

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA DORMICIÓN DE SEMILLA Y LA
SENSIBILIDAD AL AGUA EN GERMOPLASMA DE CEBADA RELEVANTE EN
URUGUAY

por

Santiago MANASLISKI GIORDANO

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

Tesis aprobada por:

Director: _____

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

MSc. (Ing. Agr.) Andrés Locatelli

MSc. (Ing. Agr.) Luis Viega

Fecha: 29 de julio de 2015

Autor: _____

Santiago Manasliski Giordano

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Ariel Castro por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de grado, orientándome e incentivándome cada día a superarme en búsqueda de mi crecimiento profesional y como persona.

A Andrés Locatelli por su dedicación, ayuda y paciencia incondicional durante todo el proceso de realización del trabajo de tesis, el cual se facilitó en gran medida con su apoyo.

A mi familia, en especial a mis padres Sonia y Eduardo por apoyarme de manera constante y paciente, enseñándome que el “NO” debía ser para no renunciar a mis objetivos en ningún momento pese a las dificultades, y por su esfuerzo realizado para darme la posibilidad de realizar una carrera universitaria.

A Daniela por estar siempre presente, ayudándome a mantener la concentración y entrega para con la tesis en los momentos difíciles, quien supo entenderme y darme el consejo adecuado cada vez que necesité de ella.

Al grupo de cebada en general: Pía Grignola, Sebastián Bartaburu, Andrés Ferráz y Juan Mosqueira; personas con las que compartí la mayor parte del tiempo en la EEMAC, estando presentes en todo momento en los que necesité de ellos, tratándome como uno más del grupo en el día a día.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VI
1 <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 EL CULTIVO DE CEBADA.....	3
2.1.1 <u>Genética y taxonomía</u>	3
2.2 CALIDAD DE CEBADA CERVECERA	3
2.2.1 <u>Parámetros de calidad de cebada</u>	4
2.2.1.1 Humedad.....	4
2.2.1.2 Pureza varietal.....	4
2.2.1.3 Peso de grano	4
2.2.1.4 Clasificación por tamaño	5
2.2.1.5 Porcentaje de proteína.....	5
2.2.1.6 Hagberg Falling Number	5
2.2.1.7 Poder germinativo.....	6
2.3 DORMICIÓN DE SEMILLAS	6
2.3.1 <u>Aspectos generales y fisiológicos</u>	6
2.3.2 <u>Base genética</u>	7
2.4 SENSIBILIDAD AL AGUA.....	8
2.5 MAPEO ASOCIATIVO.....	9
2.5.1 <u>Marco conceptual</u>	9
2.5.2 <u>Desequilibrio de ligamiento</u>	10
2.5.3 <u>Falsos positivos</u>	10
2.5.3.1 Estructura poblacional	11
2.5.3.2 Relaciones de parentesco	11

2.5.3.3	Corrección de falsos positivos	11
3	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	13
3.1	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	13
3.2	CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	13
3.3	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	13
3.3.1	<u>Diseño experimental y descripción de los experimentos</u>	13
3.3.2	<u>Toma de muestras</u>	14
3.3.3	<u>Mediciones</u>	14
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
4	<u>RESULTADOS</u>	17
4.1	CONDICIONES CLIMÁTICAS	17
4.2	DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA	19
4.2.1	<u>Dormición</u>	19
4.2.2	<u>Sensibilidad al agua</u>	19
4.2.3	<u>Correlaciones fenotípicas</u>	20
4.3	ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN	21
4.4.	ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN MARCADOR CARÁCTER	22
5	<u>DISCUSIÓN</u>	25
6	<u>CONCLUSIONES</u>	32
7	<u>RESUMEN</u>	33
8	<u>SUMMARY</u>	34
9	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	35
10	<u>ANEXOS</u>	39

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Composición del germoplasma utilizado mostrando país de origen y tipo de cultivar.....	15
2. Temperatura y precipitaciones ocurridas en los meses de octubre, noviembre y diciembre para el año 2012 y el promedio de los últimos 30 años	17
3. Temperatura y precipitaciones ocurridas para cada época de siembra en el período de llenado de granos y su tercio final (Z49 – Z85 y 3/3 Z49 – Z85 respectivamente)	18
4. Coeficientes de correlación de Pearson entre dormición de semillas (DS), sensibilidad al agua (SA), suma térmica (ST 3/3 Z49-Z85) y temperatura media del tercio final del llenado de granos (TM 3/3 Z49-Z85) para las dos épocas de siembra	21
5. Haplotipos identificados según las 4 regiones genómicas asociadas a DS, SA, ST Z49, ST Z85 y TM 3/3 Z49-Z85 de los cromosomas 3H, 5H y 7H.....	29
Figura No.	
1. Temperatura (TEMP), temperatura media histórica (TEMP MEDIA) y precipitaciones (RAIN) en el llenado de granos Época 1 y 2. Barras en color verde y rojo sobre el gráfico indican la ubicación del tercio final del llenado de granos, día de inicio y fin en que el primero y el último de los genotipos alcanza dicho momento del período	18
2. Distribución de los genotipos según valor el fenotípico de DS, agrupados en número de genotipos en las diferentes clases de acuerdo al porcentaje de germinación al día 7 para cada época de siembra. NA: datos faltantes.....	19
3. Distribución de los genotipos, agrupados en número de genotipos de acuerdo al valor fenotípico de SA, medido como la diferencia de germinación al día 3 entre 4 y 8 ml para cada época de siembra. <10% muy poco sensibles; 10 – 25% poco sensibles; 25 – 45% sensibles; >45% muy sensibles. NA: datos faltantes.....	20

4. Estructura genética de la población.	22
5. Asociaciones marcador-carácter significativas (pvalor <0,005) encontradas para DS, SA, TM 3/3 Z49-Z85, ST Z49 y ST Z85. Barras de color naranja indican asociaciones para un mismo QTL.	24
6. Estructura genética de los genotipos considerados dentro de cada grupo haplotipo.....	31

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de cebada es el segundo cereal invernal de importancia en Uruguay, ocupando un área estimada para la zafra de invierno 2012 en 112 mil hectáreas (MGAP. DIEA, 2012) y 69,6 mil hectáreas en 2013 (MGAP. DIEA, 2013).

En los sistemas de producción el cultivo ocupa un rol importante en las rotaciones agrícolas y constituye una opción para la diversificación de los ingresos y la mejora de la rentabilidad de los sistemas agrícolas. La estación de crecimiento está definida con la fecha de siembra en los meses Junio/Julio, siendo cosechada principalmente en el mes de noviembre, período en el cual ocurren condiciones ambientales óptimas (temperatura, fotoperíodo y precipitaciones) para el crecimiento y desarrollo del cultivo, siendo utilizados genotipos de tipo primaveral (Locatelli et al., 2012).

El principal destino de la producción es la industrialización para la producción de malta para la elaboración de cerveza y en menor medida de whisky (Arias, 1991). El proceso de malteo consiste en germinar el grano limpio y clasificado, con la finalidad de producir enzimas (amilolíticas y proteolíticas) a un nivel óptimo que permita posteriormente la elaboración de cerveza, por lo tanto este proceso impone importantes exigencias de calidad que permitan cumplir con dicho objetivo.

La principal condición que permite la industrialización del grano es la capacidad de la semilla para germinar, siendo afectada por diversos factores, entre ellos se pueden citar el pregerminado o brotado en la planta previo a la cosecha por la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para dicho proceso una vez alcanzada la madurez fisiológica del cultivo, explicado por la falta de dormición de la semillas. Otro factor de importancia que afecta de forma significativa el proceso de germinación es la presencia de semillas sensibles al agua, donde se observa un menor porcentaje de germinación cuando el grano entra en contacto con excesos hídricos.

En ambas características las condiciones ambientales (temperatura y precipitaciones) ocurridas durante el tercio final del período definido entre antesis (Zadocks 49) y madurez fisiológica (Zadocks 85) (llenado de granos) (García de Moral et al., 2002), tienen gran influencia sobre el grado de dormición y en la sensibilidad al agua de las semillas (Rodríguez et al. 2001, Castro et al. 2010). Además de la influencia ambiental, Benech-Arnold et al. (2001) menciona el control genético de la germinación a causa de alta dormición en algunos cultivares, mientras que los de baja dormición son susceptibles al pregerminado o brotado en la planta cuando las condiciones ambientales son favorables.

Estos cultivares susceptibles al pregerminado en la planta madre son los más perjudicados en los años climáticamente atípicos, provocando pérdida de calidad de los granos para la industria maltera.

El clima uruguayo presenta gran variabilidad entre años en cuanto a la ocurrencia de precipitaciones y niveles de temperatura, por lo que el uso a nivel comercial de cultivares de alta dormición (baja susceptibilidad al pregerminado), puede disminuir los problemas de calidad, en especial en dichos años. Por otra parte lotes de cebada con alta dormición no pueden ser malteados inmediatamente luego de la cosecha, estos mostraran valores altos de sensibilidad al agua, por lo que deben ser malteados 30 a 90 días poscosecha, aumentando los costos financieros de las malterías.

El objetivo de este trabajo es identificar regiones genómicas relacionadas al control genético de la dormición de semillas y sensibilidad al agua mediante la metodología de mapeo asociativo, utilizando una colección de cultivares de cebada representativos del germoplasma utilizado en los programas de mejoramiento de Uruguay y América del Sur.

Además se analizará la asociación de los factores genéticos que determinan la dormición de semilla y la sensibilidad al agua, relacionadas con regiones genéticas asociadas a las condiciones de temperatura ocurridas durante el tercio final del llenado de granos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL CULTIVO DE CEBADA

2.1.1 Genética y taxonomía

La cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.) es una especie vegetal diploide ($2n = 2x = 14$), posee 7 pares de cromosomas relativamente grandes y citológicamente bien diferenciados. Es una especie autógena perteneciente a la tribu Triticeae, familia Poaceae (Silveira, 2008).

2.2 CALIDAD DE CEBADA CERVECERA

El concepto de calidad de cebada cervecera es amplio, complejo de definir y muy variable, dependiendo de los procesos de producción de cerveza y con los tipos de cerveza producida en los distintos países (Arias, 1991), por tanto en cada país los valores de los parámetros tienen definición local, y en el caso de Uruguay esto no es ajeno.

Según Arias (1991) la calidad comercial de cebada cervecera se define en base a las normas de comercialización a la que está sujeta y que refieren a características objetivas y subjetivas de la cebada que están relacionadas en mayor o menor grado con el desempeño que tendrán en la maltería.

En el país los criterios para definir calidad de cebada con aptitud para la producción son establecidos por las industrias malteras. Arias (1991) describe como criterios principales el porcentaje de proteína del grano, la proporción de primera y segunda en conjunto y el porcentaje de germinación.

Los conceptos calidad de cebada y calidad de malta si bien están muy relacionados, implican ideas diferentes ya que cada uno se define por parámetros distintos.

La definición de calidad de malta se establece en relación a los parámetros: extracto de malta, tiempo de sacarificación, tiempo de filtración, color del mosto, viscosidad del mosto, índice de Kolbach, α amilasa, Poder Diastásico, Nitrógeno soluble y amino nitrógeno libre (FAN), friabilidad, índice de Hartong, atenuación límite aparente y contenido de β -glucanos, (Gómez 2005, Savin y Aguinaga 2011). Estos parámetros están relacionados con la calidad de malta, ya que son indicadores que se relacionan con el proceso de producción de la misma y posteriormente con la elaboración de cerveza, ya que afectan en forma directa y/o indirecta la calidad de la misma durante el proceso de elaboración.

La calidad de cebada refiere a característica del grano de cebada en su estado natural que determinan su aptitud para la producción de malta. Castro (1996) menciona como indispensable para la industria la recepción de semillas viables para un germinado homogéneo, tanto en el número de semillas como en la velocidad de germinación de las mismas. Por esta razón es que se desea uniformidad genética identificando el cultivar, granos redondeados, grandes y pesados, un porcentaje óptimo de proteína en el grano y alto poder germinativo; todas estas variables son consideradas características de calidad maltera requeridas por las industrias.

2.2.1 Parámetros de calidad de cebada

2.2.1.1 Humedad

La humedad del grano es un factor importante en la comercialización, ya que se relaciona directamente con la capacidad de conservación de la misma. El valor óptimo para conservar lotes de cebada por períodos prolongados es de 12%, con valores mayores de humedad los períodos para mantener la semilla con alto poder germinativo (< 95%) se reducen, por lo tanto se deberá incurrir en el secado de la semilla para asegurar altos porcentajes de germinación durante períodos prolongados (Arias, 1991). Además, aquellos lotes de semilla que sobrepasen dicho límite deben incurrir en proceso de secado, lo cual genera costos adicionales pero además debe realizarse en forma cuidadosa ya que puede afectarse la viabilidad del embrión. Otra consecuencia negativa por exceso de humedad en los granos de cebada es la presencia de hongos, los cuales producen micotoxinas que terminan afectando la calidad de la malta (Savin y Aguinaga, 2011).

2.2.1.2 Pureza varietal

La obtención de un malteado de buena calidad debe partir de lotes de semilla con alta pureza varietal, debido a que los diferentes cultivares se comportan de forma diferencial en el malteo. Obtener lotes homogéneos genotípicamente es el primer paso para homogeneizar la germinación en el proceso de malteo, ya que el proceso industrial se establece en relación al comportamiento de cada cultivar (Savin y Aguinaga, 2011). Por lo tanto malteos a partir de mezclas varietales darán como resultado maltas de inferior calidad, en comparación con maltas de lotes de semilla de un solo genotipo (Arias, 1991).

2.2.1.3 Peso de grano

El peso de grano es uno de los componentes del rendimiento, además Arias (1991) afirma que el peso de grano está relacionado con el contenido de almidón, y por ende con la calidad. Sin embargo el peso de grano por sí solo no es un buen indicador de calidad, éste debe asociarse con el tamaño y forma del mismo.

2.2.1.4 Clasificación por tamaño

La clasificación por tamaño o también denominada “calibre”, se determina mediante zarandas o tamices de calibre variable, en Uruguay se utilizan las zarandas de 2,8 mm, 2,5 mm y 2,2 mm; establecidas por las normas EBC. El objetivo de ésta clasificación refiere a que las malterías deben germinar por separado los granos de tamaño mayor a 2,5 mm, debido al comportamiento diferencial de los mismos en relación a la fracción 2,2 – 2,5 mm. Los granos de calibre mayor a 2,5 mm son los que contienen mayor cantidad de almidón, lo cual permite una mayor extracción de sustancias solubles (Savin y Aguinaga, 2011). Por tanto aquellos granos que no superan un tamaño mayor a 2,2 mm son descartados para la elaboración de malta, siendo utilizados como cebada forrajera para alimentación animal (Arias, 1991).

2.2.1.5 Porcentaje de proteína

Arias (1991) menciona que las sustancias nitrogenadas tienen gran importancia en la calidad de la malta que se fabrica, por ende el contenido de estas sustancias debe permanecer dentro de determinados rangos. Valores muy bajos de proteína en grano en lotes de cebada no pueden ser malteados, mientras que valores por fuera del óptimo (muy altos) generan problemas en la calidad industrial de la cebada cervecera. La proteína en grano se asocia a los parámetros de calidad de malta: extracto de malta, Índice de Kolbach y el poder diastásico (Gómez, 2005).

2.2.1.6 Hagberg Falling Number

Este parámetro de calidad ha sido muy utilizado por las industrias malteras para estimar el daño causado por el germinado previo a la cosecha. Éste método permite estimar el tiempo (segundos) que tarda un émbolo en atravesar una masa preparada con grano entero o harina, siendo los valores más altos (medido en segundos) los lotes de cebada con menor daño por pregerminado. El concepto detrás del índice de caída es cuantificar el nivel de actividad de la enzima alfa-amilasa de los granos. Esta enzima es sintetizada durante el proceso de germinación de la semilla, por lo cual aquellos granos que en presencia de condiciones ambientales favorables han comenzado el proceso de germinación previo a la cosecha, tendrán mayores niveles de alfa-amilasa en comparación con aquellos granos en que las condiciones ambientales post madurez fisiológica permitieron una mejor conservación. Por lo tanto granos con mayor daño por pregerminado tardarán menos tiempo (medido a través del Falling Number) en degradar el almidón, respecto a aquellos granos que no iniciaron su proceso germinativo a nivel de campo (Miralles et al., 2011).

2.2.1.7 Poder germinativo

El poder germinativo es la característica de mayor importancia en las cebadas cerveceras, siendo de vital importancia que durante el proceso de malteo todos los granos germinen y lo hagan en el menor tiempo posible, posibilitando la mayor producción de enzimas, transformando mayor cantidad del almidón y además serán menos atacadas por los microorganismos presentes en la semilla. Los granos que no logran germinar durante el malteo pasan a ser granos adjuntos o también llamados “grano crudo”, por lo que disminuye la calidad de la malta a producir. Por esta razón es imprescindible que los lotes de cebada que llegan a la maltería tengan alto poder germinativo (Arias, 1991). El objetivo de la germinación es transformar la mayor proporción del endospermo en material extraíble que permita la elaboración de malta (Gómez, 2005).

Algunas variedades de cebada presentan problemas para germinar si se las desea maltear inmediatamente pos cosecha, debido al control genético de la dormición, por lo que deben ser procesadas entre 30 a 90 días poscosecha para lograr la maduración necesaria y presenten altos porcentajes de germinación (Arias, 1991). Si bien este control genético del germinado puede ser negativo desde este punto de vista, tiene su efecto positivo ya que en años con exceso de lluvia durante el llenado de granos y particularmente en los días donde el cultivo alcanza la madurez fisiológica, sería deseable cierto grado de dormición para evitar el pregerminado en la espiga (Ullrich et al., 2009). También se ha observado que estos cultivares de cebada han mostrado bajo poder germinativo (lento inicio de la germinación y bajos valores finales) debido a la sensibilidad al agua de las semillas, la cual se menciona como una dormición secundaria, siendo también una variable negativa para el malteo, ya que podría aumentar la proporción de granos adjuntos durante dicho proceso (Arias 1991, Castro et al. 2010). Por tales motivos, la dormición y la sensibilidad al agua de las semillas de cebada, son variables muy importantes para la obtención de cebadas de alta calidad industrial, considerando que la misma debe lograrse desde la siembra del cultivo.

2.3 DORMICIÓN DE SEMILLAS

2.3.1 Aspectos generales y fisiológicos

La dormición de semillas (DS) se puede definir como la incapacidad de los embriones viables para germinar en presencia de condiciones ambientales favorables (Rodríguez et al. 2001, Benech-Arnold et al. 2002). Es conocido que algunos cultivares, luego de alcanzada la madurez fisiológica, pueden germinar aun estando en la planta como consecuencia de la falta de dormición en presencia de condiciones ambientales óptimas de humedad y temperatura. Sin embargo otros cultivares no lo hacen inclusive hasta varios meses después debido al fuerte control genético por esta característica,

(Benech-Arnold et al., 2001). Cuando se trata de cebada con destino para la producción de malta, es deseable un alto nivel de dormición luego de que el cultivo alcance la madurez fisiológica, y que permanezca al menos hasta la cosecha, con el objetivo de conservar las características de calidad del grano; pero este nivel de dormición no debe mantenerse por períodos extensos ya que al momento del germinado durante el proceso de malteo es deseable que sea baja para obtener un máximo de germinación (Beneche-Arnold et al., 2002).

Según Benech-Arnold et al. (2001) los cultivares pueden clasificarse en tres grupos según el avance del proceso de germinación previo a la cosecha: los que no germinan aún en condiciones ambientales favorables, los que se pregerminan y los que se brotan previo a la cosecha; diferenciándose estos dos últimos grupos por el tiempo de exposición a condiciones óptimas para germinar. Cuando la exposición de la semilla a condiciones favorables se da por períodos cortos (<24 horas) se produce el pregerminado; el embrión inicia el proceso de germinación pero este es interrumpido por la desecación del grano antes de ocurrida la emergencia de la radícula, conservando la viabilidad para crecer y desarrollarse. Si las condiciones persisten por períodos mayores, se produce el brotado precosecha; el proceso de germinación continúa hasta alcanzar el punto de no retorno, provocando la muerte del embrión durante la desecación del grano, a esto se le conoce como brotado precosecha. Si bien en los dos casos existen pérdidas de calidad de cebada, los mayores daños se observan con el brotado precosecha dado que se pierde la aptitud para malteo (Rodríguez et al., 2001).

2.3.2 Base genética

Numerosos estudios han demostrado que la dormición es una variable de herencia cuantitativa, controlada por un gran número de genes que son muy afectados por el ambiente (Prada et al. 2004, Gong et al. 2014). Algunos reportes se resumen en el siguiente párrafo, ubicando los QTL (Quantitative trait loci) encontrados en los diferentes cromosomas, los cuales se asocian al control genético de la dormición de semillas.

Benech-Arnold et al. (2002) menciona de manera general QTLs en los cromosomas 4H, 5H y 7H. Ullrich et al. (2008) mediante el análisis clásico de QTL en la población de haploides duplicados derivada del cruzamiento Steptoe/Morex, reporta caracteres de herencia cuantitativa en los cromosomas 1HL, 2HC, 3HC, 4HC, 5HC, 5HL Y 7HC. Ullrich et al. (2009) en línea con el estudio antes mencionado pero utilizando en este caso dos poblaciones biparentales, Triumph/Morex y Harrington/TR306, reportan QTL para los cromosomas 1HS, 3HL, 5HC, 7HC y 7HL para la primera de estas y en los cromosomas 1HL, 2HS, 3HL, 5HL y 7HL en la segunda población. Castro et al. (2010), analizando la población segregante BCD47/Baronesse, informa sobre QTL

encontrados en los cromosomas 1H, 3H, 4H, 5H, 6H y 7H asociados a la dormición de semilla. Gong et al. (2014), en estudios más recientes, reporta QTL significativos para la población Stirling/Harrington, en todos los cromosomas ubicando la mayor cantidad en el cromosoma 5H.

De acuerdo con los reportes seleccionados, considerando que la bibliografía para DS ha sido estudiada en diversas poblaciones por un gran número de autores, es importante mencionar las coincidencias en el cromosoma 1H, encontrándose marcadores que determinan regiones comunes para los bins 13 y 14 (últimos y primeros marcadores respectivamente); para el 2H una región de mayor amplitud pero coincidente en los bins 3 y 5 de este cromosoma; otra zona importante en el 5H entorno al bin 15 y para el cromosoma 7H la región definida por marcadores pertenecientes a los bins 5 y 6; no siendo coincidentes los reportes de los cromosomas 2H, 4H y 6H (Muñoz-Amatraín, 2011).

2.4 SENSIBILIDAD AL AGUA

La sensibilidad al agua (SA) se define como la reducción en la germinación de las semillas al entrar en contacto con excesos hídricos (Arias, 1991). La explicación de porqué algunos cultivares son sensibles al agua se atribuye al genotipo, a las condiciones ambientales durante el llenado de grano y la presencia de microorganismos presentes en la semilla (Castro et al., 2010). La estimación de la SA generalmente se evalúa con el Test de Pollock.

Poco se conoce sobre la sensibilidad al agua, ya que no es un problema para todas las regiones del mundo que producen cebada cervecera. Castro et al. (2010), citando a Visser et al., Narimanov y Korystov, plantean dos hipótesis, una que atribuye la sensibilidad al agua por la disminución del metabolismo del ácido abscísico (ABA), lo cual es planteado como análogo al grado de dormición de las semillas. Una segunda hipótesis refiere a una dormición secundaria inducida por la síntesis de ABA (Wang et al., 1995). Esta segunda hipótesis es similar a lo estudiado por Benech-Arnold et al. (2006), donde la hipoxia aumenta la sensibilidad al ABA en embriones de cebada disminuyendo el porcentaje de germinación. Bewley et al. (2013) en la descripción de los bloqueos de la germinación por las cubiertas de los granos citan, entre otros factores, a la interferencia del intercambio gaseoso como una forma de bloqueo de la germinación, dado que a bajas concentraciones de oxígeno los inhibidores de la germinación de las semillas permanecen intactos, dando como resultado semillas “durmientes”.

Esto, asociado a la definición de sensibilidad al agua y lo propuesto por Benech-Arnold et al. (2006), podría explicar este concepto en la medida que las semillas de cebada que entran en contacto con excesos hídricos estarían en un ambiente de

hipoxia para el embrión, disminuyendo la concentración de oxígeno que permita la oxidación de los inhibidores de la germinación, resultando en la disminución del porcentaje de germinación de los lotes de cebada por causa de la SA.

Por otra parte Castro et al. (2010), en una población de haploides duplicados (DH) derivados del cruzamiento BCD47/Baronesse reporta QTLs asociados con la sensibilidad al agua (coincidentes con la dormición de semillas y para parámetros de calidad maltera) en los cromosomas 1H, 3H, 5H y 7H, lo que evidencia el control de la SA debida al genotipo.

2.5 MAPEO ASOCIATIVO

2.5.1 Marco conceptual

El mapeo asociativo (MA) por desequilibrio de ligamiento (GWAS por sus siglas en inglés) es una metodología que intenta identificar regiones genómicas que controlan caracteres de efecto cuantitativo (QTL) mediante asociaciones marcador-carácter basados en el desequilibrio de ligamiento (DL) o también conocido como desequilibrio de la fase gamética. En términos estadísticos el MA se define como la covarianza entre un marcador polimórfico y el carácter de interés (Gupta et al., 2005).

El DL mide el grado de asociación no aleatoria entre alelos de diferente loci (Zhu et al., 2008), es decir aquellos caracteres que no segregan al azar, sino que se heredan en conjunto. El objetivo del MA es identificar marcadores moleculares que estén asociados con los genes o los QTL que determinan la expresión fenotípica de variables agronómicas de tipo cuantitativas (Pritchard et al., 2000). Las variables de tipo cuantitativas son aquellas características determinadas por un gran número de genes y que son muy influenciadas por el ambiente (Jannink et al., 2009). El ligamiento físico de caracteres refiere a correlaciones físicas entre loci en un cromosoma, en cambio el desequilibrio de ligamiento refiere a correlaciones entre alelos de diferentes loci en una población (Flint-García et al., 2003).

Zhu et al. (2008) propone el uso del MA para identificar genes responsables de caracteres de herencia cuantitativa que son de interés agronómico en bases genéticas amplias, identificando los alelos de los diferentes haplotipos que han derivado mediante evolución y/o por selección genética en determinadas condiciones, con la cuantificación del desequilibrio de ligamiento. Se plantea además como una alternativa para el estudio de la diversidad genética ya que no sería necesario el diseño de poblaciones biparentales como lo es necesario para el análisis de QTL, siendo que podrían ser identificados como se menciona anteriormente, en poblaciones de amplia base genética.

2.5.2 Desequilibrio de ligamiento

El DL se define como la asociación no aleatoria entre dos marcadores, o dos genes/QTLs, o entre un gen/QTL y un marcador de un determinado locus (Gupta et al., 2005). El desequilibrio de ligamiento mide la asociación entre alelos de diferente loci que se heredan en conjunto, siendo independiente del ligamiento físico (Hartl y Clark 2007, Zhu et al. 2008). Por lo tanto se asume como un concepto de población ya que se dice que hay una probabilidad dada de que los individuos de una población compartan determinada combinación alélica de una o varias regiones genómicas, es decir que ésta se repita en un determinado número de genotipos. Por esta razón no necesariamente se trata de un ligamiento físico entre alelos, es decir alelos de un mismo cromosoma, sino que puede ser entre alelos de diferentes cromosomas (Hartl y Clark, 2007). Si es necesario, el ligamiento físico entre el marcador y el alelo de interés que posibilite dicha asociación marcador-rasgo o marcador-carácter.

Gaut y Long (2003) mencionan que las causas de la caída del desequilibrio de ligamiento, definiendo la caída del DL como la ruptura de esas regiones heredables en conjunto por causa de un mayor número de recombinaciones, es determinada por el sistema reproductivo de algunas especies (fecundación cruzada) y/o alta tasa de mutación. Por tanto el DL es afectado por el sistema de reproducción de las diferentes especies (autógamas o alógamas); el bajo número de recombinación de algunas especies causando la fijación de ciertas regiones cromosómicas; estructura e historia de las poblaciones; y/o deriva genética y selección direccional por aumento de determinadas frecuencias alélicas, en busca de genotipos con mayor adaptación a determinados ambientes.

El DL disminuye con el incremento en la distancia entre loci, siendo el sistema reproductivo de la especie un factor de gran importancia en la ruptura del mismo, particularmente en las especies autógamas como lo es la cebada (Gupta et al., 2005). En este caso el alto desequilibrio de ligamiento es explicado en gran medida por la endogamia y en consecuencia el menor número de meiosis efectivas (evento que podría romper el desequilibrio de ligamiento), y sumado a esto se debe considerar que la base genética de la cebada proviene de un limitado número de líneas fundadoras, donde algunos haplotipos se perdieron y otros fueron preservados en busca de genotipos con mayor adaptación, direccionados por el mejoramiento genético (Kraakman et al., 2004).

2.5.3 Falsos positivos

Los falsos positivos o asociaciones espurias se denominan a aquellas asociaciones marcador-carácter que no son consecuencia de ningún loci (gen/QTL de interés), sino que pueden darse asociaciones significativas, identificando genes/QTLs que no existen, a causa de estructura poblacional y/o relaciones de parentesco entre los

genotipos, idea contraria a la del MA que representa asociaciones estadísticamente significativas entre un marcador y un rasgo fenotípico, evidenciando un ligamiento físico entre el marcador y el loci (Pritchard et al., 2000).

2.5.3.1 Estructura poblacional

Una población posee estructura cuando en ella existen subpoblaciones que han evolucionado de forma independiente, por lo que cada subgrupo conserva regiones cromosómicas propias. Por esta razón la probabilidad de encontrar asociaciones marcador-carácter significativas aumenta, pero puede no ser por un ligamiento físico entre el marcador y el rasgo de interés (gen/QTL), sino debida a la estructura misma de la población (Pritchard et al., 2000).

2.5.3.2 Relaciones de parentesco

Cuando los genotipos en cuestión presentan un ancestro común se dice que los alelos son idénticos por descendencia (IPD), mientras que cuando se habla de alelos idénticos por estado (IPE) los individuos presentan el mismo alelo para un determinado locus pero éstos no comparten ancestros comunes. Por tanto la presencia del alelo no basta para asegurar que dicha fuente de información está ligada a la región genómica de interés (gen o QTL de interés, Yu et al., 2006).

2.5.3.3 Corrección de falsos positivos

Los falsos positivos debidos a estructura poblacional o a relaciones de parentesco pueden ser corregidos con la utilización de modelos estadísticos que permiten obtener una mayor precisión en la detección de QTLs, con menor tasa de falsos positivos. La corrección mediante el análisis de componentes principales (PCA) reduce la detección de asociaciones espurias debidas a estructura poblacional por incorporar al modelo de análisis la variabilidad genética de la población. Dicha variación es reducida tanto como sea posible, a una menor cantidad de componentes que explican la mayor parte de ella, reduciendo las asociaciones espurias causadas por la conservación de regiones genómicas debidas a estructura poblacional, aumentando el poder de detección de genes/QTLs explicados por el ligamiento físico entre el marcador molecular y el carácter de interés (gen/QTL).

En cambio los falsos positivos debidos a relaciones de parentesco pueden ser corregidos incorporando al modelo de análisis, la información genotípica de los individuos en la matriz de parentesco (matriz K). De este modo es posible diferenciar alelos idénticos por descendencia de alelos idénticos por estado a través de la relación de parentesco entre dos individuos en una población. Si el alelo es IPE, no es posible asegurar que el marcador molecular esté ligado al gen/QTL de interés, sin embargo

cuando se trata de alelos IPD, es posible detectar un ancestro común que determina que ese alelo proviene de un mismo genotipo.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

En el presente trabajo se utilizaron un total de 96 genotipos de cebada de tipo primaveral de dos hileras (Cuadro 1), incluyendo variedades comerciales históricas de Uruguay, líneas experimentales avanzadas de programas de mejoramiento y ancestros utilizados como fuente de germoplasma en programas de mejoramiento locales, de importancia para Uruguay y América Latina.

3.2 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

La caracterización genotípica de la población se realizó con el primer set de oligonucleótidos para cebada (BOPA 1), establecido por “Barley Coordinated Agricultural Project” (Barley CAP). Dicho set contiene oligonucleótidos alelo-específico para un total de 1536 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), desarrollados por University of Minnesota (Close et al. 2009, Szücs et al. 2009).

Los marcadores que puedan generar potenciales errores en la asociación marcador-carácter fueron eliminados de la lista de análisis tomando el criterio de más de 10% de datos faltantes (para marcadores e individuos). Además se eliminaron para el análisis, los marcadores que tuvieran una frecuencia alélica menor al 10%. De los 1536 SNPs pertenecientes al set BOPA 1, 888 fueron informativos para la población estudiada en el presente trabajo de acuerdo con el filtrado de datos faltantes y mínima frecuencia alélica. La estimación de la posición de los SNPs se comparó con el mapa consenso desarrollado por Muñoz-Amatraín (2011), GrainGenes (2014).

3.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La caracterización fenotípica de la población se realizó en base a los experimentos realizados el año 2012 en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), Ruta 3, km 363, Paysandú, Uruguay (58°03´W, 32°55´S).

3.3.1 Diseño experimental y descripción de los experimentos

La primer época se sembró el 29 de julio, con parcelas de 3.6 m² (4 m x 0,9 m) compuestas de 6 surcos separados 0,15 m entre sí. La segunda época se sembró el 23 de setiembre en parcelas de 0,32 m² (0,80 m x 0,40 m) compuestas de 2 surcos separados 0,20 m (la diferencia entre épocas se explica por la menor disponibilidad de semilla para la última). En ambas épocas de siembra se utilizó un diseño experimental de bloques incompletos aumentados, con testigos repetidos y una única repetición por tratamiento.

3.3.2 Toma de muestras

En ambos experimentos (épocas 1 y 2; E1 y E2 respectivamente) se evaluó la dormición de semillas de cebada para lo cual se cosecharon 30 espigas por parcela al momento de madurez fisiológica (MF), determinando dicho punto por el oscurecimiento del raquis de las semillas del centro de la espiga, procedimiento utilizado por Castro et al. (2010). La sensibilidad al agua se evaluó mediante el test de Pollock (Pollock, 1962), a los 60 días pos cosecha para ambos experimentos (épocas 1 y 2).

3.3.3 Mediciones

De las 30 espigas obtenidas en MF se utilizaron 100 semillas provenientes del centro de las mismas (granos que alcanzan primero la madurez), germinadas a 20 °C durante 7 días en placas de Petri con 4 ml de agua destilada por placa, en las cuales se midió el porcentaje de germinación al día 4 y 7 siendo este último el valor fenotípico utilizado para estimar la dormición de semillas.

La sensibilidad al agua se midió utilizando el test de Pollock, el cual consiste en germinar en placas de Petri, 100 semillas de cebada (semillas germinadas a los 60 días pos cosecha del experimento) en 4 y 8 ml de agua destilada durante 3 días, determinando el valor fenotípico de sensibilidad al agua como la diferencia de germinación al día 3 entre 4 y 8 ml ($WS03 = \% \text{ germinación en 4 ml} - \% \text{ germinación en 8 ml}$).

Se midieron además la duración de las diferentes fases fenológicas, fechas a partir de las cuales se pudieron calcular los valores de suma térmica para los diferentes estadios fenológicos del ciclo del cultivo de cada genotipo, siendo importantes para el presente trabajo la suma térmica acumulada a antesis (ST Z49) y madurez fisiológica (ST Z85), además de la temperatura media ocurrida en el tercio final del llenado de granos (TM 3/3 Z49-Z85). Los datos climáticos (temperatura y precipitaciones) fueron tomados de la base de datos de la estación meteorológica de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la asociación entre los marcadores moleculares y las características de herencia cuantitativa se utilizó el siguiente modelo lineal mixto:

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

donde X es la matriz de marcadores moleculares, β es el vector de parámetros relacionado con la regresión simple de los marcadores en el fenotipo, Q es la matriz de estructura que establece la probabilidad de que un individuo pertenezca a una subpoblación, v es el vector de los efectos de cada grupo o subpoblación, K es la matriz identidad, u es el vector de efectos poligénicos y e es el vector de los errores aleatorios.

Los análisis de asociación marcador-carácter y estructura genética de la población se realizaron con el software R versión 2.10.1.

Cuadro 1. Composición del germoplasma utilizado mostrando país de origen y tipo de cultivar.

Genotipo	Origen *	Cultivar **	Genotipo	Origen *	Cultivar **
A. Laisa	Al	Cultivo	CEV97013	Br	-
A. Madi	Al	Cultivo	MN 599	Br	Cultivo
Berolina	Al	Cultivo	MN 610	Br	L. Exp.
Bido	Al	Cultivo	Harrington	Ca	Cultivo
Cheri	Al	Cultivo	Kenia	Di	Cultivo
Clivia	Al	Cultivo	Aurore	Fr	Cultivo
Danuta	Al	Cultivo	Beka	Fr	Cultivo
Defra	Al	Cultivo	Diamant	R. Ch	Cultivo
Haisa	Al	Cultivo	Hanna	R. Ch	Cultivo
Isaria	Al	Cultivo	Perun	R. Ch	Cultivo
Lisa	Al	Cultivo	Gull	Su	Cultivo
Pirolina	Al	Cultivo	Ymer	Su	Cultivo
Scarlett	Al	Cultivo	Plumage Archer	UK	Cultivo
Trumpf	Al	Cultivo	Ambev 19	Uy	Cultivo
Union	Al	Cultivo	Ambev 31	Uy	Cultivo
Villa	Al	Cultivo	Ambev 488	Uy	Cultivo
Volla	Al	Cultivo	Ambev 59	Uy	Cultivo
WM I	Al	L. Exp.	Carumbe	Uy	Cultivo
Ana	Ar	Cultivo	Ceibo	Uy	Cultivo
Bonita	Ar	Cultivo	CLE 232	Uy	Cultivo
FNC I22	Ar	Cultivo	Arrayán	Uy	Cultivo
Magnific 102	Ar	Cultivo	CLE 244	Uy	Cultivo
Magnific 104	Ar	Cultivo	CLE 247	Uy	Cultivo
Maltería Heda	Ar	Cultivo	CLE 250	Uy	Cultivo
Q. Ayelén	Ar	Cultivo	CLE 251	Uy	Cultivo
Q. Pampa	Ar	Cultivo	CLE 253	Uy	Cultivo
Clipper	Au	Cultivo	CLE 257	Uy	Cultivo
Prior	Au	Cultivo	Dayman	Uy	Cultivo
Quebracho	Au	Cultivo	FNC 1	Uy	Cultivo
Stirling	Au	Cultivo	FNC 6-1	Uy	Cultivo
Br2	Br	Cultivo	Guaviyú	Uy	Cultivo

Genotipo	Origen *	Cultivar **	Genotipo	Origen *	Cultivar **
C 8806	Uy	L. Exp.	C9529	Uy	L. Exp.
C 8828	Uy	L. Exp.	C9614	Uy	L. Exp.
C 9035	Uy	L. Exp.	C97043	Uy	L. Exp.
C 9038	Uy	L. Exp.	C97068	Uy	L. Exp.
C 9046	Uy	L. Exp.	CB9214	Uy	L. Exp.
C 9053	Uy	L. Exp.	CB9215	Uy	L. Exp.
C 9172	Uy	L. Exp.	Bowman	US	Cultivo
C 9173	Uy	L. Exp.	NCL9970	US	-
C 9201	Uy	L. Exp.	Karl	US	Cultivo
C 9315	Uy	L. Exp.	Logan	US	Cultivo
C 9616	Uy	L. Exp.	ND 14016	US	L. Exp.
C8730	Uy	L. Exp.	ND 17293	US	L. Exp.
C9303	Uy	L. Exp.	ND10277	US	L. Exp.
C9402	Uy	L. Exp.	ND21990	US	L. Exp.
C9404	Uy	L. Exp.	O - 131	-	-
C9412	Uy	L. Exp.	O - 49	-	-
C9528	Uy	L. Exp.	TOLAR	-	-

* País de origen: Alemania (Al), Argentina (Ar), Australia (Au), Brasil (Br), Canadá (Ca), Dinamarca (Din), Francia (Fr), República Checa (R. Ch.), Suecia (Su), Reino Unido (UK), Uruguay (Uy), Estados Unidos (US). ** Tipo de cultivar: Cultivo, Línea Experimental (L. Exp.).

4 RESULTADOS

4.1 CONDICIONES CLIMÁTICAS

En cuanto a la temperatura media ocurrida durante los meses de octubre, noviembre y diciembre, período en el cual se ubicó el llenado de granos de ambos experimentos, se registraron valores superiores en comparación con los promedios históricos. De manera similar ocurre para las precipitaciones acumuladas en dichos meses, siendo noviembre el mes donde las precipitaciones fueron inferiores a la media histórica, diferenciándose octubre y diciembre por los altos valores respecto a los datos climáticos para el promedio de los últimos 30 años (Cuadro 2, INUMET, 2014).

Cuadro 2. Temperatura y precipitaciones ocurridas en los meses de octubre, noviembre y diciembre para el año 2012 y el promedio de los últimos 30 años.

	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
T media 2012 (°C) *	18,3	22,4	23,6
T media histórica (°C) *	17,5	20,4	23,1
RR año 2012 (mm) **	382	41,8	435
RR media histórica (mm) **	122	118	115

* Temperatura media año 2012 y media histórica (T media histórica); ** Precipitaciones acumuladas año 2012 y media histórica.

Los valores de temperatura media para el llenado de granos de la E1 fueron menores en comparación a la E2 (3.4 °C), mientras que para el tercio final la diferencia entre épocas fue de menor magnitud (1 °C). En cuanto a las precipitaciones se observaron diferencias importantes en la cantidad registrada entre los ambientes durante la fase fenológica de llenado de granos y principalmente en las ocurridas en el tercio final del período (Cuadro 3), donde se concentraron más del 90% de las precipitaciones del período (Figura 1). Para ambos factores ambientales en el período considerado del año 2012, los valores muestran un año climáticamente atípico en cuanto a temperatura y precipitaciones en comparación a los datos promedio de los últimos 30 años.

Cuadro 3. Temperatura, suma térmica y precipitaciones ocurridas para cada época de siembra en el período de llenado de granos y su tercio final (Z49 – Z85 y 3/3 Z49 – Z85 respectivamente).

	ÉPOCA 1		ÉPOCA 2	
	Z49 – Z85	3/3 Z49 – Z85	Z49 – Z85	3/3 Z49 – Z85
Inicio del período	3/10/2012	23/10/2012	5/11/2012	18/11/2012
Final del período	19/11/2012	19/11/2012	28/12/2012	28/12/2012
Duración media (días)	31.5	10.5	27	9
T media llenado (°C) *	19.5	22.9	22.9	23.9
ST Media (°C.día) *	473	187	494	170
Precipitaciones (mm) **	408	58	506	460

* valor medio del período, considerando como día de inicio y fin la fecha en que el primero y el último de los genotipos alcanza dicho momento del ciclo respectivamente; ** precipitaciones acumuladas en el período señalado en *.

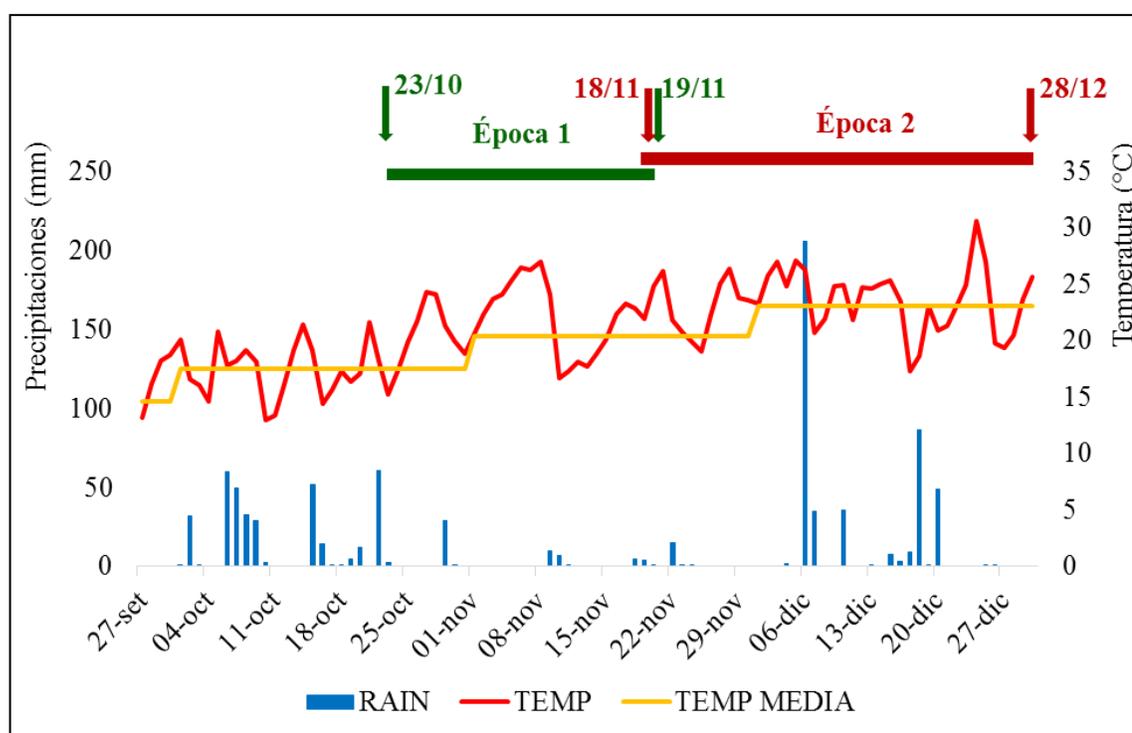


Figura 1. Temperatura (TEMP), temperatura media histórica (TEMP MEDIA) y precipitaciones (RAIN) en el llenado de granos Época 1 y 2. Barras en color verde y rojo sobre el gráfico indican la ubicación del tercio final del llenado de granos, día de inicio y fin en que el primero y el último de los genotipos alcanza dicho momento del período.

En la época 1 se observa mayor concentración en el tiempo en la ubicación del llenado de granos y por ende el tercio final, en cambio en la época 2 hay mayor

dispersión en las fechas de inicio del llenado para cada genotipo, comprendiendo un período de tiempo mayor que en la época 1.

4.2 DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA

4.2.1 Dormición

La mayor parte de los genotipos (82%, Figura 2) mostraron valores de germinación al día 7 menores al 5% para ambas épocas. Para la E1 el 57% de los cultivares (55 genotipos) tuvieron 0% de germinación, mientras que para la E2 fue un 47% (46 genotipos). En la segunda clase (1- 3%) las diferencias se invierten a favor de la segunda época con un 33% (32 genotipos), y un 22% de los cultivares (21 genotipos) para la primer época.

Para las restantes clases no se observan diferencias mayores en el porcentaje de germinación entre las épocas, coincidiendo además en la clase de menor dormición (>15% germinación) donde no hubo cultivares que mostraran este comportamiento.

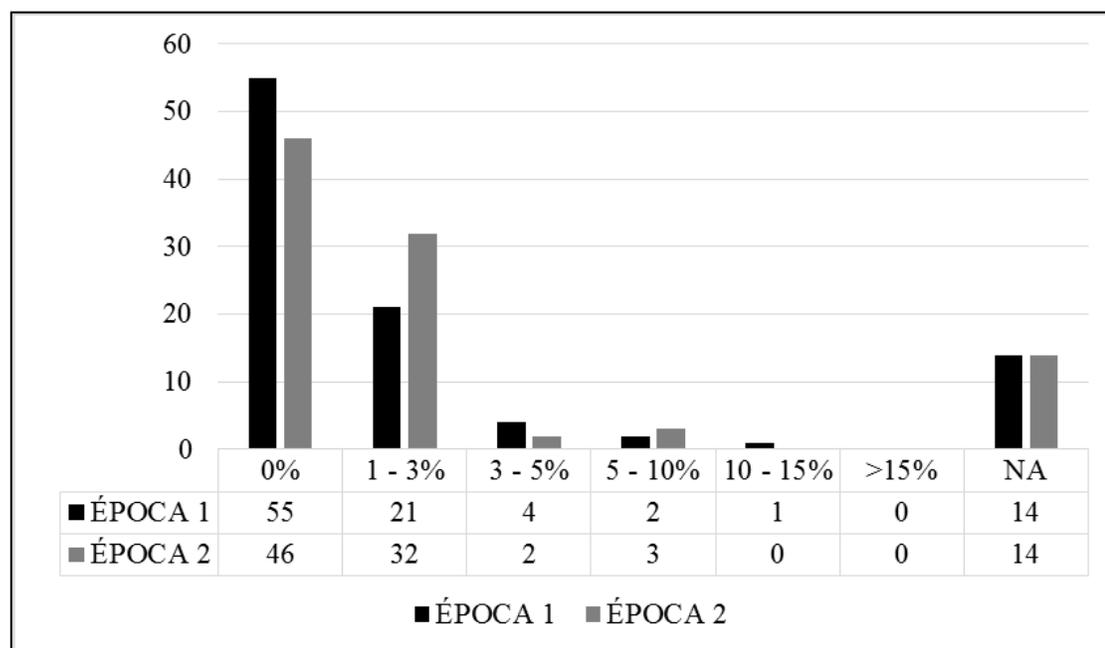


Figura 2. Distribución de los genotipos según el valor fenotípico de DS, agrupados en número de genotipos en las diferentes clases de acuerdo al porcentaje de germinación al día 7 para cada época de siembra. NA: datos faltantes.

4.2.2 Sensibilidad al agua

Los valores observados de sensibilidad al agua tuvieron una distribución similar a los observados para dormición de semillas (Figura 3), concentrándose la mayor

cantidad de genotipos en la clase de menor sensibilidad (<10%), en ambas épocas de siembra. La época 1 muestra valores superiores en las clases “poco sensibles”, “sensibles” y “muy sensibles” respecto a la época 2, no así para la clase “muy poco sensibles” donde la época 2 muestra una mayor concentración de genotipos.

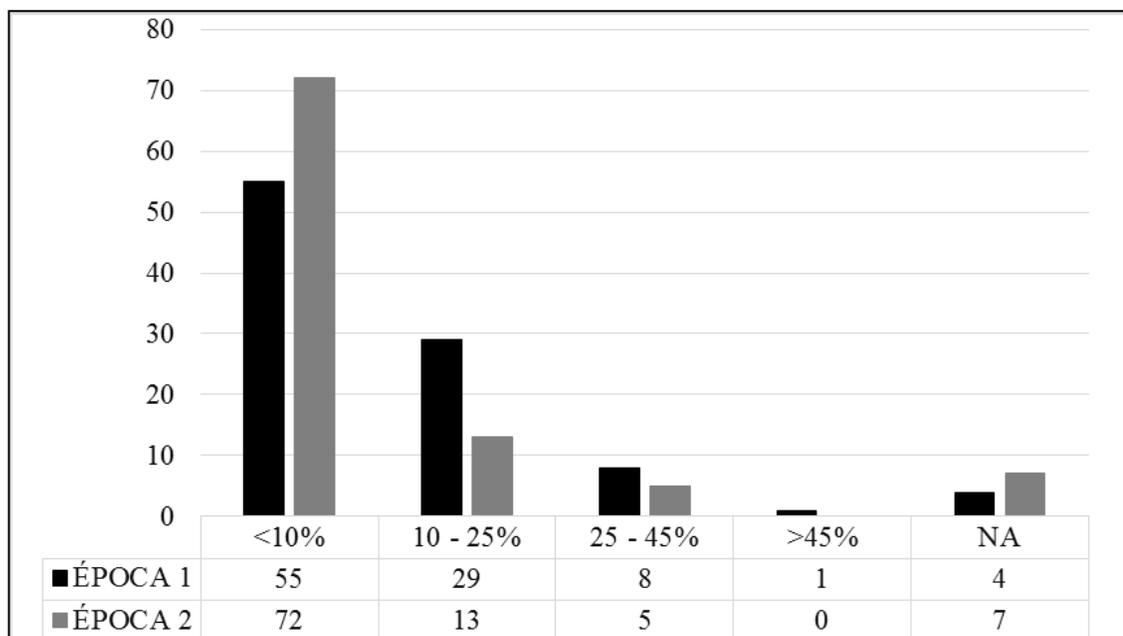


Figura 3. Distribución de los genotipos, agrupados en números de genotipos de acuerdo al valor fenotípico de SA, medido como la diferencia de germinación al día 3 entre 4 y 8 ml para cada época de siembra. <10% muy poco sensibles; 10 – 25% poco sensibles; 25 – 45% sensibles; >45% muy sensibles (Arias, 1991). NA: datos faltantes

4.2.3 Correlaciones fenotípicas

Las correlaciones fenotípicas encontradas para las variables dormición de semilla, sensibilidad al agua, suma térmica y temperatura media del tercio final del llenado de granos, mostraron, la mayoría de ellos, valores de correlación bajos y no significativos entre los datos fenotípicos para cada ambiente por separado (E1 y E2), como también entre ambientes de siembra (Cuadro 4).

Cuadro 4. Coeficientes de correlación de Pearson entre dormición de semillas (DS), sensibilidad al agua (SA), suma térmica (ST 3/3 Z49-Z85) y temperatura media del tercio final del llenado de granos (TM 3/3 Z49-Z85) para las dos épocas de siembra.

ÉPOCA 1			
	SA	ST 3/3 Z49-Z85	TM 3/3 Z49-Z85
DS	0,058 ns	0,15 ns	-0,11 ns
SA	1	0,09 ns	-0,14 ns

ÉPOCA 2			
	SA	ST 3/3 Z49-Z85	TM 3/3 Z49-Z85
DS	-0,16 ns	0,011 ns	0,10 ns
SA	1	-0,24 *	-0,18 ns

E1 vs E2			
	DS 2	SA 1	SA 2
DS 1	-0,09 ns	-	-
DS 2	1	-	-
SA 1	-	1	-0,06 ns
SA 2	-	-	1

*significativo con p-valor < 0.05; ns= no significativo.

4.3 ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN

De acuerdo al análisis de estructura, realizado con los componentes principales de mayor importancia (PC1 y PC2), se pueden establecer cuatro grupos (considerando los genotipos progenitores y su descendencia) según origen: los genotipos Europeos y sus descendientes conforman el Grupo 1; los materiales de North Dakota y sus descendientes el Grupo 2; los cultivares Australianos y sus descendientes integran el Grupo 3 y los genotipos Argentinos y sus descendientes el Grupo 4 (Figura 4). Los genotipos denominados como uruguayos, es esperable que estén dispersos en varios puntos del gráfico dado que son y fueron generados en base a diferentes tipos de germoplasma proveniente de diferentes orígenes.

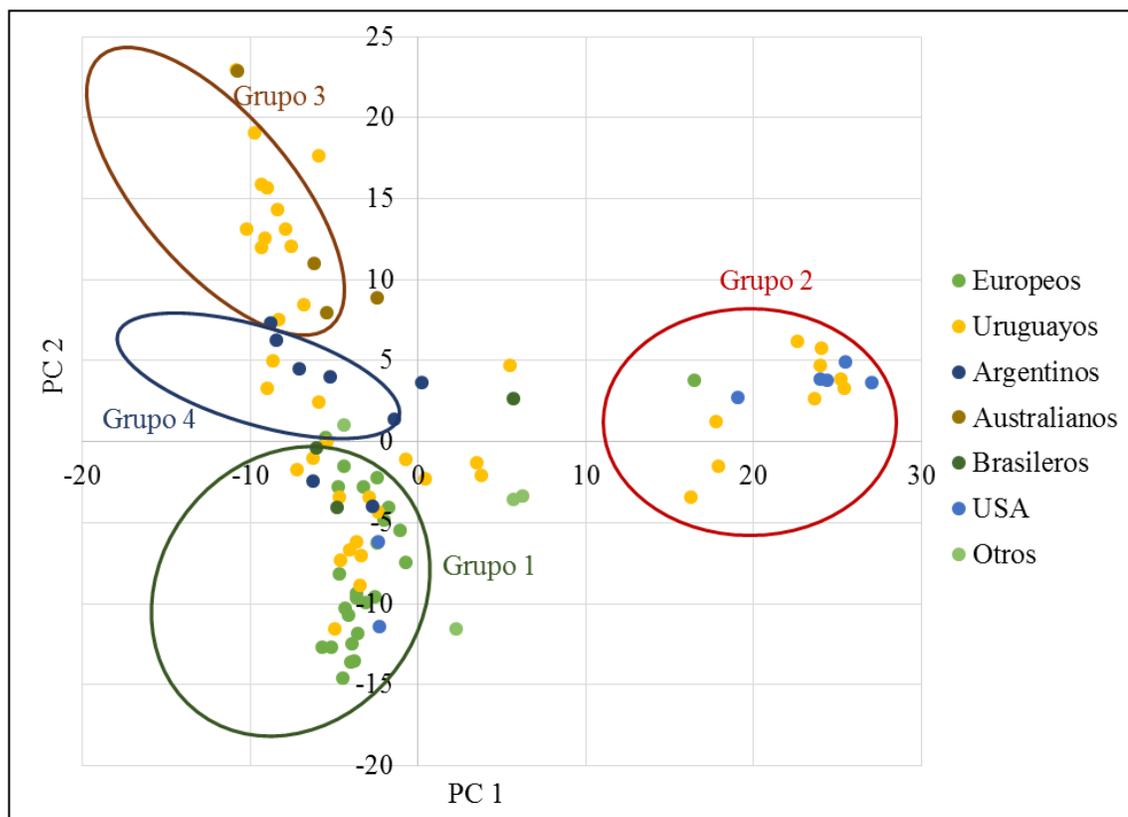


Figura 4. Estructura genética de la población.

4.4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN MARCADOR CARÁCTER

La presencia de regiones genómicas asociadas a las variables cuantitativas estudiadas se definieron en base a asociaciones marcador-carácter significativas con p valor <0.005 , asociadas a la misma variable o variables diferentes de marcadores cercanos (<10 cM) y que se encontraban DL ($r^2 > 0,20$). También se consideraron para determinar las regiones genómicas asociadas a DS y SA, las asociaciones con largo de ciclo a floración, madurez fisiológica y temperatura media del tercio final del llenado de granos. Por lo tanto en las regiones genómicas donde se encontraron asociaciones marcador-carácter significativas determinadas por varios marcadores en DL, se consideró una distancia menor a 10 cM para asumir esa región del cromosoma como un QTL.

Se detectaron un total de 18 asociaciones marcador-carácter para DS, 5 (en los cromosomas 3H, 5H, 6H y 7H) solo en la primera época, 7 (en los cromosomas 2H, 3H, 4H, 5H, 6H y 7H) en la segunda época y 6 (en los cromosomas 3H, 5H y 7H) en ambas épocas de siembra. De estos 18 QTL detectados para DS la mayor parte se localizaron

en el cromosoma 3H con 6 QTLs, mientras que el cromosoma 2H fue el de menor cantidad con solo 1 QTL (Figura 5).

Para SA se detectaron un total de 16 asociaciones marcador-carácter, 4 (en los cromosomas 3H, 4H y 5H) solo en la primer época, 7 (en los cromosomas 3H, 5H, 6H y 7H) solo en la segunda época y 5 (en los cromosomas 2H, 4H y 6H) en ambas épocas de siembra. De estos 16 QTL detectados para SA la mayor parte se localizaron en el cromosoma 6H (4 QTLs), mientras que el de menor cantidad de detecciones fue el 2H con solo 1 QTL (Figura 5).

Se detectaron un total de 7 asociaciones marcador-carácter para TM 3/3 Z49-Z85, 2 (en los cromosomas 5H y 6H) solo en la primera época, 2 (en los cromosomas 2H y 3H) solo en la segunda época y 3 (en los cromosomas 3H, 5H y 7H) en ambas épocas de siembra. Para ST Z49 se detectaron en total 5 asociaciones marcador-carácter, 2 (en los cromosomas 5H y 7H) solo en la primera época, 1 (en el cromosoma 5H) solo en la segunda época y 2 (en los cromosomas 3H y 7H) en ambas épocas de siembra. Para ST Z85 las asociaciones marcador-carácter detectadas fueron un total de 5, solo 1 en cada época (en el cromosoma 3H) y 2 (en los cromosomas 5H y 7H) en ambas épocas de siembra (Figura 5).

Del total de las 20 regiones genómicas encontradas, 3 se asociaron únicamente a DS, ubicadas en los cromosomas 3H y 5H y 2 solo a SA en el cromosoma 6H; 6 fueron coincidentes entre DS y SA ubicados en los cromosomas 3H (1110863 – 41,9 cM y 1120704 – 75,7 cM), 4H (1111292 – 108,7 cM y 1121035 – 133,3 cM), 6H (1120881 – 2,2 cM) y 7H (1110772 – 46,7 cM); y las restantes 9, además de estar asociadas a DS y/o SA, fueron coincidentes con ST Z49, ST Z85 y/o TM 3/3 Z49-Z85, en los cromosomas 2H, 3H, 5H, 6H y 7H (Figura 5).

Para DS y SA se encontraron menor cantidad de asociaciones en la primer época de siembra (11 y 9 respectivamente) respecto a la segunda (13 y 12 respectivamente), la cual se caracterizó por presentar valores más altos de temperatura y precipitaciones durante el llenado de granos y particularmente en el tercio final del período. Al parecer las condiciones de mayor temperatura y precipitaciones ocurridas en la época tardía, aumentan las diferencias fenotípicas de los cultivares.

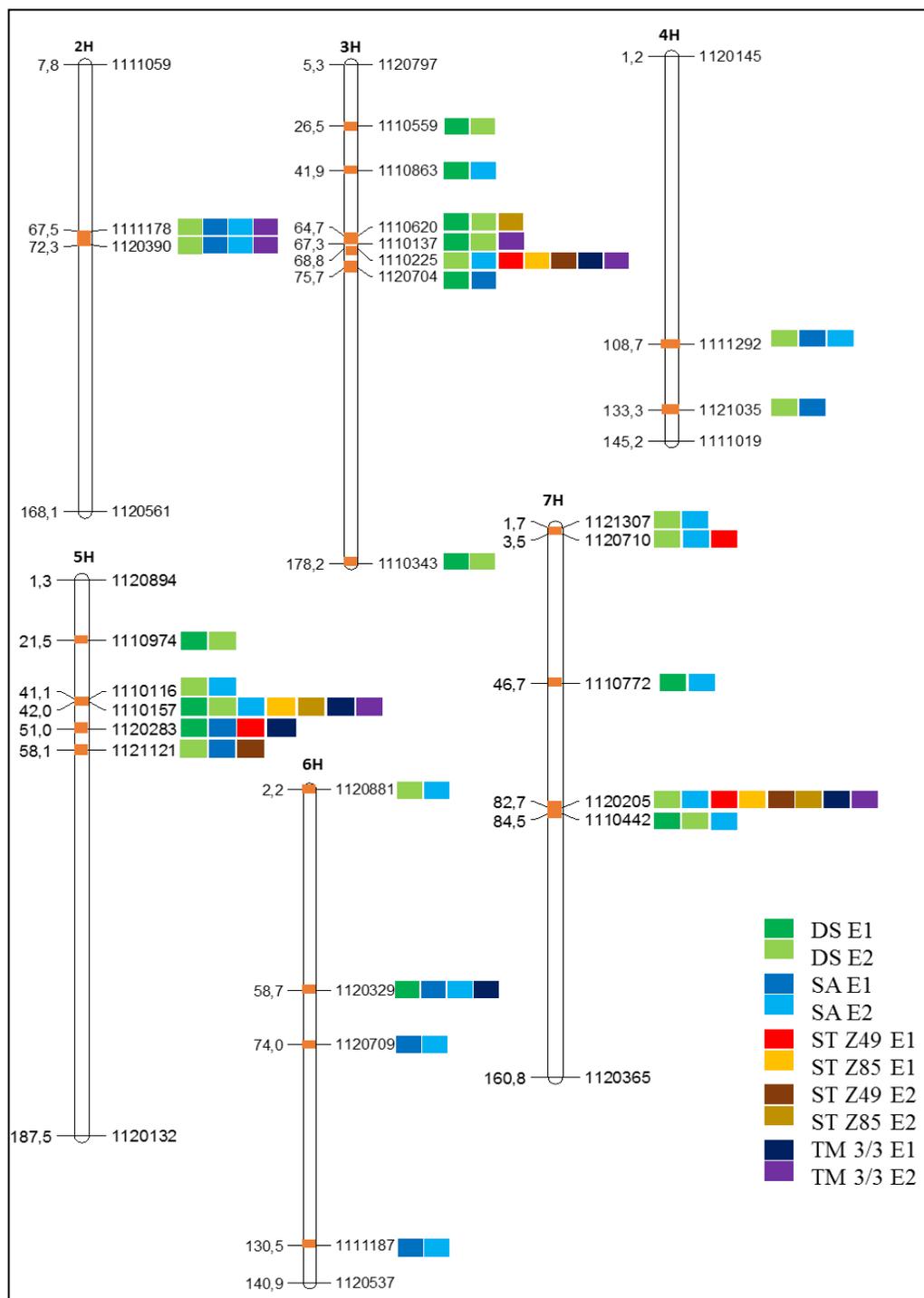


Figura 5. Asociaciones marcador-carácter significativas (pvalor <0,005) encontradas para DS, SA, TM 3/3 Z49-Z85, ST Z49 y ST Z85. Barras de color naranja indican asociaciones para un mismo QTL.

5 DISCUSIÓN

El cultivo de cebada en Uruguay tiene como principal destino del grano producido la elaboración de malta. Para que el grano pueda ser industrializado debe mantener altos porcentajes de germinación. La falta de dormición y la sensibilidad al agua son dos características que presentan algunos genotipos de cebada, características que afectan negativamente el porcentaje de germinación, generando problemas de calidad de la malta a elaborar. Si bien también son afectadas por variables ambientales, ambos caracteres presentan control genético, lo que hace de interés para el mejoramiento genético nacional el estudio de sus componentes genéticos. En el presente trabajo se buscó estudiar dichas bases mediante el estudio de un conjunto de 96 cultivares de cebada representativos del germoplasma utilizado en Uruguay y América del Sur con el objetivo de encontrar regiones genéticas asociadas al control génico de la DS y SA. Considerando que es una germoplasma de amplia base genética, utilizamos la metodología de mapeo asociativo (AM o GWAS).

La cobertura de marcadores fue de 126,8 marcadores/cromosoma. Es un valor relativamente alto en comparación a estudios previos realizados con objetivos comparables. Kraakman et al. (2004), Comadran et al. (2009) reportan densidades de 33,7 y 116 marcadores/cromosoma respectivamente. Esta densidad de marcadores puede considerarse adecuada al trabajar con un tamaño poblacional relativamente pequeño.

La estructura genética de la población se asoció al origen geográfico del germoplasma y a la influencia de progenitores relevantes para los programas locales de mejoramiento en Uruguay y América del Sur, de manera similar a lo reportado por Comadran et al. (2009). La población pudo separarse en cuatro grupos, que en un primer análisis no presentan una asociación obvia con un origen determinado (Figura 4). Sin embargo cuando se considera el origen geográfico de algunos genotipos clave, tales como Isaria, Lisa, Volla y Union en el grupo 1 (Europeos), Bowman y Logan para el grupo 2 (USA, North Dakota), Quebracho y Prior en el grupo 3 (Australianos) y genotipos antiguos de América Latina como Maltería Heda y Magnific 102 en el grupo 4 (Argentinos), es posible establecer como primer patrón de estructuración el origen geográfico (Locatelli et al., 2012). Por otro lado existen cultivares que no se agrupan según su origen geográfico, como es el caso de los uruguayos, donde aparece la influencia de los progenitores utilizados como fuente de germoplasma en los programas de mejoramiento locales como segundo patrón de agrupamiento, determinando que cultivares desarrollados en Uruguay compartan características con los genotipos progenitores en base a los que fueron creados, por lo tanto es esperable encontrar cultivares uruguayos en los cuatro grupos en los cuales se dividió la población en estudio (Cuadro 1).

De acuerdo al nivel de significancia estadística utilizado para considerar asociaciones marcador-carácter significativas para las variables en estudio fue relativamente bajo (pvalor <0,005), en este sentido aquellos marcadores con pvalor cercanos a este límite podrían sobre estimar la detección de QTLs, aumentando la detección de falsos positivos, dado que a un nivel de exigencia mayor esos puntos no serían considerados.

Para DS se detectaron un total de 18 asociaciones marcador-carácter, 5 solo en la primera época, 7 en la segunda época y 6 en ambas épocas de siembra. En cambio para SA las asociaciones detectados fueron un total de 16, 4 solo en la primera época, 7 solo en la segunda época y 5 en ambas épocas de siembra.

Del total de los 20 QTLs encontrados, 3 se asociaron únicamente a DS, ubicados en los cromosomas 3H y 5H y 2 solo a SA en el cromosoma 6H; 6 fueron coincidentes entre DS y SA ubicados en los cromosomas 3H, 4H, 6H y 7H; y los restantes 9 además de estar asociados a DS y/o SA también fueron coincidentes con ST Z49, ST Z85 y/o TM 3/3 Z49-Z85, en los cromosomas 2H, 3H, 5H, 6H y 7H.

Las asociaciones marcador-carácter encontradas para DS en los cromosomas 3H (1110559 – 26,5 cM; 1110343 – 178,2 cM) y 5H (1110974 – 21,5 cM) y para SA en el 6H (1120709 – 74,0 cM; 1111187 – 130,5 cM), fueron detecciones consistentes en las dos épocas de siembra para cada una de las variables por separado, lo cual estaría indicando la existencia de genes/QTL en la población determinantes del control genético de DS y SA, que no están relacionados a las condiciones ambientales en las que ocurre el llenado de grano o que son consecuencia del largo del ciclo del cultivar. Por otro lado los QTLs detectados en los cromosomas 3H (1110863 – 41,9 cM), 4H (1111292 – 108,7 cM; 1121035 – 133,3 cM), 6H (1120881 – 2,2 cM) y 7H (1110772 – 46,7 cM), coincidentes para DS y SA, se pueden considerar como QTL involucrados en el control genético de ambas variables, si bien DS y SA se estiman fenotípicamente de forma diferente, es lógico pensar en genes que regulan los mecanismos fisiológicos relacionados con la germinación de la semilla, pueden ser similares o incluso los mismos, dado que en ambas variables se mide lo mismo: porcentaje de germinación (Benech-Arnold et al. 2002, Castro et al. 2010, Bewley et al. 2013).

Para DS se encontraron coincidencias con los reportes bibliográficos en 5 de los 18 QTLs detectados, en los cromosomas 3H (1110225 – 68,8 cM y 1120704 – 75,7 cM) y 5H (11121121 – 58,1 cM) con lo reportado por Ullrich et al. (2008), en el cromosoma 6H (1120329 – 58,7 cM) coincidente con Castro et al. (2010) y en el cromosoma 7H la región definida entre los marcadores 1120205 – 82,7 cM a 1110442 – 84,5 cM, coincidente con Ullrich et al. (2008), Ullrich et al. (2009), Castro et al. (2010). En base a estas coincidencias establecidas a partir del mapa consenso de Muñoz-Amatraín (2011),

podríamos pensar que se trate de los mismos QTLs involucrados en el control genético de la DS que han sido estudiados y reportados previamente. Para SA las coincidencias fueron escasas, dado que existen pocos trabajos orientados al estudio de la sensibilidad al agua, aun así se encontró un QTL en el cromosoma 7H (1121307 – 1,7 cM a 1120710 – 3,5 cM) muy cercano en cuanto a posición al reportado por Castro et al. (2010) para la población BCD47/Baronesse.

Algunos QTLs detectados presentaron acumulación de efectos, además de DS y SA, se encontraron asociaciones para ST Z49, ST Z85 y TM 3/3 Z49-Z85, ubicándose en los cromosomas 3H (1110620 – 64,7 cM a 1110137 – 67,3 cM y 1110225 – 68,8 cM), 5H (1110116 – 41,1 cM a 1110157 – 42,0 cM y 1120205 – 51,1 cM) y 7H (1120205 – 82,7 cM a 1110442 – 84,5 cM). La acumulación de asociaciones marcador-carácter para más de una variable y consistentes en ambas épocas de siembra en estos 4 QTLs, estaría indicando que se trata de genes/QTLs de efecto pleiotrópico sobre DS, SA, ST Z49, ST Z85 y TM 3/3 Z49-Z85 (Figura 5). En cuanto a las correlaciones fenotípicas (Cuadro 4), la mayoría de ellas no presentaron significancia estadística, resultado que indicaría que la proporción de la variabilidad genética detectada para DS y SA es baja, siendo esperable que otros genes no detectados estén involucrados en determinar el valor fenotípico de estas variables, explicando la baja relación entre los valores fenotípicos de estos caracteres. Los efectos de sustitución alélica en estos QTLs, determinan diferentes relaciones entre DS y SA, en algunos casos, tales como en los marcadores del cromosoma 3H (1110137 – 67,3 cM y 1110225 – 68,8 cM), 5H (1110116 – 41,1 cM y 1120205 – 51,1 cM) y 7H (1120205 – 82,7 cM) el alelo para mayor DS y SA fue el mismo tanto en la E1 como en la E2; en cambio en el caso particular de los marcadores 1110157 – 42,0 cM del cromosoma 5H, no hubo diferencias en el efecto de cada alelo para SA, mientras que el alelo para alta DS en la E1 invierte su efecto en la E2, siendo el alelo para baja dormición en este ambiente; y el marcador 1110442 – 84,5 cM del cromosoma 7H, el alelo para baja DS en la E1 no tuvo efecto diferencial para SA, mientras que en la E2 el efecto de este alelo es mayor DS y menor SA. En estos dos casos particulares (marcadores de los cromosomas 5H y 7H) los alelos para menor DS son los alelos de mayor TM 3/3 Z49-Z85, lo cual sería consistente con lo reportado por Rodríguez et al. (2001), Benech-Arnold et al. (2002), Castro et al. (2010), mayor temperatura en este período disminuye la dormición de semilla. Si bien esta tendencia es consistente con la bibliografía, las diferencias en temperatura media en el tercio final del llenado de granos entre épocas es tan solo 1°C (22,9 y 23,9°C, E1 y E2 respectivamente), en ambos casos la temperatura media de este período estaría dentro de los valores que afectan de forma positiva a salida de la dormición.

En base a estas 4 regiones genómicas se diferenciaron 4 grupos haplotipos (Cuadro 5) en relación a los QTLs donde se dio acumulación de efectos (Figura 5), los

cuales no presentaron grandes diferencias entre sí al observar de manera general los valores fenotípicos de DS y SA de cada grupo. Sin embargo cuando se observa más en detalle, los cultivares del haplotipo 3 son los que presentan alta DS y baja SA (< 10 %), lo cual se explica por presentar la combinación alélica favorable para los marcadores de los cromosomas 3H y 5H. Además la mayoría de estos cultivares comparten su origen geográfico (Uruguay) excepto Quebracho que fue desarrollado en Australia (Figura 6) (pero de muy alta adaptación a nuestras condiciones); esto indicaría que seleccionar los genotipos por determinadas combinaciones alélicas en nuestros ambientes de producción permite obtener cultivares de mayor adaptación.

El haplotipo 4 reúne cultivares de alta DS y baja SA, aunque con valores levemente superiores al grupo anterior, manteniendo la misma configuración alélica en el cromosoma 3H, no así en el 5H, diferenciándose además por su origen geográfico, siendo la mayoría de ellos Europeos (Cuadro 5).

En el haplotipo 1 se agrupan materiales con alta DS al igual que los haplotipos 3 y 4, pero diferenciándose fenotípicamente en la SA, mostrando valores más elevados (10 – 25 %) que los anteriores grupos. Estos cultivares se diferencian por tener el alelo A en los 4 SNPs del cromosoma 7H (Cuadro 5), además de diferenciar el comportamiento fenotípico de DS y SA, también los separa del resto de la población por estructura genética, siendo la mayor parte de ellos, cultivares del “Grupo 2” (Figura 4).

Por último, el haplotipo 2 está formado por los genotipos que no serían los deseados en cuanto a DS y SA para la producción de cebada cervecera, pero sí por sus conocidas características de calidad maltera, ya que agrupa cultivares con baja DS y alta SA (> 25 %); si bien contienen un alelo favorable en el cromosoma 3H en el SNP 1110225 - 68,78 cM, no es suficiente para lograr valores óptimos de DS y SA como los cultivares del haplotipo 3 o el 4, ya que en las demás regiones no presentan ninguno de los alelos deseados para lograr el genotipo “ideal” en cuanto a dichas variables (Cuadro 5). Por otra parte estos materiales no presentan un patrón de origen geográfico por el que puedan ser agrupados (Figura 6), en cierto modo al examinar poblaciones de amplia base genética es esperable encontrar los genotipos recombinantes, tanto de mayor como de menor adaptación a nuestro ambiente de producción.

Cuadro 5. Haplotipos identificados según las 4 regiones genómicas asociadas a DS, SA, ST Z49, ST Z85 y TM 3/3 Z49-Z85 de los cromosomas 3H, 5H y 7H.

Cultivar	País *	Cromosoma									
		3H			5H			7H			
		Posición (cM)									
		64,67	67,25	68,78	42,02	51,04	58,12	1,7	3,46	82,67	84,51
Marcador Molecular											
Haplotipo 1		1110620	1110137	1110225	1110157	1120283	1121121	1121307	1120710	1120205	1110442
C 9616	Uy	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
C9528	Uy	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
C9614	Uy	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
Carumbe	Uy	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
Dayman	Uy	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
Guaviyú	Uy	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
Bowman	US	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
Logan	US	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
ND 14016	US	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
ND10277	US	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
ND21990	US	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A
Haplotipo 2		B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Lisa	Al	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Piroline	Al	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Scarlett	Al	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Union	Al	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
WM I	Al	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Magnific 102	Ar	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Magnific 104	Ar	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Prior	Au	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Ambev 19	Uy	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
C 8806	Uy	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
TOLAR		B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Haplotipo 3		A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
Quebracho	Au	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
C 8828	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
C 9038	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
C 9046	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B

C 9315	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
C9412	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
C97068	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
CB9214	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
CB9215	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
CLE 244	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
CLE 251	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
CLE 257	Uy	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
Haplotipo 4											
Berolina	Al	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Cheri	Al	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Clivia	Al	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Trumpf	Al	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Malt. Heda	Ar	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Diamant	R. Ch	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
C 9035	Uy	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B

* País de origen: Alemania (Al), Argentina (Ar), Australia (Au), República Checa (R. Ch.), Uruguay (Uy), Estados Unidos (US); A o B indican la combinación alélica para los marcadores de importancia en determinar alta DS y baja SA en cada haplotipo.

La estructura genética de los 4 grupos formados en base a las 4 regiones donde se dio acumulación de efectos, en la cual se consideran solo 7 SNPs (Figura 6), es similar a la estructura genética de la población donde están contemplados los 888 SNPs informativos para la población analizada (Figura 4), esto refleja la importancia de estos QTLs en la estructura genética de la población, dado que en la mayoría de ellos se encontraron asociaciones significativas para variables fenológicas, lo cual indicaría que la fenología es un factor importante en diferenciar grupos genotípicos, siendo una de las variables agronómicas más importantes en la adaptación de los cultivares a diferentes ambientes (Locatelli et al., 2012).

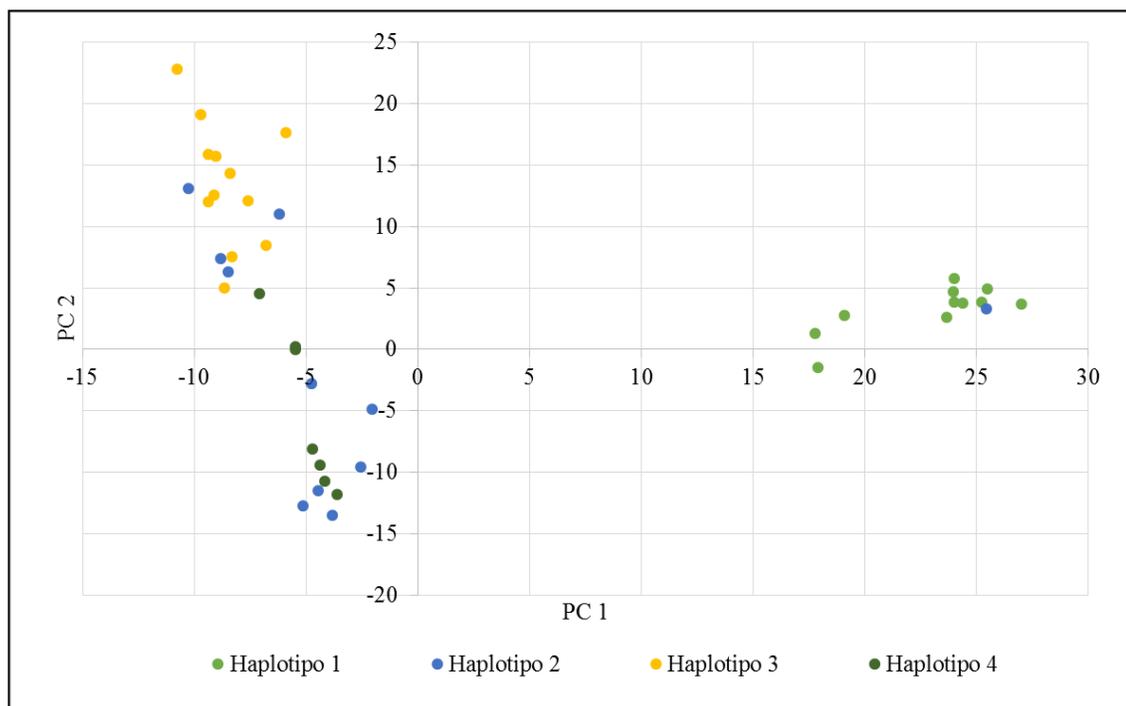


Figura 6. Estructura genética de los genotipos considerados dentro de cada grupo haplotipo.

6 CONCLUSIONES

Estudiar las bases genéticas de la dormición de semilla (DS) y sensibilidad al agua (SA) a través del mapeo asociativo (MA), permitió examinar una población de amplia base genética.

El germoplasma de cebada cervecera de relevancia para Uruguay está constituido por introducciones de genotipos que fueron utilizados como parentales para el desarrollo de nuevos cultivares y/o utilizados como tales a nivel de producción, por tanto la importancia de utilizar el MA en esta base genética, radica en generar información nacional utilizable en los programas de mejoramiento local para el desarrollo de nuevos y mejores cultivares.

Consideramos que la metodología de MA es adecuada para el tipo de base genética con la que se trabajó, si bien no es una población de gran tamaño en relación a la utilizada por Comadran et al. (2009) se tuvo una cobertura de SNPs por cromosoma mayor (126,8 marcadores/cromosoma), por lo que creemos que es una relación adecuada entre el tamaño de la población y la cobertura de marcadores.

La estructura genética de la población (Figura 4) estuvo explicada por el origen geográfico de los genotipos y la influencia de progenitores. El encontrar cultivares de diferente origen geográfico en cada uno de los grupos, evidencia en este caso, que el lugar de origen por sí solo no es un criterio suficiente para explicar la estructura de la población.

El hecho de encontrar correlaciones fenotípicas sin significancia estadística (Cuadro 4) evidencia que se detectó una porción baja de la variabilidad genética (asociado a lo que fue posible medir fenotípicamente) relacionada a la DS y SA.

Las 4 regiones genómicas de mayor importancia para DS y SA ubicadas en los cromosomas 3H, 5H y 7H (Figura 5), se asociaron además a variables fenológicas y temperatura media en el tercio final del llenado de granos, indicando no solo que se trata de variables afectadas por muchos genes, sino también genes/QTLs de efecto pleiotrópico, dado que en estas regiones han sido reportados importantes genes de fenología.

Los genotipos del haplotipo 3 (Cuadro 5) son los que presentaron la combinación alélica deseable para lograr cultivares de alta DS y baja SA.

7 RESUMEN

En Uruguay el cultivo de cebada (*Hordeum vulgare*) es el segundo cereal invernal en importancia agrícola, siendo su principal destino la elaboración de malta. Los ambientes productivos son de alta variabilidad, condicionando la obtención de lotes de cebada de alta calidad para la industria maltera. La dormición de semillas (DS) y la sensibilidad al agua (SA) son variables de gran influencia en la calidad del grano para malteo. La DS es una barrera que impide la germinación en la planta previo a la cosecha frente a condiciones ambientales favorables, en cambio la SA es la caída en la germinación durante el proceso de malteo. Con el objetivo de identificar regiones genéticas asociadas a la DS y SA se realizaron experimentos parcelarios en dos épocas de siembra, en el año 2012 en la EEMAC, Paysandú; utilizando una población de 96 genotipos de cebada de tipo primaveral de dos hileras, considerado como germoplasma relevante para Uruguay. La estimación del valor fenotípico de DS se obtuvo del % de germinación de las semillas provenientes del centro de la espiga, cosechadas en madurez fisiológica al día 7; la SA en cambio, se evaluó mediante el test de Pollock, estimando el valor fenotípico como la diferencia en el % de germinación al día 3 entre 4 y 8 ml, a los 60 días pos cosecha de los ensayos. La caracterización genotípica de la población se realizó con el set BOPA1, siendo informativos para la población 888 de 1536 SNPs. Los cromosomas con mayor número de asociaciones marcador-carácter fueron el 3H, 5H y 7H, con el mayor número de marcadores en de desequilibrio de ligamiento (DL). Se detectaron 20 regiones genómicas asociadas a la DS y SA, siendo las más importantes las detectadas en los cromosomas 3H, 5H y 7H. Se identificaron 4 haplotipos, reuniendo uno de ellos las combinaciones alélicas favorables para lograr genotipos con alta DS y baja SA.

Palabras clave: Mapeo asociativo; Mapeo por desequilibrio de ligamiento; QTL; Cebada cervecera; Dormición de semilla; Sensibilidad al agua.

8 SUMMARY

Barley crop (*Hordeum vulgare*) is the second winter cereal of agricultural importance in Uruguay, being its main target malt elaboration. Productive environments are highly variable, acting as conditioner for the obtaining of lots of high quality barley for malting industry. Seed dormancy (SD) and water sensitivity (WS) are influential variables in grain quality for malting. SD is a barrier that prevents preharvest germination in plant under favorable environmental conditions, whereas the WS is a fall in germination during the malting process. With the target of identifying genetic regions associated with SD and SA, parcel experiments were conducted in two planting seasons, in 2012 in EEMAC, Paysandú; using a population of 96 genotypes of spring barley type double row, considered relevant germplasm for Uruguay. Estimation of phenotypic value of SD was obtained from the germination percentage of seeds from the spike's center at day 7, harvested at physiological maturity; WS however, was evaluated by the Pollock test, estimating the phenotypic value as the difference in the germination percentage on day 3 between 4 and 8 ml; at 60 days post-harvest of the experiments. Genotypic characterization of the population was made with BOPA 1 set, being informative for the population 888 of 1536 SNPs. Chromosomes with most number of associations were 3H, 5H and 7H, with the largest number of markers in linkage disequilibrium (LD). 20 genomic regions associated with SD and WS were detected, being the most important detected in 3H, 5H and 7H chromosomes. Four haplotypes were identified, gathering one of its favorable allelic combinations to achieve genotypes with high SD and low WS.

Keywords: Association mapping; Linkage disequilibrium mapping; Quantitative trait loci (QTL); Malting barley; Seed dormancy; Water sensitivity

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Arias, G. 1991. Calidad industrial de la cebada cervecera. Montevideo, INIA. 54 p. (Serie Técnica no. 18).
2. Benech-Arnold, R.; Gualano, N.; Leymarie, J.; Côme, D.; Corbineau, F. 2006. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1423-1430.
3. Bewley, J. D.; Bradford, K. J.; Hilhorst H. W. M.; Nonogaki, H. 2013. Seeds; physiology of development, germination and dormancy. 3rd ed. New York, USA, Springer. 392 p.
4. Castro, A. J.; Benítez, A.; Hayes, P. M.; Viega, L.; Wright, L. 2010. Coincident quantitative trait loci effects for dormancy, water sensitivity and malting quality traits in the BCD47_Baronesse barley mapping population. *Crop and Pasture Science*. 61: 691-699.
5. Close, T.; Prasanna, R.; Bhat, P.; Wu, Y.; Rostoks, N.; Ramsay, L.; Druka, A.; Stein, N.; Svensson, J.; Wanamaker, S.; Bozdag, S.; Rose, M.; Moscou, M.; Chao, S.; Varshney, R.; Szücs, P.; Sato, K.; Hayes, P.; Mathews, D.; Kleinhofs, A.; Muehlbauer, G.; Deyoung, J.; Mashall, D.; Madishetty, K.; Fenton, R.; Condomine, P.; Graner, A.; Waugh, R. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics*. 10: 582-594.
6. Comadran, J.; Thomas, W. T. B.; Van euwijk, F.; Ceccarelli, S.; Grandó, S.; Stanca, A.; Pecchioni, N.; Akar, T.; Al-Yassin, A.; Benbelkacem, A.; Ouabbou, H.; Romagosa, I.; Hackett, C.; Russell, J. 2009. Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics*. 119: 175-187.
7. Flint-García, S.; Thornsberry, J. M.; Buckler, E. S. IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 357-374.
8. Gaut, B.; Long, A. 2003. The lowdown on linkage disequilibrium. *The Plant Cell*. 15: 1502-1506.
9. Gómez, B. 2005. Factores que afectan la fermentabilidad de la cebada malteada (*Hordeum vulgare*). Lic. en Bioquímica. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 58 p.

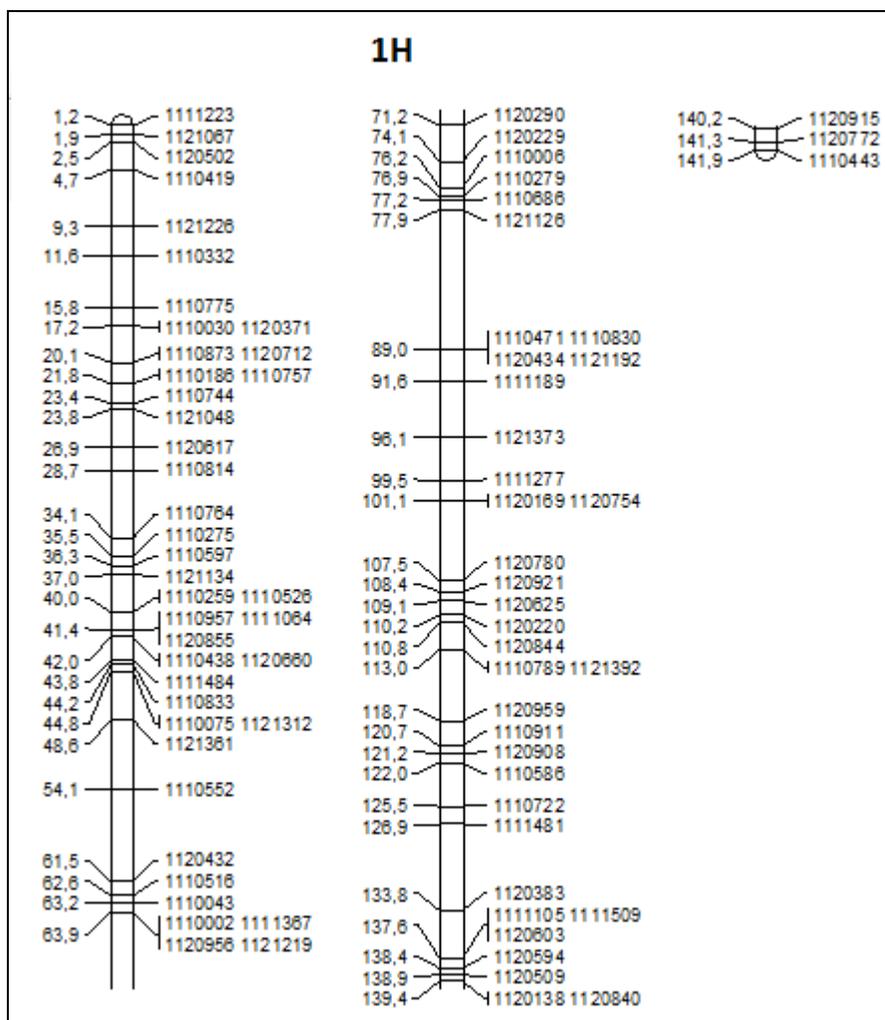
10. Gong, X.; Li, C.; Zhou, M.; Bonnardeaux, Y.; Yan, G. 2014. Seed dormancy in barley is dictated by genetics, environments and their interactions. *Molecular Breeding*. 197: 355-368.
11. GrainGenes 2.0 GrainGenes; a database for Triticeae and Avena. 2014. GrainGenes map data report; Barley, OPA 2011, Consensus. (en línea). Washington, D. C. s.p. Consultado 21 may. 2014. Disponible en <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=mapdata&name=Barley,+OPA+2011,+Consensus>.
12. Gualano, N.; Del Fueyo, P.; Menciondo, G.; Benech-Arnold, R.; Rodríguez, M. 2011. Implicancias de la dormición en la producción y utilización del cultivo. *In*: Miralles, D.; Benech-Arnold, R.; Abeledo, G. eds. *Cebada cervecera*. Buenos Aires, AR, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. pp. 171-204.
13. Gupta, P.; Rustgi, S.; Kulwal, P. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants; present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*. 57: 461-485.
14. Hartl, D.; Clark, A. 2007. *Principles of population genetics*. 4th ed. Massachusetts, USA, Sinauer. 652 p.
15. Hoffman, E.; Castro, A.; Arbeletche, P. 2012. Área agrícola y superficie cultivada anualmente en Uruguay: implicancias de las diferencias en los números oficiales. (en línea) *Cangüé*. no. 34: 12-18. Consultado 22 mar. 2014. Disponible en <http://www.eemac.edu.uy/cangue/numero34/itemlist/category/35-número-34-setiembre/2013.html>
16. INUMET (Instituto Uruguayo de Meteorología, UY). 2014. Estadísticas climatológicas. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 09 set. 2014. Disponible en <http://meteorologia.gub.uy/ServCli/estadisticasClimatologicas>.
17. Jannink, J.; Iwata, H.; Bhat, P. R.; Chao, S.; Wenzl, P.; Muehlbauer, G. J. 2009. Marker imputation in barley association studies. *The Plant Genome*. 2: 11-22.
18. Kermodé, A. R. 2011. *Seed dormancy; methods and protocols*. Burnaby, CA, Springer. 432 p.

19. Kraakman, A.; Niks, R.; Van den Berg, P.; Stam, P.; Van eeuwijk, F. 2004. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetic Society of America*. 168: 435-446.
20. Locatelli, A. 2011. Bases genéticas de las variables agronómicas de interés local en el germoplasma de cebada (*Hordeum vulgare* L.) utilizado en Uruguay. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 88 p.
21. _____; Cuesta-Marcos, A.; Gutiérrez, L.; Hayes, P. M.; Smith, K. P.; Castro, A. J. 2012. Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germoplasm in Uruguay. *Molecular Breeding*. 31 (3): 631-654.
22. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2012. Resultados de la encuesta agrícola “invierno 2012”. (en línea). Montevideo 3 p. Consultado 22 mar. 2014. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,93,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU;>
23. _____. 2013. Encuesta agrícola “invierno 2013”. (en línea). Montevideo. 20 p. Consultado 22 mar. 2014. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,93,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU;>
24. Miralles, D.; Benech-Arnold, R.; Abeledo, G. 2011. Cebada cervecera. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. 284 p.
25. Prada, D.; Ullrich, J.; Molina-Cano, L.; Cistu, L.; Clancy, J.; Romagosa, I. 2004. Genetic control of dormancy in a Triumph/Morex cross in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 62-70.
26. Pritchard, J.; Stephens, M.; Rosenber, N.; Donnelly, P. 2000. Association mapping in structured populations. *The American Society of Human Genetics*. 67: 170-181.
27. Rodríguez, M. V.; Margineda, M.; González-Martín, J. F.; Insausti, P.; Benech-Arnold, R. L. 2001. Predicting preharvest sprouting susceptibility in barley; a model based on temperature during grain filling. *Agronomy Journal*. 93: 1071-1079.
28. Savin, R.; Aguinaga, A. 2011. Los requerimientos de la industria; calidad comercial e industrial y sus determinantes. In: Miralles, D.; Benech-Arnold, R.;

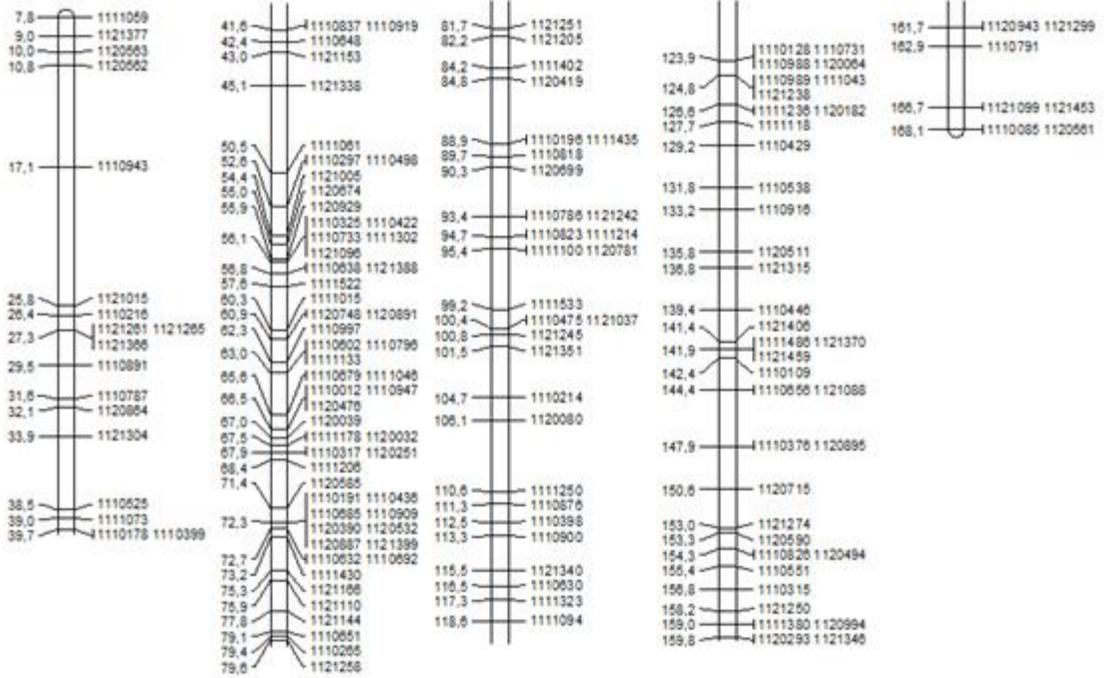
- Abeledo, G. eds. Cebada cervecera. Buenos Aires, AR, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. pp. 205-241.
29. Silveira, M. 2008. Caracterización genómica de variables agronómicas en cebada cervecera (*Hordeum vulgare*). Tesina Lic. en Bioquímica. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 82 p.
 30. Slafer, G.; Molina-Cano, J.; Savin, R.; Araus, J.; Romagosa, I. 2002. Barley science; recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality. New York, Food Products. 565 p.
 31. Szücs, P.; Blake, V.; Bhat, P.; Chao, S.; Close, T.; Cuesta-Marcos, A.; Muehlbauer, G.; Ramsay, L.; Waugh, R.; Hayes, P. 2009. An integrated resource of barley linkage map and malt quality QTL alignment. *The Plant Genome*. 2: 134-140.
 32. Ullrich, S.; Clancy, J.; del Blanco, I.; Lee, H.; Jitkov, V.; Han, F.; Kleinhofs, A.; Matusi, K. 2008. Genetic analysis of preharvest sprouting in a six-row barley cross.. *Molecular Breeding*. 21: 249-259.
 33. _____; Lee, H.; Clancy, J.; del Blanco, I.; Jitkov, V.; Kleinhofs, A.; Han, F.; Prada, D.; Romagosa, I.; Molina-Cano, J. 2009. Genetic relationships between preharvest sprouting and dormancy in barley. *Euphytica*. 168: 331-345.
 34. Yu, J.; Pressoir, G.; Briggs, W.; Vroh BI, I.; Yamasaki, M.; Doebley, J.; McMullen, M.; Gaut, B.; Nielsen, D.; Holland, J.; Kresivich, S.; Buckler, E. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*. 38 (2): 203-208.
 35. Zhu, C.; Gore, M.; Buckler, E. S.; Yu, J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*. 1: 5-20.

10 ANEXOS

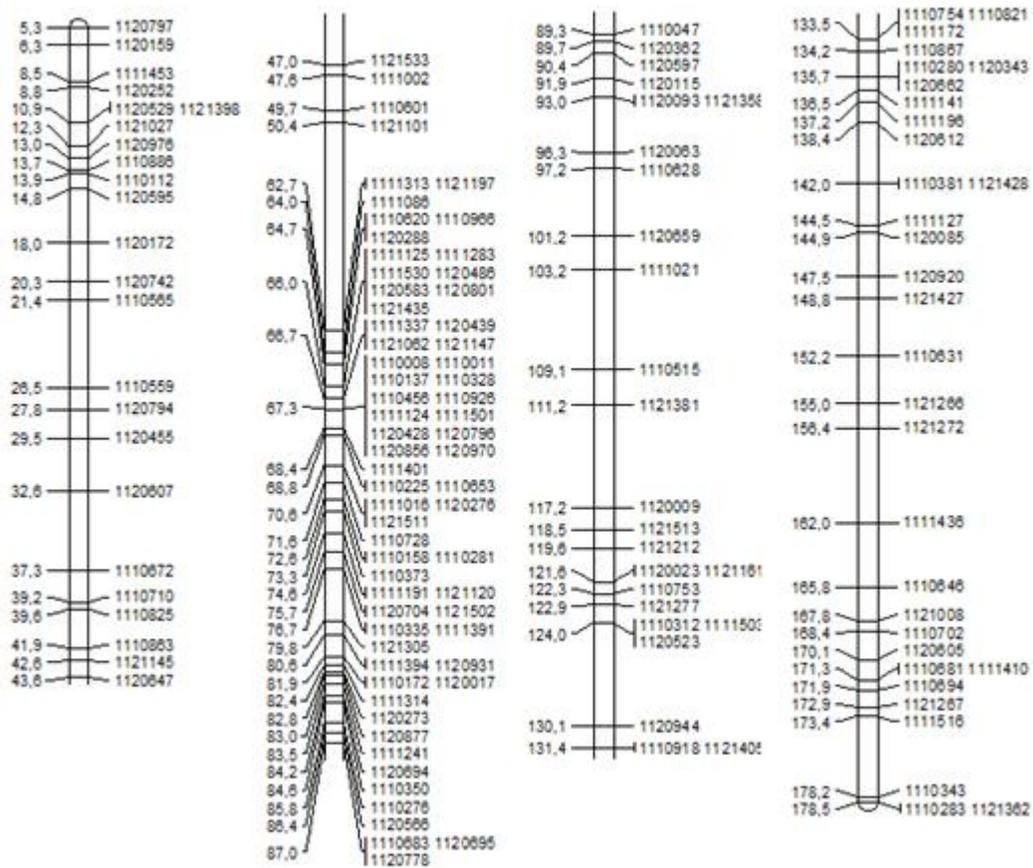
ANEXO 1. Mapa de ligamiento de cada cromosoma derivado de los 888 SNPs informativos para la población. Posición en cM a la izquierda, marcador molecular a la derecha del cromosoma.



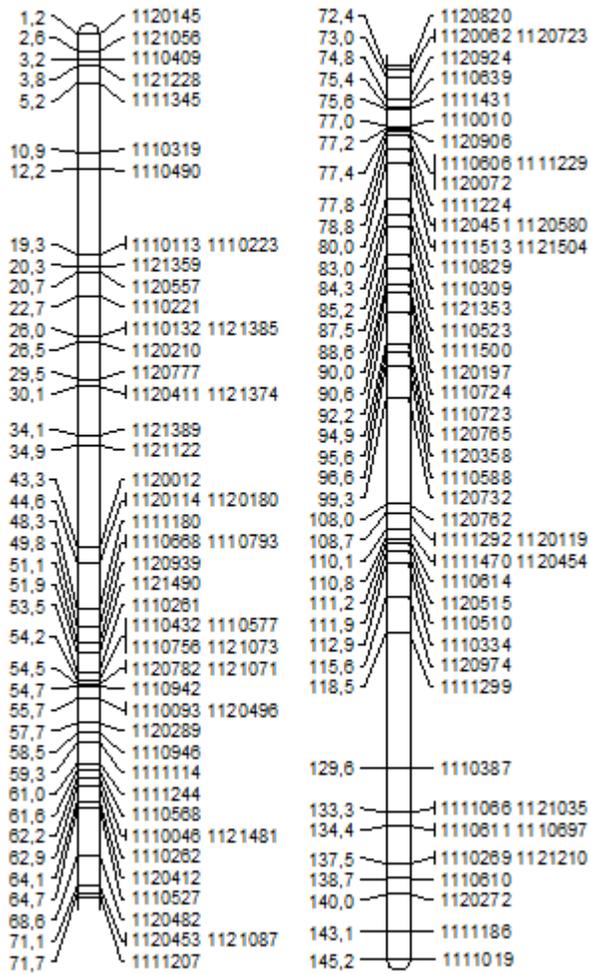
2H



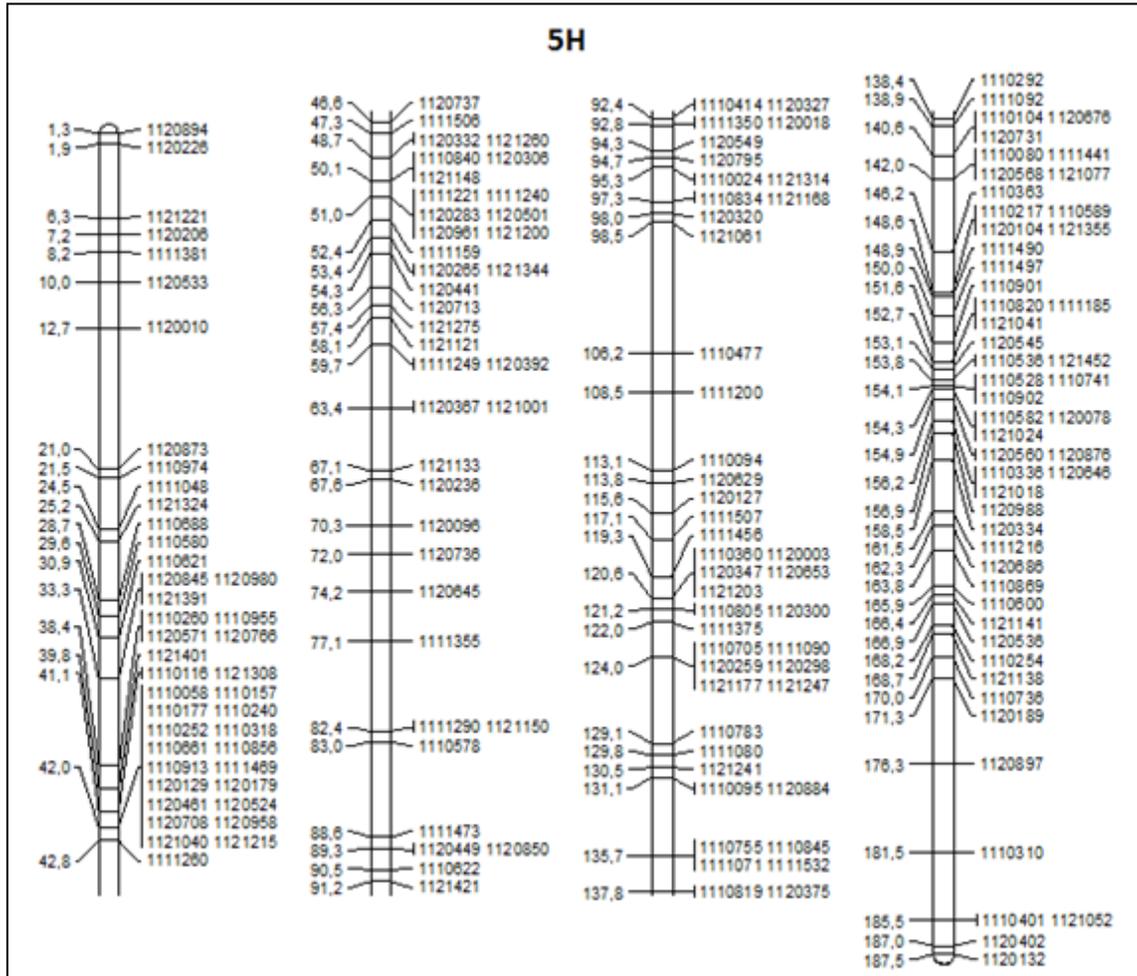
3H



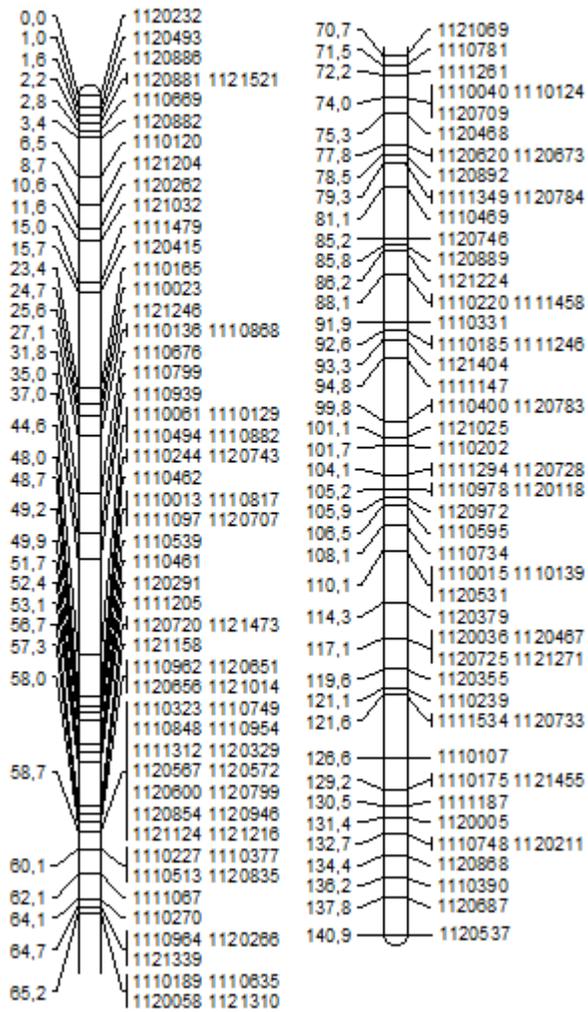
4H



5H



6H



7H

