullrich SE, y Wesenberg DM. (2001) QTL analysis of agronomic traits in barley based on the doubled haploid progeny of two elite north American varieties representing different germplasm groups. *Theor Appl Genet.* 103(4):625–37. doi:10.1007/PL00002919
- Mascher, M., Muehlbauer, G. J., Rokhsar, D. S., *et al.* (2013). Anchoring and ordering NGS contig assemblies by population sequencing (POPSEQ). *The Plant Journal*, 76(4), 718–727. doi:10.1111/tpj.12319
- Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A. *et al.* (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544, 427–433 doi:10.1038/nature22043
- Massman, J.; Cooper, B.; Horsley, R.; Neate, S.; Dill-Macky, R.; Chao, S.; Dong, Y.; Schwarz, P.; Muehlbauer, G.J. y Smith, K.P. (2011) Genome-wide association mapping of Fusarium head blight resistance in contemporary barley breeding germplasm. *Mol. Breeding.* 27: 439-454. doi:10.1007/s11032-010-9442-0
- Mather, D.E.; Tinker, N.A.; LaBerge, D.E.; Edney, M.; Jones, B.L.; Rossnagel, B.G.; Legge, W.G.; Briggs, K.G.; Irvine, R.B.; Falk, D.E. y Kasha, K.J. (1997) Regions of the genome that affect grain and malt quality in a North American two-row barley cross. *Crop Sci.* 37: 544-554. doi:10.2135/cropsci1997.0011183X003700020039x
- Mather, K., y Jinks, J. 1. (1971) Biometrical genetics (2nd ed.). Chapman & Hall, London. doi:10.1007/978-1-4613-3387-6
- Matthies, I. E., Malosetti, M., Röder, M. S., y van Eeuwijk, F. (2014). Genome-wide association mapping for kernel and malting quality traits using historical European barley records. *PLoS one*, 9(11), e110046. doi:10.1371/journal.pone.0110046
- Mayer, K. F. X., Martis, M., Hedley, P. E. *et al.* (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23, 1249–1263. doi:10.1105/tpc.110.082537

- Mayer, K. F. X., Waugh, R., Langridge, P., *et al.* (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711–716. doi:10.1038/nature11543
- McCleary, B. V., y Shameer, I. (1987). Assay of malt β - glucanase using azo- barley glucan: an improved precipitant. *Journal of the Institute of Brewing*, 93(2), 87-90. doi:10.1002/j.2050-0416.1987.tb04481.x
- Meuwissen, T. H., Hayes, B. J., & Goddard, M. E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157(4), 1819-1829. doi: 10.1093/genetics/157.4.1819
- Mickelson, S., See, D., Meyer, F.D., Garner, J.P., Foster, C.R., Blake, T.K., y Fischer, A.M. (2003) Mapping of QTL associated with nitrogen storage and remobilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J Exp Bot.* 54(383):801–12. doi:10.1093/jxb/erg084
- Miller, M.R., Dunham, J.P., Amores, A., Cresko, W.A. y Johnson, E.A. (2007) Rapid and cost effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17(2):240-248. doi:10.1101/gr.5681207
- Mohammadi, M., Blake, T. K., Budde, A. D., Chao, S., Hayes, P. M., Horsley, R. D., Olbert, D.E., Ullrich, S.E. y Smith, K. P. (2015). A genome-wide association study of malting quality across eight US barley breeding programs. *Theoretical and applied genetics*, 128(4), 705-721. doi:10.1007/s00122-015-2465-5
- Mohler, V., y Schwarz, G. (2004) Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphisms to Single Nucleotide Polymorphisms. In: Lörz H., Wenzel G. (eds) *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 55. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/3-540-26538-4_2
- Monat, C., Padmarasu, S., Lux, T., *et al.* (2019). TRITEX: chromosome-scale sequence assembly of Triticeae genomes with open-source tools. *Genome biology*, 20(1), 1-18. doi:10.1186/s13059-019-1899-5
- Muñoz-Amatriaín, M., Moscou, M.J., Bhat, P.R., *et al.* (2011) An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and single nucleotide

- polymorphism markers. *Plant Genome*, 4, 238–249. doi:10.3835/plantgenome2011.08.0023
- Muñoz-Amatriaín, M., Lonardi, S., Luo, M., *et al.* (2015). Sequencing of 15 622 gene-bearing BACs clarifies the gene-dense regions of the barley genome. *The Plant Journal*, 84(1), 216-227. doi:10.1111/tbj.12959
- Nicot, N., Chiquet, V., Gandon, B., Amilhat, L., Legeai, F., Leroy, P., Bernard, M.... y Sourdille, P. (2004). Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics*, 109(4), 800-805. doi 10.1007/s00122-004-1685-x
- Nilan, R. A., (1974) Barley (*Hordeum vulgare*). In: R. C., King (Ed.), *Handbook of genetics* 2. (Plenum Press, New York.) pp. 93–110 doi: 10.1007/978-1-4684-2994-7_4
- OPYPA: Oficina de Programación y política agropecuaria, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicación/publicaciones/anuario-opypa-2020>
- Panozzo, J.F., Eckermann, P.J., Mather, D.E., Moody, D.B., Black, C.K., Collins, H.M., Barr, A.R., Lim, P., Cullis, B.R. (2007) QTL analysis of malting quality traits in two barley populations. *Aust J Agr Res* 58:858–866. doi: 10.1071/AR06203
- Parisseaux, B. y Bernardo, R. (2004) In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theor. Appl. Genet.* 109: 508-514. doi:10.1007/s00122-004-1666-0
- Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewit, S. Peterson, S. E. Lincon y S. D. Tanksley, 1988 Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335: 721-726. doi:10.1038/335721a0
- Paterson, A.H., 1996. Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas. doi:10.1016/0958-1669(93)90114-C
- Patterson, N., Price, A.L. y Reich, D. (2006) Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet* 2(12):e190. doi: 10.1371/journal.pgen.0020190

- Pauli, D., Brown-Guedira, G., y Blake, T. K. (2015). Identification of malting quality QTLs in advanced generation breeding germplasm. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(1), 29-40. doi:10.1094/ASBCJ-2015-0129-01
- Pedersen, C., y Linde-Laursen, I. (1995) The relationship between physical and genetic distances at the Hor1 and Hor2 loci of barley estimated by two-colour fluorescent in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 91:941–946. doi:10.1007/BF00223904
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., y Jannink, J.-L. (2012) Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. *PLoS ONE*, 7(2), e32253. doi:10.1371/journal.pone.0032253
- Potokina, E., Druka, A., Luo, Z., Wise, R., Waugh, R., y Kearsy, M. (2008) Gene expression quantitative trait locus analysis of 16,000 barley genes reveals a complex pattern of genome-wide transcriptional regulation. *Plant Journal* 2008, 53:90-101. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03315.x
- Pourkheirandish, M., y Komatsuda, T. (2007). The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective. *Annals of Botany*, 100(5), 999–1008. doi:10.1093/aob/mcm139
- Powell, W., Machray, G. C., y Proven, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends in Plant Science*, vol. 1, no. 7, pp. 215–222, 1996 doi:10.1016/1360-1385(96)86898-1
- Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A. y Reich, D. (2006) Principal component analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38: 904-909. doi:10.1038/ng1847
- Pritchard, J.K.; Stephens, M. y Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155: 945-959. doi:10.1093/genetics/155.2.945
- Qi, X.; Stam, P. y Lindhout, P. (1996) Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome*. 39: 379-394. doi:10.1139/g96-049

- Qi, X., Stam, P., y Lindhout, P. (1998) Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map of barley. *Theoretical and Applied Genetics* 96:376–384. doi:10.1007/s001220050752
- Qi, J. C., Chen, J. X., Wang, J. M., Wu, F. B., Cao, L. P., y Zhang, G. P. (2005). Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 6, 1069–1075. doi: 10.1631/jzus.2005.B1069
- Qi X, y Lindhout P (1997) Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 254:330–336. doi:10.1007/s004380050423
- R Development Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria
- Rae, S., Macaulay, M., Ramsay, L., Leigh, F., Matthews, D., O’Sullivan, D., Donini, P., Morris, P. C., Powell, W., Marshall, D. F., Waugh, R. y Thomas, W.T.B. (2007). *Molecular barley breeding*. *Euphytica* 158, 295–303. doi: 10.1007/s10681-006-9166-8
- Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanissevich, S. D., *et al.* (2000). A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*, 156(4), 1997–2005. doi:10.1093/genetics/156.4.1997
- Rannala, B., y Slatkin, M. (2000) Methods for multipoint disease mapping using linkage disequilibrium. *Genet Epidemiol* 9:S71–77 doi:10.1002/1098-2272(2000)19:1+<::AID-GEPI11>3.0.CO;2-D
- Ren, X., Wang, J., Liu, L., Sun, G., Li, C., Luo, H., y Sun, D. (2016). SNP-based high density genetic map and mapping of btwd1 dwarfing gene in barley. *Scientific reports*, 6(1), 1–7. doi: 10.1038/srep31741
- Risch, N., y Merikangas, K. (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516–1517 doi: 10.1126/science.273.5281.1516
- Roncallo, P. F., Beaufort, V., Larsen, A. O., Dreisigacker, S., y Echenique, V. (2019). Genetic diversity and linkage disequilibrium using SNP (KASP) and AFLP markers in a worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var durum) collection. *PLOS ONE*, 14(6), e0218562. doi:10.1371/journal.pone.0218562

- Rostoks, N., Mudie, S., Cardle, L., Russell, J., Ramsay, L., Booth, A., Svensson, J.T., Wanamaker, S.I., Walia, H., Rodriguez, E.M., Hedley, P.E., Liu, H., Morris, J., Close, T.J., Marshall, D.F., y Waugh, R. (2005): Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* 2005, 274:515-527. doi:10.1007/s00438-005-0046-z
- Roy, J.K.; Smith, K.P.; Muelbahuer, G.J.; Chao, S.; Close, T.J. y Steffenson, B.J. (2010) Association mapping of spot blotch resistance in wild barley *Mol. Breeding*. 26: 243-256. doi:10.1007/s11032-010-9402-8
- Russell, L. (2020). *emmeans*: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4. 5 (2020)
- Saghai-Marooif, M.A., Biyashev, R.B., Yang, G.P., Zhang, Q., y Allard, R.W. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5466–5470 doi:10.1073/pnas.91.12.5466
- Salimath, S.S., de Oliveira, A.C., Bennetzen, J., y Godwin, I.D. (1995) Assessment of genomic origin and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38, 757–763.
- Sato, K., Nankaku, N., y Takeda, K. (2009): A high density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity*, 103:110-117. doi:10.1038/hdy.2009.57
- Sato, K., Hisano, H., Matsumoto, S., Zhou, T. S., y Kihara, M. (2018). Detection of QTLs controlling alpha-amylase activity in a diversity panel of 343 barley accessions. *Molecular breeding*, 38(1), 1-10. doi:10.1007/s11032-017-0773-y
- Sax, K. The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *PHASEOLUS VULGARIS*. *Genetics*. 1923;8(6):552-560. doi:10.1093/genetics/8.6.552
- Schreiber, M., Mascher, M., Wright, J., Padmarasu, S., Himmelbach, A., Heavens, D., Milne, L., Clavijo, B. J., Stein, N. y Waugh, R. (2020). A Genome Assembly of the Barley “Transformation Reference” Cultivar Golden Promise. *G3*; *Genes/Genomes/Genetics*, g3.401010.2019. doi:10.1534/g3.119.401010

- Schulte, D., Close, T. J., Graner, A., Langridge, P., Matsumoto, T., Muehlbauer, G., Sato, K., Schulman, A.H., Waugh, R., Wise R.P. y Stein, N. (2009). The international barley sequencing consortium at the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant physiology*, 149(1), 142-147. doi:10.1104/pp.108.128967
- See, D.K., Kephart, V., y Blake, K. (2002) Mapping genes controlling variation in barley grain protein concentration. *Crop Sci*, 42:680–685. doi:10.2135/cropsci2002.6800
- Shendure, J., y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145. doi:10.1038/nbt1486
- Sherman, J. D., Fenwick, A. L., Namuth, D. M., y Lapitan, N. L. V. (1995). A barley RFLP map: alignment of three barley maps and comparisons to Gramineae species. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(4), 681-690. doi:10.1007/BF00223297
- Shin, J.S.; Corpuz, L.; Chao, S. y Blake, T.K. (1990) A partial map of the barley genome. *Genome*. 33: 803-808. doi:10.1007/s11032-010-9402-8
- Shin, J. H., Blay, S., McNeney, B., y Graham, J. (2006). *LDheatmap*: an R function for graphical display of pairwise linkage disequilibria between single nucleotide polymorphisms. *Journal of statistical software*, 16(3), 1-10. doi:10.18637/jss.v000.i00
- Singh, S., Tripathi, R. K., Lemaux, P. G., Buchanan, B. B., y Singh, J. (2017). Redox-dependent interaction between thaumatin-like protein and β -glucan influences malting quality of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 7725–7730. doi: 10.1073/pnas.1701824114
- Søgaard, B., y von Wettstein-Knowles, P. (1987). Barley: Genes and chromosomes. Carlsberg Research Communications, 52(2), 123–196. doi:10.1007/bf02907531
- Somers, D.J. (2004) Molecular Marker Systems and Their Evaluation for Cereal Genetics. In: Gupta P.K., Varshney R.K. (eds) *Cereal Genomics*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-2359-6_2
- Sorokin, A., Marthe, F., Houben, A., Pich, U., Graner, A., y Künzel, G. (1994). Polymerase chain reaction mediated localization of RFLP clones to microisolated translocation chromosomes of barley. *Genome*, 37(4), 550-555. doi:10.1139/g94-078

- Sreenivasulu, N., Graner, A., y Wobus, U. (2008). Barley genomics: an overview. *International journal of plant genomics*, 2008. doi:10.1155/2008/486258
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, R.K., Perovic, D., Grosse, I., y Graner, A. (2007) A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 114:823-839. doi:10.1007/s00122-006-0480-2
- Stich, B, y Malchinger, A. (2010). An introduction to association mapping in plantas. *CAB Reviews: Perspectives in agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, Vol. 5, Nº 39 ,1-9. doi: 10.1079/PAVSNNR20105039
- Stracke, S., Haseneyer, G., Veyrieras, J.B., Geiger, H.H., Sauer, S., Graner, A. y Piepho, H.P. (2009) Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of Flowering time in barley. *Theor. Appl. Genet.* 118: 259-273. doi:10.1007/s00122-008-0896-y
- Szűcs, P., Blake, V.C., Bhat, P.R., Close, T.J., Cuesta-Marcos, A., Muehlbauer, G.J., Ramsay, L.V., Waugh, R., y Hayes, P.M. (2009) An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *The Plant Genome*, 2:134-140. doi:10.3835/plantgenome2008.01.0005
- Taheri, S., Lee Abdullah, T., Yusop, M., Hanafi, M., Sahebi, M., Azizi, P., & Shamshiri, R. (2018) Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants. *Molecules* 23, no. 2: 399. doi:10.3390/molecules23020399
- Taketa, S., Yuo, T., Tonooka, T., Tsumuraya, Y., Inagaki, Y., Haruyama, N., Larroque, O. y Jobling, S. A. (2011). Functional characterization of barley betaglucanless mutants demonstrates a unique role for CslF6 in (1, 3; 1, 4)- β -D-glucan biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 63, 381–392. doi: 10.1093/jxb/err285
- Tanksley, S.D., (1993) Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27: 205–233. doi:10.1146/annurev.ge.27.120193.001225
- Thomas, W. T. B. (2003). Prospects for molecular breeding of barley. *Annals of applied Biology*, 142(1), 1-12. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00223.x

- Thomas, W.T.B.; Powell, W.; Waugh, R.; Chalmers, K.J.; Barua, U.M.; Jack, P.; Lea, V.; Forster, B.P.; Swanston, J.S.; Ellis, R.P.; Hanson, P.R. y Lance, R.C.M. (1995) detection of quantitative trait loci agronomic, yield, grain, and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 91: 1037-1047. doi:10.1007/BF00223917
- Thomas, W.T.B.; Powell, W.; Swanston, J.S.; Ellis, R.P.; Chalmers, K.J.; Barua, U.M.; Jack, P.; Lea, V.; Forster, B.P.; Waugh, R. y Smith, D.A. (1996) 86 Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. *Crop Sci.* 36: 265-276. doi:10.2135/cropsci1996.0011183X003600020009x
- Thomson, M.J. (2014) High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breed Biotech.*;2:195–212. doi:10.9787/PBB.2014.2.3.195
- Thornsberry, J., Goodman, M.M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D., y Buckler, E. (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics.* doi: 10.1038/90135
- Turner, S. D. (2018). *qqman*: an R package for visualizing GWAS results using QQ and manhattan plots. *J. Open Source Softw.* 3: 731
- Varshney, R. K., Hoisington, D. A., y Tyagi, A. K. (2006). Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 490–499. doi:10.1016/j.tibtech.2006.08.006
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks RE, y Graner A. (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 114:1091-1103. doi:10.1007/s00122-007-0503-7
- Verocai, M. (2021) Identificación de los componentes genéticos que determinan la adaptación de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en condiciones de alto rendimiento. Tesis de Magister. Paysandú, Facultad de Agronomía, UDELAR, Uruguay.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vande, L.T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J. Paleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414. doi:10.1093/nar/23.21.4407

- Von Zitzewitz, J., Cuesta-Marcos, A., y Condon, F. (2011) The genetics of winter hardiness in Barley: perspectives from genome-wide association mapping. *The Plant Genome* 4:76-91. doi:10.3835/plantgenome2011.07.0020
- Walker, C. K., Ford, R., Muñoz-Amatriaín, M., y Panozzo, J. F. (2013). The detection of QTLs in barley associated with endosperm hardness, grain density, grain size and malting quality using rapid phenotyping tools. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(10), 2533-2551. doi:10.1007/s00122-013-2153-2
- Wang, M., Jiang, N., Jia, T., Leach, L., Cockram, J., Waugh, R., Ramsay, L. y Luo, Z. (2012). Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(2), 233-246. doi:10.1007/s00122-011-1697-2
- Wang, J., Yang, J., Jia, Q., Zhu, J., Shang, Y., Hua, W., y Zhou, M. (2014). A new QTL for plant height in barley (*Hordeum vulgare* L.) showing no negative effects on grain yield. *Plos one*, 9(2), e90144. doi: 10.1371/journal.pone.0090144
- Wang, J., Yang, J., Zhang, Q., Zhu, J., Jia, Q., Hua, W., Shang, Y., Li, C. y Zhou, M. (2015). Mapping a major QTL for malt extract of barley from a cross between TX9425× Naso Nijo. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(5), 943-952. doi:10.1007/s00122-015-2481-5
- Wang, J., Yang, J., Hua, W., Wu, X., Zhu, J., Shang, Y., y Zhou, M. (2018). QTL mapping reveals the relationship between pasting properties and malt extract in barley. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3559. doi: 10.3390/ijms19113559
- Waugh, R., Bonar, N., Baird, E., Thomas, B., y Graner, A. (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol Gen Genet* 255:311–321 doi:10.1007/s004380050502
- Wei, K., Xue, D. W., Huang, Y. Z., Jin, X. L., Wu, F. B., y Zhang, G. P. (2009). Genetic mapping of quantitative trait loci associated with beta-amylase and limit dextrinase activities and beta-glucan and protein fraction contents in barley. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 839–846. doi: 10.1631/jzus.B0920135

- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., y Kilian, A. (2004) Diversity Arrays Technology (DART) for whole-genome profiling of barley *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jun 2004, 101 (26) 9915-9920; DOI: 10.1073/pnas.0401076101
- Wenzl, P., Li, H., Carling, J., *et al.* (2006). A high-density consensus map of barley linking DART markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC genomics*, 7(1), 1-22. doi:10.1186/1471-2164-7-206
- Wicker, T., Zimmermann, W., Perovic, D., Paterson, A.H., Ganai, M., Graner, A., y Stein, N. (2005) A detailed look at 7 million years of genome evolution in a 439 kb contiguous sequence at the barley Hv-eIF4E locus: recombination, rearrangements and repeats. *Plant J* 41: 184–194. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02285.x
- Williams, J., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, vol. 18, no. 22, pp. 6531–6535 doi:10.1093/nar/18.22.6531
- Wright, S. I., y Gaut, B. S. (2005). Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants. *Molecular biology and evolution*, 22(3), 506-519. doi:10.1093/molbev/msi035
- Xu, Y., Li, P., Yang, Z., y Xu, C. (2016) Genetic mapping of quantitative trait loci in crops. *Crop J* 5 (2): 175–184.
- Xu, Y., Zhang, X. Q., Harasymow, S., Westcott, S., Zhang, W., y Li, C. (2018). Molecular marker-assisted backcrossing breeding: an example to transfer a thermostable β -amylase gene from wild barley. *Molecular Breeding*, 38(5), 1-9. doi:10.1007/s11032-018-0828-8
- Xu, Y. B. (1997). Quantitative trait loci: separating, pyramiding, and cloning. *Plant breeding reviews* (USA). doi:10.1002/9780470650097.ch4
- Yao, X., Wu, K., Yao, Y., Bai, Y., Ye, J., y Chi, D. (2018). Construction of a high-density genetic map: genotyping by sequencing (GBS) to map purple seed coat color (Psc) in hulless barley. *Hereditas*, 155(1), 1-11. doi:10.1186/s41065-018-0072-6

- You, Q., Yang, X., Peng, Z. Xu, L. y Wang, J. Development and applications of a high throughput genotyping tool for polyploid crops: single nucleotide polymorphism (SNP) array. *Front Plant Sci.* 2018;9:104. doi:10.3389/fpls.2018.00104
- Young, N.D. (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol* 34: 479–501. doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.479
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Bi, IV, Yamasaki, M., Doebley, J., McMullen, M., Gaut, B.S., Nielsen, D., Holland, J., Kresovich, S., y Buckler, E. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2), 203–208. doi:10.1038/ng1702
- Yu, Y., Tomkins, J. P., Waugh, R., Frisch, D. A., Kudrna, D., Kleinhofs, A., brueggeman, R.S., Muehlbauer, G.J., Wise, R.P. y Wing, R. A. (2000). A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(7), 1093-1099. doi: 10.1007/s001220051584
- Yu, H., Wang, J., Zhao, Z., Sheng, X., Shen, Y., Branca, F., y Gu, H. (2019). Construction of a high-density genetic map and identification of loci related to hollow stem trait in broccoli (*Brassic oleracea* L. *italica*). *Frontiers in plant science*, 10, 45. doi:10.3389/fpls.2019.00045
- Yu, J., y Buckler, E. (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:155-160. doi: 10.1016/j.copbio.2006.02.003
- Zhang, Z.; Guo,X.; Liu,B.; Tang,L.; y Chen,F. (2011) Genetic diversity and genetic relationship of *Jatropha curcas* between China and Southeast Asian revealed by amplified fragment length polymorphisms. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 15, pp. 2825–2832, 2011 doi:10.5897/AJB10.838
- Zhang, Y., Wang, L., Xin, H., Li, D., Ma, C., Ding, X., *et al.* (2013). Construction of a high-density genetic map for sesame based on large scale marker development by specific length amplified fragment (SLAF) sequencing. *BMC Plant Biol.* 13:141. doi: 10.1186/1471-2229-13-141
- Zhao, J., Xu, Y., Li, H., Yin, Y., An, W., Li, Y., Wang, Y., Fan, Y., Wan, R., Guo, X. y Cao, Y. (2019). A SNP-based high-density genetic map of leaf and fruit related quantitative

trait loci in Wolfberry (*Lycium Linn.*). *Front. Plant Sci.* 10:977 10.3389/fpls.2019.00977

- Zhou, T., Takashi, I., Ryouichi, K., Naohiko, H., Makoto, K., Takehiro, H., y Kazuhiro, S. (2012). Malting quality quantitative trait loci on a high-density map of Mikamo golden * Harrington cross in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Molecular Breeding* 30, 103–112. doi: 10.1007/s11032-011-9602-x
- Zhou, G., Zhang, Q., Zhang, X. Q., Tan, C., y Li, C. (2015). Construction of high-density genetic map in barley through restriction-site associated DNA sequencing. *PLoS One*, 10(7), e0133161. doi:10.1371/journal.pone.0133161
- Zhou, G., Panozzo, J., Zhang, X. Q., Cakir, M., Harasymow, S., y Li, C. (2016). QTL mapping reveals genetic architectures of malting quality between Australian and Canadian malting barley (*Hordeum vulgare L.*). *Molecular Breeding*, 36(6), 70. doi:10.1007/s11032-016-0492-9
- Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S., y Yu, J. (2008). Status and prospects of association mapping in plants. *The plant genome*, 1(1). doi:10.3835/plantgenome2008.02.0089
- Ziyatdinov, A., Vázquez-Santiago, M., Brunel, H., et al (2018) lme4qtl: Linear mixed models with flexible covariance structure for genetic studies of related individuals. *BMC Bioinformatics* 19:68. doi: 10.1186/s12859-018-2057-x

6- MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S 1. Resumen de marcadores con LOD > 3 que conforman cada QTL

Número del QTL ^a	Localidad ^b	Cantidad de marcadores ^c	Caracter ^d	Marcador ^e	Cro. ^f	Ubicación (cM) ^g	<i>p</i> -valor ^h
1	MOSA	7	EX	6421	1	4.96003	4.47E-04
				7452		8.430047	9.30E-04
				8325		9.920056	5.99E-05
				10363		15.080063	8.06E-04
				10365		15.080064	2.24E-04
				10366		15.080065	6.83E-04
				10336		15.090067	2.65E-04
2	TODAS	3	EX	8325	1	9.920056	8.90E-04
				10365		15.080064	6.53E-04
				10336		15.090067	9.14E-04
3	INIA	4	EX	141347	2	142.631048	4.94E-04
				141350		142.631049	4.49E-04
				141670		142.63105	4.49E-04
				141795		142.631051	3.35E-04
4	TODAS	1	EX	287830	5	41.740141	5.16E-04
5	INIA	18	NS	72668	2	18.910115	8.32E-04
				72691		18.910117	8.32E-04
				72852		18.910118	8.91E-04
				72905		18.91012	8.32E-04
				72920		18.910121	8.91E-04
				72943		18.910122	8.32E-04
				72944		18.910123	8.85E-04
				72948		18.910124	8.91E-04
				72950		18.910125	8.32E-04
				73023		18.910127	9.58E-04
				73026		18.910128	9.58E-04
				73122		18.910129	9.58E-04
				73166		19.050134	9.58E-04
				73422		19.900137	8.78E-04
				73500		19.90014	9.58E-04
				73510		19.900141	9.58E-04
				73755		22.170142	7.66E-04
				74681		24.500151	6.98E-04
6	INIA	17	NS	77416	2	37.960154	8.02E-04
				77653		38.810155	8.66E-04
				77905		38.810157	8.48E-04
				77836		39.380158	8.48E-04
				77956		39.380159	8.02E-04
				78080		39.66016	7.85E-04

Número del QTL ^a	Localidad ^b	Cantidad de marcadores ^c	Caracter ^d	Marcador ^e	Cro. ^f	Ubicación (cM) ^g	p-valor ^h
				78081		39.660161	7.94E-04
				78132		39.660162	9.98E-04
				78167		40.080163	5.45E-04
				78199		40.090164	8.08E-04
				78209		40.090165	8.02E-04
				78233		40.230168	7.44E-04
				77325		40.890174	8.66E-04
				77326		40.890175	8.48E-04
				77232		41.440182	8.48E-04
				77607		45.220197	8.66E-04
				80847		47.780206	8.63E-04
7	MOSA	2	NS	107749	2	80.030448	6.29E-04
				107816		80.030449	4.76E-04
8	TODAS	53	NS	106749	2	76.910439	6.41E-04
				106842		76.91044	5.48E-04
				107708		77.430441	4.46E-04
				106893		77.930442	5.98E-04
				106895		77.930443	4.96E-04
				107449		80.030445	7.91E-05
				107661		80.030447	4.77E-04
				107749		80.030448	3.39E-04
				107816		80.030449	3.28E-04
				107860		80.17045	4.46E-04
				108103		80.590453	2.70E-04
				108122		80.880454	2.70E-04
				108145		80.880455	2.89E-04
				108147		80.880456	2.70E-04
				108149		80.880457	3.21E-04
				108213		80.880458	2.70E-04
				108163		80.950459	2.70E-04
				108191		80.95046	2.70E-04
				108518		81.520463	9.12E-04
				108661		81.520464	8.81E-04
				108707		81.520465	8.81E-04
				108544		81.800466	8.81E-04
				108545		81.800467	8.81E-04
				108649		81.800468	9.12E-04
				108669		81.800469	8.81E-04
				108797		82.290472	8.81E-04
108769	82.510473	8.81E-04					
108776	82.510474	9.12E-04					
108787	82.510476	8.81E-04					
108801	82.510477	8.81E-04					

Número del QTL ^a	Localidad ^b	Cantidad de marcadores ^c	Caracter ^d	Marcador ^e	Cro. ^f	Ubicación (cM) ^g	<i>p</i> -valor ^h
				108844		82.510478	9.12E-04
				108855		82.51048	9.12E-04
				108873		82.510481	9.12E-04
				108902		82.510482	9.12E-04
				108926		82.510483	8.81E-04
				108928		82.510484	8.81E-04
				108929		82.510485	9.12E-04
				109018		82.510486	8.81E-04
				109076		82.510487	8.81E-04
				109148		82.510488	9.12E-04
				109198		82.510489	8.81E-04
				109216		82.51049	9.12E-04
				109289		82.510492	8.81E-04
				109299		82.510493	9.12E-04
				109308		82.510494	8.81E-04
				109317		82.510495	9.12E-04
				109318		82.510496	9.12E-04
				109319		82.510497	9.12E-04
				109365		82.510498	9.63E-05
				109370		82.510499	9.63E-05
				109382		82.5105	9.12E-04
				109383		82.510501	9.12E-04
				109414		85.850502	5.73E-04
9	INIA	4	NS	109431	2	85.850504	9.97E-04
				109594		86.610507	8.82E-04
				112144		92.210542	9.40E-04
				112096		92.780556	6.29E-04
10	EEMAC	1	NS	305809	5	50.000294	9.88E-04
11	INIA	1	NS	305809	5	50.000294	6.41E-04
12	MOSA	1	NS	305809	5	50.000294	2.29E-04
13	TODAS	9	NS	301262	5	46.600259	6.94E-05
				301293		46.60026	2.46E-05
				301876		48.190269	2.46E-05
				305809		50.000294	9.76E-06
				308272		53.100323	1.32E-04
				308359		53.100324	1.46E-04
				308360		53.100325	1.14E-04
				308368		53.100326	1.32E-04
				308374		53.100327	1.26E-04
14	INIA	5	PG	107449	2	80.030445	9.38E-04
				107749		80.030448	2.47E-04
				107816		80.030449	3.51E-04
				109365		82.510498	5.12E-04

Número del QTL ^a	Localidad ^b	Cantidad de marcadores ^c	Caracter ^d	Marcador ^e	Cro. ^f	Ubicación (cM) ^g	<i>p</i> -valor ^h
				109370		82.510499	5.12E-04
15	INIA	14	PG	109414	2	85.850502	3.88E-04
				109594		86.610507	1.34E-04
				109666		86.61051	1.96E-04
				109678		86.610511	2.55E-04
				111436		89.770517	6.07E-05
				110405		89.800522	2.12E-05
				110599		89.800523	8.41E-05
				111307		90.720529	6.07E-05
				111314		90.72053	6.73E-04
				111570		90.720531	6.07E-05
				111550		91.010532	2.20E-05
				111554		91.010533	7.53E-05
				111564		91.010535	6.07E-05
				111828		91.010539	6.07E-05
16	MOSA	4	PG	340688	5	133.750714	8.93E-04
				344577		139.100783	9.90E-04
				344688		139.100787	9.13E-04
				345420		139.240819	5.91E-04
17	MOSA	1	PG	500871	7	108.780815	4.24E-04
18	INIA	1	BG	229394	4	24.380077	4.89E-04
19	MOSA	1	BG	292121	5	44.170192	7.89E-04
20	INIA	28	BG	291801	5	42.99015	4.00E-04
				292291		44.10016	3.41E-04
				292998		44.10017	4.99E-04
				293765		44.10017	4.00E-04
				294937		44.10017	3.41E-04
				297132		44.10018	3.41E-04
				298706		44.10018	3.41E-04
				296759		44.13019	4.00E-04
				297709		44.13019	7.53E-04
				292121		44.17019	7.02E-04
				292205		44.17019	3.41E-04
				292771		44.17019	3.41E-04
				292797		44.17019	4.99E-04
				293240		44.1702	4.99E-04
				293433		44.1702	5.91E-04
				293507		44.1702	3.41E-04
				293886		44.1702	4.00E-04
				294651		44.17021	7.53E-04
294771	44.17021	3.41E-04					
295251	44.17021	5.18E-04					
296120	44.17021	5.68E-04					

Número del QTL ^a	Localidad ^b	Cantidad de marcadores ^c	Caracter ^d	Marcador ^e	Cro. ^f	Ubicación (cM) ^g	<i>p</i> -valor ^h
				296418		44.17021	5.91E-04
				296577		44.17022	5.69E-04
				297761		44.17023	5.47E-04
				298123		44.17023	3.41E-04
				297625		44.20023	5.69E-04
				301224		46.53026	5.64E-04
				300512		46.60026	5.69E-04
21	EEMAC	9	BG	301262	5	46.600259	9.57E-04
				301293		46.60026	4.52E-04
				301876		48.190269	4.52E-04
				305809		50.000294	2.63E-05
				308272		53.100323	1.28E-04
				308359		53.100324	1.35E-04
				308360		53.100325	9.96E-05
				308368		53.100326	1.28E-04
				308374		53.100327	1.04E-04
22	TODAS	34	BG	291801	5	42.990149	3.71E-04
				292291		44.100163	3.94E-04
				292998		44.100165	4.03E-04
				293765		44.100168	3.71E-04
				294937		44.100172	3.94E-04
				297132		44.100177	3.94E-04
				298706		44.100181	3.94E-04
				296759		44.130187	3.71E-04
				297709		44.130189	4.18E-04
				292121		44.170192	1.62E-04
				292205		44.170193	3.94E-04
				292771		44.170194	3.94E-04
				292797		44.170195	4.03E-04
				293240		44.170198	4.03E-04
				293433		44.170199	3.78E-04
				293507		44.1702	3.94E-04
				293886		44.170201	3.71E-04
				294651		44.170205	4.33E-04
				294771		44.170207	3.94E-04
				295251		44.170209	3.42E-04
				296120		44.170212	4.03E-04
				296418		44.170215	3.78E-04
				296577		44.170217	4.40E-04
				297761		44.170225	3.78E-04
				298123		44.170227	3.94E-04
				297625		44.20023	4.40E-04
				301224		46.530256	1.61E-04

Número del QTL ^a	Localidad ^b	Cantidad de marcadores ^c	Carácter ^d	Marcador ^e	Cro. ^f	Ubicación (cM) ^g	<i>p</i> -valor ^h
				300512		46.600258	3.39E-04
				305809		50.000294	1.53E-04
				308272		53.100323	6.40E-04
				308359		53.100324	7.18E-04
				308360		53.100325	6.01E-04
				308368		53.100326	6.40E-04
				308374		53.100327	6.75E-04
23	MOSA	10	BG	338922	5	130.900692	6.02E-04
				340216		133.750705	4.54E-04
				340323		133.750707	4.44E-04
				343372		135.95075	1.26E-04
				343373		135.950751	1.30E-04
				343384		135.950753	1.26E-04
				343392		135.950754	1.26E-04
				342906		136.60076	1.45E-04
				342925		136.600761	1.30E-04
				344176		137.920772	4.54E-04
24	MOSA	20	BG	349738	5	145.65086	3.43E-04
				349777		145.650861	3.43E-04
				349795		145.650862	2.96E-04
				349813		145.650863	3.43E-04
				349818		145.650864	3.43E-04
				349904		145.650865	3.43E-04
				350368		149.790875	2.96E-04
				349856		150.170887	6.88E-04
				349859		150.170888	2.96E-04
				351622		151.11089	7.51E-04
				351353		151.250891	2.57E-04
				351372		151.250893	2.57E-04
				351449		151.250896	2.61E-04
				351832		151.670904	6.36E-04
				352381		151.670905	6.36E-04
				352391		151.670909	6.74E-04
				352393		151.67091	7.31E-04
				352394		151.670911	6.36E-04
				352989		152.360937	7.71E-04
				351810		153.540964	3.80E-04

a- Número de QTL asignado en la Tabla 4

b- Localidad donde fue detectado el QTL

c- Cantidad de marcadores con LOD mayor a 3 que integran el QTL del QTL

d- Carácter en estudio

e- SNP más significativa del QTL. Se eliminó la nomenclatura JHI-Hv50k que precede al marcador

f- Cromosoma donde fue detectado el QTL

g- Ubicación de cada Marcador^e

h- *p-valor* para cada Marcador^e

En naranja se resalta el SNP más significativo del QTL.

En azul se indican los marcadores que fueron utilizados (juntos con el pico del QTL) para determinar los haplotipos de cada QTL mostrados en la Tabla 5.

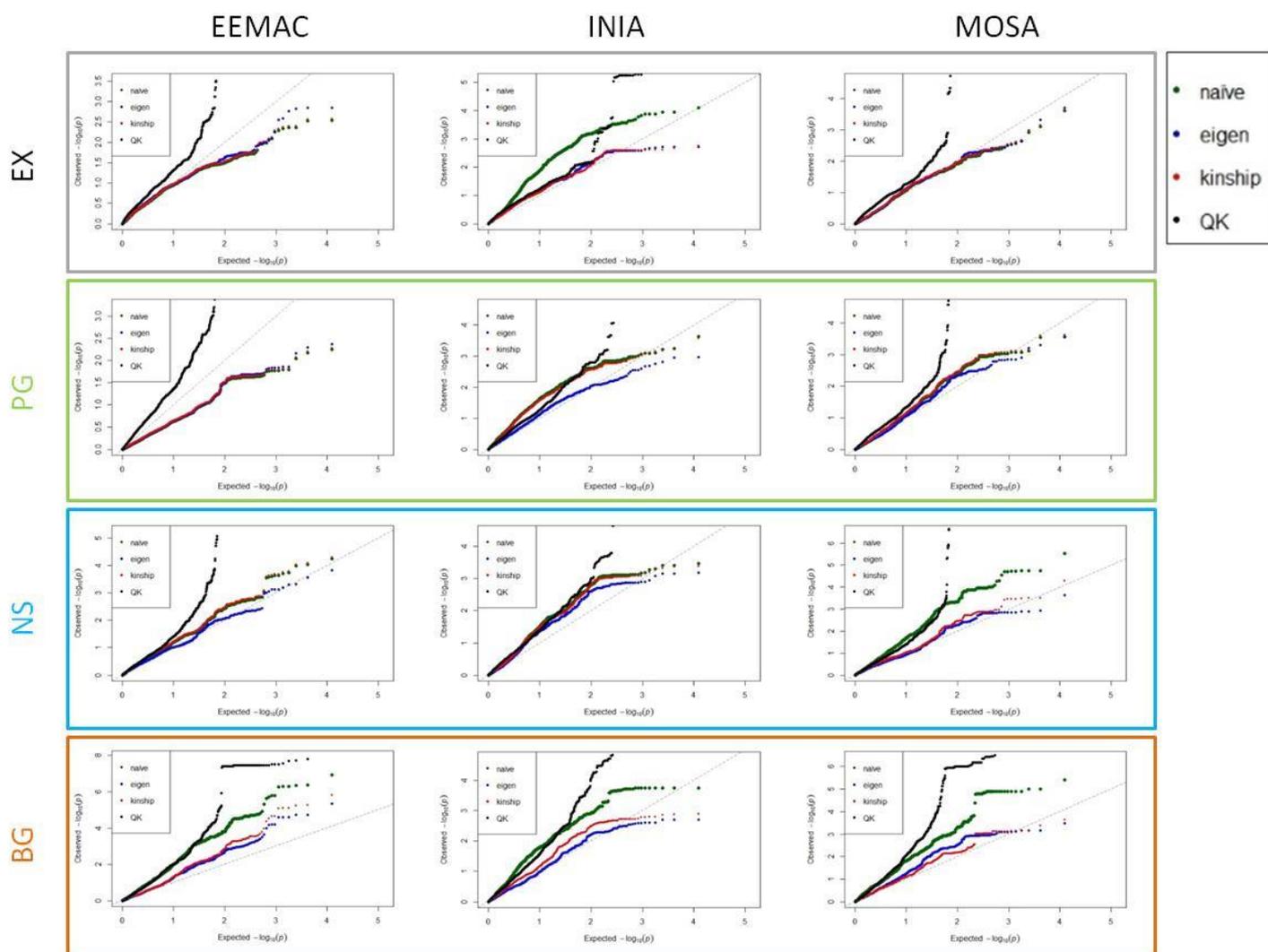


Figura S 1. Función de distribución acumulativa de los p -valores en estudio de GWAS para todos los caracteres y ambientes. Las diferentes curvas corresponden a diferentes modelos comparados: 1) Naive; una prueba simple de asociación sin corrección para la estructura de la población); 2) Eigenstrat; modelo de efectos mixtos que incluye estructura poblacional como efecto aleatorio (Price *et al.*, 2006, Malosetti *et al.*, 2007); 3) Kinship ; modelo mixto que incluye la matriz de coancestría entre genotipos como efecto aleatorio (Parisseaux y Bernardo 2004); 4) Q + K ; modelo de efectos mixtos que incluye tanto la estructura de la población como la coancestría entre genotipos (Yu *et al.*, 2006 a,b). EX, extracto de malta; NS, Nitrógeno soluble; PG, contenido de proteína de grano; BG, β -glucano de mosto.