



**Universidad de León**

*Determinación de la floración en una población de cebada (*Hordeum vulgare* L.) bajo condiciones mediterráneas y sus implicaciones agronómicas*

**Determination of flowering time in a barley population (*Hordeum vulgare* L.) under Mediterranean environment and agronomic implications**

Trabajo de tesis doctoral realizado por:

*Trinidad Aparicio Ruiz*

Director: *Dr. Francisco Jesús Ciudad Bautista*

Tutor: *Dr. Pedro García García*

## Agradecimientos

---

Después de esta larga travesía por fin a llegado el final. En ella he conocido un mundo totalmente apasionante, el mundo de la investigación donde he aprendido que no hay nada mejor que un poco de ilusión y curiosidad.

En primer lugar me gustaría agradecerle a mi director de tesis la increíble oportunidad que me ha dado al hacerme participe de este trabajo junto a todo su equipo. Gracias Paco por tu paciencia y dedicación, tanto en los buenos como en los malos momentos.

Quiero también darles las gracias a todo el equipo de cereales con el que durante años he trabajado “codo a codo” y que, junto a Paco, me han ayudado en todo momento, especialmente a Nieves y Marivi, sin las cuales estoy segura que los trabajos necesarios para la realización de esta tesis hubieran sido imposible de realizar, tanto por sus sabios consejos y experiencia, como por su infinita paciencia conmigo.

También le agradezco al INIA, por la concesión de una beca FPI y, especialmente, al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León por facilitarme tanto el personal, como las instalaciones necesarias para realizar todos los trabajos que fueron oportunos: campo, invernaderos, laboratorios...etc. Y, por supuesto, a mi tutor Pedro, quien ha sido mi puente de comunicación con la Universidad de León.

Me gustaría dedicarle una especial atención a todo el personal que a lo largo de los años me han echado una mano: María, en el “labo”, y todo el personal de campo del ITAcyl que en algún momento aportaron su granito de arena (o pedrusco): Olegario, Santi, Carmelo, Encarna, Eusebio... Seguro que me dejo alguno, pero estaros seguros que aunque no al escribir estas palabras, seguro que habéis estado en mi cabeza en algún momento de la redacción de esta tesis, así que por esto mismo: Muchas gracias a todos, todos vosotros tenéis un pedacito de esta tesis.

Así mismo, no me puedo olvidar del equipo de leguminosas del ITAcyl que en su día me brindó la oportunidad de adentrarme en este mundo que es la investigación. Gracias Tinín por confiar en mi; a ti Abel, por tu sabiduría y consejos (en campo no hay nadie mejor que tú); Ali, por tu apoyo y ayuda; Manolo, por esos largos momentos de ordenador. Habéis sido de gran apoyo para mi.

Y como no, les agradezco de todo corazón a los que me han sufrido en casa a lo largo de estos años, escuchándome hablar de cosas como la genética, QTL, *VRN-H1*, *PPD-H2*, *denso*... que mínimo les sonaba a chino, pero ahí han estado apoyándome en todo momento mi madre, mi hermana y la “yaya”. Y por supuesto, no me puedo olvidar de quienes han estado conmigo en esta recta final, mis tres “peques”: Banderín, Cristian y Sofía. Os agradezco muchísimo la paciencia que habéis tenido con “mamá” quien en vez de ser bombera será doctora. Lo sois todo para mi.

# Resumen

---

La cebada es uno de los cultivos con mayor importancia a nivel mundial, siendo el cuarto cereal más cultivado después del trigo, el maíz y el arroz. Las variedades de cebada cultivada pertenecen a la especie *Hordeum vulgare* L. Su genoma es uno de los más conocidos por haber sido utilizado en muchos estudios genéticos, disponiendo además de una gran variabilidad genética, tanto en la especie cultivada, debido al hecho de haber sido uno de los primeros cultivos domesticados, como en otras especies del género *Hordeum*.

Los factores más importantes que afectan al desarrollo y a la determinación de la floración en cebada son la respuesta a la temperatura, la respuesta al fotoperiodo, la vernalización y la precocidad intrínseca. Por tanto, estos factores serán determinantes a la hora de elegir una buena variedad con un fondo genético adaptado a las condiciones ambientales de cada lugar para obtener un rendimiento óptimo del cultivo. Se ha propuesto también que variando la duración de las fases de pre-espigado sin modificar el tiempo total de espigado se podría incrementar el rendimiento en cebada (Slafer et al, 2005).

El control de la floración por fotoperiodo está muy estudiado en *Arabidopsis* (dicotiledónea) en condiciones de día largo y en arroz (monocotiledónea) en condiciones de día corto. En *Arabidopsis* la expresión de *GIGANTEA* (*GI*) y *CONSTANS* (*CO*) está regulado por un reloj circadiano que coincide con un pico de expresión de *CO* en horas de luz que sólo ocurre en condiciones de día largo. La proteína *CO* es un factor de transcripción que reduce la expresión de ciertos genes, incluyendo el gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), el cual es una llave reguladora de la floración. La cebada es una planta de día largo, como *Arabidopsis*, pero está filogenéticamente más cerca del arroz. Se han identificado varios genes homólogos de la ruta de fotoperiodo en cebada, tales como *HvCO1* a *HvCO9* (Griffiths et al. 2003), *HvGI* (Dunford et al 2005) y *HvFT1* a *HvFT5* (Faure et al. 2007)

En cebada, la variación en el requerimiento de vernalización está determinada por tres genes *VRN-H1*, *VRN-H2* y *VRN-H3* (*HvFT1*). El gen *VRN-H1* codifica para un factor de transcripción tipo MADS-box APETALA1 (*AP1*) necesario para el inicio del desarrollo reproductivo en el ápice de la planta (Trevaskis et al. 2003, Yan et al.). El gen *VRN-H2* es un represor dominante de la floración (Yan et al. 2004). El gen *VRN-H3* es homólogo del gen *FT* de *Arabidopsis* (Yan et al. 2006; Faure et al. 2007). Este gen exhibe un elevado nivel de expresión cuando su alelo dominante está presente, lo que se traduce en un aceleramiento de la floración y una alternativa al requerimiento de vernalización (Yan et al. 2006). Las mutaciones de pérdida de función en *VRN-H2* permiten la expresión de *VRN-H1* sin previa vernalización, causando una rápida floración bajo condiciones de día largo (variedades primaverales). Sin embargo, esto requiere un gen activo *Ppd-H1*, el cual es el mayor determinante de la respuesta al fotoperiodo en cebada. *Ppd-H1* no corresponde a ninguno de los genes *CO-like* de cebada. El alelo de floración tardía *ppd-H1*, de carácter recesivo, presenta una sensibilidad reducida bajo fotoperiodo largo ya que imposibilita la función de este gen. A todo esto, hay que añadir la existencia de otro gen de respuesta al fotoperiodo, *Ppd-H2* (*HvFT3*). Este gen causa diferencias en la fecha de floración bajo

condiciones de fotoperiodo corto (Laurie *et al.* 1995; Boyd *et al.* 2003) y además *VRN-H2*, activo bajo fotoperiodo largo, actúa como represor de este (Casao *et al.*, 2011a).

Se han descrito otros genes que afectan a la determinación de la floración, independientemente de las condiciones de vernalización y fotoperiodo, que generalmente se denominan loci de precocidad intrínseca, como *Eam6* (*HvCEN*). En siembras de otoño, bajo las condiciones de la zona norte española, en las cuales se encuentran saturados tanto el requerimiento de vernalización como la respuesta a la sensibilidad al fotoperiodo, el locus *Eam6* ha sido identificado como el mayor determinante de la fecha de floración (Cuesta-Marcos *et al.*, 2008; Comadrán *et al.*, 2012). Bajo condiciones mediterráneas, este ayuda a salvar el déficit hídrico al que se ve sometido el cultivo al final del ciclo, lo que permite un correcto llenado de grano aprovechando los recursos disponibles.

Por otro lado, los genes de semenanismo han sido ampliamente estudiados en programas de mejora genética de cebada para reducir la altura de la planta y mejorar su resistencia al encamado, demostrándose que, al igual que los genes de precocidad intrínseca, alteran la fecha de floración. El alelo *denso* (mutación del gen *Hv20ox2*, Jia *et al.*, 2009) cuenta con una amplia aceptación en cebada maltera europea. Pero éste causa además distintos efectos pleiotrópicos como retraso de la floración, bajo peso del grano y un crecimiento juvenil semipostrado (Sears *et al.*, 1981). Sin embargo, algunas variedades que portan este alelo presentan mejor tamaño de grano.

En esta tesis se han buscado las principales regiones del genoma implicadas en el espigado y las fases previas a este desde la nascencia de la planta, bajo distintas condiciones controladas de fotoperiodo y vernalización mediante la detección de QTL y la interacción de estos tanto con el ambiente como entre ellos. Así como la detección de QTL de espigado y parámetros del rendimiento bajo ambiente mediterráneo con sequía terminal, en seis ambientes diferentes.

Para ello se ha utilizado una población de cebada que segrega para los principales genes implicados en la inducción de la floración y la respuesta al fotoperiodo, además de segregar para el alelo de semenanismo *denso*. Dicha población consta de 185 líneas BC1F5 de seis carreras procedentes del retrocruzamiento entre las variedades comerciales Nevada (variedad primaveral de dos carreras portadora del alelo *denso* y grano de alta calidad maltera) y Barbarrosa (variedad invernal de seis carreras, altura media y baja calidad maltera). Dado que el interés de la población fue la selección de variedades de seis carreras se realizó una selección hacia este tipo en la generación BC1F1.

En primer lugar, para una posterior detección de QTL se ha realizado un mapa genético de dicha población el cual consta de un total de 347 marcadores moleculares de tipo DArT, SSR e intragénicos de los principales genes diana distribuidos en un total de 9 grupos de ligamiento. Por tanto, el grupo 2H se encuentra dividido en dos subgrupos: 2H1 y 2H2, debido a la selección solamente de líneas de seis carreras, ya que en este grupo se encuentra uno de los principales genes implicados en la fertilidad, *vrs1* (Komatsuda *et al.*, 1998), el cual no segrega en la población. Algo similar ocurre con el grupo 7H que se encuentra dividido en los grupos 7H1 y 7H2. En este cromosoma se encuentra por ejemplo *VRN-H3* para el cual tampoco segrega la población de estudio.

A pesar de todo ello el mapa obtenido, guarda similitud con otros mapas genéticos consenso, como el mapa consenso de Wenzl et al (2006), guardando también los distintos marcadores utilizados una posición relativa a la de otros mapas como el Bin Map de Marcel et al (2007).

Para el estudio de las fases de pre-espigado se ha realizado un ensayo con la población utilizando cuatro ambientes diferentes conjugando tratamiento de vernalización o no y condiciones de fotoperiodo: largo y corto. Los parámetros estudiados en este caso han sido tanto la duración en tiempo térmico de cada una de las fases: desde nascencia a encañado (J), de encañado a hoja bandera (elongación del tallo, SE) y desde nascencia a estado de hoja bandera (FL) y espigado (F), calculándose también el cociente entre el tiempo térmico de la elongación del tallo y encañado como el ratio SE/J del cual se ha observado una alta heredabilidad, 0,73, superior al de ambas fases por separado. Así como el número de hojas de cada una de las fases: número de hojas basales (BL), caulinares (SEL) y totales (TL), además del filocrono (PHY), como grados centígrados necesarios para que se desarrolle una hoja. Se ha encontrado una alta correlación entre número de hojas y duración en tiempo térmico en cada una de las fases.

Se ha realizado un análisis de varianza multi-ambiental de cada uno de los caracteres en donde se ha encontrado un mayor peso del factor genotípico (G) que de la interacción GxE a pesar que las condiciones de los ambientes propuestos eran totalmente opuestas. Así mismo al realizar los modelos AMMI de cada una de las fases, se ha observado que el primer eje IPCA guarda una alta explicación de la interacción GxE, especialmente en las fases desde nascencia hasta encañado, hoja bandera y hasta espigado. Además, en estas fases es donde existe una mayor dispersión de los datos, pudiendo discriminarse entre las líneas que necesitan vernalizar y las que no. Mientras que en el caso del filocrono y de la fase de elongación del tallo esto no ocurre, aunque sí si nos fijamos en el ratio SE/J. También podemos claramente discriminar entre ambientes, encontrándonos que el ambiente VL (con fotoperiodo largo y tratamiento de vernalización) es el más inductivo para todas las líneas teniendo tiempos térmicos similares e inferiores en todas las fases, mientras que L (fotoperiodo largo sin tratamiento de vernalización) produce las mayores diferencias entre las líneas con genotipo invernal (vrn-H1 Vrn-H2) y las líneas con genotipo primaveral.

Se ha realizado un análisis multi-ambiental de detección de QTL utilizando modelos mixtos, así como las interacciones entre estos, tanto con el ambiente (QTLxE) como entre ellos (QTLxQTL). Se ha encontrado que los genes diana segregantes en la población se encuentran situados en las regiones de los principales QTL significativos para los caracteres de pre-espigado estudiados. Analizando fase a fase, nos encontramos con que los efectos de *Eam6* no fueron detectados en la fase desde nascencia hasta encañado, aunque sí en todas las demás fases, detectándose interacciones importantes con este gen en todas ellas. Por tanto, el gen *Eam6* está potenciando estas fases acelerándolas con grandes efectos sobre otros genes de floración a partir de encañado. Por su parte *PPD-H2* fue significativo en todas las fases bajo fotoperiodo corto, a excepción de la fase de elongación del tallo. Aunque para el ratio entre esta fase y la fase desde nascencia hasta encañado *PPD-H2* fue uno de los principales QTL detectados, lo que indica que éste juega un papel crucial en el ajuste entre ambas fases sin variar el tiempo total de espigado. Por tanto, en vista de estas diferencias podemos decir que en la población NxBxB existe un

distinto control genético entre las fases de pre-espigado y espigado. *denso* no fue significativo para ningún parámetro estudiado en las fases de pre-espigado de esta población

Para el estudio del rendimiento y sus componentes, se han realizado seis ensayos de campo bajo condiciones típicamente mediterráneas, donde se dio una fuerte sequía terminal al final del ciclo del cultivo en cinco de los ambientes, y, además, uno de estos cinco fue realizado bajo siembra primaveral. En todos ellos se han estudiado tanto el rendimiento, como los para parámetros de llenado de grano, peso de mil semillas y peso específico, granos por metro cuadrado y longitud y número de granos por espiga. De la misma manera se ha estudiado también la altura de planta, donde la segregación del alelo *denso* queda claramente reflejada, así como el tiempo hasta espigado de cada una de las líneas.

De la misma manera que en el estudio de las fases de pre-espigado se ha realizado un análisis de varianza multi-ambiental, los modelos AMMI y la detección de QTL mediante modelos mixtos de cada uno de los parámetros estudiados.

Se ha visto que el rendimiento está altamente influenciado por el ambiente. Los parámetros estudiados con mayor componente genético fueron el peso de mil semillas y los parámetros relacionados con la espiga, tanto granos por espiga como la longitud de esta, guardando estos una alta correlación entre ellos. Además, la interacción entre los distintos QTL detectados estuvo también fuertemente influenciada por el ambiente, siendo significativas distintas interacciones QTLxQTL para rendimiento y sus parámetros en función del ambiente estudiado.

El alelo *denso* tuvo una fuerte repercusión en lo que respecta al rendimiento de las líneas de la población NxBxB, viéndose también involucrado en la gran mayoría de interacciones QTLxQTL de rendimiento y sus parámetros.. Tuvo grandes efectos en la fecha de espigado de los ensayos de campo realizados, retrasando notablemente la fecha de espigado. Mientras que en lo que respecta a rendimiento y parámetros de llenado de grano, tuvo una repercusión claramente negativa, probablemente debida al retraso de espigado que este provoca, y, por consiguiente, mayor exposición a la sequía terminal que sufrieron las líneas en este estudio. Sin embargo, un considerable número de líneas portadoras de este alelo respondieron positivamente a lo que rendimiento se refiere en varios de los ambientes de estudio.

Haciendo una comparación entre los QTL de espigado detectados en ambos estudios realizados con esta población (de rendimiento y fases de pre-espigado) encontramos que estos coinciden con los principales genes de vernalización *VRN-H1* y *VRN-H2*, este segundo sólo se detecta en condiciones controladas bajo fotoperiodo largo, pero no bajo fotoperiodo corto ni en campo. Así mismo resultaron significativos los genes de sensibilidad a fotoperiodo *PPD-H1* y *PPD-H2*, el primero bajo fotoperiodo largo y el segundo bajo fotoperiodo corto, así como *Eam6*, el cual provoca un adelanto de la fecha de espigado. Además, otro QTL en 3H se detectó tanto para alcanzar el estado de hoja bandera como para el tiempo total de espigado en el estudio de las fases de pre-espigado, el cual ha sido significativo en el estudio del rendimiento para parámetros como altura y rendimiento.

La influencia de genes relacionados con la floración en el rendimiento ha sido muy alta, destacando la influencia de *VRN-H1* en el rendimiento, pero especialmente la influencia de la presencia de *Eam6* en la población. Este ha causado grandes diferencias no sólo en el adelanto del espigado, sino también en mayores rendimientos y mejores llenados de grano, reafirmando la importancia de este bajo condiciones Mediterráneas para incrementar el rendimiento, salvando la sequía terminal del ciclo, en beneficio de un correcto llenado de grano. Sin embargo, el alelo tardío ha incrementado los parámetros relacionados con longitud y número de granos por espiga. En este sentido, encontramos que de manera general los alelos que incrementan los parámetros de llenado de grano tienen una repercusión positiva en el rendimiento, mientras que un mayor número de granos por espiga y longitud de esta repercutieron negativamente, lo cual queda de manifiesto también en las correlaciones que existen entre el rendimiento y estos parámetros.

En cuanto a *PPD-H2* se ha encontrado que bajo las condiciones de este estudio podría aportar un beneficio con respecto peso específico, por tanto un correcto llenado de grano, de manera que la sensibilidad a fotoperiodo corto ha sido beneficiosa tanto para este, como para el desarrollo vegetativo, en cuanto a una mayor altura de las plantas, principalmente cuando la sequía terminal del ciclo no fue extrema así como bajo siembra primaveral cuando las plantas estuvieron expuestas solamente a fotoperiodos largos. Esto ha ocurrido a pesar de que este gen es considerado de sensibilidad a fotoperiodo corto, por lo que su función podría ir más allá de las primeras fases del ciclo del cultivo, repercutiendo en el llenado de grano.

Además, se han detectado otros dos QTL robustos para llenado de grano no relacionados con la fecha de espigado en la población de estudio. Uno de ellos en el grupo de ligamiento 1H, cuyos alelos procedentes de Barbarrosa incrementan estos parámetros, incrementando los de Nevada el número de granos por metro cuadrado. Y el otro en el grupo 5H, siendo los alelos de Nevada en esta ocasión los que incrementan tanto peso de mil semillas como peso específico. Estos han sido utilizados junto con *Eam6* y *PPD-H1* para realizar una selección de las líneas de esta población con alto potencial de rendimiento. Las líneas seleccionadas se han dividido según el alelo de *PPD-H2* que poseen, indistintamente de si portal denso o no. Así, se ha comprobado el comportamiento en cuanto a rendimiento de estas líneas, concluyendo que si se elimina de la selección el QTL en 5H, la mayoría de las líneas con mayores rendimientos medios en el modelo AMMI para rendimiento se encuentran en esta selección, muchas de ellas con *PPD-H2* activo, y, por tanto, sensibles a fotoperiodo corto.

Sin embargo, se ha realizado otra selección en función del ratio SE/J, con la finalidad de buscar líneas con tiempos de encañado minimizados con los máximos tiempos de elongación del tallo sin variar el tiempo de espigado como proponen Slafer et al (2005) para intentar incrementar el rendimiento en grano. Pero en esta ocasión tan solo una línea de las seleccionadas bajo este criterio se encuentra entre las de mayores rendimientos, tanto en los distintos ambientes por separado, como bajo el modelo AMMI de rendimiento. Por tanto, bajo las condiciones de este estudio y para este fondo genético, la hipótesis de incrementar el rendimiento aumentando el tiempo de la fase de elongación del tallo sin variar el tiempo total de espigado no es válida.

# Summary

---

Barley is one of the most important crops in the world because it is the fourth most cultivated cereal after wheat, corn and rice. Cultivated varieties belong to the species *Hordeum vulgare* L. Barley has been used in many genetic studies so its genome is one of the most known. It has a great genetic variability, both in the cultivated species, due to the fact of having been one of the first domesticated crops, as in other species of the genus *Hordeum*.

The most important factors that affect the development and determination of flowering in barley are the response to temperature, the response to photoperiod, vernalization and intrinsic precocity. Therefore, these factors will be decisive when choosing a good variety with a genetic background adapted to the environmental conditions of each place to obtain optimum crop yield. It has also been proposed that by varying the duration of the pre-heading phases without modifying the total heading time the barley yield could be increased (Slafer et al, 2005).

The control of flowering by *photoperiod* is very studied in *Arabidopsis* (dicotyledonous) under long day conditions and in rice (monocotyledonous) in short day conditions. In *Arabidopsis* the expression of *GIGANTEA* (GI) and *CONSTANS* (CO) is regulated by a circadian clock that coincides with a peak of CO expression in hours of light that only occurs in long day conditions. CO protein is a transcription factor that reduces the expression of certain genes, including the *FLOWERING LOCUS T* (FT) gene, which is a key regulator of flowering. Barley is a long-day plant, like *Arabidopsis*, but it is phylogenetically closer to rice. Several homologous genes have been identified from the *photoperiod* pathway in barley, such as *HvCO1* to *HvCO9* (Griffiths et al., 2003), *HvGI* (Dunford et al 2005) and *HvFT1* to *HvFT5* (Faure et al., 2007).

In barley, the variation in the vernalization requirement is determined by three genes: *VRN-H1*, *VRN-H2* and *VRN-H3* (*HvFT1*). *VRN-H1* codes for a MADS-box type transcription factor APETALA1 (AP1) necessary for the initiation of reproductive development at the apex of the plant (Trevaskis et al., 2003, Yan et al.). *VRN-H2* is a dominant repressor of flowering (Yan et al., 2004). *VRN-H3* is homologous to *FT* of *Arabidopsis* (Yan et al., 2006, Faure et al., 2007). This gene exhibits a high-level of expression when dominant allele is present, which translates into an acceleration of flowering and an alternative to the requirement of vernalization (Yan et al., 2006). Mutations of loss of function in *VRN-H2* allow the expression of *VRN-H1* without prior vernalization, causing rapid flowering under long day conditions (spring varieties). However, this requires an active *PPD-H1*, which is the major determinant of the photoperiod response in barley. *PPD-H1* does not correspond to any of the CO-like genes of barley. The late flowering allele *ppd-H1*, of a recessive nature, has a reduced sensitivity under a long photoperiod since it makes the function of this gene impossible. To all this, we must add the existence of another photoperiod response gene, *PPD-H2* (*HvFT3*). This gene causes differences in the date of flowering under short photoperiod conditions (Laurie et al., 1995; Boyd et al., 2003) and, in addition, *VRN-H2*, active under long photoperiod, acts as a repressor of this (Casao et al, 2011a).

Other genes that affect the determination of flowering have been described, independently of the conditions of vernalization and photoperiod. These are generally called intrinsic precocity loci, such as *Eam6* (*HvCEN*). *Eam6* has been identified as the major determinant of the flowering date under the conditions of the northern Spanish zone, when vernalization requirement and photoperiod sensitivity are saturated (Cuesta-Marcos et al, 2008; Comadrán et al, 2012). This is because under the strong water deficit to which the crop is subjected at the end of the cycle, a major precocity helps to a correct filling of grain under Mediterranean conditions.

On the other hand, semi-dwarf genes have been extensively studied in breeding programs of barley. These reduce the height of the plant and improve its resistance to lodging, but they modify the date of flowering too. The *denso* allele (mutation of the *Hv2Oox2* gene, Jia et al, 2009) has a wide acceptance in European malting barley. This also causes different pleiotropic effects such as delayed flowering, low grain weight and semi-reduced juvenile growth (Sears et al, 1981). However, some varieties that carry this allele have a better grain size.

In this thesis, QTL involved in flowering and pre-heading date phases have been sought under different controlled conditions of photoperiod and vernalization. In addition, the detection of heading date QTL and yield QTL under Mediterranean environment with terminal drought, in six different environments.

For this, a BC1F5 population of 185 line barley has been used. This population segregates for the main genes of flowering and photoperiod, in addition to segregate for the semi-dwarfism allele, *denso*. This population comes from backcrossing between the commercial varieties Nevada (spring variety of two rows and high quality malting grain, carrying the dense allele) and Barbarrosa (winter variety of six rows, average height and low malting quality). Given that the interest of the population was the selection of varieties of six rows, a selection was made towards this kind of lines in the BC1F1 generation.

First, a genetic map of this population has been made. This has a total of 347 markers (DArT, SSR and intragenic molecular markers of the main target genes) distributed in a total of 9 linkage groups. Therefore, the 2H group is divided into two subgroups: 2H1 and 2H2, due to the selection of only six rows lines since in this group one of the main genes involved in fertility of spikelets is located, *vrs1* (Komatsuda et al. , 1998). Something similar happens with the group 7H that is divided into the groups: 7H1 and 7H2. In this chromosome, for example, *VRN-H3* is found, for which it also does not segregate the study population.

Despite all this, the map obtained is similar to other consensus genetic maps, such as the consensus map of Wenzl et al (2006), also keeping the markers used a position relative to that of other maps such as the Bin Map of Marcel et al. (2007).

For the study of the pre-heading phases, a trial was conducted with the population using four different environments combining vernalization treatment or not and photoperiod conditions: long and short. The parameters studied in this case have been both the duration in thermal time of each of the phases: from nascence to jointing (J), from jointing to flag leaf (stem elongation, SE) and from nascence

to flag state (FL) and flowering (F), calculating also the ratio between the thermal time of the elongation of the stem and jointing (SE/J). A high heritability has been observed in this ratio, 0.73, superior to that of both phases separately. In addition, the number of leaves of each one of the phases: number of basal leaves (BL), main stem leaves (SEL) and total leaves (TL), in addition to the phylcron (PHY), as degrees centigrade necessary for the development of a leaf. A high correlation was found between number of sheets and duration in thermal time in each of the phases.

A multi-environmental analysis of variance of each of the characters has been performed. A greater weight of the genotypic factor (G) has been found than of the GxE interaction, even though the conditions of the proposed environments were totally opposite. Likewise, when performing the AMMI models of each of the phases, it has been observed that the first IPCA axis keeps a high explanation of the GxE interaction, especially in the phases from nascence to jointing, flag leaf and even flowering. In addition, in these phases is where there is a greater dispersion of data, being able to discriminate between the lines that need to vernalize and those that do not. While in the case of the phylcron and the stem elongation phase this does not happen, but yes if we look at SE / J. We can also clearly discriminate between environments, finding that the VL (environment with long photoperiod and vernalization treatment) is the most inductive for all lines having similar and lower thermal times in all phases, while L (long photoperiod without vernalization treatment) produces the greatest differences between the lines with winter genotype (vrn-H1 Vrn-H2) and the lines with spring genotype.

A multi-environmental QTL detection was performed using mixed models, as well as the interactions between them, both with the environment (QTLxE) and between them (QTLxQTL). It has been found that the segregating target genes in the population are located in the regions of the main QTL significant for the pre-heading characters studied. Analyzing phase by phase, we found that the effects of *Eam6* were not detected in the phase from nascence to jointing, although in all other phases, significant interactions with this gene were detected in all of them. Therefore, *Eam6* is accelerating these phases with great effects on other flowering genes starting from jointing. On the other hand, *PPD-H2* was significant in all the phases under short photoperiod, with the exception of the stem elongation phase. Although for the ratio between this phase and the phase from nascence to jointing *PPD-H2* was one of the main QTL detected. This indicates that *PPD-H2* has an important role in the adjustment between both phases without changing the total time of spike. Therefore, in view of these differences we can say that in the NxBxB population there is a different genetic control between the pre-heading phases and flowering. *denso* was not significant for any parameter studied for pre-heading phases and flowering of this population.

For the study of yield and its components, six field trials have been conducted under typical Mediterranean conditions, where there was a strong terminal drought at the end of the crop cycle in five of the environments. One of them was carried out under spring sown. In all of them, yield has been studied. Parameters for grain filling, weight of a thousand seeds and specific weight, grains per square meter and length and number of grains per spike has been studied too. In the same way, the height of the plant has also been studied. The segregation of *denso* is clearly reflected, as well as the delay in heading date that this causes.

In the same way that in the study of the pre-heading phases, an analysis of multi-environmental variance, AMMI models and QTL detection using mixed models have been carried out of each of the parameters.

It has been seen that yield is highly influenced by the environment. The parameters studied with the greatest genetic component were the weight of a thousand seeds and the parameters related to the spike, both grains per spike and its length, keeping a high correlation between them. In addition, the interaction between the different QTL detected was also strongly influenced by the environment, with different QTLxQTL interactions for yield and their parameters being significant depending on the environment studied.

*denso* had a strong impact on the yield of NxBxB population, and was also involved in the vast majority of QTLxQTL. It had great effects on the date of flowering, notably delaying heading date. While it had a clearly negative impact on yield and grain filling parameters. Probably this effect is due to the delayed in heading date that it causes, and, consequently, greater exposure to the terminal drought suffered by the lines in this study. However, a considerable number of lines with *denso* allele responded positively to what yield is reported in several of the study environments.

If we compare the flowering time QTL detected in both studies carried out with this population (yield and pre-heading phases), we find that these coincide with the main vernalization genes: *VRN-H1* and *VRN-H2*. The second one was only detected under controlled conditions under long photoperiod, but not under short photoperiod or in the field. Likewise, the photoperiod sensitivity genes *PPD-H1* and *PPD-H2* were significant, the first under long photoperiod and the second under short photoperiod, as well as *Eam6*, which causes an advance in the date of spike. In addition, another QTL in 3H was detected both to reach the state of the flag leaf and to the total time of flowering in the study of the pre-heading phases. A QTL in a similar region has been significant in the study of yield for parameters such as height and performance.

The influence of flowering genes on yield has been very high, highlighting the influence of *VRN-H1* on yield, but especially the influence of the presence of *Eam6* on the population. This has caused great differences not only in an earlier heading date, but also in higher yields and better filled with grain. This fact reaffirms the importance of this under Mediterranean conditions to increase the yield, saving the terminal drought of the cycle, in benefit of a correct filling grain. However, the late allele of *Eam6* has increased the parameters related to length and number of grains per spike. In this sense, we found that in general, the alleles that increase the parameters of grain filling have a positive impact on yield. While a greater number of grains per spike and length of this one had negative repercussions, which is also evident in the correlations that exist between yield and these parameters.

Regarding *PPD-H2* has been found that under the conditions of this study it could provide a benefit with respect to specific weight, therefore a correct grain filling. So that the sensitivity to short photoperiod has been beneficial both for this and for the vegetative development, as far as a greater height of the plants, mainly when the terminal drought of the cycle was not extreme as well as under spring sowing when the plants were only exposed to long photoperiods. This has occurred despite the

fact that this gene is considered sensitive to short photoperiod. So its function could go beyond the first phases of the crop cycle, affecting the grain filling.

In addition, two other robust QTL have been detected for grain filling not related to heading date in the study population. One of them in linkage group 1H, whose alleles from Barbarrosa increase these parameters, increasing those of Nevada the number of grains per square meter. And the other in the group 5H, being the alleles of Nevada this time those that increase as much weight of a thousand seeds as specific weight. These have been used together with *Eam6* and *PPD-H1* to make a selection of the lines of this population with high yield potential. The selected lines have been divided according to the allele of *PPD-H2* they have, regardless of whether they carried *denso* or not. Thus, the behavior in terms of yield of these lines has been verified, concluding that if the QTL in 5H is eliminated from the selection, most of the lines with higher average yields in the AMMI model for yield are found in this selection, many of them with active *PPD-H2*, and, therefore, sensitive to short photoperiod.

However, another selection has been made based on the SE/J ratio, in order to look for lines with minimized jointing times with the maximum stem elongation times without varying the heading date, as proposed by Slafer et al (2005) to increase grain yield. However, this time only one line of those selected under this criterion is among the highest yields, both in the different environments separately, and under the AMMI performance model. Therefore, under the conditions of this study and for this genetic background, the hypothesis of increasing yield by increasing the time of the stem elongation phase without changing the total time of flowering is not valid.

# Índice

---

*Determinación de la floración en una población de cebada (Hordeum vulgare L.) bajo condiciones mediterráneas y sus implicaciones agronómicas*

## Capítulo primero:

<b>Introducción general</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Nociones generales de la cebada</b>	<b>2</b>
1.1.1 Descripción general	2
1.1.2 Morfología y arquitectura de planta de la cebada: implicaciones en el rendimiento en grano	2
<b>1.2 Situación actual del cultivo de la cebada</b>	<b>3</b>
1.2.1 Situación europea del cultivo de cereales	3
1.2.2 Situación específica en Castilla y León	5
<b>1.3 Revisión bibliográfica</b>	<b>7</b>
1.3.1 El genoma de la cebada	7
1.3.2 Los mapas genéticos y su uso en mejora	7
1.3.3 Mapeo de caracteres cuantitativos (QTL, Quantitative Trait Loci)	12
1.3.4 Desarrollo y fisiología: Cómo afectan al rendimiento final del cultivo	14
1.3.4.1 Respuesta a vernalización y fotoperiodo	14
1.3.4.2 La temperatura	18
1.3.4.3 Precocidad intrínseca	19
1.3.4.4 Otros factores	20
1.3.5 Requerimientos agronómicos del cultivo	22
<b>1.4 Justificación y objetivos</b>	<b>23</b>

## Capítulo segundo:

### **Realización de un mapa genético en una población BC1F5 de cebada.**\_\_\_\_\_ **24**

#### **2.1 Introducción: El uso de mapas genéticos en mejora genética de cebada**\_\_\_\_\_ **25**

#### **2.2 Materiales y métodos**\_\_\_\_\_ **26**

##### *2.2.1 Desarrollo de la población de trabajo*\_\_\_\_\_ **26**

##### *2.2.2 Marcadores moleculares utilizados en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa (NxBxB) para la realización de un mapa genético*\_\_\_\_\_ **28**

##### *2.2.2.1 Microsatélites (SRR)*\_\_\_\_\_ **28**

##### *2.2.2.2 Marcadores intragénicos*\_\_\_\_\_ **31**

##### *2.2.2.3 Diversity Array Technology (DArT)*\_\_\_\_\_ **34**

##### *2.2.3 Realización de un mapa genético de la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa (NxBxB)*\_\_\_\_\_ **35**

#### **2.3 Resultados**\_\_\_\_\_ **36**

##### *2.3.1 Marcadores moleculares*\_\_\_\_\_ **36**

##### *2.3.2 Mapa genético*\_\_\_\_\_ **38**

#### **2.4 Discusión**\_\_\_\_\_ **40**

## Capítulo tercero:

### **Control genético de las distintas fases de desarrollo hasta espigado en una población de cebada**\_\_\_\_\_ **46**

#### **3.1 Introducción: Importancia del control de las fases de desarrollo. Repercusiones en el rendimiento**\_\_\_\_\_ **47**

#### **3.2 Materiales y métodos**\_\_\_\_\_ **49**

##### *3.2.1 Población y material vegetal utilizados*\_\_\_\_\_ **49**

##### *3.2.2 Caracterización fenológica de la población NxBxB para la detección de las distintas fases de desarrollo*\_\_\_\_\_ **49**

##### *3.2.3 Metodología de los análisis estadísticos empleados*\_\_\_\_\_ **51**

##### *3.2.3.1 Análisis preliminares: Estadística descriptiva*\_\_\_\_\_ **51**

##### *3.2.3.2 Análisis de varianza*\_\_\_\_\_ **51**

3.2.3.3	Búsqueda de genotipos más adaptados a condiciones mediterráneas para un hipotético ajuste de las fases para optimizar el potencial de rendimiento	53
3.2.3.4	Metodología para la detección de caracteres cuantitativos (Quantitative trait loci, QTL) en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa y sus interacciones	55
3.2.3.4.1	Detección de QTL de las variables estudiadas y su interacción con el ambiente (QTLxE)	55
3.2.3.4.2	Búsqueda de interacciones entre los QTL detectados (QTLxQTL)	56
<b>3.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>57</b>
3.3.1	Resumen de los parámetros estudiados	57
3.3.2	Correlaciones entre caracteres derivados de número de hojas y tiempo térmico	62
3.3.3	Correlaciones entre fases de pre-espigado/espigado	62
3.3.4	ANOVA y AMMI: Análisis de variancia y sus interacciones	64
3.3.4.1	Interpretación AMMI para la duración de las fases desde nascencia a encañado y elongación del tallo principal	68
3.3.4.2	Interpretación AMMI para la duración de las fases desde nascencia hasta espigado y estado de hoja bandera	70
3.3.5	Búsqueda de genotipos más adaptados a condiciones mediterráneas para un hipotético ajuste de las fases para optimizar el potencial de rendimiento	72
3.3.5.1	Selección de líneas bajo el modelo propuesto para un óptimo ajuste a las condiciones mediterráneas bajo siembra otoñal	74
3.3.6	Principales QTL detectados y sus interacciones	79
3.3.6.1	Resumen de los QTL detectados en cada ensayo realizado para este estudio	81
3.3.6.1.1	Ensayo con fotoperiodo largo (L)	81
3.3.6.1.2	Ensayo con fotoperiodo corto (S)	81
3.3.6.1.3	Ensayo con fotoperiodo largo y tratamiento previo de vernalización (VL)	82
3.3.6.1.4	Ensayo con fotoperiodo corto y tratamiento previo de vernalización (VS)	82
3.3.6.2	QTL para cada una de las fases estudiadas y sus interacciones	83
3.3.6.2.1	Fase desde nascencia a encañado	83
3.3.6.2.2	Fase de elongación del tallo principal	85
3.3.6.2.3	Ratio elongación del tallo principal/encañado (SE/J)	85
3.3.6.2.4	Filocrono	86
3.3.6.2.5	Fase de estado de hoja bandera	87
3.3.6.2.6	Espigado/Floración	87
3.3.6.3	Interacciones QTLxAmbiente (QTLxE)	90
3.3.6.4	Interacciones QTLxQTL en ambiente controlado	90
<b>3.4</b>	<b>Discusión</b>	<b>92</b>
3.4.1	Control genético de la fase de espigado y estado de hoja bandera	93
3.4.2	Control genético de las fases hasta encañado y elongación del tallo principal. Fraccionamiento de las fases de pre-espigado	95
3.4.3	Papel de PPD-H2	97

## **Capítulo cuarto:**

### ***Detección de caracteres cuantitativos (QTL) de rendimiento en una población BC1F5 de cebada bajo condiciones mediterráneas.* \_\_\_\_\_ 99**

#### **4.1 Introducción: El control genético del rendimiento y sus parámetros \_\_\_\_\_ 100**

#### **4.2 Materiales y métodos \_\_\_\_\_ 102**

4.2.1 Población y material vegetal utilizados _____	102
4.2.2 Caracterización fenológica y ambientes del estudio _____	102
4.2.2.1 Condiciones climáticas de cada ambiente de estudio _____	103
4.2.3 Metodología de los análisis estadísticos empleados _____	105
4.2.3.1 Análisis preliminares: Estadística descriptiva _____	105
4.2.3.2 Análisis de varianza: interacciones entre los distintos componentes de la varianza _____	105
4.2.3.3 Metodología para la detección de caracteres cuantitativos (Quantitative trait loci, QTL) en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa y sus interacciones _____	105
4.2.4 Selección de genotipos de alto rendimiento _____	106

#### **4.3 Resultados \_\_\_\_\_ 107**

4.3.1 Resumen parámetros estudiados _____	107
4.3.2 Análisis de varianza (ANOVA) y modelización AMMI de los parámetros estudiados _____	117
4.3.2.1 Modelo AMMI respecto al tiempo de espigado y altura: covariable genética <i>denso</i> _____	119
4.3.2.2 Modelo AMMI para el rendimiento _____	120
4.3.2.3 Modelo AMMI para los distintos parámetros del rendimiento: covariables genéticas _____	121
4.3.3 QTL de rendimiento y sus parámetros _____	129
4.3.3.1 QTL detectados para floración _____	133
4.3.3.2 QTL detectados para rendimiento y sus parámetros _____	134
4.3.3.3 Interacciones QTLxAmbiente (QTLxE) _____	141
4.3.3.4 Principales interacciones QTLxQTL: Interacciones más relevantes entre QTL _____	142
4.3.4 Análisis del rendimiento obtenido por las líneas de la población NXBxB según su genotipo _____	143
4.3.4.1 Selección de genotipos de alto rendimiento en función de los QTL para rendimiento obtenidos _____	147
4.3.4.2 AMMI para rendimiento de las líneas según su genotipo _____	150
4.3.4.3 Rendimiento y sus parámetros en las líneas seleccionadas según el ratio $SE_{VI}/J_{Vc}$ _____	154

<b>4.4 Discusión</b>	<b>159</b>
4.4.1 <i>La complejidad del control genético del rendimiento y su interacción con el ambiente</i>	160
4.4.1.1 Genotipos más adaptados a los ambientes estudiados en la población NxBxB según los resultados obtenidos	165
4.4.2 <i>La influencia del tiempo de espigado en el rendimiento: El papel de PPD-H2, denso y otros genes de floración</i>	167
4.4.2.1 <i>denso</i>	168
4.4.2.2 <i>VRN-H1 y VRN-H2</i>	170
4.4.2.3 <i>PPD-H1</i>	172
4.4.2.4 <i>PPD-H2</i>	173
4.4.2.4.1 <i>Eam6</i>	175

<b>Conclusiones Finales</b>	<b>178</b>
-----------------------------	------------

<b>Bibliografía</b>	<b>183</b>
---------------------	------------

<b>Anexos</b>	<b>203</b>
---------------	------------

### Índice de tablas

<b>Tabla 1-</b>	Datos de Eurostat del rendimiento de los distintos cereales en la Unión Europea durante la campaña de 2016.	5
<b>Tabla 2-</b>	Resumen del genotipo de los parentales Nevada y Barbarrosa de los genes de vernalización y fotoperiodo para los que segrega la población NxBxB.	27
<b>Tabla 3-</b>	Microsatélites utilizados en el mapa NxBxB.	29
<b>Tabla 4-</b>	Marcadores intragénicos utilizados en el mapa genético de la población NxBxB.	31
<b>Tabla 5-</b>	Resultados de los marcadores tipo microsatélites utilizados para la elaboración del mapa NxBxB.	36
<b>Tabla 6-</b>	Tabla resumen de cada grupo de ligamiento obtenido en el mapa genético de la población NxBxB.	39
<b>Tabla 7-</b>	Descripción de los cuatro ambientes controlados para el estudio de las fases de pre-espigado en la población NxBxB.	49

<b>Tabla 8-</b>	Resumen de los estadísticos descriptivos de los caracteres para el estudio de las fases de pre-espigados en los cuatro ambientes. _____	60
<b>Tabla 9-</b>	Correlaciones de Pearson entre los parámetros de tiempo térmico y número de hojas de cada una de las fases de pre-espigado en cada uno de los ambientes. _____	62
<b>Tabla 10-</b>	Correlaciones de Pearson entre las fases de pre-espigado estudiados en cada uno de los ambientes. _____	63
<b>Tabla 11-</b>	Análisis de varianza de cada uno de los caracteres estudiados en el estudio de las fases de pre-espigado de la población $N \times B \times B$ . _____	64
<b>Tabla 12-</b>	Estadísticos descriptivos del ambiente modelo en donde los tiempos de encañado corresponden al ambiente VC y los de elongación del tallo principal a VL. _____	72
<b>Tabla 13-</b>	Correlaciones de Pearson entre los parámetros de las fases de pre-espigado correspondientes al ambiente modelo con tiempos de encañado correspondientes a VC y los de elongación del tallo principal a VL y dichos parámetros en los ambientes VC y VL. _____	73
<b>Tabla 14-</b>	Correlaciones de Pearson entre los parámetros de las fases de pre-espigado en el ambiente modelo con tiempos de encañado correspondientes a VC y los de elongación del tallo principal a VL. _____	73
<b>Tabla 15-</b>	Líneas seleccionadas en el modelo del ambiente modelo con tiempos de encañado correspondientes a VC y los de elongación del tallo principal a VL con ratios $SE_{VL}/J_{VL}$ mayores a 1,1. _____	75
<b>Tabla 16-</b>	Listado de los QTL significativos para los parámetros de pre-espigado en un análisis multi-ambiental donde se muestran las heredabilidades, efectos aditivos de Nevada y Barbarrosa y la significación de las interacciones QTLx $E$ . _____	80
<b>Tabla 17-</b>	Interacciones significativas QTLxQTL entre los QTL significativos para las fases de pre-espigado en cada uno de los ambientes del estudio. _____	91
<b>Tabla 18-</b>	Resumen de los estadísticos descriptivos de los parámetros estudiados en los ambientes de campo del rendimiento y sus parámetros. _____	108
<b>Tabla 19-</b>	Correlaciones de Pearson entre el rendimiento y cada uno de los parámetros de este estudiado en cada uno de los ambientes. _____	115
<b>Tabla 20-</b>	Correlaciones de Pearson entre los distintos parámetros del rendimiento en cada ambiente del estudio. _____	116
<b>Tabla 21-</b>	Análisis de varianza de cada uno de los caracteres estudiados para el rendimiento y sus parámetros en la población $N \times B \times B$ . _____	117

<b>Tabla 22-</b>	Listado de los QTL significativos para rendimiento y sus parámetros en un análisis multi-ambiental, donde se muestran las heredabilidades, efectos aditivos de Nevada y Barbarrosa y la significación de las interacciones QTLxE. _____	129
<b>Tabla 23-</b>	Interacciones significativas QTLxQTL entre los QTL significativos de rendimiento y sus parámetros en cada uno de los ambientes del estudio. _____	142
<b>Tabla 24-</b>	Listado de las 10 líneas con mayores rendimientos en cada uno de los seis ambientes estudiados. _____	143
<b>Tabla 25-</b>	Listado de las 10 líneas con mayores rendimientos medios en el modelo AMMI para rendimiento. _____	144
<b>Tabla 26-</b>	Líneas con genotipos potencialmente de alto rendimiento según los QTL detectados para los parámetros de este. _____	149
<b>Tabla 27-</b>	Líneas con genotipos potencialmente de alto rendimiento con <i>PPD-H2</i> activo según los QTL detectados para los parámetros de este, sin tener en cuenta el QTL de los parámetros de rendimiento situado en 5H. _____	150
<b>Tabla 28-</b>	Genotipos de las líneas seleccionadas por el ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ para los marcadores con el $-\log_{10}(p)$ máximo de los principales QTL de rendimiento y sus parámetros detectados en el estudio. _____	155
<b>Tabla 29-</b>	Valor del ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ de las líneas con mayores rendimientos en el modelo AMMI de rendimiento. _____	156
<b>Tabla 30-</b>	Valor del ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ de las 10 líneas con mayores rendimientos en cada uno de los ambientes estudiados. _____	157
<b>Tabla 31-</b>	Correlaciones de Pearson entre el ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ y los distintos parámetros del rendimiento estudiado en cada uno de los ambientes. _____	158

### Índice de gráficos

<b>Gráfico 1-</b>	Distribución en porcentaje de los distintos cereales en la Unión Europea. _____	4
<b>Gráfico 2-</b>	Distribución de los distintos cereales en Castilla y León. _____	5
<b>Gráfico 3-</b>	Superficie cultivada de los diferentes cereales en Castilla y León. _____	6
<b>Gráfico 4-</b>	Frecuencias relativas del tiempo térmico desde nascencia hasta encañado en cada uno de los	

	ambientes del estudio de la fase de pre-espigado.	57
<b>Gráfico 5-</b>	Frecuencias relativas del tiempo térmico para la elongación del tallo principal en cada uno de los ambientes del estudio de la fase de pre-espigado.	58
<b>Gráfico 6-</b>	Frecuencias relativas del tiempo térmico desde nascencia a espigado en cada uno de los ambientes del estudio de la fase de pre-espigado.	59
<b>Gráfico 7-</b>	Frecuencias relativas del ratio SE/J en cada uno de los ambientes del estudio de la fase de pre-espigado.	59
<b>Gráfico 8-</b>	Modelo AMMI para el filocrono en el estudio de las fases de pre-espigado.	67
<b>Gráfico 9-</b>	Modelo AMMI para el tiempo térmico de la fase desde nascencia a encañado en el estudio de las fases de pre-espigado.	68
<b>Gráfico 10-</b>	Modelo AMMI para el tiempo térmico de la fase de elongación del tallo principal en el estudio de las fases de pre-espigado.	69
<b>Gráfico 11-</b>	Modelo AMMI para el cociente entre el tiempo térmico de elongación del tallo y encañado (SE/J) en el estudio de las fases de pre-espigado.	70
<b>Gráfico 12-</b>	Modelo AMMI para el tiempo térmico de la fase desde nascencia hasta alcanzar el estado de hoja bandera en el estudio de las fases de pre-espigado.	71
<b>Gráfico 13-</b>	Modelo AMMI para el tiempo térmico de la fase desde nascencia hasta espigado en el estudio de las fases de pre-espigado.	71
<b>Gráfico 14-</b>	Ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ frente al tiempo térmico de espigado en el ambiente modelizado utilizando tiempos térmicos de encañado en el ambiente VC y de elongación del tallo en VL, mostrando las líneas seleccionadas con ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ superior a 1,1.	74
<b>Gráfico 15-</b>	Ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ frente al tiempo térmico de espigado en el ambiente VL, mostrando las líneas seleccionadas con ratio $SE_{VL}/J_{VC}$ superior a 1,1.	76
<b>Gráfico 16-</b>	Modelo AMMI para tiempo térmico hasta espigado en el estudio de las fases de pre-espigado mostrando las líneas seleccionadas con mayores ratios $SE_{VL}/J_{VC}$ .	77
<b>Gráfico 17-</b>	Modelo AMMI para tiempo térmico desde nascencia hasta encañado en el estudio de las fases de pre-espigado mostrando las líneas seleccionadas con mayores ratios $SE_{VL}/J_{VC}$ .	77
<b>Gráfico 18-</b>	Modelo AMMI para tiempo térmico de elongación del tallo principal en el estudio de las fases de pre-espigado mostrando las líneas seleccionadas con mayores ratios $SE_{VL}/J_{VC}$ .	78
<b>Gráfico 19-</b>	Grafica de temperaturas medias y precipitaciones registradas en los seis ambientes para el estudio del rendimiento y sus parámetros.	104

<b>Gráfico 20-</b>	Frecuencias relativas para el tiempo de espigado en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	109
<b>Gráfico 21-</b>	Frecuencias relativas para la altura en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	110
<b>Gráfico 22-</b>	Frecuencias relativas para el rendimiento en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	111
<b>Gráfico 23-</b>	Frecuencias relativas para el peso específico en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	112
<b>Gráfico 24-</b>	Frecuencias relativas para el peso de mil semillas en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	112
<b>Gráfico 25-</b>	Frecuencias relativas para número de espiguillas en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	113
<b>Gráfico 26-</b>	Frecuencias relativas para longitud de la espiga en cada uno de los ambientes del estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	114
<b>Gráfico 27-</b>	Modelo AMMI para tiempo de espigado en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	119
<b>Gráfico 28-</b>	Modelo AMMI para rendimiento en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	120
<b>Gráfico 29-</b>	Modelo AMMI para altura de planta en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	121
<b>Gráfico 30-</b>	Modelo AMMI para peso específico en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	122
<b>Gráfico 31-</b>	Modelo AMMI para peso de mil semillas en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	124
<b>Gráfico 32-</b>	Modelo AMMI para número de granos por metro cuadrado en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	125
<b>Gráfico 33-</b>	Modelo AMMI para número de granos por espiga en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	127
<b>Gráfico 34-</b>	Modelo AMMI para longitud de la espiga en el estudio del rendimiento y sus parámetros. _____	128
<b>Gráfico 35-</b>	Número de granos por espiga frente a rendimiento mostrando las líneas portadoras de <i>denso</i> . _____	145
<b>Gráfico 36-</b>	Peso de mil semillas frente a rendimiento mostrando las líneas portadoras de <i>denso</i> . _____	146

<b>Gráfico 37-</b>	Peso específico frente a rendimiento mostrando las líneas portadoras de denso.	147
<b>Gráfico 38-</b>	Modelo AMMI para el rendimiento de eje IPCA1 frente a las medias del modelo de las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento según los QTL detectados.	152
<b>Gráfico 39-</b>	Modelo AMMI para el rendimiento de eje IPCA2 frente a las medias del modelo de las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento según los QTL detectados.	153
<b>Gráfico 40-</b>	Modelo AMMI para el rendimiento mostrando las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento según los QTL detectados distinguiendo entre las líneas que poseen <i>PPD-H2</i> activo.	154
<b>Gráfico 41-</b>	Modelo AMMI para el rendimiento mostrando las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento según los QTL detectados distinguiendo entre las líneas seleccionadas con mayores ratios $SE_{VI}/J_{VC}$ .	156

## Índice figuras

<b>Figura 1-</b>	Esquema explicativo: cebadas de invierno y cebadas de primavera. Genes <i>VRN-H1</i> y <i>VRN-H2</i> .	16
<b>Figura 2-</b>	Interacciones entre los genes <i>VRN</i> y los genes del ciclo circadiano.	17
<b>Figura 3-</b>	Esquema de los distintos genes que afectan al rendimiento del cultivo de la cebada en grano.	21
<b>Figura 4-</b>	Genealogía de la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa.	26
<b>Figura 5-</b>	Mapa genético de la población NxBxB.	38
<b>Figura 6-</b>	Comparativa entre los mapas NxBxB y el mapa consenso de DArT de Wenzl et al (2006).	41
<b>Figura 7-</b>	Comparativa entre los mapas NxBxB y Bin Map de Marcel et al (2009).	42
<b>Figura 8-</b>	Comparativa de los grupos de ligamiento 2H y 7H del mapa consenso de DArT (Wenzl et al, 2006) con los grupos obtenidos en el mapa genético de la población NxBxB: 2H1, 2H2, 7H1 y 7H2.	43

- Figura 9-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para el tiempo térmico de las fases de pre-espigado de elongación del tallo principal, desde nascencia hasta encañado así como los QTL significativos para el cociente entre ambas fases, ratio SE/J, bajo un análisis multi-ambiental. \_\_\_\_\_ 84
- Figura 10-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para las fases de pre-espigado tanto en tiempo térmico como en número de hojas, bajo un análisis multi-ambiental. \_\_\_\_\_ 86
- Figura 11-** Distribución en el mapa genético NxBxB de los QTL detectados para número de hojas y tiempo térmico de las fases de pre-espigado, así como los QTL para filocrono y el ratio SE/J. \_\_\_\_\_ 89
- Figura 12-** Distribución en el mapa genético NxBxB de los QTL detectados para espigado, rendimiento y parámetros los parámetros analizados de este en los seis ambientes de campo de este estudio. \_\_\_\_\_ 131
- Figura 13-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para espigado bajo un análisis multi-ambiental de los seis ambientes en donde se evaluó el rendimiento y sus parámetros. \_\_\_\_\_ 134
- Figura 14-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para espigado y rendimiento bajo un análisis multi-ambiental de los seis ambientes en donde se evaluó el rendimiento y sus parámetros. \_\_\_\_ 136
- Figura 15-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para rendimiento bajo un análisis multi-ambiental. \_\_\_\_\_ 137
- Figura 16-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para los parametros del rendimiento peso de mil semillas y peso específico bajo un analisis multi-ambiental . \_\_\_\_\_ 139
- Figura 17-** Gráficos que muestran tanto el  $-\log_{10}(p)$  como los efectos aditivos de los parentales Nevada y Barbarrosa de los QTL detectados para los parámetros del rendimiento granos por espiga y longitud de la misma bajo un análisis multi-ambiental . \_\_\_\_\_ 141

## Abreviaturas

<b>2006.</b>	Ambiente para análisis del rendimiento y sus parámetros llevado a cabo en la campaña de 2006 en la finca Zamadueñas bajo siembra otoñal.
<b>2008.</b>	Ambiente para análisis del rendimiento y sus parámetros llevado a cabo en la campaña de 2008 en la finca Zamadueñas bajo siembra otoñal.
<b>2009_Spring.</b>	Ambiente para análisis del rendimiento y sus parámetros llevado a cabo en la campaña de 2009 en la finca Zamadueñas bajo siembra primaveral.
<b>2009_Winter.</b>	Ambiente para análisis del rendimiento y sus parámetros llevado a cabo en la campaña de 2009 en la finca Zamadueñas bajo siembra otoñal.
<b>2011_P.</b>	Ambiente para análisis del rendimiento y sus parámetros llevado a cabo en la campaña de 2011 en la localidad vallisoletana de Peñaflor de Hornija bajo siembra otoñal.
<b>2011_Z.</b>	Ambiente para análisis del rendimiento y sus parámetros llevado a cabo en la campaña de 2011 en la finca Zamadueñas bajo siembra otoñal.
<b>AFLP.</b>	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism).
<b>AMMI.</b>	Modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativo (Additive Main effects and Multiplicative Interaction).
<b>ANOVA.</b>	Análisis de varianza (Analysis of Variance).
<b>BL.</b>	Número de hojas basales.
<b>BLUPs.</b>	Mejores estimadores lineales insesgados (Best Linear Unbiased Predictors).
<b>CIM.</b>	Mapeo por intervalo compuesto (Composite Interval Mapping).
<b>cM.</b>	Centimorgan.
<b>DArT.</b>	Tecnología de ensayo de diversidad (Diversity Array Technology).
<b>df.</b>	Grados de libertad (degrees of freedom).
<b>E.</b>	Ambiente.
<b>e.</b>	Error.
<b>F.</b>	Duración en tiempo térmico de la fase desde nacimiento hasta encañado de la planta.

<b>FL.</b>	Duración en tiempo térmico de la fase desde nascencia hasta alcanzar el tallo principal el estado de hoja bandera.
<b>G.</b>	Genotipo.
<b>G/m<sup>2</sup>.</b>	Número de granos por metro cuadrado.
<b>G/S.</b>	Número de granos por espiga.
<b>GL.</b>	Grupo de ligamiento.
<b>GxE.</b>	Interacción genotipo por ambiente.
<b>h<sup>2</sup>.</b>	Heredabilidad.
<b>IM.</b>	Mapeo por intervalo (Interval mapping).
<b>IPCA.</b>	Análisis de componentes principales de interacción (Interaction Principal Component Analysis).
<b>J.</b>	Duración en tiempo térmico de la fase desde nascencia hasta espigado.
<b>L.</b>	Ambiente controlado sin tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo.
<b>LS.</b>	Longitud de la espiga.
<b>MS.</b>	Media de cuadrados (Mean Squares).
<b>P.</b>	Fenotipo.
<b>PCR.</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
<b>PIC.</b>	Contenido de información polimórfica (Polymorphism information content).
<b>QTL.</b>	Loci de los caracteres cuantitativos (Quantitative Trait Loci).
<b>QTLxE.</b>	Interacción QTL por ambiente.
<b>QTLxQTL.</b>	Interacción entre QTL.
<b>RAPD.</b>	ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplification of Polymorphic DNA).
<b>RFLP.</b>	Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms).
<b>S.</b>	Ambiente controlado sin tratamiento de vernalización y fotoperiodo corto.

- SE.** Duración en tiempo térmico de la fase de elongación del tallo, o fase que parte del momento de encañado hasta que alcanza el estado de hoja bandera.
- SE/J.** Ratio entre la duración en tiempo térmico entre las fases de elongación del tallo principal y la fase de encañado.
- SEL.** Número de hojas caulinares.
- SE<sub>VL</sub>/J<sub>VS</sub>.** Ratio SE/J en el modelo propuesto utilizándose los tiempos térmicos de las fases que lo componen de los ambientes señalados.
- SNP.** Polimorfismo de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism).
- SS.** Suma de cuadrados (Sum of Squares).
- SSR.** Microsatélites, repeticiones de secuencias simples (Simple Sequence Repeats).
- SW.** Peso específico.
- TKW.** Peso de mil semillas.
- TL.** Número de hojas totales del tallo principal.
- VL.** Ambiente controlado bajo tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo.
- VS.** Ambiente controlado bajo tratamiento de vernalización y fotoperiodo corto.

*Capítulo primero:*

*Introducción general*

# Introducción general

---

## 1. Nociones generales de la cebada

### 1. 1.1 Descripción general

La cebada es uno de los cultivos con mayor importancia a nivel mundial, ya que es el cuarto cereal más cultivado después de trigo, maíz y arroz, encontrándose ampliamente representado en todos los continentes por su gran adaptación a las diferentes condiciones ambientales (Schulte et al, 2009; Tester y Langridge 2010).

La cebada fue uno de los primeros cereales domesticados. Existen muchas referencias antiguas a la cerveza y a la cebada ya en el temprano Egipto que datan de más de 5000 años de antigüedad (. Probablemente la cebada se originó en el área del creciente fértil (Mascher et al, 2016; Kernich et al, 1995).

Las variedades de cebada cultivadas pertenecen al género *Hordeum*, concretamente a la especie *Hordeum vulgare* L. que es miembro de la tribu Triticeae de la familia Gramineae (Briggs, 1978; Kernich et al, 1995). La especie *Hordeum vulgare* L. consta de dos subespecies: *vulgare* y *spontaneum* (cebasas silvestres) (Blattner, 2018; Mascher et al 2016). Son plantas herbáceas, anuales y hermafroditas de fecundación autógama. Evidencias moleculares han revelado que existe una considerable homología entre la cebada, el trigo y el arroz. Entre los *Hordeum* silvestres hay especies diploides, tetraploides y hexaploides, pero la especie cultivada es diploide (Blattner, 2018; Nishikawa et al, 2001).

### 2. 1.2 Morfología y arquitectura de planta de la cebada: implicaciones en el rendimiento en grano

El sistema radicular de la cebada, al igual que el de otras especies de la familia Triticeae, está compuesto de raíces primarias o seminales y de raíces secundarias, adventicias o coronarias.

Las raíces primarias (de cinco a seis en trigo y cebada) son funcionales normalmente desde la emergencia hasta el comienzo del ahijado, mientras que las secundarias nacen del nudo de ahijamiento, para ir sustituyendo progresivamente a las primeras. Las raíces secundarias son de tipo fasciculado y se extienden oblicuamente en todas direcciones. En comparación con el trigo la cebada tiene raíces más superficiales y menos importantes.

El sistema aéreo está formado por tallos que parten de una zona situada en la base de la planta que se denomina nudo de ahijamiento. Cada tallo porta las hojas y en su extremo termina en la inflorescencia.

Los tallos formados por nudos y entrenudos, los primeros están rellenos y lignificados y son zonas meristemáticas a partir de las cuales se alargan los entrenudos y se diferencian las hojas. Cada nudo es el punto de unión de una hoja y el número de estas está directamente relacionado con la fecha de floración, ya que en plantas más tardías el número de hojas será mayor.

Las hojas se disponen alternas y en dos filas a lo largo del tallo. Cada hoja tiene dos partes: la vaina, que es la zona inferior que envuelve el entrenudo y el limbo o zona superior. Las vainas están sujetas a nivel del nudo, encajándose unas en otras cuando son jóvenes, formando un tubo cilíndrico alrededor del tallo. El limbo tiene unas nerviaciones paralelas y es más largo que ancho. En la unión del limbo y la vaina existe una pequeña membrana no vascular, más o menos alargada y dentada llamada lígula y a cada lado de esta, en la base del limbo, se encuentran las estípulas que son glabras y muy abrazadoras.

La inflorescencia es tipo espiga cuya unidad morfológica básica es la espiguilla, lo que difiere con otras especies de Triticeae como el arroz. En el caso de la cebada, esta espiga consta de tres espiguillas por articulación del raquis y una sola flor por espiguilla la cual se encuentra envuelta por dos glumillas denominadas lema y pálea. La espiguilla está flanqueada por las dos glumas, uniéndose al eje principal de la inflorescencia o raquis. Cuando las tres espiguillas son fértiles, lo que hace que nos encontremos con tres granos por articulación, estamos hablando de cebadas de seis carreras, mientras que cuando sólo la espiguilla central es fértil, hablamos de cebadas de dos carreras. Por su parte, las flores contienen tres estambres cada una, con anteras en forma de "X", un ovario formado por un solo carpelo encerrando un óvulo y con dos estilos cuyos estigmas son plumosos. En la base del ovario hay dos pequeñas escamas llamadas glomélulas o lodículas.

El fruto es seco e indehiscente, llamado cariósipide, quedando el grano encerrado en el tegumento del fruto, llamado pericarpio, que proviene de los tejidos del ovario. En todas las variedades cultivadas en la actualidad en España el grano es vestido, es decir, las glumillas, lema y palea de la flor se adhieren al grano en el momento de la madurez, permaneciendo en el grano después de la trilla.

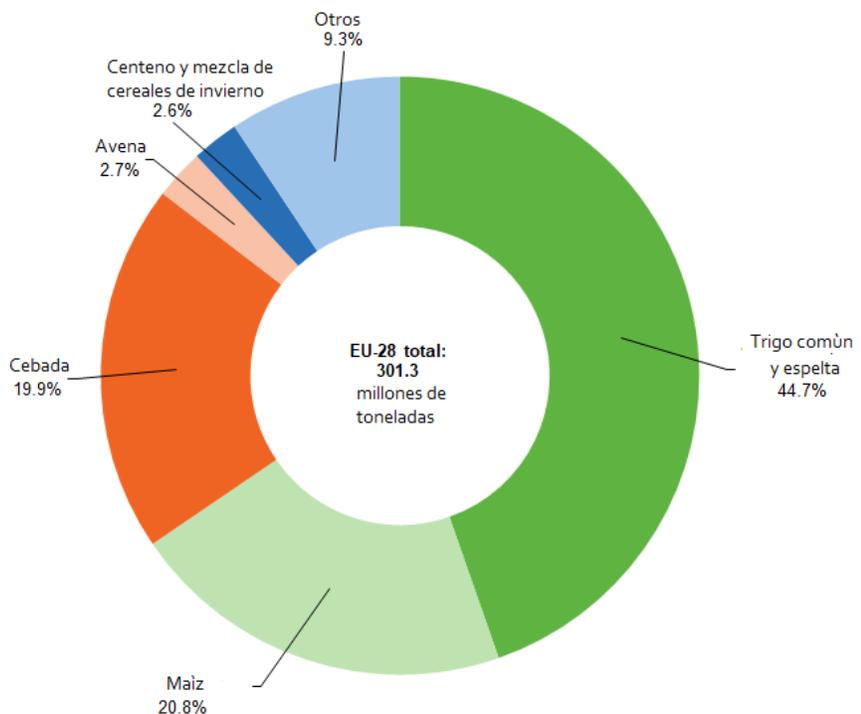
Como trataremos más adelante existen también factores genéticos que interfieren tanto en la arquitectura de la planta (como los genes de semienanismo), como en la arquitectura de la propia inflorescencia lo que puede llegar a causar grandes variaciones en el rendimiento del cultivo.

## 2. Situación actual del cultivo de la cebada

### 2.1 Situación europea del cultivo de cereales

En 2016, la producción de cereales en los 28 miembros de la Unión Europea, incluyendo el arroz, fue de alrededor de 301 millones de toneladas, con una tendencia a la baja frente a campañas anteriores. Esto representa el 11,6% de la producción mundial de cereales ([Eurostat](#), 2017).

Trigo, maíz y cebada en este mismo año representaron el 85,4% de la producción de cereales en la Unión Europea. El 19,9% de esta producción europea representó la producción de cebada de este año, frente al 44,7% que supuso la producción de trigo.



Nota: 'Cereales totales' incluye la producción de cereales grano (incluyendo la reservada para semilla). 'Otros' incluye el arroz, triticale, sorgo, mijo, etc.

**Gráfica 1.** Porcentajes de producción de los principales cereales grano en Europa en el año 2016 según datos de Eurostat 2017.

En cuanto a países se refiere, Francia contó con alrededor de un quinto de la producción de cereales, de manera que Francia produjo el 18% de la producción de cereales de la Unión Europea, seguido de Alemania que aportó el 15,1% y Polonia el 9,9%, contribuyendo entre los tres al 43% de la producción de la Unión Europea. España se situó en el siguiente lugar, con un 8% de la producción europea. En cuanto a especies, Francia fue el mayor productor de trigo, mientras que Alemania lo fue de cebada, con un 17,9% de la producción total de cebada de los miembros de la Unión Europea.

En 2016, la relativamente Buena cosecha de cereales, combinada con el suficiente stock y, en general la tendencia a la baja del mercado común, han llevado a la caída del precio del cereal. Este bajo un 8,5% comparado con el año anterior y un 21,4% si lo comparamos con la media de los últimos 5 años.

	Cereales Totales	Trigo	Maíz	Cebada	Avena	Otros (incluyendo arroz)
<b>U.E-28</b>	301358	134558	62793	60082	8123	7689
<b>Francia</b>	54209	27560	11941	10435	347	98
<b>Alemania</b>	45401	24329	4018	10731	536	3174
<b>Polonia</b>	29849	10828	4343	3441	1358	2395
<b>España</b>	24115	6815	4070	9176	1110	435
<b>Reino Unido</b>	21965	14383	19	6655	816	49
<b>Rumania</b>	21765	8406	10746	1817	381	26
<b>Italia</b>	18219	2989	6840	988	260	13

Tabla 1. Producción de los principales productores de cereales de los 28 miembros de la Unión Europea en miles de toneladas.

## 2.2 Situación específica en Castilla y León

Castilla y León es la primera región en superficie dedicada a los cereales, que ocupan el 64% de sus tierras de cultivo. Se dedican cerca de 2,3 millones de hectáreas al cultivo de los cereales, lo que supone algo más de un tercio de la superficie nacional. Se trata, además, de la primera región de España en superficie de cebada, con 1,25 millones de hectáreas de las que se obtienen el 34% de la producción nacional, trigo, 0,65 millones de hectáreas y el 26% de la producción nacional, maíz, 0,15 millones de hectáreas y centeno, 0,07 millones de hectáreas, y la segunda en superficie de avena, 150.000 hectáreas, detrás de Castilla La Mancha. Por provincias destaca, Burgos, con más del 25% de la superficie de trigo y el 18% de cebada, Valladolid con el 24% de la superficie de cebada y León con el 49% de la superficie de maíz según la Consejería de Agricultura y Ganadería de la junta de Castilla y León. Las producciones se sitúan alrededor de los 8 millones de toneladas anuales, un 38% de la producción nacional.

### Distribución de la producción de cereal grano en 2016

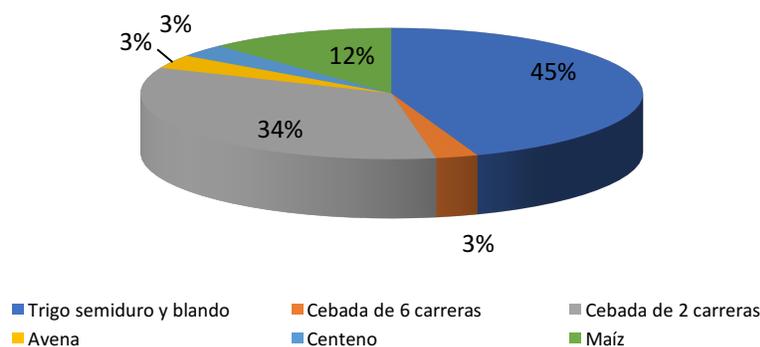
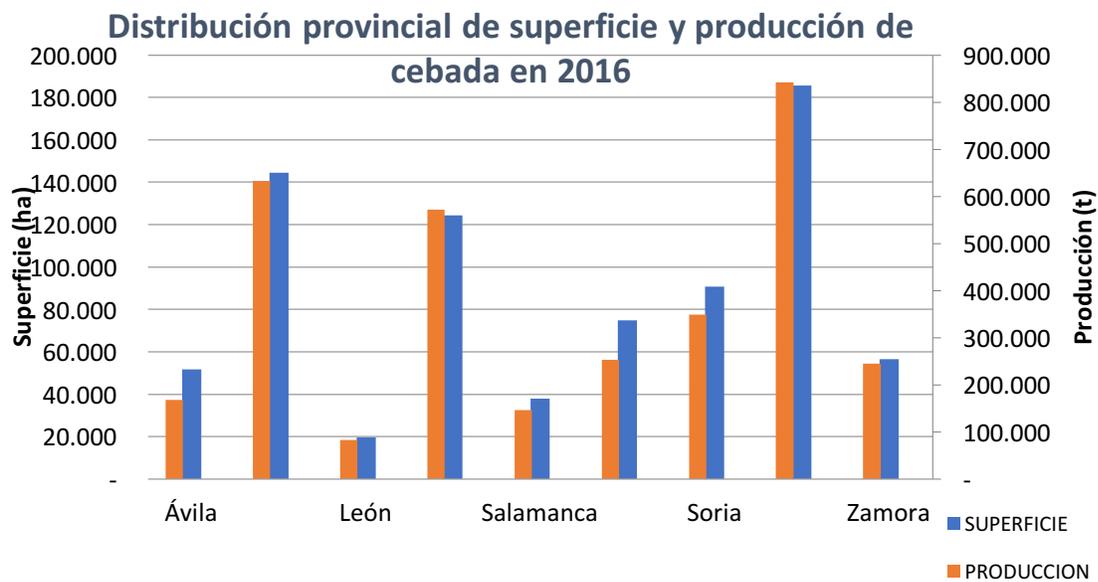


Gráfico 2. Distribución de la producción de los distintos cereales grano en Castilla y León en el año 2016 según la junta de Castilla y León.

En Castilla y León destacan los denominados cereales de invierno: trigo, cebada, avena y centeno, de los que Castilla y León posee más de la tercera parte de la superficie nacional. Aunque una presencia similar supone la superficie que tienen los cereales de primavera.



**Gráfica 3.** Datos de superficie y producción de cebada en las distintas provincias según datos de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la junta de Castilla y León.

### 3. Revisión bibliográfica

#### 3.1 El genoma de la cebada

El tamaño y la complejidad del genoma de la cebada (*Hordeum vulgare*), y otras especies relacionadas como el trigo (*Triticum aestivum*), implican un gran obstáculo a la hora de desarrollar diferentes estrategias de selección y programas de mejora genética.

La cebada (*Hordeum vulgare*) es una especie diploide que contiene 7 pares de cromosomas ( $2n=2x=14$ ). El tamaño de su genoma es de 5,1 giga pares de bases (Gpb) (Doležel et al, 1989), un tamaño considerablemente grande y con gran complejidad, aunque ligeramente inferior a la del trigo, especie halohexaploide (AABBDD) que cuenta con tres genomas diploides procedentes de varias especies originales ( $2n=6x=42$ ) con un tamaño que triplica al de la cebada (17 Gpb) (The International Wheat Genome Sequencing, 2014). Aunque esta complejidad sí es mucho mayor que en especies como *Brachipodium*, la cual es considerada especie modelo para estudios de genética y genómica en cereales.

#### 3.2 Los mapas genéticos y su uso en mejora

Un mapa genético o de ligamiento es una representación, en forma de tabla o gráfico, de la posición de los genes o marcadores dentro de un grupo de ligamiento. Las posiciones del mapa son estimadas desde las frecuencias de recombinación estimadas entre los marcadores.

Los principales usos de los mapas genéticos son los siguientes:

- Conocer el orden de los genes/marcadores en un genoma.
- Predecir la probabilidad de que ocurran determinados gametos, por lo tanto determinados genotipos.
- Identificar los sitios del genoma con alta y baja tasa de recombinación.
- Agrupar los individuos según su genotipo.
- Detectar la posición en el genoma de caracteres cuantitativos.
- Realizar selección indirecta de genes de interés estrechamente ligados a un marcador.
- Obtener datos sobre posibles reordenamientos cromosómicos por comparación de mapas genéticos de especies relacionadas.

Los primeros mapas genéticos contenían, en muchos casos, tan solo unos pocos marcadores morfológicos, representando principalmente genes para los cuales se disponía de fenotipos mutantes. Generalmente, tan solo dos o tres marcadores de genes estaban segregando simultáneamente, de manera que los mapas genéticos tenían que ser establecidos a partir de un número de diferentes poblaciones experimentales. No obstante, incluso antes de la llegada de los marcadores moleculares, se construyeron un elevado número de las llamadas “líneas multimarcadores” en especies tales como cebada, maíz o *Arabidopsis*. Estas líneas llevaban alelos mutantes en gran número de loci, para que estos loci segregaran simultáneamente en la F2 cuando se cruzaban estas líneas con líneas silvestres (no mutantes). El problema con este tipo de líneas es que muy a menudo se obtienen fenotipos sesgados, ya que muchos mutantes tienen caracteres con un efecto deletéreo, como por ejemplo deficiencia en clorofila, enanismo, malformación de las flores...etc. De manera que tales líneas eran difíciles de mantener, y además, el fenotipo de un mutante a menudo sólo puede ser claramente reconocido en ausencia de otra mutación.

Con el descubrimiento de los marcadores moleculares los problemas de herencia de estas “líneas multimarcadores” desaparecieron. A nivel de DNA la cantidad de variación es tan grande, que en un cruzamiento cualquiera entre dos genotipos más de mil marcadores pueden estar segregando simultáneamente.

Un marcador genético se define como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, por tanto, un marcador genético es un locus marcador que tiene que ser polimórfico, (Nuez y Carrillo, 2000). Como marcador puede utilizarse con una doble finalidad, para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o marcar otro locus próximo que controle algún carácter de interés. Los tipos más importantes (Cubero, 2003) son:

- Morfológicos: son visibles o fácilmente detectables, aunque normalmente hay que esperar al desarrollo completo de la planta para su manifestación. No muestran codominancia y suelen afectar a más de una función.
- Isoenzimas: son variantes de una enzima y por tanto expresión directa de una serie alélica. Son codominantes y lo que unido a su bajo coste los ha hecho material de trabajo ideal durante mucho tiempo. Pero son insuficientes para formar mapas saturados en el reino vegetal.
- RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphism): fueron los primeros marcadores de ADN en aparecer, pues permitieron por primera vez la construcción de mapas saturados. Están formados por secuencias muy largas. El problema es su coste y que hay que utilizar radiactividad.
- RAPD: (Random Amplified Polymorphic DNA): están basados en las técnicas de PCR, es rápida, sencilla y económica y permite mapear cientos de marcadores en poco tiempo. No es codominante. Esta técnica es muy utilizada para construir mapas preliminares.

- AFLP: (Amplified Fragment Length Polymorphism): Combina características de los dos anteriores.
- SCAR: (Sequence Characterised Amplified Region): Consiste en un fragmento de ADN genómico que se identifica por amplificación mediante PCR usando un par de cebadores específicos.
- Microsatélites: (STMS: Sequence Tagged Microsatellite Sites; SSR: Short Sequence Repeats): Se basan en ADN de una máximo de 100 pares de bases. El número de poliformismos es muy elevado, son codominates de alta reproductividad y dan lugar a puntos fijos de mapa. El análisis también se hace por PCR, lo cual es otra ventaja. La desventaja es que son de elevado coste.
- STS: (Sequence Tagged Sites): se obtienen secuenciando ADN complementario y consiguiendo así secuencias de ADN codificante, lógicamente son secuencias únicas.

- SNP: (Single Nucleotide Polymorphisms): Consiguen detectar cambios en un solo nucleótido, aunque hay que amplificar por PCR la región de ADN a estudiar. Este análisis tiene utilidad para sondear variaciones alélicas dentro de un gen o, en general, dentro de un segmento de ADN conocido. En la cebada, los marcadores morfológicos han sido utilizados por Cross (1994) para la identificación de una colección de cebadas de primavera, y por Bahrman et al (1999), para el análisis de la diversidad de una colección de variedades antiguas francesas. Los marcadores morfológicos tienen sus límites en los estudios de diversidad, fundamentalmente por el número de caracteres disponible. Por eso, la mayoría de los estudios recientes utilizan marcadores moleculares. Estos marcadores permiten una caracterización de la diversidad más potente y precisa. Los RFLPs son los primeros marcadores moleculares que se emplearon para este fin. Diferentes autores utilizaron estos marcadores para estudios de diversidad en cebada con éxito, como Saghai-Marouf et al, (1994a) en la evaluación de cultivares de cebada de calidad maltera, o Casas et al, (1998), quienes emplearon los RFLPs para estudiar la diversidad genética de un conjunto de variedades de cebada cultivadas en España. El descubrimiento de las técnicas basadas sobre la PCR, hizo que los investigadores se dirigieran más a este tipo de marcadores, de uso más fácil. Los RAPDs y los AFLPs, son los primeros métodos basados en esta técnica. Los dos se manejan mucho en estudios de diversidad en cebada. Manninen y Nissilä (1997) usaron RAPDs para la evaluación de la diversidad de la cebada de seis carreras de primavera. Baum et al (1998) aplicaron los RAPDs en la identificación de las cebadas canadienses. Ellis et al (1997) utilizaron AFLPs para evaluar la diversidad genética de las cebadas europeas de primavera, y estimar la relación de parentesco entre ellas. También Hayes et al (1997) usaron estos marcadores para la caracterización y explotación de la diversidad genética de las cebadas americanas y el estudio de los caracteres cuantitativos presentes en ellas.

Recientemente, los investigadores recurren cada vez más a los microsatélites, por su facilidad de uso, el alto grado de polimorfismo que presentan y su fiabilidad. Morgante y Olivieri (1993) los describieron como la herramienta más eficaz para la detección de la variación genética inter e intra-específica. La eficacia de los microsatélites se ha demostrado en diferentes estudios de diversidad genética, Struss y Plieske (1998) aplicaron estos marcadores para detectar la

diversidad existente en cebadas espontáneas y cultivadas. Russell et al (1997) usaron microsatélites para evaluar la diversidad genética existente en algunas variedades europeas de cebada. Pillen et al (2000) y Maestri et al (2002) estudiaron respectivamente la variación genética en cebadas cultivadas alemanas e italianas. Matus y Hayes (2002) estudiaron la diversidad en tres grupos de germoplasma, incluyendo variedades y descendencias de cruzamientos entre líneas élite de germoplasma americano. De forma similar, Karakousis et al (2003) identificaron variedades del germoplasma australiano, y Russell et al (2003) variedades locales de Siria y Jordania, mediante microsatélites. Otros autores como Dávila et al (1999), Ivandic et al (2002) usaron estos marcadores, para estudiar la diversidad en *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* L.

En los análisis de ligamiento se usa una medida de confiabilidad alternativa, el valor LOD, el cual nos indica cuanta confiabilidad podemos tener en la suposición de que dos loci estén ligados, basándose en las frecuencias observadas de los genotipos o fenotipos. Simbólicamente la definición de LOD ( $-\log_{10}(p)$ ) se lee como:  $\text{LOD} = \log\left(\frac{\text{probabilidad de los datos, dada una frecuencia de recombinación igual a la estimada}}{\text{probabilidad de los datos, dada una frecuencia de recombinación igual a 0,5}}\right)$ .

Cuando un elevado número de marcadores están segregando en la población con la que se quiere hacer un mapa genético, el primer paso es agrupar esos marcadores en grupos de ligamiento (idealmente el número de grupos de ligamiento es igual al número de haploide de la especie). Los grupos de ligamiento se establecen considerando todas las estimas de las frecuencias de recombinación, de manera que si dos marcadores están significativamente ligados (según el valor LOD) estos pertenecerán al mismo grupo. Una búsqueda computerizada a través de todos los pares de marcadores, usando un umbral del valor LOD, producirá entonces un agrupamiento de los marcadores. Un elevado umbral del LOD puede llevarnos a más grupos de ligamiento que el número haploide de cromosomas de la especie. Cuando se construye un mapa de ligamiento con marcadores a los que no se les ha asignado previamente un grupo de ligamiento, es más sabio utilizar un umbral del LOD elevado para evitar que grupos de marcadores de diferentes cromosomas se les asigne incorrectamente a un único grupo de ligamiento.

Finalmente, una vez que tenemos establecidos los grupos de ligamiento, el siguiente paso es establecer el orden de los marcadores en cada uno de ellos y calcular las distancias genéticas entre estos. Existen muchos criterios para ordenar los marcadores dentro de un grupo de ligamiento. Así, por ejemplo, software JoinMap te da a elegir entre dos criterios diferentes: *algoritmo de mapeo por regresión* y *algoritmo de mapeo de máxima probabilidad*. El método de “mapeo por regresión” (Stam, 1993) consiste en un proceso de construcción de un mapa por adicción de los loci uno a uno, empezando por el par de loci más informativos. Para cada locus añadido, se busca la mejor posición por comparación de la bondad de ajuste del mapa calculado para cada posición probada. En el caso del “mapeo por máxima probabilidad”, éste se desarrolló debido a que, en ocasiones, cuando queremos ordenar más de 50 loci en un mismo grupo de ligamiento, la eficiencia del mapeo por regresión disminuye, puesto que la velocidad para obtenerlo, aumenta. Este nuevo método de mapeo, desarrollado por Jansen et al, 2001, usa la combinación de varias técnicas para ordenar loci y calcular sus distancias: “anillamiento simultáneo”, “muestreo de Gibbs” y “muestreo espacial”. El muestreo de

Gibbs lo usa para estimar las frecuencias de recombinación multipunto que pueden usarse para calcular las probabilidades, el anillamiento simultáneo busca el orden que tiene la máxima probabilidad y el muestreo espacial nos evita el quedarnos atrapados en un óptimo parcial llevándonos a la solución global óptima para los errores cometidos en el genotipado y los datos perdidos.

La distancia genética entre dos marcadores en un mapa se define como el número medio de eventos de recombinación que ocurren entre estos en la meiosis. La unidad de distancia en los mapas genéticos es el centimorgan (cM), donde 1cM corresponde a un uno por ciento de frecuencia de recombinación. Hemos de tener en cuenta que la relación entre distancia de mapa y frecuencia de recombinación no es lineal, de manera que para calcular estas distancias hay que utilizar las funciones genéticas de mapeo las cuales describen la relación matemática entre la frecuencia de recombinación y la distancia de mapa. Existen dos funciones matemáticas de este tipo: la función de Haldane y la función de Kosabi. La función de Haldane se expresa matemáticamente de la siguiente manera:

$$r = 1/2 (1 - e^{-2x})$$

donde  $r$  es la frecuencia de recombinación y  $x$  la distancia de mapa entre dos marcadores. En cambio, la función de Kosabi, matemáticamente se expresa como:

$$r = 1/2 \tanh (2x)$$

General mente, la función de Kosabi nos lleva a distancias más pequeñas que la función de Haldane dada una misma frecuencia de recombinación.

Por tanto, la elaboración de un mapa genético conlleva las siguientes etapas:

1. Obtención de una población de líneas puras polimórfica para un elevado número de caracteres/marcadores moleculares, con un tamaño adecuado.
2. Elección de unos buenos marcadores genéticos polimórficos en la población a mapear.
3. Cálculo de la frecuencia de recombinación entre cada pareja de marcadores para la determinación de los distintos grupos de ligamiento.
4. Ordenar los marcadores utilizados en el grupo de ligamiento asignado y calcular las distancias genéticas entre ellos.

El desarrollo de los mapas genéticos con marcadores de ADN se inició en la década de los ochenta y en la actualidad son de enorme utilidad en la mejora genética vegetal.

La disponibilidad de mapas genéticos es determinante y su uso potencial en los programas de mejora los convierte en una importante herramienta en la mejora genética.

### 3.3 Mapeo de caracteres cuantitativos (QTL, Quantitative Trait Loci)

El mapeo de caracteres cuantitativos a través de la identificación de loci de QTL se considera una herramienta importante dentro de la mejora genética de plantas. Los QTL se detectan dentro del genoma de una planta basándose en la asociación entre los marcadores moleculares polimórficos y el fenotipo de los individuos de una población.

Existen varios procedimientos para detectar QTL. El más sencillo de todos es el “análisis de marcador sencillo” o “Single-Marker Analysis” el cual se basa en la idea de que, si existe una asociación entre un marcador genotípico y un valor fenotípico, es posible que un QTL esté ligado a ese locus. En principio, actualmente este método se utiliza para realizar un rápido escaneo del genoma completo para encontrar los mejores posibles QTL e identificar los datos perdidos que pudieran afectar posteriormente al análisis cuando se proceda a utilizar métodos más minuciosos y precisos como indicadores de QTL. Los métodos más utilizados comúnmente son el “mapeo por intervalo” o “Interval Mapping” (IM) y “mapeo por intervalo compuesto” o “Composite Interval Mapping” (CIM), aunque existen otros tales como el “mapeo por múltiples intervalos” o “Multiple Interval Mapping” (MIM), el cual utiliza múltiples intervalos de marcadores simultáneamente para ajustar para ajustar múltiples supuestos QTL directamente en el modelo, de manera que es un método apropiado para estimar los efectos e interacciones de los QTL significativos y su contribución a la varianza genética; o el método “mapeo por intervalos Bayesianos” o “Bayesian Interval Mapping”, el cual proporciona un buen complemento de los análisis clásicos de QTL.

El método “Interval Mapping” (IM) desarrollado por Launder y Botstein (1989) es una extensión de “Single-Marker Analysis”. En este último sólo se usa un marcador para el mapeo de QTL, de manera que los efectos de este son sub-estimables y su posición no se puede determinar, mientras que el método IM utiliza dos marcadores flanqueantes para construir un intervalo en el cual buscar un QTL. En IM se calcula un mapa o perfil de probabilidad de QTL, por ejemplo, para cada posición en el genoma (cada centimorgan) se determina la probabilidad de la presencia de un QTL segregante (la probabilidad bajo la hipótesis alternativa,  $H_1$ ), al mismo tiempo que se calculan los efectos genotípicos del QTL y la varianza residual. Esta probabilidad bajo la hipótesis alternativa es contrastada con la probabilidad de que un locus con un efecto genético nulo esté segregando, como por ejemplo cuando no hay ningún QTL segregando (esta sería la probabilidad bajo la hipótesis nula,  $H_0$ ). Esta comparación se realiza con el ratio estadístico LOD el cual es el logaritmo en base diez del cociente de estas dos respectivas probabilidades. Cuando el LOD excede un umbral determinado, se determina que un QTL segregante significativo ha sido detectado. Para obtener un intervalo del 95% de confianza alrededor de ese punto se utiliza el “two-LOD support interval” que consiste en restar 2 al valor del LOD máximo a ambos lados de este.

El otro método comúnmente empleado para la detección de QTL, el “Composite Interval Mapping” (CIM), añade los “marcadores de fondo” al IM, de forma que este método ajusta los parámetros para un QTL diana en un intervalo, mientras que simultáneamente ajusta los coeficientes para los “marcadores de fondo” para tener en cuenta la varianza causada por los QTL no diana. Por tanto, CIM nos da más

poder de resolución y precisión que IM, ya que los efectos de otros QTL no están presentes en la varianza residual.

El programa informático más extendido para la detección de QTL es el WinQTLcartographer, debido a que además de ser gratuito, puedes elegir cualquiera de los métodos mencionados anteriormente y te realiza los análisis con una gran rapidez. Actualmente está tomando fuerza el paquete estadístico GenStat, por su gran versatilidad tanto para la realización de distintos análisis estadísticos e incluso mapas genéticos, como la posibilidad de cartografiar QTL tanto en poblaciones monoparentales como en grandes pools genéticos mediante “mapeo por asociación” o “Association Mapping”, tan utilizados actualmente en estudios de diversidad genética gracias a la gran cantidad de marcadores genéticos puestos a punto, tales como los DArT (Wenzl et al, 2004) o la BOPA 1 y 2 basados en micro-arrays, lo que hace que sean razonablemente económicos en grandes poblaciones y han permitido una gran saturación de los mapas genéticos de cebada, obteniéndose mapas consenso de gran resolución.

### 3.4 Desarrollo y fisiología: Cómo afectan al rendimiento final del cultivo.

El desarrollo se define como una secuencia de acontecimientos fenológicos controlados por factores genéticos modulados por factores ambientales. Cada acontecimiento es marcado por cambios en la morfología y en las funciones de alguno de los órganos (Slafer y Rawson, 1994). Los mecanismos fisiológicos están fuertemente influenciados por el ambiente, por tanto, el conocimiento del desarrollo fenológico de un cultivo es esencial para multitud de aplicaciones agronómicas, ya que la fenología, la influencia del ambiente en el desarrollo, es el factor más importante en la adaptación genotípica (Roberts et al, 1988).

Durante el desarrollo de cualquier planta superior podemos distinguir dos fases: la fase de desarrollo vegetativo y la fase reproductora. La fase vegetativa en cebada es aquella que va desde la germinación de la semilla hasta que se produce el encañado de la planta, o momento en el cual la planta deja su crecimiento en roseta y alarga los entrenudos para formar las cañas de los tallos.. La fase reproductora comienza en este momento. En esta fase podemos distinguir tres sub-fases distintas: fase de elongación de los tallos hasta estado de hoja bandera (o última hoja producida en el tallo), fase de espigado hasta la aparición de las barbas del 50% de los tallos y fase de llenado de grano hasta la maduración de la espiga y secado. Todas estas fases están determinadas genéticamente pero fuertemente influenciadas por el ambiente.

Los factores más importantes que afectan al desarrollo de la cebada son la respuesta al fotoperiodo, la vernalización, temperatura y precocidad intrínseca.

#### 3.4.1 Respuesta a vernalización y fotoperiodo

La vernalización, el requerimiento de un periodo de baja temperatura para inducir la transición del estado vegetativo al estado reproductivo, es un importante carácter de la tribu Triticeae, tanto económicamente hablando como evolutivo.

El término “variedad de invierno” se usa comúnmente para describir los cereales sembrados en otoño los cuales generalmente necesitan vernalización. El fenotipo sensible a vernalización se encuentra a menudo en conjunción con la sensibilidad al fotoperiodo, retrasándose la floración en condiciones de día corto. La sensibilidad a la vernalización y fotoperiodo pueden contribuir a la tolerancia a bajas temperaturas por mantener la planta en su estado vegetativo.

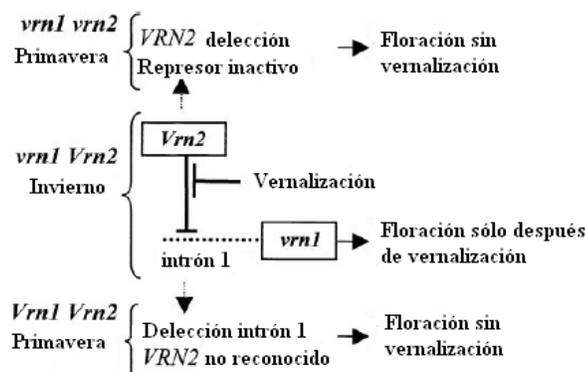
La vernalización y la respuesta a fotoperiodo no son fenómenos independientes. De esta manera, la exposición a fotoperiodos de corta duración en las primeras etapas de crecimiento, en algunos genotipos que presisan vernalización , puede tener un efecto similar a la exposición a bajas temperaturas. Evans (1987) propuso el nombre de “vernalización de día corto” para este fenómeno. Tanto los fenómenos de vernalización por bajas temperaturas como la vernalización de día corto, parece

que tiene un efecto en la reducción de la fase pre-inductiva (aquella que sigue a la nascencia, en la que la planta es insensible al incremento del fotoperiodo) y en la reducción del número de hojas del tallo principal (Roberts et al., 1988). También se ha constatado que, en muchos casos, la inducción de la floración que provoca el incremento de fotoperiodo está condicionado por la etapa de bajas temperaturas inmediatamente anterior (Bernier et al, 1981).

El control de la floración por fotoperiodo está muy estudiado en *Arabidopsis* (dicotiledóneas) en condiciones de día largo y en arroz (monocotiledónea) en condiciones de día corto. En *Arabidopsis* la expresión de *GIGANTEA* (*GI*) y *CONSTANS* (*CO*) está regulado por un reloj circadiano que coincide con un pico de expresión de *CO* en horas de luz que sólo ocurre en condiciones de día largo. La proteína *CO* es un factor de transcripción que reduce la expresión de ciertos genes, incluyendo *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), el cual es una llave reguladora de la floración. La cebada es una planta de día largo, como *Arabidopsis*, pero está filogenéticamente más cerca del arroz. Se han identificado varios genes homólogos de la ruta de fotoperiodo en cebada, tales como *HvCO1* a *HvCO9* (Griffiths et al, 2003), *HvGI* (Dunford et al, 2005) y *HvFT1* a *HvFT5* (Faure et al, 2007).

En cebada, la variación en el requerimiento de vernalización está determinada por tres genes *VRN-H1* (5H), *VRN-H2* (4H) y *VRN-H3* (7H). El gen *VRN-H1* codifica para los factores de transcripción tipo MADS-box *APETALA1* y *FRUITFULL-like* necesarios para el inicio del desarrollo reproductivo en el ápice de la planta (Trevaskis et al, 2003; Yan et al, 2003). El gen *VRN-H2* es un represor dominante de la floración y codifica para una proteína con un motivo en dedos de zinc y un dominio CCT (como *CO*, *CO-like* y *TOC1*) (Yan et al, 2004). El gen *VRN-H3* (*HvFT1*) es homólogo del gen *FT* de *Arabidopsis* (Yan et al, 2006; Faure et al, 2007). Este gen exhibe un elevado nivel de expresión cuando su alelo dominante está presente, lo que se traduce en un aceleramiento de la floración y una alternativa al requerimiento de vernalización (Yan et al, 2006).

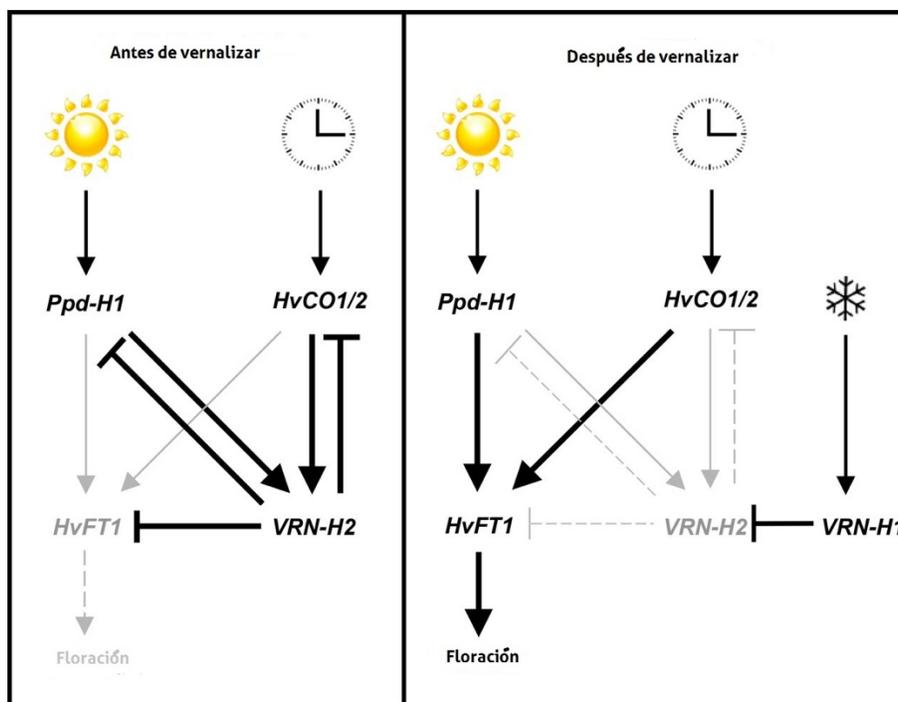
*VRN-H1* se expresa en bajos niveles hasta que su expresión aumenta bajo vernalización, con unos niveles de expresión correlativos con la longitud del tratamiento de frío (Yan et al, 2003; Trevaskis et al, 2006). La vernalización promueve al paso de cromatina inactiva a cromatina activa en *VRN-H1* (Oliver et al, 2009). La expresión de *VRN-H1* es independiente de la longitud del día y permanece elevada después de la vernalización (Sasani et al, 2009). *VRN-H1* regula negativamente a *VRN-H2*, y permite la inducción de *VRN-H3* (*HvFT1*) en día largo para acelerar consecuentemente la floración (Trevaskis et al, 2006; Hemming et al, 2008; Sasani et al, 2009). Mutaciones en el promotor o deleciones en el primer intrón de *VRN-H1* están asociadas con altos niveles en la expresión de éste y un reducido requerimiento de vernalización (Yan et al, 2003; Fu et al, 2005). La variación alélica en *VRN-H1* y *VRN-H3* puede también influir en el requerimiento de vernalización. Las mutaciones de pérdida de función en *VRN-H2* permiten la expresión de *VRN-H1* sin previa vernalización, causando una rápida floración bajo condiciones de día largo. Sin embargo, esto requiere un gen activo *PPD-H1* (2H).



**Figura 1.** Esquema modificado de Yan et al, 2003 que muestra las interacciones entre los genes VRN-H1 y VRN-H2, así como el genotipo de variedades invernales y primaverales.

*Ppd-H1* es el mayor determinante de la respuesta al fotoperiodo en cebada. Este actúa como un regulador de la ruta de una clase de genes involucrados en las funciones del reloj circadiano, los genes CO-like (*HvCO1* y *HvCO2*) (Turner et al, 2005). El alelo de floración tardía *ppd-H1* es recesivo. Esta mutación de *PPD-H1* imposibilita su función, traduciéndose en una reducida respuesta al fotoperiodo debida a la alteración de la ruta de los genes *CONSTANS* y, por tanto, una reducción de la expresión de su gen diana *FLOWERING LOCUS (FT)*, lo cual produce un retraso de la floración (Turner et al, 2005).

Así mismo, las últimas investigaciones de los genes *CONSTANS* de cebada (*HvCO1* y *HvCO2*) nos muestran que la inducción del represor *VRN-H2* y el activador *VRN-H3 (HvFT1)* están regulados tanto por el gen *Ppd-H1* como por los genes *HvCO1* y *HvCO2* (Mulki y Korff 2016). Según este estudio, *VRN-H2* reprimen los niveles de expresión de *PPD-H1* y de *HvCO2*. *PPD-H1* y *HvCO1/CO2* corregulan *HvFT1* (Turner et al, 2005) pero también *VRN-H2*, lo que revela una doble función de estos como activadores/represores de la floración dependiendo de la presencia de *VRN-H2*. Por tanto, en condiciones de fotoperiodo de día largo la floración se encuentra reprimida antes de vernalizar a través de la función de *PPD-H1, HvCO* y *VRN-H2* pero esta se activa después de vernalizar cuando la expresión de *VRN-H2* es inhibida. Estas interacciones genéticas con *VRN-H2* se deben tener en cuenta en los programas de mejora genética de cebada, ya que, la manipulación de los genes implicados en la ruta de respuesta al fotoperiodo puede también afectar a la respuesta de vernalización.



**Figura 2.** Esquema de Mulki y Korff 2016 que muestra las supuestas interacciones entre los genes *VRN-H2*, *PPD-H1* y *HvCO1/CO2* antes y después del fenómeno de vernalización.

A todo esto, hay que añadir la existencia de otro gen de respuesta al fotoperiodo: el gen *PPD-H2*, cuyo candidato es *HvFT3*, situado en el cromosoma 1H (Faure et al, 2007; Kikuchi et al., 2009). Este gen causa diferencias en la fecha de floración bajo condiciones de fotoperiodo corto (Laurie et al, 1995; Boyd et al, 2003). Se han descrito dos alelos: un alelo funcional dominante (*Ppd-H2*), que está frecuentemente presente en variedades primaverales que no necesitan vernalizar, y un alelo no funcional recesivo (*ppd-H2*), que está mayoritariamente presente en variedades típicamente invernales que necesitan vernalizar para florecer (Faure et al, 2007). Parece ser que *VRN-H2* también actúa como represor de *HvFT3* además de reprimir *HvFT1*. Por este motivo el patrón de expresión de *HvFT3* con respecto a la longitud del día podría estar determinado por la expresión de *VRN-H2*. En las variedades de cebada donde *VRN-H2* está deletado, *HvFT3* se expresa bajo condiciones de día largo. Sin embargo, este se expresa en niveles más bajos bajo día largo que bajo día corto (Casao et al, 2011a).

Debido a la gran complejidad de todo lo dicho anteriormente, se han podido seleccionar variedades de cebada con una mayor especialización a la adaptación al fotoperiodo, lo que ha sido crucial a la hora de conseguir potenciar la productividad el cultivo según las condiciones climáticas y de fotoperiodo de cada región.

Resumiendo, en términos agronómicos, las variedades cultivadas típicamente de invierno, son aquellas que necesitan vernalizar, de forma que en su genotipo portan los genes *VRN-H* sin ningún evento de mutación ni deleción, es decir, presentan el genotipo *vrn-H1 Vrn-H2 Vrn-H3* mientras que la mayoría de las variedades de primavera están modificadas para que no requieran del fenómeno de

vernalización, presentando una delección en el intrón 1 del gen *VRN-H1* (figura 1). No hay unanimidad en la literatura sobre la denominación de variedades alternativas. Von Zitzewitz et al (2005), denominan alternativas a las variedades que tienen el alelo *vrn-H1* inalterado, pero tienen el alelo inactivo *vrn-H2* y, por tanto, no requieren vernalización para florecer. Otros autores asignan el tipo alternativo a las variedades que no requieren vernalización, pero por su gran respuesta al fotoperiodo están indicadas para siembras de otoño (Mahfoozi et al, 2001).

#### Interacciones vernalización/fotoperiodo

Una exposición moderada a bajas temperaturas tiene además el efecto de incrementar la resistencia al frío, necesaria en aquellas zonas donde se producen temperaturas por debajo de 0°C. La máxima tolerancia a las bajas temperaturas se consigue en la fase vegetativa del desarrollo (Fowler et al., 2001). Los genotipos de invierno son más resistentes al frío; sin embargo, este proceso de inducción de la resistencia se produce de la misma manera en los genotipos de primavera. Se ha comprobado, en un gran número de genotipos de invierno de cebada, que los fenotipos de respuesta al fotoperiodo, a la vernalización y a la resistencia a las bajas temperaturas se encuentran en todas las combinaciones posibles (Karsai et al., 2001). El hecho de que estos tres fenómenos estén interrelacionados es más probable que sea atribuible a efectos de ligamiento que a la pleiotropía (Francia et al., 2004). La identificación de los genes CBF en la proximidad de *VRNH1* apoya esta observación (Skinner et al., 2006).

#### 3.4.2 La temperatura

Se ha demostrado que la fecha de espigado de la cebada se ve adelantada según una relación lineal con el aumento de la temperatura, hasta un valor óptimo por encima del cual no se produce un adelanto mayor, o incluso se retrasa (Roberts et al., 1988). Esta relación se cumple en todos los genotipos y todas las fases de desarrollo de la cebada, variando esta sensibilidad a la temperatura en función del genotipo.

Tradicionalmente, se ha empleado el concepto de integral térmica (grados-día acumulados), basado en la observación de que, en muchas circunstancias se cumple esta relación lineal:  $1/f = a + bT$ , donde  $f$  es el tiempo entre siembra y floración (días), y  $1/f$  es la tasa de desarrollo.  $T$  es la temperatura media diurna (°C),  $a$  es la temperatura base por debajo de la cual no se produce avance en el desarrollo y  $1/b$  es la integral térmica, siendo estos dos valores,  $a$  y  $b$ , constantes específicas de cada genotipo. Solamente si se cumple esta ecuación se puede afirmar que la floración ocurre cuando la integral térmica necesaria, diferente para cada genotipo, para un determinado fotoperiodo y bajo unas determinadas condiciones de vernalización. La temperatura, además de influir en la tasa de desarrollo y, por tanto, en la duración de las diferentes fases, también afecta a la tasa de iniciación de hojas y espiguillas y al filocrono o tasa de aparición de las hojas (Klepper et al., 1982).

Sin embargo, cuando se producen cambios en la duración del fotoperiodo, como ocurre en condiciones de campo, la tasa de desarrollo varía en función de la fenología, con lo que el concepto de

integral térmica no es totalmente aplicable (Roberts et al., 1988). Para solventar esta dificultad, Ellis et al. (1988) introdujeron el concepto de integral fototérmica:  $1/f=a+bT+cP$ ; donde P es el fotoperiodo en horas/día, T es la temperatura media diurna (°C) y a, b y c son constantes específicas de cada genotipo. Los límites de esta relación se encuentran entre la temperatura base mínima y una óptima, y entre unos valores de fotoperiodo mínimos (que impiden la floración) y máximos, cuya superación no supone un cambio en la respuesta.

### 3.4.3 Precocidad intrínseca

Existen otros factores que pueden afectar al desarrollo de la planta. En este trabajo nos centramos principalmente en loci que han sido descritos previamente como locus de precocidad intrínseca, que afectan a la fecha de floración con las consecuencias que puede acarrear esto en las diferentes variedades de cebada cultivada, y los loci de semenanismo, que además de afectar a la altura de la planta, afectan a otros factores como veremos posteriormente.

Existen variedades de cebada cuya floración, independientemente de sus requerimientos de vernalización, son ligeramente más precoces de lo esperado. Esto en muchos estudios se ha atribuido a los locus de precocidad intrínseca, como *Eam6* o *Eam7*. De esta manera los alelos en el locus *Eam6*, situado en el cromosoma 2H, alteran el tiempo para el inicio de la floración cuando la planta crece en condiciones de fotoperiodo largo. En siembras de otoño, bajo las condiciones de la zona norte española el locus *Eam6* ha sido identificado como el mayor determinante de la fecha de floración en la población Beka x Logan (Moralejo et al, 2004; Cuesta-Marcos et al, 2008) así como en otros materiales procedentes de Australia bajo condiciones mediterráneas (Boyd et al, 2003). Se ha comprobado que *HvCEN*, homólogo a *Antirrhinum CENTRORADIALIS* (Comadrán et al, 2012), es el gen candidato de *Eam6*. Por su parte *Eam7*, localizado en la región centromérica del cromosoma 6H, confiere precocidad bajo condiciones de fotoperiodo corto.

Los genes de semenanismo han sido ampliamente estudiados en programas de mejora genética de cebada para reducir la altura de la planta y mejorar su resistencia al encamado. Existen distintos tipos de estatura en cebada, incluyendo las producidas por los alelos *brachytic*, *erectoid*, *ari*, *uzu1.a* y *sdw1* (Sears et al, 1981). Las variedades *uz1.au* están confinadas en China, Japón y Corea, donde cerca del 80% de las variedades llevan el alelo *uzu* de enanismo. Los mutantes de cebada *sdw* se han usado para desarrollar varios cultivares de baja estatura destinados a alimentación animal en el oeste de Estados Unidos, Canadá y Australia. El alelo *denso* cuenta con una amplia aceptación en variedades de cebada con calidad maltera en Europa, el cual se ha demostrado que es alélico al *sdw* y consecuentemente ambos han sido situados en el mismo locus del cromosoma 3H. Los alelos de *sdw* y *denso* derivan de recursos diferentes. El alelo *sdw* viene de la variedad noruega Jotun y *denso* de la variedad checa Diamant.

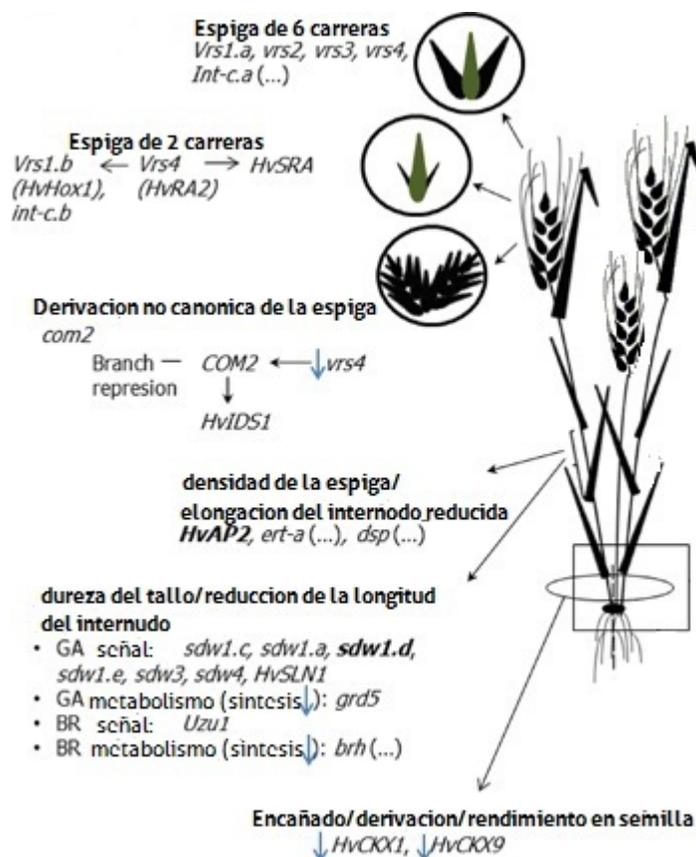
Ambos tienen similares características agronómicas como retraso de la floración, bajo peso del grano y un crecimiento juvenil semipostrado. Sin embargo, algunas variedades que portan dichos alelos

presentan mejor tamaño de grano. Estudios han demostrado que el gen *denso* corresponde a una GA-20 oxidasa, enzima que cataliza un paso en la ruta de síntesis de las giberelinas, no descrita con anterioridad (Jia et al, 2009). Hasta el momento estaban descritos dos genes que codifican para GA-20 oxidasa: *Hv20ox1* y *Hv20ox3*, y según estos estudios *denso* corresponde a *Hv20ox2*, ya que presenta una gran homología con *Os20ox2* de arroz (el conocido gen de semienanismo *sd1*, tan utilizado en arroz para evitar el encamado de este). Otro mutante semienano que ha tenido interés comercial es el conocido como *ari-e* (apócope de *breviaristatum*), que se encontró en la variedad inglesa Golden Promise.

En este sentido, se ha demostrado ampliamente que este tipo de mutaciones que provocan semienanismo, y que han sido seleccionados desde la conocida Revolución Verde que comenzó sobre los años cuarenta por los grandes cambios que provocan en la arquitectura de la planta provocando grandes beneficios agronómicos, corresponden a genes y mutaciones que afectan a la señalización y metabolismo de las giberelinas, lo que lleva consigo cambios pleiotropicos que son beneficiosos para la producción del cultivo (Börner et al, 1993; Chandler y Harding 2013; Franckowiak y Lundqvist 2012; Peng et al, 1999; Saville et al, 2012).

#### 3.4.4 Otros factores

Existe otra serie de factores, de menor efecto en comparación con los descritos, que afectan también a la fecha de espigado. Entre ellos se pueden citar el estrés hídrico del suelo (Aspinall, 1961), los niveles de nutrientes (Halse & Weir, 1970), la capacidad fotosintética y la disponibilidad de asimilados (Dale & Wilson, 1979), y la radiación global (Thompson & Mathews, 1981).



**Figura 3.** Esquema modificado de Nadolska-Orczyz et al, 2017. En él se muestran los principales genes que determinan la arquitectura de la planta en cebada. Las flechas verticales indican la regulación enzimática/expresión de gen positiva o negativa; las flechas horizontales indican la dirección de la co-regulación de los genes; negrita, el principal alelo; puntos suspensivos, múltiples alelos.

Sin embargo, existe un factor que sí es determinante en el propio rendimiento en grano, pero no en la modificación de la fecha de espigado, que es la arquitectura de la espiga: que esta sea de dos o de seis carreras. Esto divide al cultivo en dos grandes grupos.

Los principales genes implicados en el desarrollo de la espiga son aquellos que regulan la fertilidad de las espiguillas laterales: *SIX-ROWED SPIKE 1 (VRS1)* (Komatsuda et al, 2007; Lundqvist 1997; Lundqvist & Lundqvist 1988) e *INTERMEDIUM-C (INT-C)* (Lundqvist & Lundqvist 1988; Ramsay et al, 2011), los cuales fueron encontrados como mutaciones naturales y el origen de ambas formas (dos y seis carreras) data del periodo de domesticación de la cebada (Ramsay et al, 2011).

El alelo *vrs1* proviene de la pérdida de función del genotipo salvaje de dos carreras, lo que genera el fenotipo de seis carreras. El alelo salvaje *Vrs1* codifica para un represor transcripcional (HD-Zip I) que inhibe la proteína que controla la división celular y desarrollo específico de las espiguillas laterales (Komatsuda et al, 2007). Los efectos pleiotrópicos del alelo *vrs1* afectan a múltiples caracteres que repercuten en distintos parámetros del rendimiento tales como la reducción del número de tallos por planta y por tanto el número de espigas por pie de planta, pero esto se ve compensado por el aumento de número de granos por espiga.

A su vez, los fenotipos originados por el alelo *Vrs1* pueden ser distintos en función de los alelos del locus *INT-C* (Ramsay et al, 2011). De esta manera los alelos de este causan variaciones en la fertilidad masculina provocando el desarrollo alterado de los granos laterales de espigas con genotipo *Vrs1* de dos carreras, pasando a ser de fenotipo intermedio. Junto a estos dos locus existe otro que al igual que *INT-C*, bajo el alelo *Vrs1* sus distintos alelos pueden causar fertilidad de las espiguillas laterales. Este es *SIX-ROWED SPIKE 4 (VRS4)* (Koppolu et al, 2013).

### 3.5 Requerimientos agronómicos del cultivo

La cebada tiene una gran capacidad para adaptarse a diferentes estreses abióticos y bióticos: Entre los abióticos es obligado referirse en primer lugar a su resistencia a la sequía, conseguida por adaptación a zonas marginales de bajos insumos en los entornos de los Centros de Dispersión de la especie, especialmente en la poco lluviosa Media Luna Fértil. La resistencia a las bajas temperaturas obtenida por adaptación a las siembras en latitudes altas de inviernos duros y secos. Resistencia a la acidez en suelos con concentraciones altas de cationes  $Al^{+}$ , aunque no tanto para el  $Mn^{-}$  al que la cebada es relativamente sensible (Fageria et al, 2011). Tolerancia relativa a los suelos salinos sódicos (Nevo y Chen, 2010), tanto de las especies silvestres como cultivadas.

En cuanto a los factores bióticos que suponen una amenaza para la cosecha de la cebada, debemos referirnos a las plagas y enfermedades, sobre las cuales el largo proceso de domesticación de la especie ha ido creando resistencias, a la vez que el cultivador ha tratado de evadir esos problemas protegiendo la cosecha con estrategias agronómicas como la rotación de cultivos, y atendíendose modernamente desde la introducción de resistencias específicas a través de la mejora genética (Newton et al, 2011).

Aunque una gran parte del material vegetal de cebada utilizado por el hombre a lo largo de la historia del cultivo ha ido desapareciendo, sobre todo en los países desarrollados, la versatilidad de la cebada ha quedado resguardada en los Bancos de Germoplasma de todo el mundo, en los que FAO se estima que existen más de 290.000 accesiones que se pueden clasificar como: un 15% de parientes silvestres, un 44% de variedades locales, un 28% de poblaciones de mejora genética y un 15% de cultivares. (Estrategia Mundial para la Conservación ex situ y el Uso de Germoplasma de Cebada, 2008).

# Justificación y objetivos

---

El presente estudio trata de esclarecer qué regiones del genoma/genes están implicados tanto en la floración, como en rendimiento y parámetros de este en una población de líneas de cebada cuyos parentales han sido utilizados durante años en el Plan Nacional de Mejora Genética de Cebada. Por este motivo, muchos de los genes seleccionados a partir de líneas obtenidas a través de alguno de los dos parentales utilizados en el presente estudio, estarán presentes en variedades comerciales obtenidas en el Programa Nacional de Mejora Genética de Cebada.

Para ello se han fijado los siguientes objetivos:

- Realizar un mapa genético de la población BC1F5 del retrocruzamiento las variedades comerciales (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa utilizando distintos tipos de marcadores moleculares.
- Buscar las principales regiones del genoma implicadas en la inducción de floración y el ahijamiento bajo distintas condiciones de fotoperiodo y vernalización mediante la detección de caracteres cuantitativos (QTL), buscando su interacción con el alelo *denso* en esta población en la cual el parental no recurrente es portador de este.
- Buscar los principales QTL asociados a parámetros agronómicos en la población de estudio, así como la asociación de estos parámetros al alelo *denso* y la repercusión del gen *PPD-H2* en los mismos.
- Detectar mediante métodos estadísticos las posibles interacciones entre QTL (QTLxQTL) tanto los implicados en floración, como las posibles interacciones QTLxQTL que se dan entre los distintos parámetros agronómicos estudiados que afectan al rendimiento del cultivo.

## Capítulo segundo:

Realización de un mapa genético en una población BC1F5 de cebada

# Realización de un mapa genético en una población BC1F5 de cebada

---

## 1. Introducción: El uso de mapas genéticos en mejora genética de cebada

El uso de mapas genéticos en cebada está ampliamente extendido. Los primeros mapas genéticos se remontan a los años ochenta y empezaron como herramienta de ayuda en los programas de mejora genética de cebada. De esta manera, conociéndose la diversidad en distintas poblaciones de caracteres morfológicos, resistencia a enfermedades y de diferencias en fecha de espigado, derivadas de parentales de variedades comerciales ampliamente extendidas en la agricultura de esas fechas, se quiso dilucidar en qué posición del genoma se encontraban para así empezar a hacer análisis estadísticos de caracteres cuantitativos relacionados con caracteres agronómicos.

El fin de éstos siempre ha sido hacer una selección asistida en los programas de mejora genética para obtener variedades más productivas, resistentes a enfermedades y con mayor capacidad de adaptación al medio. Por tanto, al mismo tiempo, se iba descubriendo qué genes estaban implicados en el control de estos caracteres, y que posición tenían en el genoma, a pesar del gran tamaño de éste. Con la gran dificultad de que para este tipo de estudios se tenían que usar materiales genéticos muy alejados unos de otros, y, por tanto, muchas veces muy alejados de los materiales realmente utilizados en los propios planes de mejora genética para la obtención de nuevas variedades que puedan ser comercializadas. Como ocurre con la gran cantidad de trabajos derivados de poblaciones cuyo parental es Morex, variedad primaveral americana de seis carreras de alta calidad maltera, pero con una baja adaptación a climas mediterráneos, o la población Oregon Wolfe Barley (OWB), derivada de parentales dihaploides uno de ellos con caracteres recesivos y el otro con caracteres dominantes, útil solamente para comprensión de mecanismos genéticos, pero no con aplicación práctica.

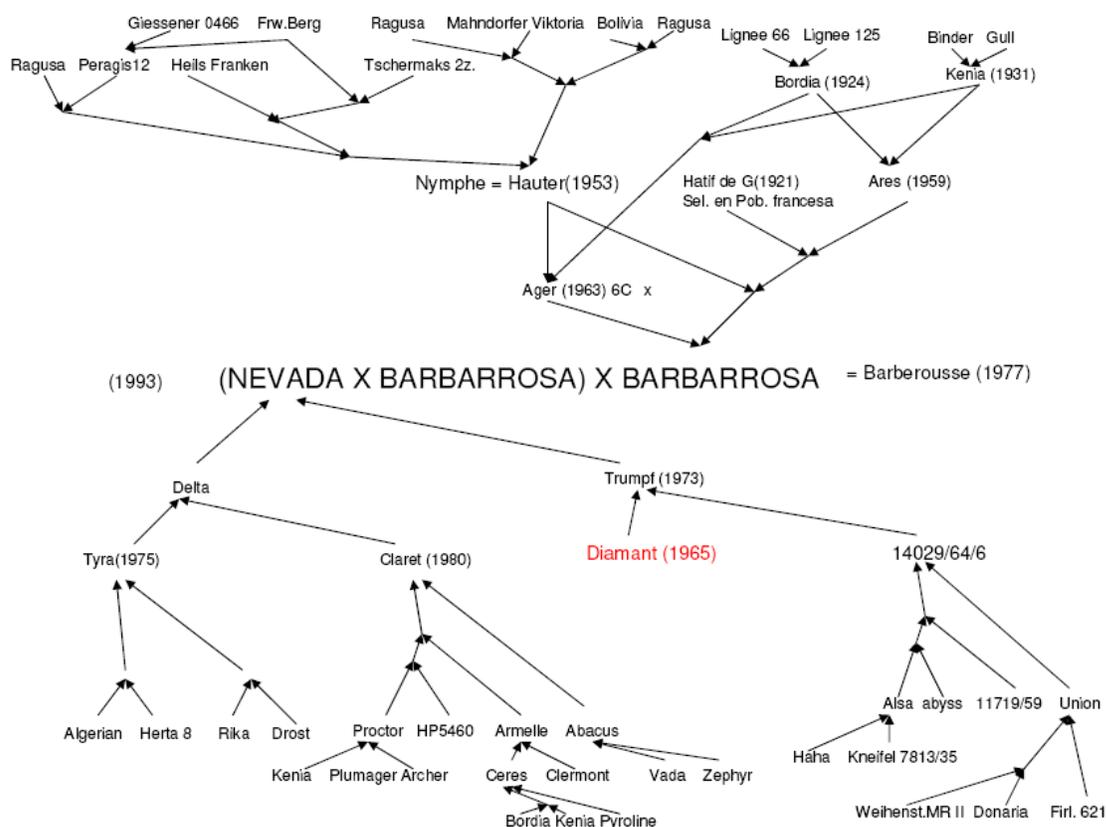
De este modo, los primeros mapas consistían en la ordenación de caracteres morfológicos en poblaciones derivadas de poblaciones segregantes para dichos marcadores. Con el descubrimiento en los años ochenta de los marcadores moleculares, se empezaron a desarrollar mapas más saturados y con una mayor resolución para la búsqueda de caracteres cuantitativos (QTL) principalmente de rendimiento, basándose en mapas primero de RFLPs, AFLPs, SSR y posteriormente con SNPs y marcadores basados en microarrays como los DArTs, OPA1 y 2 y los RAD.

Poco a poco esto llevó a la obtención de diversos mapas consenso derivados de varias poblaciones tales como el mapa de residuales (bin map) de Marcel y colaboradores de 2007 o el mapa consenso de DArTs (Wenzl et al, 2004). Estos poco a poco iban teniendo una mayor saturación de marcadores y por tanto una mayor resolución relativa de la posición, tanto de los caracteres cuantitativos, como de genes clonados, de los cuales se habían desarrollado marcadores moleculares para la determinación de su posición en estos mapas.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Desarrollo de la población de trabajo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una población F5 derivada de un retrocruzamiento el cual se llevó a cabo entre las variedades comerciales Nevada, variedad de primavera de dos carreras que contiene el alelo *denso* de semienanismo y grano de alta calidad maltera, y Barbarrosa, variedad de invierno de seis carreras con una altura media y baja calidad (ver figura 4 para ver la genealogía de ambas).



**Figura 4.** Genealogía de los parentales de la población de estudio, donde se muestra la procedencia del alelo *denso* en el parental Nevada de la variedad Diamant (mostrada en rojo), así como los distintos cruzamientos que dieron origen a las dos variedades comerciales: Nevada y Barbarrosa.

Este material procede del plan de mejora genética de cebada que lleva a cabo el Instituto Tecnológico Agrario junto a la Estación Experimental Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Zaragoza (EEAD-CSIC), el Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentaries de Lérida (IRTA) y el Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP). Por tanto, en este caso los posteriores estudios de detección de caracteres cuantitativos de carácter agronómico, tienen un uso

directo en este plan de mejora genética, ya que otros estudios para detección de QTL como la Oregon Wolfe Barley (Cistué et al, 2011) o Steptoe x Morex (Hayes et al, 1993; Kikuchi et al, 2009) utilizan materiales exóticos sin aplicación directa en planes de mejora, por lo que es más difícil extrapolar los resultados a este tipo de planes, y por tanto, que este tipo de resultados de caracteres cuantitativos tengan una utilización práctica para la obtención de nuevas variedades más productivas.

El cruzamiento entre estas dos variedades se llevó a cabo en la campaña de 1997 en los invernaderos de dicho centro de manera que en esa campaña se recogieron semillas F1, las cuales se utilizaron en la campaña siguiente para retrocruzarla con la variedad Barbarrosa, de manera que en la campaña de 1999 se sembró la descendencia de este retrocruzamiento (BC1F1). Sólo se recogieron las plantas de seis carreras, que al ser el carácter recesivo, quedó fijado en la población, por lo que en las generaciones siguientes todas las líneas fueron de seis carreras. En el año 2002 se observó que en esta población existía una fuerte segregación transgresiva en altura de planta, con individuos más bajos que el parental Nevada que porta *denso* y más altos que Barbarrosa que, sin eventos de mutación conocidos, fue seleccionado para talla baja y resistencia a encamado. Para poder estudiar esta interacción, se retomaron de nuevo las semillas BC1F2, recogidas en la BC1F1, (todas ellas de seis carreras) para desarrollar la población que posteriormente se ha usado en este estudio. Además, a lo largo de las distintas campañas y ensayos se vio también una importante segregación en diferentes parámetros de rendimiento, de manera que, aparte de seguir en el programa de mejora genética donde fue obtenida, se seleccionó para diferentes estudios tales como el que ocupa este trabajo.

	GENOTIPO				
	VRN-H1	VRN-H2	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	Hv200x
Barbarrosa	Vrn-H1	Vrn-H2	Ppd-H1	ppd-H2	Sin denso
Nevada	delección	delección	ppd-H1	Ppd-H2	<i>denso</i>

**Tabla 2.** Genotipo de los parentales respecto a los genes de vernalización, fotoperiodo y *Hv200x*. Se muestran los alelos que presentan Nevada y Barbarrosa, siendo dominantes los alelos: Vrn-H1, Vrn-H2, Ppd-H1, Ppd-H2 y sin *denso*.

Finalmente, para este estudio se han utilizado 185 líneas BC1F5, de manera que se sembraron en invernadero, para el estudio de caracteres en condiciones controladas y obtención de material vegetal para la extracción de DNA, y en campo para el estudio de caracteres cuantitativos de carácter agronómico tal y como se describe en capítulos posteriores.

## 2.2 Marcadores moleculares utilizados en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa (NxBxB) para la realización de un mapa genético

A la hora de elegir unos buenos marcadores se tuvo en cuenta que fueran marcadores altamente polimórficos, codominantes, de forma que se distingan los individuos homocigotos de los heterocigotos, que no existiera epistasia, fueran insensibles al ambiente y que precisaran de técnicas sencillas, rápidas y relativamente baratas. Por este motivo se seleccionaron tres tipos de marcadores moleculares de DNA: microsatélites (SSR), marcadores DArTs y marcadores intragénicos de los genes de interés, con el fin de integrar los datos obtenidos en campo e invernadero para buscar la posición de los distintos parámetros medidos en los distintos grupos de ligamiento de la cebada, es decir que se busca la posición de caracteres cuantitativos (QTL) tales como rendimiento y altura.

Para ello se sembraron 10 plantas BC1F5 de cada una de las líneas del estudio y cuando tuvieron unas tres hojas se recogió materia verde de cinco plantas de cada una de las líneas para extraer su DNA. El DNA se extrajo con un kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se prepararon las diluciones de trabajo, 10 ng/ $\mu$ l para los SSR y sin diluir para los DArT.

Para las PCRs realizadas tanto para los SSR como para los marcadores intragénicos, se utilizaron los termocicladores de Applied Biosystem, así como para las incubaciones con enzimas de restricción de los marcadores intragénicos que lo precisaban. Del mismo modo para detectar los productos de amplificación y digestión se utilizaron geles agarosa al 1,5% para los marcadores intragénicos y de agarosa MS8 al 3.5% en el caso de los SSR, teñidos posteriormente en bromuro de etidio, excepto para los polimorfismos que diferían en 4 o menos pares de bases, para los cuales se utilizaron geles de acrilamida al 6% (19:1), añadiendo bromuro de etidio previamente en el buffer.

### 2.2.1 Microsatélites (SSR)

Los SSR son un tipo de marcador molecular basado en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), de forma que se amplifican secuencias que se encuentran en el genoma repetidas en tándem, denominadas microsatélites. Las diferencias son detectadas en geles de agarosa de acuerdo a su peso molecular, que viene determinado en función del número de repeticiones en tándem que posea el fragmento amplificado.

Se han seleccionado 39 marcadores de este tipo que son polimórficos para dicha población como muestra la tabla 3.

Nombre del SSR	G. L.	Secuencia primer directo (5'- 3')	Secuencia primer reverso (5'- 3')	Motivo repetido	PIC	Referencia
Bmag0211	1H	ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC	ACATCATGTCGATCAAAGC	(CT) <sub>16</sub>	0,83	Ramsay et al, 2000
HvALAAAT	1H	TACATACAACCCTCATGGG	AAGGATGACATGGCTTTG	(CT) <sub>10</sub>	n.d.	Ramsay et al, 2000
Bmac0032	1H	CCATCAAAGTCCGGCTAG	GTCGGGCCTCATACTGAC	AC) <sub>7</sub> T(CA) <sub>15</sub> (AT) <sub>9</sub>	0,61	Ramsay et al, 2000
Bmag382	1H	TGAAACCCATAGAGAGTGAGA	TCAAAGTTTCGTCCAAATA	(AG) <sub>7</sub> AA(AG) <sub>7</sub>	0,36	Ramsay et al, 2000
HvHVA1	1H	CATGGGAGGGGACAACAC	CGACCAAACACGACTAAAGGA	(ACC) <sub>5</sub>	0,34	Ramsay L et al, 2000
Bmac0134	2H	CCAAGTCTGATCTCG	CTTCGTTGCTTCTACCTT	(AC) <sub>28</sub>	0,76	Ramsay et al, 2000
HVM36	2H	TCCAGCCGACAATTTCTTG	AGTACTCCGACACCAGTCC	(GA) <sub>13</sub>	n.d.	Liu et al, 1996
Bmac132	2H	AACCTCCATAGTGTAGGGG	GTTTGTCTTTTGATTTTGTTG	(AC) <sub>15</sub>	n.d.	Ramsay et al, 2000
Bmac93	2H	CGTTTGGGACGTATCAAT	GGGAGTCTTGAGCCTACTG	(AC) <sub>24</sub>	0,81	Ramsay et al, 2000
Bmag0378	2H	CTTTTGTTCGATAGCATCTA	ATCCAAGTATAGTAGCAAAGCC	(AG) <sub>14</sub>	0,79	Ramsay et al, 2000
Bmac67	3H	AACGTACGAGCTCTTTTCTA	ATGCCAAGCTGTTGTTAG	(AC) <sub>18</sub>	0,82	Ramsay et al, 2000
Bmag0006	3H	TTAAACCCCCCTCTAG	TGCAGTTACTATCGCTGATTAGC	(AG) <sub>17</sub>	0,64	Ramsay et al, 2000
Bmag0225	3H	AACACACCAAAAATATTACATCA	CGAGTAGTTCCTCATGTGAC	(AG) <sub>26</sub>	0,42	Ramsay et al, 2000
Bmag0013	3H	AAGGGGAATCAAATGGGAG	TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	(CT) <sub>21</sub>	0,72	Ramsay et al, 2000
HVM03	4H	ACACCTTCCCAGACAATCCATTG	AGCACGAGAGCACCGAAAAAGTC	(AT) <sub>29</sub>	n.d.	Liu et al, 1996
Bmag353	4H	ACTAGTACCCACTATGCACGA	ACGTTCAATAAATCACAACCTG	(AG) <sub>21</sub>	0,67	Ramsay et al, 2000
HVMLOH1A	4H	CCTCCCCTCTGATATGATAA	GTACAGACGGTTTAATTGTCC	(GA) <sub>6</sub>	0,52	Ramsay et al, 2000
HdAMYB	4H	CAAGCAAAGGTTAAAGGTGCC	TTGTCGAAACCCATCCGCTC	(TG) <sub>10</sub> (G) <sub>16</sub>	n.d.	Pillen K et al, 2000

Tabla 3. SSR utilizados en el estudio. G. L. Grupo de ligamiento en cebada según bibliografía. PIC (Polymorphism information content, contenido de información polimórfica): valores obtenidos en la referencia bibliográfica. Valor n.d.= no determinado o no disponible.

Las concentraciones utilizadas en cada caso en un volumen total de 15 µl en todos los casos y los programas utilizados son los siguientes:

Para GBM1176, HdAMYB, HVM36, HVM03, HVM04 y HvLEU se utilizó una concentración de 0,1 µM de cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 1U de Taq Polimerasa y 30 ng de DNA, utilizando un programa que incluye 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, una temperatura de anillamiento de 65°C durante 1 minuto, decreciendo 0,5 grados en cada ciclo y 1 minuto a 72°C, seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C, con 3 minutos finales a 72°C.

Para scssr09041, scssr15334, scssr07970 y scssr04056 se utilizó una concentración de 0,4 µM de cada primer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 0,6U de Taq Polimerasa y 30 ng de DNA, utilizando un programa de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C, con 10 minutos finales a 72°C.

En el caso de HvGLB2 y HvHEMH1se utilizó una concentración de 0,1µM de cada primer, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 0,25 U de Taq Polimerasa y 60 ng de DNA, utilizando un programa que constaba de 10 ciclos 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 64°C descendiendo un grado en cada ciclo y 1 minuto a 74°C, seguido de 30ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minutos a 72°C, con 5 minutos finales a 72°C.

Nombre del SSR	G. L.	Secuencia primer directo (5'-3')	Secuencia primer reverso (5'-3')	Motivo repetido	PIC	Referencia
GBM1176	5H	TATACATCAGCGGGCCTTT	CTCCAACCTCGAAAGAGTC	(AT) <sub>8</sub>	0,7	Varshney RK et al, 2007
Bmac0113	5H	TCAAAGCCGGTCTAATGCT	GTGCAAAGAAAATGCACAGATAG	(AT)7(AC) <sub>18</sub>	0,66	Ramsay et al, 2000
HvHEM-H1	5H	TCCTGGCCTTCTCCTGCTG	AATTATATTGTTATTATCATGGCAGTC	(T) <sub>8</sub>	0,44	Pillen K et al, 2000
EBmac970	5H	ACATGTGATACCAAGGCAC	TGCATAGATGATGTGCTTG	(AC) <sub>8</sub>	0,49	Ramsay et al, 2000
HvLEU	5H	TTGGAAGTGACAGCAATGGAG	TGAAAGGCCCCACAAGATAG	(ATTT) <sub>4</sub>	n.d.	Becker J. y Heun M. 1995
scssr15334	5H	GGGAGCCGTAAGTAAGAACC	CGACCTCTGAATCTCAAATCC	(CTT) <sub>10</sub>	n.d.	Varshney RK et al, 2007
scssr09041	5H	CATGTCAGTGGGGTTCTAGC	TCTACTTGGACCTGCTGACC	(CATA) <sub>12</sub>	n.d.	Varshney RK et al, 2007
Bmac0316	6H	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	ATCACTGCTGTGCCTAGC	(AC) <sub>19</sub>	0,69	Ramsay et al, 2000
Bmag500	6H	GGGAAGTCTAATGAAGAG	AATGTAAGGGAGTGCATAG	(AG) <sub>6</sub> CG(AG) <sub>29</sub> (AGAGGG) <sub>3</sub> (AG) <sub>6</sub>	0,8	Ramsay et al, 2000
Bmag0173	6H	CATTTTGTGGTGACGG	ATAATGGCGGGAGAGACA	(CT) <sub>29</sub>	0,72	Ramsay et al, 2000
Ebmac0806	6H	ACTAAGTCTTTCACGAGGA	GTGTGTAGTAGTGGGTACTTG	(CA) <sub>4</sub> GA(CA) <sub>8</sub> (CA) <sub>5</sub>	0,78	Ramsay et al, 2000
Bmac40	6H	AGCCCGATCAGATTTACG	TTCTCCCTTGGTCTTG	(AC) <sub>20</sub>	0,89	Ramsay et al, 2000
scssr07970	7H	TGCATTGGGAGTGCTAGG	TGCAAGAAGCCAAGAATACC	-	0,69	Varshney RK et al, 2007
HVM04	7H	AGAGCAACTACCAGTCCAATGGCA	GTCGAAGGAGAAGCGGCCTGGTA	(AT) <sub>9</sub>	n.d.	Liu Z-W et al, 1996
Bmag0206	7H	TTTTCCCTATTATAGTGACG	TAGAAGTGGGTATTTCTTGA	(GT)5(AG) <sub>14</sub>	0,79	Ramsay et al, 2000
Bmag0120	7H	ATTTATCCCAAAGGAGAC	GTCACATAGACAGTGTCTTCC	(AG) <sub>15</sub>	0,86	Ramsay et al, 2000
Bmac156	7H	AACCGAATGTATTCTCTGTA	GCCAAACACTATCGTGAC	(AC) <sub>22</sub> (AT) <sub>5</sub>	0,89	Ramsay et al, 2000
scssr4056	7H	CCCATGAAGCCTTTACG	GGAACGGAGGGAGTATTAAGC	(CT) <sub>5</sub>	0,81	Varshney RK et al, 2007
Bmag0135	7H	ACGAAAGAGTTACAACGGATA	GTTTACCACAGATCTACAGGTG	(AG) <sub>10</sub> GG(AG) <sub>12</sub>	0,87	Ramsay et al, 2000
HVGLB2	7H	GCCAGCCAAACCTCAGTTG	AGCGTCTAATGCAGTCCGGC	(GT) <sub>5</sub> (G) <sub>12</sub>	n.d.	Pillen K et al, 2000

**Tabla 3. Continuación.** SSR utilizados en el estudio. G. L. Grupo de ligamiento en cebada según bibliografía. PIC (Polymorphism information content, contenido de información polimórfica): valores obtenidos en la referencia bibliográfica. Valor n.d.= no determinado o no disponible.

Finalmente, con los SSR descritos por Ramsay et al se utilizó en todos los casos una concentración de 0,3  $\mu$ M de cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 0,6U de Taq Polimerasa y 30 ng de DNA, utilizando un programa diferente según fuera el caso. Para Bmac00032 se usó un programa que constaba de un ciclo de 1 minuto a 94°C, una temperatura de anillamiento de 66°C durante 1 minuto y 1 minuto a 72°C, 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, decreciendo 1°C la temperatura de anillamiento, seguido de 24 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, con 5 minutos finales a 72°C de elongación. Para Bmac0134, HVMLOH1A, HvHVA1, Bmac0316, EBmac806, EBmac970, Bmac93, Bmac67 y Bmac156, un programa que incluye un ciclo de 1 minuto a 94°C, una temperatura de anillamiento de 55°C durante 1 minuto y 1 minuto a 72°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con 5 minutos finales a 72°C. Mientras que para Bmag0211, Bmag0378, Bmag0225, Bmag0382, Bmac0132, HvALAAT, Bmag0353, Bmag0500, Bmac040, Bmag0206, Bmag00013, Bmag0006, Bmac0113, Bmag0173, Bmag0120 y Bmag0135 se utilizó un programa idéntico al último descrito, pero en ambos casos con una temperatura de anillamiento de 58°C en vez de 55°C.

### 2.2.2 Marcadores intragénicos

Se utilizaron también marcadores intragénicos (tabla 3) para los genes de vernalización VRN-H1 (Fu et al, 2005) y VRN-H2 (Szücs et al, 2006), los genes de sensibilidad a fotoperiodo *Ppd-H1* (Turner et al, 2005) y *Ppd-H2* (Ana Casas, comunicación personal) para los cuales la población es polimórfica, así como un marcador intragénico del gen *denso* (Jia et. al 2009) y los genes *HvCO4* del cromosoma 2H y *srh* (short rachilla hair) del 5H.

Nombre de los primers	G. L.	Secuencia primer directo (5'- 3')	Secuencia primer reverso (5'- 3')	Enzima de restricción	Nevada	Barbarrosa	Referencia
<i>denso</i>	3H	CGCTGATTAAGTGGGACACA	GTCGCTCGTTAGGAAGCAG	Sau96I	No corta	Corta	Jia et al, 2009
SNP22 ( <i>ppd-H1</i> )	2H	ATGCGAATGGTGATCGGC	TATAGCTAGGTGCGTGGCG	BstUI	No corta	Corta	Turner 2005
<i>HvCO4</i>	2H	TGCGTGATGGTGCGATCTTTCT	CATAGTACAGACGCAAGCGCTCAT	BsaWI	Corta	No corta	-
HvFT3 ( <i>ppd-H2</i> )	1H	ATCCATTGGTTGTGGCTCAT	GTGGAGGGTTTGGAAATCGTA	-	Ampl.	n.a.	Ana Casas
Intr1/H/1 (VRN-H1)	5H	GCTCCAGCTGATGAACTCC	CTTCATGGTTTTGCAAGCTCC	-	Ampl.	n.a.	Fu et al, 2005
Intr1/H/3 (VRN-H1)	5H	TTCATCATGGATCGCCAGTA	AAAGCTCCTGCCAACTACGA	-	n.a.	Ampl.	Fu et al, 2005
<i>srh</i> (Os09g32320B)	5H	GATGCTGTAGTGATTGCAAGGT	AAAGTAACAACATCGGCGTCT	-	n.a.	Ampl.	-
ZCCT-Ha/b (VRN-H2)	4H	CCTAGTAAAACATATATCCATAGAC	GATCGTTGCGTTGCTAATAGTG	-	n.a.	Ampl.	Szucs P et al, 2006

**Tabla 4.** Marcadores intragénicos utilizados. G.L. Grupo de ligamiento. Ampl. Los primers utilizados amplifican. N.a. Los primers utilizados no amplifican.

Para *VRN-H1* se utilizaron dos parejas de primer (tabla 4). Esta descrito que la diversidad de *VRN-H1* se debe a una delección total o parcial del intrón 1 de este gen, de forma que las plantas que poseen esta delección no reconocen el represor de floración *Vrn-H2* y florecen en ausencia de vernalización. Por ello, para hacer el diagnóstico de *VRN-H1* se utilizaron los primers Intr1/H/F1 y Intr1/H/R1 descritos por Fu et al, 2005 que amplifican una región de 474 pares de bases del gen VRN-H1 cuando está presente la delección del intrón 1 de dicho gen en contraposición a los primers Intr1/H/F3 y Intr1/H/R3 de los mismos autores que amplifican una región de 403 pares de bases cuando no existe esta delección. Para ello se amplificaron en un volumen total de 15 µl que contenía 30 ng de DNA y 0,6U de taq polimerasa con una concentración de 0,3 µM de cada pareja de primers, 2,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche, usando un programa de 38 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante un minuto seguido posteriormente de un ciclo de 72°C durante 10 minutos. Pudiendo detectar de esta manera las líneas que como Nevada llevan la delección, en cuyo caso amplifican tan solo con los primers Intr1/H/F1 y Intr1/H/R1 y las que no llevan esta delección, como Barbarrosa, que tan solo amplifican con los primers Intr1/H/F3 y Intr1/H/R3, así como aquellas líneas que son heterocigotas.

En el caso de *VRN-H2* se utilizaron los primers descritos por Szücs et al, 2007 para los genes ZCCT-Ha y ZCCT-Hb. Está descrito que las plantas que portan el alelo recesivo *vrn-H2* presentan una delección total de los 3 genes ZCCT-H (Fu et al, 2005; Karsai et al, 2005; von Zitzewitz 2005), de manera que el marcador elegido en este caso es el InDel ZCCT-Ha/b cuyos primers se encuentran reflejados en la tabla 4, realizando una PCR que consta de 38 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido posteriormente de un ciclo de 72°C durante 10 minutos para un

volumen total de 15 para cada reacción que contenía 30ng de DNA, 0,6 U de Taq polimerasa y una concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  de cada pareja de primers, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche, distinguiendo las líneas que llevan dicha delección, como Nevada, de las que no la llevan, como Barbarrosa.

Para la evaluación del gen *PPD-H1* se utilizó el SNP 22 descrito por Turner et al (2005) como la causa principal de la mutación *ppd-H1*. Este SNP es una mutación de una base en el dominio CCT, dominio conservado en las proteínas PRR, producto de este gen, la cual causa un cambio de Gly a Trp. Esta mutación consiste en un cambio de G a T produciéndose un sitio de corte para *BstUI* en el alelo *ppdH1*. De esta manera amplificando esta región utilizando los cebadores de la tabla 4 y digiriendo este producto con *BstUI* podemos distinguir las líneas de la población que llevan el alelo *ppd-H1*, como el parental Nevada, de las que llevan el alelo *Ppd-H1*, como Barbarrosa. Para la amplificación se utilizó una concentración de 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 1,25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1U de Taq Polimerasa, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 20 ng de DNA en un volumen de reacción de 15  $\mu\text{l}$ , utilizando un programa que incluye 6 ciclos de 45 segundos a 94°C, una temperatura de anillamiento de 65°C durante 45 segundos, decreciendo un grado en cada ciclo y 1 minuto a 72°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C, con 7 minutos finales a 72°C de elongación. Posteriormente el producto de esta PCR era incubado a 60°C con 0,8U de *BstUI* para cada muestra durante toda la noche.

*Ppd-H2* fue evaluado mediante PCR utilizando los primers diseñados por Ana Casas que amplifican una región de 431 pares de bases entre los exones 1 y 2 del gen *HvFT3*, teniendo en cuenta que las líneas que portan el alelo recesivo *ppd-H2* se supone que no tienen el exón 1 de este gen, de manera que las líneas como Barbarrosa, no amplificarán nada utilizando esta combinación de primers. En este caso se usó un programa que constaba de 6 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 63°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto, decreciendo 1°C la temperatura de anillamiento, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 58°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto, con 7 minutos finales a 72°C de elongación, utilizando un volumen de reacción de 15  $\mu\text{l}$  que contenía 30 ng de DNA, 1U de taq polimerasa y una concentración de 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche.

En cuanto al alelo *denso*, se utilizaron los primers descritos por Jia et al, 2009 que amplifican una región del intrón 2 del gen *Hv2Oox2* de 194 pares de bases, donde nos encontramos que las variedades que portan el alelo *denso*, como Nevada, tienen una sustitución de guanina a adenina. Este polimorfismo es fácilmente detectable debido a que esta guanina se encuentra en el único sitio de corte de la enzima de restricción *Sau96I* (NEB) en el fragmento amplificado por los primers anteriormente mencionados. De esta manera, nos encontramos que las líneas sin el alelo *denso*, tras la digestión con esta enzima, presentan dos bandas, una de 106 pares de bases y otra de 88 pares de bases, mientras que, en las líneas con el alelo *denso*, el sitio de corte de *Sau96I* al haber sido alterado, presentan una única banda de 194 pares de bases, como ocurre con Nevada. Para la PCR se usó una concentración de 0,4  $\mu\text{M}$  de cada primer, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1,2U de Taq Polimerasa, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 50 ng de DNA en un volumen de reacción de 15  $\mu\text{l}$ , usando un programa de 35 ciclos de 94°C durante un minuto, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante un minuto seguido posteriormente de un

ciclo de 72°C durante 5 minutos. Este producto de amplificación se incubó a 37°C durante toda la noche con 0,5U de la enzima de restricción.

Para el caso de *HvCO4*, este fue previamente secuenciado en ambos parentales para buscar posibles polimorfismos utilizando primers diseñados a partir de las bases de datos del NCBI para este gen en cebada. Los polimorfismos detectados se utilizaron posteriormente en toda la población para su mapeo, pero en este caso se buscó un polimorfismo que fuera diana de una enzima de restricción en uno de los parentales y no en el otro. Este fue el caso de *BsaWI* (NEB), la cual digería en Nevada uno de los fragmentos secuenciados de un total de 635 pb en dos fragmentos, uno de 409pb y otro de 226pb. Esto es debido a que al secuenciar dicho fragmento de 635 pb existe un SNP del cual la enzima de restricción *BsaWI* es diana sólo en el caso del alelo procedente de Nevada. Para la amplificación de este fragmento se utilizó una concentración de 0,2 µM de cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq Polimerasa, 0,2 mM de dNTPs, 10% DMSO y Buffer 1x de Biotools con 50 ng de DNA en un volumen de reacción de 15 µl. Para la PCR se usó un programa PCR-Touchdown que contaba con 25 ciclos de 94°C durante un medio minuto, 55°C durante un minuto y 72°C durante tres minutos cada uno de ellos, con un Touchdown previo de 10 ciclos con temperaturas y tiempos de desnaturalización y elongación exactos a los de los 25 ciclos posteriores, pero donde la temperatura de anillamiento (Ta) descendía un grado en cada ciclo, partiendo de 65°C. A todo ello le siguió finalmente de un ciclo de elongación de 5 minutos a 72°C. Este producto de amplificación se incubó a 60°C durante toda la noche con 1U de la enzima de restricción.

El gen *srh* (short rachilla hair) determina la longitud de los pelos de la raquilla en los granos de cebada y ha sido mapeada en el cromosoma 5H (Druka et al, 2011). En este sentido, se observó que Nevada posee pelos largos en la raquilla, mientras que Barbarrosa tiene pelos cortos, por lo que se utilizó parte del estudio realizado durante la estancia en el James Hutton Institute. De esta manera, se diseñaron primers en una región próxima a este gen donde a partir de estudios de mapeo por asociación se determinó en que región del genoma se encontraba este, así como las regiones homólogas en arroz y *Brachipodium*, de manera que se diseñaron primers próximos a dicha región a partir de la secuencia más similar a uno de los genes de arroz de esta región homóloga, Os09g32320B, donde con esta combinación sólo amplificaban Barbarrosa y los miembros de la población con el alelo de este parental (pelo corto). Para la PCR se usó una concentración de 1µM de cada primer, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq Polimerasa, 0,2 mM de dNTPs y Buffer 1x de Roche con 10 ng de DNA en un volumen de reacción de 10µl, usando un programa de 25 ciclos de 94°C durante un minuto, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante un minuto seguido posteriormente de un ciclo de 72°C durante 5 minutos, con 10 ciclos previos de touch down PCR donde la temperatura de anillamiento descendía 1°C en cada ciclo, partiendo de 65°C.

### 2.2.3 Diversity Array Technology (DART)

Diversity Array Technology (DART) es una tecnología genérica de genotipado a un coste efectivo que fue desarrollada por el doctor Andrzej Kilian para superar alguna de las limitaciones de otros marcadores moleculares. Las principales ventajas del uso de DArTs son que es una tecnología fiable basada en la hibridación del DNA en microarrays, no depende a priori de información de secuencias, tiene un alto rendimiento de procesamiento con altos niveles de complejidad y se obtienen gran cantidad de datos reproducibles a bajo coste.

Para la obtención de estos datos se enviaron las muestras a Diversity Array Technology P/L-Triticarte P/L donde se solicitó el servicio "Barley *PstI* (*BstNI*) v1.7" que comprende alrededor de 1500 marcadores polimórficos en un amplio rango de cultivares de cebada australianos y europeos.

La tecnología DART consiste en una serie de pasos (Wenzl et al, 2004):

- a. Reducción de la complejidad del DNA de interés: Preparación del DNA de una mezcla representativa de distintos cultivares de cebada que es cortado con la enzima de restricción *PstI*. Un adaptador *PstI* se liga con T4 DNA ligasa y el producto de ligación se amplifica mediante PCR utilizando el primer específico DART-*PstI*.
- b. Creación de una librería: Los amplicones posteriormente son clonados en *E. coli* y dichas colonias transformantes seleccionadas, cada una conteniendo un producto de PCR diferente, se mantienen en glicerol al 10%.
- c. Miniaturización de la librería en portaobjetos de vidrio: De cada muestra mantenida en glicerol se realiza una PCR genérica a fin de obtener múltiples copias de cada fragmento obtenido de la amplificación del producto de ligación en la reducción de la complejidad del DNA. Estos productos de PCR se precipitan y se purifican para preparar los portaobjetos que contendrán el DNA a hibridar en los pasos posteriores.
- d. Hibridación de DNA marcado con fluorocromos en los portaobjetos: Las muestras con el DNA de cebada problema se someten al mismo proceso explicado en reducción de la complejidad del DNA, de manera que estos amplicones en esta ocasión son purificados, desnaturalizados y marcados con el fluorocromo cy3. A su vez se purifican, se desnaturalizan y se marcan con el fluorocromo cy5 el DNA procedente del producto de ligación contenido en los plásmidos de las colonias obtenidas en la librería original, que será el mismo DNA que tendremos en los portaobjetos (microarrays), de manera que se puede utilizar de referencia. Este DNA marcado, obtenido de ambas vías se desnaturaliza y se hibrida en los portaobjetos (microarrays) obtenidos en la miniaturización de la librería. Posteriormente, tras dejar toda una noche hibridando esto a 65°C, estos portaobjetos son lavados y escaneados para detectar la señal de hibridación.

- e. Extracción y análisis de datos: El software DARTSOFT desarrollado por la empresa Diversity Array Technology P/L-Triticarte P/L automáticamente localiza los puntos en todos los pares de imágenes escaneadas (cy3, cy5) generadas en un experimento, eliminando aquellos con una débil señal de referencia y computa y normaliza las intensidades de hibridación relativas (calculadas como  $\log[\text{cy3muestra}/\text{cy5referencia}]$ ). De esta manera de cada clon polimórfico se marca como 1 ó 0 en la muestra problema si esta hibrida o no.

### *2.3 Realización de un mapa genético de la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa (NxBxB)*

El mapa genético se realizó utilizando el programa desarrollado por van Ooijen JoinMap 4. Para ello, se utilizaron 347 marcadores polimórficos en la población. En este programa se cargaron todos los datos de los marcadores moleculares utilizados en este estudio y se calculó el agrupamiento de los loci utilizando los genotipos de los 347 marcadores, utilizando como parámetro de agrupamiento el valor-LOD del test por independencia. Para calcular este parámetro se le indicó un paso inicial con un valor de 2,0, un valor final de 10,0 y un tamaño de 1,0 en cada paso que determina los rangos y pasos de los niveles de significación que serán usados en el agrupamiento. Un determinado loci que esté significativamente asociado al valor del umbral del LOD estudiado en ese momento con al menos un miembro de un grupo estará en ese grupo. El valor del LOD independiente que calcula JoinMap se basa en el estadístico  $G^2$  para independencia en una tabla de contingencia de dos vías:  $G^2 = 2 \sum O \log(O/E)$  donde O y E son los individuos observados y esperados respectivamente en una celda. Bajo la hipótesis nula el estadístico tiene una distribución chi cuadrado con tantos grados de libertad como número de filas menos uno multiplicado por el número de columnas menos uno. El test de independencia no está afectado por la distorsión de la segregación, lo que nos lleva a una menor incidencia de falsos ligamientos porque si los pares pueden diferir en el número de celdas de la tabla de contingencia, pero en ese caso los grados de libertad diferirán también. Por eso, el estadístico  $G^2$  con más de un grado de libertad es transformado a estadístico  $G^2$  con un grado de libertad usando una aproximación basada en la igualdad de los valores-P. Finalmente, para conseguir la escala normal del LOD, el valor obtenido lo multiplica por 0,217 ( $=0,5 * \log_{10}(e)$ ). Cuando en un retrocruzamiento no existe distorsión de segregación este valor de LOD es igual al valor LOD normalmente utilizado en los análisis de ligamiento (denominado en JoinMap como linkage LOD).

Una vez obtenidos los grupos, se procedió a ordenar los marcadores y calcular las distancias entre estos. Para ello se utilizó el método de mapeo por regresión del mismo programa, ya que los grupos de ligamiento obtenidos oscilaban entre 12 y 62 marcadores, con lo cual computacionalmente este método era viable, y para calcular las distancias se utilizó la función de Haldane.

### 3. Resultados

#### 3.1 Marcadores moleculares

Los 39 SSR habían sido seleccionados de manera que estos se situaran uniformemente distribuidos por el genoma. Por este motivo nos encontramos tal como se muestra en la tabla 5 cinco marcadores de este tipo en el grupo de ligamiento 1H, otros cinco en los grupos 2H1 y 6H, cuatro en los grupos 3H y 4H, seis en el grupo 1H y 5H y nueve en el grupo 7H distribuidos en cinco SSR en el subgrupo 7H1 y cuatro en el 7H2. El microsatélite scssr7970 resulto ser polimórfico para dos loci distintos que, aunque mapearon ambos en el grupo 7H1, lo hicieron en posiciones bien distintas, como vemos en la tabla 5. Por tanto, nos encontramos con 40 marcadores microsatélites. Mientras que la situación en el mapa obtenido de los siete marcadores intragénicos utilizados corresponde a la esperada, como describe la tabla 4.

Nombre del SSR	Barbarrosa (pb)	Nevada (pb)	G. L.	Posición (cM)
<b>Bmag0211</b>	186	180	1H	64,739
<b>HvALAAT</b>	199	202	1H	68,014
<b>Bmac0032</b>	237	217	1H	104,387
<b>Bmag382</b>	109	109	1H	125,291
<b>HvHVA1</b>	151	154	1H	134,098
<b>Bmac0134</b>	168	148	2H1	4,699
<b>HVM36</b>	110	112	2H1	16,597
<b>Bmac132</b>	191	189	2H1	69,192
<b>Bmac93</b>	157	159	2H1	70,398
<b>Bmag0378</b>	139	149	2H1	91,359
<b>Bmac67</b>	173	179	3H	65,715
<b>Bmag0006</b>	172	176	3H	71,306
<b>Bmag0225</b>	148	164	3H	99,199
<b>Bmag0013</b>	165	157	3H	129,806
<b>HVM03</b>	178	210	4H	12,186
<b>Bmag353</b>	122	114	4H	32,374
<b>HVMLOH1A</b>	183	175	4H	68,232
<b>HdAMYB</b>	211	192	4H	106,309

**Tabla 5.** Resultados del tamaño de banda de los distintos microsatélites en los dos parentales, así como su posición en los grupos de ligamiento obtenidos en el mapa de la población de estudio.

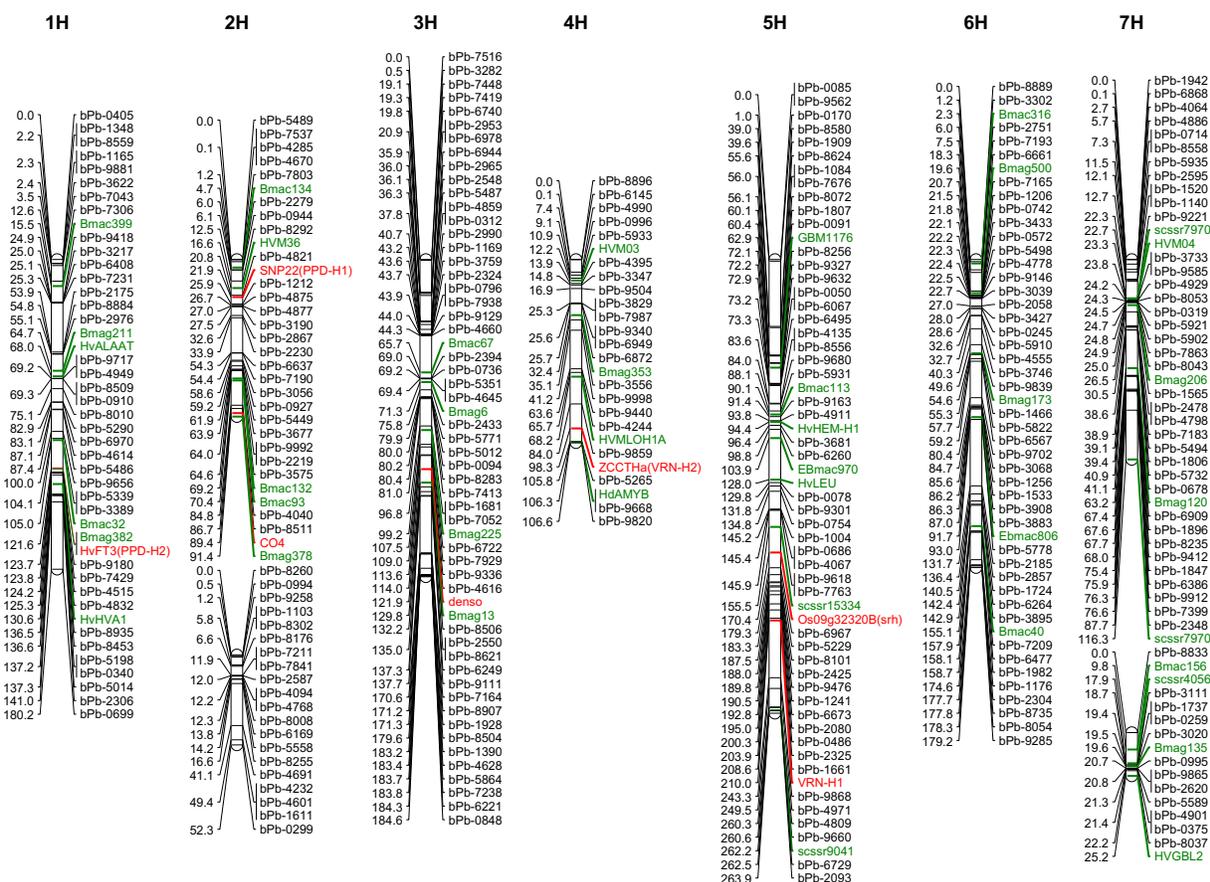
Nombre del SSR	Barbarrosa (pb)	Nevada (pb)	G.L.	Posición (cM)
<b>GBM1176</b>	282	288	5H	62,867
<b>Bmac0113</b>	181	197	5H	90,057
<b>HvHEM-H1</b>	200	196	5H	94,436
<b>EBmac970</b>	192	190	5H	103,897
<b>HvLEU</b>	171	167	5H	127,965
<b>scssr15334</b>	192	176	5H	155,472
<b>scssr09041</b>	168	146	5H	262,151
<b>Bmac0316</b>	165	139	6H	2,3
<b>Bmag500</b>	164	176	6H	19,58
<b>Bmag0173</b>	124	150	6H	54,603
<b>Ebmac0806</b>	158	170	6H	91,662
<b>Bmac40</b>	226	220	6H	155,136
<b>scssr07970</b>	277	293	7H1	22,671
<b>scssr07970b</b>	220	181	7H1	116,3
<b>HVM04</b>	198	204	7H1	23,26
<b>Bmag0206</b>	251	247	7H1	26,498
<b>Bmag0120</b>	260	230	7H1	63,183
<b>Bmac156</b>	159	143	7H2	9,82
<b>scssr4056</b>	146	188	7H2	17,935
<b>Bmag0135</b>	138	161	7H2	19,606
<b>HVGLB2</b>	212	nulo	7H2	25,167

**Tabla 5. Continuación.** Resultados del tamaño de banda de los distintos microsatélites en los dos parentales, así como su posición en los grupos de ligamiento obtenidos en el mapa de la población de estudio.

Los restantes marcadores utilizados en el mapa son de tipo DArT, utilizándose de toda la batería obtenida en el microarray, los que, siendo polimórficos, tenían un PIC adecuado para la utilización en la realización el mapa genético.

### 3.2 Mapa genético

El mapa genético obtenido está compuesto por un total de nueve grupos de ligamiento como observamos en la figura 5.



**Figura 5.** Mapa obtenido con la población NxBxB. En color negro están marcados los marcadores de tipo DArT, en verde los SSR y en rojo los marcadores intragénicos.

El mapa consta de un total de 347 marcadores, de los cuales 300 son de tipo DArT, distribuidos en un total de 1203,3 cM distribuidos en los nueve grupos de ligamiento obtenidos. Los marcadores se distribuyen de la siguiente manera, tal y como vemos en la tabla 6.

- Grupo 1H: con 45 marcadores y una longitud de 183,7 cM. En este grupo nos encontramos el marcador de *HvFT3*, gen candidato a *ppdH2*, en la posición 115,2.
- Grupo 2H1: con un total de 33 marcadores y una longitud de 91,4 cM. En él se encuentran los marcadores del gen *CO4* y el marcador *SNP22*, correspondiente al gen *ppdH1* en las posiciones 89,4 y 21,9 respectivamente.

- c. Grupo 2H2: Con un total de 20 marcadores, todos ellos de tipo DArT, distribuidos en 52,3 cM.
- d. Grupo 3H: con 57 marcadores en una longitud de 184,6 cM. En él mapea *denso* en la posición 122.
- e. Grupo 4H: con 26 marcadores distribuidos en 106,6 cM. Aquí se encuentra el marcador para el gen VRNH2 en la posición 98,3.
- f. Grupo 5H: con 59 marcadores y un total de 264 cM. En él se encuentran el gen *shr* en la posición 170,4 y los dos marcadores utilizados para mapear el gen VRNH1, el cual se encuentra en la posición 210.
- g. Grupo 6H: con 49 marcadores distribuidos en 179,2 cM.
- h. Grupo 7H1: con 42 marcadores, de los cuales 5 son microsatélites, en 116,3 cM.
- i. Grupo 7H2: con 16 marcadores, 4 de ellos microsatelites, en 25,2 cM.

Grupo	Longitud (cM)	N total de marcadores	SSR	otros	densidad (marcador/cM)
1H	183,7	45	6	<i>HvFT3</i>	0,245
2H1	91,4	33	5	CO4 y SNP22	0,361
2H2	52,3	20	0		0,382
3H	184,6	57	4	<i>denso</i>	0,309
4H	106,6	26	4	<i>ZCCTHa</i>	0,244
5H	264	59	7	<i>shr</i> y <i>VRNH1</i>	0,223
6H	179,2	49	5		0,273
7H1	116,3	42	5		0,361
7H2	25,2	16	4		0,635
<b>Total</b>	1203,3	347	40	7	0,288

**Tabla 6.** Resumen del mapa NxByB donde nos encontramos el número de marcadores distribuidos por tipo y grupo de ligamiento, así como la longitud total y por grupo y sus densidades.

## 4. Discusión

En un primer lugar, nos encontramos con que el mapa obtenido a partir de los 347 marcadores polimórficos para la población de estudio tiene 9 grupos de ligamiento, en vez de 7 grupos que sería lo propio en cebada. Además, los marcadores no se encuentran distribuidos homogéneamente a lo largo de estos, sino que se encuentran formando grupos.

El mapa obtenido con esta población coincide con la posición relativa de los marcadores utilizados para este estudio con mapas previos (Ramsay et al, 2000; Szücs et al, 2009; Vahrsney et al 2007; Wenzl et al, 2006; GrainGenes), por tanto podemos concluir que este mapa es correcto para su utilización en trabajos posteriores para la búsqueda de QTL. En la figura 6 observamos la comparativa entre el mapa obtenido para la población NxBxB y el mapa consenso de DArTs de Wenzl et al (2006). Aquí podemos observar como la distribución relativa de los marcadores tipo DArTs y microsatélites es altamente similar entre ambos mapas, coincidiendo incluso en la posición relativa del gen *shr*, mapeado en el cromosoma 5H.

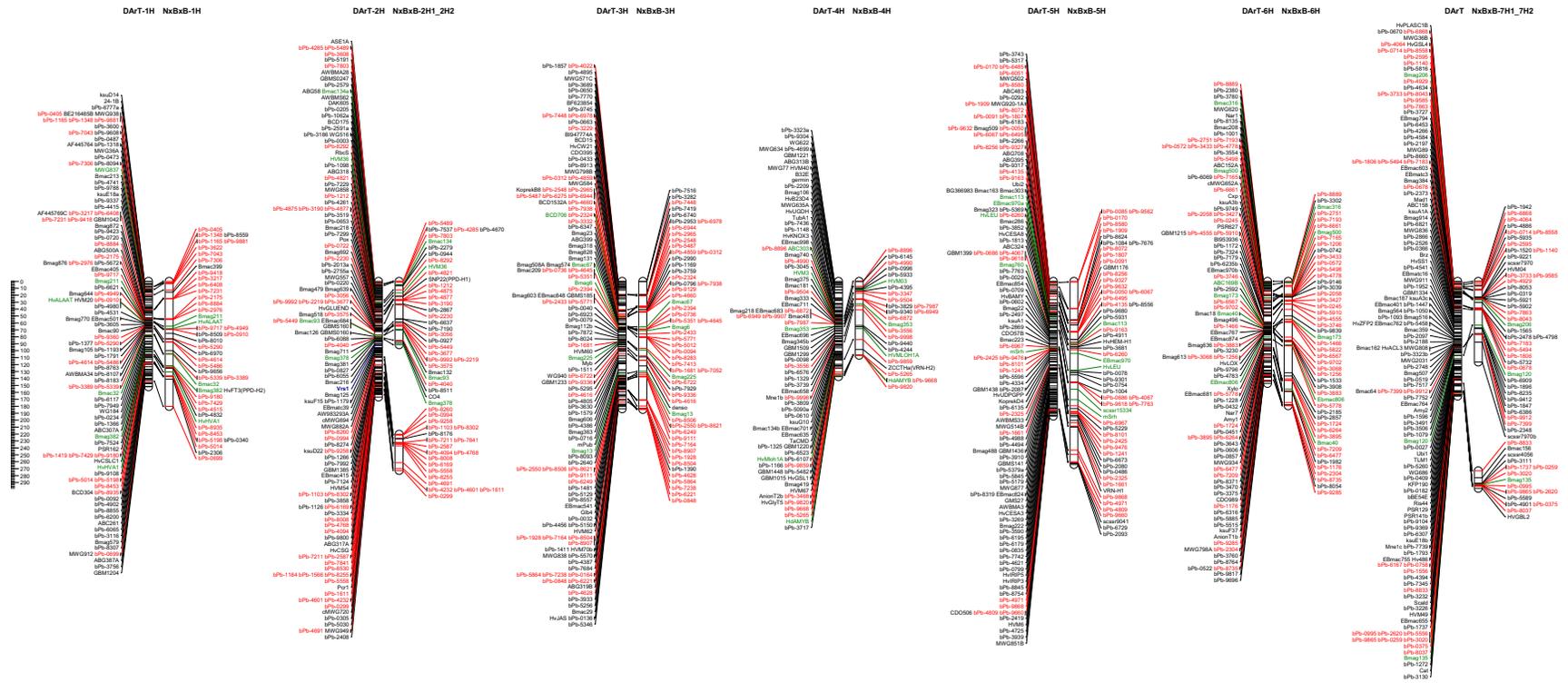
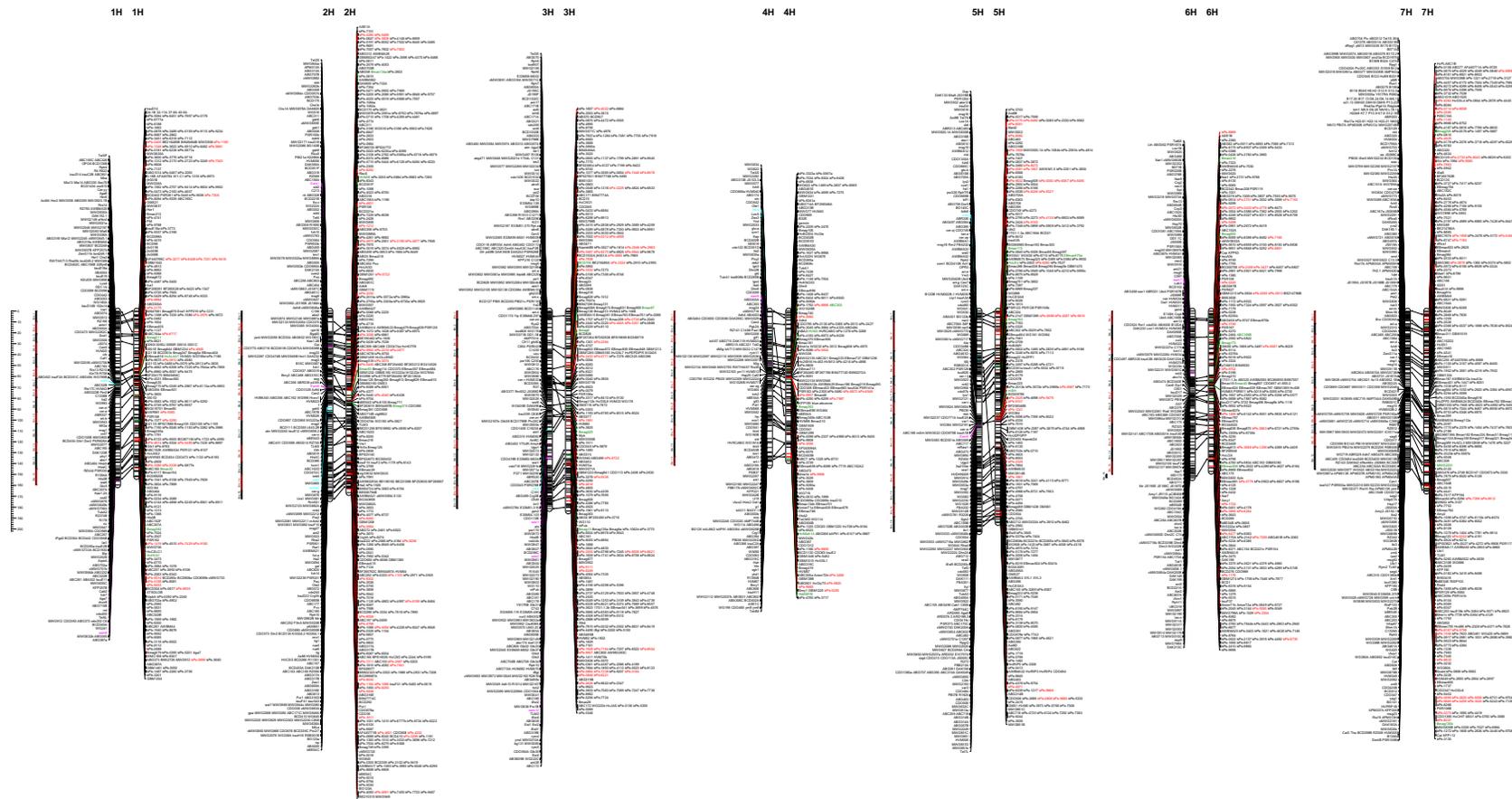


Figura 6. Comparativa del mapa consenso de DArTs (Wenzl et al, 2004) con el mapa obtenido con la población de estudio. En rojo aparecen los marcadores DArT repetidos en ambos mapas y en verde los marcadores tipo SSR.

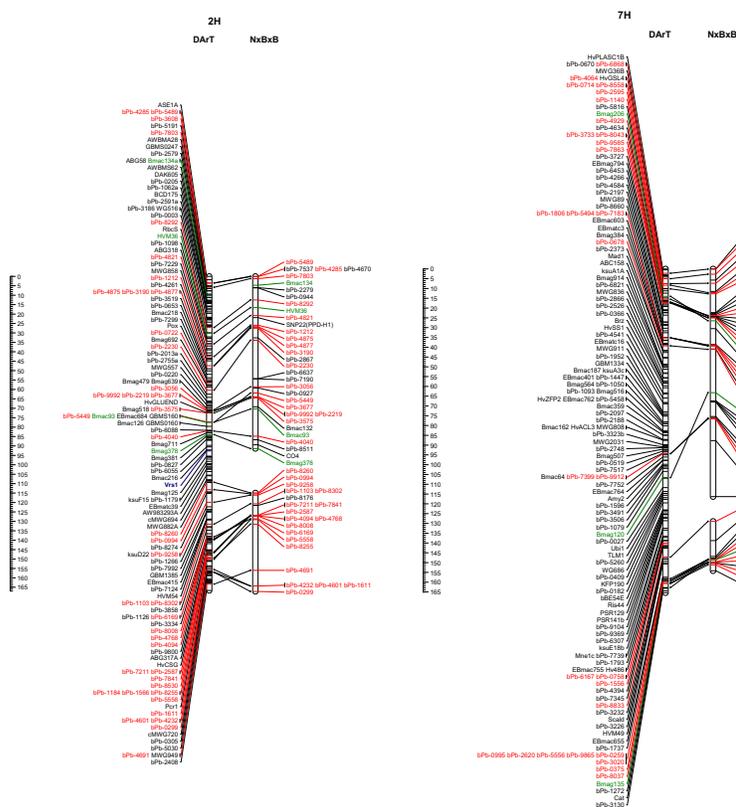


**Figura 7.** Comparativa del mapa consenso DArT con el bin map (Marcel et al, 2007). En rojo aparecen los DArT coincidentes con el mapa NxByB y en verde los microsatelites. En el bin map aparecen marcados los genes de precocidad y semenanismo en rosa y en azul claro los genes *vrs* e *int-c*.

El hecho de encontrarnos con 9 grupos es fácilmente explicable, ya que puede que existan zonas del genoma no polimórficas en la población que nos llevan a un “agujero” en las frecuencias de recombinación tan grande que derivan en asignar a dos grupos diferentes lo que realmente está en uno solo. Esto es lo que sucede con los grupos 2H que lo tenemos dividido en 2H1 y 2H2 y el grupo 7H que se encuentra dividido en 7H1 y 7H2.

En el caso de 2H esta división está causada por la selección previa que tuvo la población de estudio, utilizando para obtener la población solamente las líneas de seis carreras. Se sabe que este carácter está controlado por el gen *vrs1* el cual se encuentra en el grupo 2H (Franckowiak y Lundqvist, 1997; Komatsuda et al, 1998) y haciendo una comparación con el mapa consenso de DARtS (Wenzl et al, 20016) y el mapa de la población Oregon Wolfe Barley (Szücs et al, 2009) en el cual se integran tanto DARtS como el gen *vrs1*, se ve claramente que existe una zona intermedia entre los grupos 2H1 y 2H2 donde se encuentra este gen (ver figura 8). Por tanto, en estas líneas está fijado dicho carácter, lo que implica que existe una baja tasa de recombinación en esta región.

También debemos señalar que podemos observar una región no informativa en cromosoma 4H, ya que el principio de este, no se encuentra en el mapa de NxBxB, región donde se encuentra el gen *intc*, otro gen implicado en la determinación de que sean cebadas de seis o dos carreras (Druka et al, 2011).



**Figura 8.** Comparativa de los grupos de ligamiento 2H (izquierda) y 7H (derecha) del mapa consenso de DARtS (Wenzl et al, 2006) con los grupos de ligamiento 2H1, 2H2, 7H1 y 7H2 del mapa obtenido con la población NxBxB. En ella nos encontramos de color rojo los marcadores de tipo DARt que son comunes en ambos mapas y en color verde los microsatelites comunes. Se encuentra también marcado en color azul el gen *vrs1* en el grupo 2H del mapa consenso.

Algo similar ocurre con el grupo 7H, dividido en dos grupos (7H1 y 7H2) debido a la baja frecuencia de recombinación. En este caso nos encontramos que esto ocurre en la región donde se encuentra el gen *VRN-H3 (HvFT1)* el cual no segrega en la población de estudio. Al parecer, esto abarca una amplia región próxima a este ya que si nos fijamos en las homologías existentes tanto con el mapa de ligamiento de Wenlz et al (2006) y la homología de este con el mapa (bin Map) de Marcel et al (2007) observamos que el vacío existente en el mapa NxBxB abarca, usando la terminología de Marcel et al (2007) desde finales del bin 3, donde se encuentra el último marcador DArT homólogo al mapa consenso de DArTs del grupo 7H1, el bPb-7399, a finales del bin 7, donde mapea el primer DArT homólogo al grupo 7H2 (bPb-8833). Lo que nos lleva a una pérdida de una región importante del cromosoma 7H, por lo que debemos tenerlo en cuenta a la hora de buscar caracteres cuantitativos.

Por otro lado, la utilización de DArTs nos ha llevado a obtener un mapa en el cual los marcadores se encuentran agrupados en zonas concretas con distancias muy pequeñas entre sí, siendo imposible el conseguir un mapa saturado con distancias entre marcadores de un centimorgan. Incluso se han eliminado una gran cantidad de marcadores tipo DArT que mapeaban exactamente en la misma posición que otro si incluido en el mapa. Si observamos el mapa consenso de DArTs de Wenlz et al (2006) observamos que existe este mismo problema (figura 7).

Este problema se debe a la propia metodología de los DArTs cuyos clones a hibridar posteriormente, procedentes de la librería previamente creada, se encuentran en zonas muy próximas del genoma o en lugares idénticos. Esto podría ser debido a que la enzima de restricción utilizada, *PstI*, podría cortar en distintos sitios en las distintas variedades utilizadas para la creación de la librería, lo que podría haber provocado la creación de distintos clones, que posteriormente fueron asignados como marcadores diferentes, pero en realidad, coinciden con la misma zona del genoma. Este problema se intentó subsanar mediante el anclaje en el mapa de otro tipo de marcadores, como fueron los microsatélites. Pero a pesar de todo, nos seguimos encontrando regiones donde existen vacíos de más de diez centimorgans, lo que se traduce en una densidad media relativamente baja, 0,288 marcadores por centimorgan, o lo que es lo mismo, una media de un marcador cada 3,5 cM, con el inconveniente señalado anteriormente de que estos no se encuentran uniformemente distribuidos, ya que como observamos al comparar las densidades en los distintos grupos, nos encontramos con densidades que oscilan de un marcador cada 1,6 cM en el grupo 7H2 a un marcador cada 4,1 cM como es el caso de los grupos 1H y 4H.

Por otro lado, nos encontramos que una característica de esta población es que, al derivar de un retrocruzamiento, las frecuencias esperadas de alelos no son iguales para los dos parentales (1:1), como ocurre en poblaciones derivadas tanto de dihaploides como de RILs procedentes de cruzamientos simples, sino que se espera una distribución 3:1 (3B:1N). Debido a esto, debemos tener en cuenta que el poder de resolución de la prueba es menor, a pesar de usar algoritmos que tienen en cuenta dichas frecuencias. Por esto mismo, a la hora de usar este mapa genético para la detección de caracteres cuantitativos debemos tener en cuenta que algunos QTL de efecto pequeño podrían quedar enmascarados, lo que no quita que queden bien reflejados los QTL con mayor efecto.

Por todo lo dicho anteriormente, concluimos que el mapa de la población (Nevadax Barbarrosa) x Barbarrosa (NxBxB) finalmente es considerado válido para su utilización de detección de caracteres cuantitativos que nos ocupa en los capítulos posteriores de este trabajo, teniendo en cuenta las características del mismo ya descritas. Destacando también, el hecho de que este mapa procede de una población no exótica, sino de una población directamente aplicada en un plan de mejora genética de cebada, por lo que los posteriores resultados tienen una aplicación directa para la obtención de nuevas variedades comerciales.

## *Capítulo tercero:*

*Control genético de las distintas fases de desarrollo hasta espigado en una población de cebada*

# Control genético de las distintas fases de desarrollo hasta espigado en una población de cebada

---

## 1. Introducción: Importancia del control de las fases de desarrollo. Repercusiones en el rendimiento.

El desarrollo de un cultivo se define como una secuencia de eventos fenológicos controlados por el genotipo, el ambiente (principalmente temperatura y fotoperiodo) y su interacción (García del Moral et al, 2002). Considerando los cambios que ocurren en el ápice, el tiempo hasta la antesis puede dividirse en tres fases: producción de hojas (fase vegetativa), producción de espiguillas (fase temprana reproductiva) y crecimiento de la espiga (fase reproductiva tardía, la cual ocurre durante la elongación del tallo (Appleyard et al., 1982; Slafer y Rawson, 1994). Varios autores han demostrado la variabilidad fenotípica de la duración de las tres fases, comparando diferentes grupos de cultivares, e incluso la variabilidad de la fase reproductora tardía en variedades con tiempo de antesis similares (Appleyard et al., 1982; Kernich et al., 1995, 1997). Por otro lado, la respuesta a vernalización, fotoperiodo y temperatura puede diferir enormemente tanto entre genotipos como entre fases (y relativamente esta variación entre fases puede ser mayormente independiente (Slafer y Rawson, 1994; Miralles y Richards, 2000; González et al., 2002). Esta evidencia ha llevado a estos autores a sugerir que las diferentes fases desde la siembra hasta la antesis podrían estar bajo distintos mecanismos de control genético (Digel et al, 2015) y que estas fases podrían manipularse sin cambiar el tiempo total hasta antesis (Slafer et al., 1996).

Los caracteres fenológicos poseen una importancia crítica ya que ellos no sólo confieren una adaptabilidad a ambientes particulares, sino también una influencia en la mejora del rendimiento a través del incremento del potencial de rendimiento, aunque el rendimiento se va formando continuamente desde la siembra hasta la madurez de la espiga (Slafer y Rawson, 1994), el periodo de elongación del tallo es crítico ya que es donde se define la antesis definiéndose el número de espiguillas fértiles, lo cual se traducirá en el número final de granos (Fischer, 2007; Miralles y Slafer, 2007). Por tanto, se ha propuesto que la longitud de la duración de la fase de elongación del tallo, sin modificar el tiempo total hasta antesis, podría incrementar el número de granos por metro cuadrado (Slafer et al., 2005) y, por lo tanto, el potencial de rendimiento del grano en cereales de grano pequeño (Fischer, 2007, 2008; Miralles y Slafer, 2007) ya que el peso del grano es mucho más estable que el número de granos en cereales de grano pequeño (Peltonen-Sainio et al, 2007), incluyendo la cebada (García del Moral et al, 2002).

Durante la fase de elongación del tallo, la muerte de las espiguillas coincide con el rápido crecimiento de tallo y espiga, los cuales se encuentran en competencia por asimilados (Kirby, 1988) y se ha demostrado que la duración de la fase de elongación del tallo puede correlacionarse con el número de espiguillas fértiles en antesis (González et al., 2003a) y, en consecuencia, el número de granos por metro cuadrado (Miralles et al, 2000; González et al, 2003b). También se ha demostrado específicamente en cebada que podría haber más potencial para aumentar el número de granos al

reducir el nivel de aborto de espiguillas (que ocurre durante el alargamiento del tallo) que el hecho de aumentar el número máximo de primordios de espiguillas (Kernich et al., 1997).

Por todos estos motivos el control genético de la duración de las fases de pre-espigado posee un interés crucial para mejorar el potencial de rendimiento del cultivo de la cebada. Pero a pesar de esta importancia ampliamente demostrada, pocos estudios al respecto hay sobre las evidencias del control genético de la duración de estas fases, la mayoría de ellos realizados en trigo (Whitechurch et al, 2007; González et al, 2002; González et al, 2005; Lewis et al, 2008).

En este sentido, Borràs et al (2009), no encontró correlaciones genéticas entre las fases hasta encañado de la planta y elongación del tallo en la población Henni x Meltan, la cual a pesar de derivar de dos cultivares primaverales del norte de Europa, posee una alta variabilidad genética, segregación transgresiva y heredabilidad para ambas fases. Borràs-Gelonch et al. (2010) encontró algunos QTL responsables de las diferencias del control genético de ambas fases en esta población, la cual no segrega para los principales genes de desarrollo. Mientras que Borràs-Gelonch et al (2012) realizó un estudio de estas características en la población Steptoe x Morex, la cual sí segrega para dichos genes (Hayes et al, 1993; Kikuchi et al, 2009). Bajo este fondo genético la duración de la fase hasta encañado y la duración de la fase de elongación del tallo no correlacionaban, lo que parece indicar control genético diferencial. Para la fase de encañado los mayores efectos se debieron al gen *PPD-H2* y a *Eam6* en la fase de elongación del tallo, además de otra serie de QTL con pocos o nulos efectos en el tiempo total hasta espigado.

Por tanto, este capítulo de tesis tratará de dilucidar estos aspectos tanto para la duración de las fases de pre-espigado, como número de hojas desarrolladas en cada una de las fases de estudio, así como las correlaciones tanto entre ambos caracteres (número de hojas y duración en tiempo térmico), como entre fases. Para ello se ha utilizado un fondo genético distinto que también segrega para los principales genes de desarrollo de respuesta a fotoperiodo y vernalización, por lo que, para tratar de resolver el papel en el control genético de dichas fases por parte de estos genes, se han aplicado ambientes controlados extremos, con distintos tratamientos de vernalización y fotoperiodo, con el fin de encontrar como afectan estas variables ambientales a las distintas fases de pre-espigado. Paralelamente, se tratará de seleccionar las líneas que podrían tener un potencial ajuste del tiempo de encañado/elongación del tallo sin afectar al tiempo total hasta espigado con el fin de potenciar la fase de llenado de grano y por tanto, el rendimiento.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Población y material vegetal utilizados

La población utilizada para este estudio fue la población de 185 líneas BC1F5 (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa (NxBxB) descrita en el anterior capítulo, utilizándose el mapa genético obtenido en este último para realizar la detección de caracteres cuantitativos (QTL).

### 2.2 Caracterización fenológica de la población NxBxB para la detección de las distintas fases de desarrollo

Para el estudio fenológico se realizaron ensayos en ambiente controlado, manipulando las condiciones de temperatura y fotoperiodo según el tratamiento que se quería estudiar. Los caracteres medidos en ambos tipos de ensayos, fueron los que posteriormente se utilizaron para su análisis y detección de QTL.

Estos ensayos se realizaron en los invernaderos de cereales del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León durante la campaña 2008/2009. En ellos se aplicó la combinación de dos factores: vernalización y fotoperiodo resultando cuatro tratamientos diferentes: fotoperiodo largo (17 horas de luz) vernalizado (VL); fotoperiodo corto (10 horas de luz) vernalizado (VS), fotoperiodo largo no vernalizado (L) y fotoperiodo corto no vernalizado (S)(ver tabla 7).

L	S	VL	VS
<b>No vernalizado</b> Sin acumulo de horas de frío	<b>No vernalizado</b> Sin acumulo de horas de frío	<b>Vernalizado</b> 8 semanas 4°C noche 8°C día	<b>Vernalizado</b> 8 semanas 4°C noche 8°C día
<b>Fotoperiodo largo</b> 17 horas de luz	<b>Fotoperiodo corto</b> 10 horas de luz	<b>Fotoperiodo largo</b> 17 horas de luz	<b>Fotoperiodo corto</b> 10 horas de luz

**Tabla 7.** Tabla donde quedan representados los cuatro ensayos realizados en el estudio, con los tratamientos aplicados en cada caso.

La vernalización consistió en 8 semanas con temperaturas de 4°C durante la noche y 8°C durante el día y tras estas ocho semanas en las que se mantuvieron las plantas en las cámaras de frío del mismo centro, se llevaron a los invernaderos para mantener temperaturas entre 20°C durante el día y 10°C noche.

En el caso de los ensayos sin vernalizar, se realizó la siembra dos semanas antes de terminar el periodo de vernalización de los ensayos anteriores, con el fin de que todas las plantas acumularan el mismo tiempo térmico y se encontraran en el mismo grado de desarrollo. En este caso, las temperaturas se mantuvieron entre 20°C durante el día y 10°C en la noche durante todo el ciclo. En el caso del

fotoperiodo corto se mantuvieron 10 horas de luz hasta el 15 de diciembre, ya que a partir de este momento se aprovechó el fotoperiodo natural.

En todos los casos se sembraron seis semillas BC1F5 procedentes de espigas individuales de cada línea, además de los parentales y los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic. A continuación se anotaron las fechas de nascencia, de manera, que tras las ocho semanas del periodo de vernalización y las dos semanas de germinación, según procediera, se eligieron las tres plantas de cada línea para cada uno de los ambientes que eran similares eran entre sí en tamaño y fecha de nascencia. Estas se colocaron en los invernaderos en macetas independientes siguiendo un diseño experimental aleatorio, de forma que cada ensayo constara de tres repeticiones.

En todos los casos se evaluó:

- el índice de Haun (Haun 1973), tomándose como referencia el tallo principal y valorándose éste cada dos días,
- el número de días hasta el espigado y hoja bandera,
- el número de hojas totales de este mismo tallo (TL) y
- el número de hojas situadas a una altura al primer nudo menor a 2,5 centímetros, así como la altura al nudo menor a 2,5 centímetros y la altura total al nudo situado a más de 2,5 centímetros de cada planta con el fin de estimar el número de hojas basales (BL), que corresponde al número de hojas que ha formado la planta antes de encañar, lo cual nos da idea de la necesidad o no de cada línea a vernalizar debido a que este parámetro nos marca el momento de la inducción de floración dependiendo de su necesidad o no a acumular horas de frío y/o de luz. De esta manera se pueden clasificar las distintas líneas en líneas de invierno o de primavera, ya que está claro que en cebada la diferenciación del ápice del tallo para la formación de la espiga y el inicio del alargamiento del tallo son dos fenómenos controlados por diferentes mecanismos genéticos (Appleyard et al, 1982; Kernich et al, 1995, 1997; Digel et al, 2015). Esto hace que, en variedades de primavera, de poca sensibilidad al fotoperiodo, en condiciones de fotoperiodo largo, la duración del período de inicio de encañado a espigado sea mayor que en variedades de invierno sensibles al fotoperiodo.

Finalmente los parámetros evaluados para realizar la disección genética de las distintas fases de desarrollo hasta espigado fueron:

- el número de hojas totales (TL) y basales (BL),
- el número de hojas caulinares (SEL) como la diferencia entre el número de hojas totales menos las basales (TL-BL),
- los tiempos térmicos utilizando los datos obtenidos de los termo hidrógrafos instalados en los distintos invernaderos obteniéndose:
  - a. el tiempo térmico desde nascencia hasta encañado (J),
  - b. el tiempo térmico desde nascencia hasta llegar al estado de hoja bandera (FL) y
  - c. el tiempo térmico desde nascencia hasta espigado (F) y
  - d. el tiempo térmico para la elongación del tallo principal (SE) como el tiempo térmico desde encañado o estado de doble arruga del ápice (primordios folial y floral) hasta alcanzar el estado de hoja bandera (de J a FL),
  - e. el filocrono (PHY), como tiempo térmico para que se desarrolle una hoja y
  - f. se determinó también el ratio entre el tiempo térmico de elongación del tallo y el tiempo térmico hasta encañado (SE/J), el cual se ha observado tener una alta

heredabilidad en otras poblaciones de cebada (Borràs-Gelonch et al,2010; Borràs-Gelonch et al,2012) y bajos efectos de la interacción genotipo por ambiente (Borràs-Gelonch et al,2012).

## 2.3 Metodología de los análisis estadísticos empleados

### 2.3.1 Análisis preliminares: Estadística descriptiva

Con el fin de resumir y ver más claramente todos los parámetros estudiados se realizó un análisis estadístico descriptivo de todos ellos en cada uno de los ensayos realizados, tanto de campo como de invernadero, empleándose los estadísticos: media poblacional, desviación standard, máximo y mínimo, así como las medias de los dos parentales, Barbarrosa y Nevada.

Así mismo se ha realizado un estudio de las correlaciones de los distintos caracteres estudiados en cada fase de pre-espigado, número de hojas y tiempo térmico, y entre las distintas fases. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson, considerándose significativas aquellas correlaciones con un grado de significación igual o menor al 0,05. Para ello se ha utilizado el estadístico correlación en GenStat 12 (Payne 2009), el cual calcula dicho parámetro.

### 2.3.2 Análisis de varianza

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para cada carácter estudiado, en el conjunto de los cuatro ambientes de este estudio.

El objetivo de este análisis es una primera aproximación a la detección de posibles diferencias tanto genotípicas como ambientales, a la importancia que cada uno de estos dos factores puede representar en cuanto a las diferencias totales detectadas y la identificación de una posible existencia de interacción genotipo x ambiente (GxE en adelante) que deberá ser tomada en cuenta, caso de resultar significativa, para una correcta interpretación de los resultados y para definir correctamente el resto de la metodología empleada.

El modelo general utilizado para este análisis de varianza fue:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + e_j + g_{eij} + b_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Siendo  $Y_{ijk}$  el valor fenotípico del genotipo  $i$ -ésimo en el bloque  $k$ -ésimo del  $j$ -ésimo ambiente;  $\mu$  la media total de todas las observaciones;  $g_i$  el efecto del genotipo  $i$ -ésimo;  $e_j$  el efecto del ambiente  $j$ -ésimo;  $g_{eij}$  la interacción del genotipo  $i$ -ésimo en el ambiente  $j$ -ésimo;  $b_{jk}$  el efecto del bloque  $k$ -ésimo en el ambiente  $j$ -ésimo y  $\varepsilon_{ijk}$  = componente del error experimental, o variación residual de la observación en el bloque  $k$ -ésimo del ambiente  $j$ -ésimo para el genotipo  $i$ -ésimo. Los efectos principales genotipo y ambiente se consideraron factores fijos y el bloque se consideró como aleatorio.

Para la resolución del presente modelo de análisis de varianza se ha utilizado el análisis de varianza general del Genstat 12 (Payne et al, 2009b).

Se realizó también para todos los caracteres estudiados un análisis AMMI (Additive Main effects and Multiplicative Interaction) (Mandel, 1971; Gauch, 1988; Zobel et al, 1988; Gauch & Zobel 1997) el cual combina el análisis de varianza para los efectos principales aditivos (genotípico y ambiental) con el análisis por componentes principales para la interacción GxE, siendo ampliamente utilizado en ensayos de rendimiento.

El modelo AMMI es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + e_j + \sum \lambda_n c_{ik} d_{jk} + \theta_{ij} + b_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde  $\mu$  es la media total de todas las observaciones;  $g_i$  es el efecto del genotipo  $i$ -ésimo;  $e_j$  el efecto del ambiente  $j$ -ésimo;  $\lambda_n$  el autovalor del eje  $n$  del análisis por componentes principales de la interacción;  $c_{ik}$  es el vector propio unitario del genotipo  $i$ -ésimo asociado al eje  $n$  el cual puede ser interpretado como sensibilidades genotípicas;  $d_{jk}$  es el vector propio unitario del ambiente  $j$ -ésimo asociado al eje  $n$  y puede ser interpretado como caracterizaciones ambientales (van Eeuwijk et al, 2005);  $b_{jk}$  es el efecto del bloque  $k$ -ésimo en el ambiente  $j$ -ésimo y  $\theta_{ij}$  es el residual de la interacción. Los vectores unitarios son adimensionales, estando las unidades incluidas en el factor  $\lambda$ .

El ajuste de este modelo se realiza en dos etapas. En la primera etapa se estiman los efectos aditivos según el modelo utilizado para el análisis de varianza general. En la segunda etapa se genera una matriz de interacción GxE como residuo del modelo ANOVA y se descompone en valores singulares que permiten estimar los vectores unitarios genéticos y ambientales (Romagosa et al, 2008).

Las coordenadas genotípicas (IPCAn<sub>g</sub>) y ambientales (IPCAn<sub>e</sub>) se calculan multiplicando cada uno de los vectores unitarios por la raíz cuadrada del autovalor del eje sobre el que están definidos (IPCA, Interaction Principal Component Analysis).

Los grados de libertad para cada eje definido se calculan a partir de la fórmula propuesta por Gollob (1968):  $GI = g + a - 2n$ . Donde  $g$  es el número de genotipos,  $a$  el de ambientes y  $n$  el número de orden en la definición del eje en el proceso de componentes principales.

La suma de cuadrados para cada eje se obtuvo multiplicando la suma de cuadrados de la interacción GxE por el porcentaje de variación retenido en cada eje.

A partir de aquí se puede completar una tabla estándar de análisis de varianza para la definición del número de ejes que deben ser incluidos en el modelo (son significativos), con la obtención del estadístico F aproximado (Gollob, 1968) que compara los cuadrados medios de cada eje con el cuadrado medio del error experimental o residuo puro.

Para apoyar en la decisión del número de ejes a seleccionar se puede considerar un máximo de explicación de la interacción basado en el porcentaje de ruido que ésta pueda englobar (Gauch, 1992). Para dicho cálculo se multiplicó el cuadrado medio del error experimental por los grados de libertad de la interacción GxE, lo que nos define la suma de cuadrados atribuible al ruido presente en la interacción. El máximo de la suma de cuadrados de interacción, que se considera debe explicarse, se obtuvo restando a la suma de cuadrados de la interacción la suma de cuadrados atribuible a ruido.

Una forma alternativa muy sencilla para establecer el número de términos bilineales a retener consiste en determinar aquéllos que explican un porcentaje mayor que el esperado de acuerdo a la suma de cuadrados de GxE. Este valor corresponde a dividir 100% por el mínimo del número de genotipos menos uno o del número de ambientes menos uno (Romagosa et al, 2008).

El análisis AMMI permite la obtención de gráficos de dispersión de fácil interpretación en cuyos ejes se pueden representar tanto los efectos principales (en forma de medias genotípicas y ambientales) como las coordenadas de los ejes de explicación de la interacción (Voltas et al, 1999).

En general, cuando lo que se representa son los efectos principales y las coordenadas sobre un eje IPCA (normalmente IPCA1 por ser el que mayor porcentaje de interacción explica), el efecto de interacción de un genotipo en un determinado ambiente será positivo cuando las coordenadas genotípica y ambiental sobre el eje IPCA compartan el mismo signo, y negativo cuando sean de signos distintos. Si son dos ejes IPCA de interacción los que se representan, el valor de la interacción puede observarse en función de la distancia al origen de la proyección ortogonal del punto en el gráfico del genotipo sobre la recta que une el origen con el punto definido para el ambiente. El signo de la interacción será positivo si el ángulo formado entre los vectores del genotipo y del ambiente es agudo, y negativo si forman un ángulo obtuso (Voltas et al, 2002).

Desde un punto de vista práctico no es aconsejable la utilización de más de tres ejes de explicación de la interacción, pues interpretar con un número mayor de ejes es una tarea compleja y, muchas veces ineficaz; demostrando la experiencia que, pese a poder haberse obtenido significatividad en la variación explicada por el cuarto eje o superior, ésta suele estar dominada por ruido o no tener una interpretación biológica (Gauch & Zobel 1996). Lo más práctico, según la experiencia, es la utilización de dos ejes, siempre y cuando sumen la mayoría de la explicación del modelo.

### *2.3.3 Búsqueda de genotipos más adaptados a condiciones mediterráneas para un hipotético ajuste de las fases para optimizar el potencial de rendimiento*

Se buscarán las líneas que tengan un comportamiento óptimo para condiciones mediterráneas. Es decir, aquellas líneas que siendo lo suficientemente precoces para salvar la sequía terminal que se sufre en estos ambientes tengan optimizado el tiempo de llenado de grano para obtener mayores rendimientos (Slafer et al., 2005; Fischer, 2007, 2008; Miralles y Slafer, 2007) ). Para ello se elaborará un modelo construido bajo la premisa de que la sensibilidad a fotoperiodo podría cambiar entre la fase hasta encañado de la planta y elongación del tallo y que la variación entre fases puede ser altamente independiente (Slafer y Rawson 1994; Miralles y Richards 2000; González et al, 2002) habiéndose encontrado bajas correlaciones genéticas entre ambas fases.

Por tanto, se van a seleccionar las líneas que bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo corto (VS) poseen tiempos de encañado más cortos, diferenciándose entre líneas de primavera y de invierno, mientras que bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo poseen un tiempo de elongación del tallo mayor y, por tanto, según la hipótesis propuesta por Slafer et al (2005) un incremento del potencial de rendimiento.

Para lograrlo se ha construido un hipotético modelo en el que el tiempo térmico hasta encañado corresponde con los tiempos térmicos hasta encañado bajo condiciones de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización, simulando el inicio del ciclo bajo las latitudes mediterráneas, mientras que los tiempos térmicos de la fase de elongación del tallo serán tomados del ensayo bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo, ya que habiendo satisfecho las necesidades de vernalización de las

líneas que lo necesitan para inducir la floración, simula el fotoperiodo que tiene lugar durante la fase de elongación del tallo y espigado. De esta manera nos acercaremos al ciclo bajo las condiciones ambientales naturales de la meseta castellana, donde al inicio del ciclo bajo siembra otoñal, por la latitud donde está situada, este comienza con fotoperiodo largo y condiciones invernales, por tanto se sacia también la necesidad de vernalizar de las líneas invernales durante el periodo que va desde la siembra hasta el encañado, para finalmente producirse la elongación del tallo y el espigado bajo condiciones de día largo al final del ciclo.

Para lo cual se calculó el ratio  $SE_{VL}/J_{VC}$  utilizándose los tiempos térmicos en numerador y denominador en función de los ambientes señalados: tiempo térmico de la duración de la fase de elongación del tallo en el ambiente VL entre el tiempo térmico de la fase de encañado en VS.

Así, el modelo del tiempo térmico de espigado utilizando los parámetros mencionados anteriormente, queda de la siguiente manera:

$$\text{Espigado}(m) = J_{VS} + SE_{VL} + (F_{VL} - FL_{VL})$$

donde (m) indica el modelo;  $J_{VS}$  es el tiempo térmico desde nascencia hasta encañado en el ensayo VS;  $SE_{VL}$  es el tiempo térmico de la fase de elongación del tallo en el ensayo VL;  $F_{VL}$  es el tiempo térmico desde nascencia hasta espigado en el ensayo VL y  $FL_{VL}$  es el tiempo térmico desde nascencia hasta alcanzar el estado de hoja bandera en el ensayo VL. Se calcularon los parámetros tanto de tiempo térmico hasta espigado como de tiempo térmico hasta estado de hoja bandera, encañado y tiempo térmico de elongación del tallo principal de cada una de las líneas dentro del modelo.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo del modelo, calculándose también las correlaciones de Pearson entre las distintas fases introducidas en el modelo, comparándolas con las correlaciones obtenidas entre estas fases en los distintos ensayos realizados, para finalmente seleccionar las líneas cuyo ratio  $SE_{VL}/J_{VS}$  sea más elevado, dividiendo estas en líneas seleccionadas precoces y tardías en función de que el tiempo total de espigado en el modelo sea mayor o menor a la media poblacional en dicho modelo.

Se comprobó el comportamiento de estas líneas seleccionadas bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo, VL, por ser el ensayo realizado que más se ajusta a la realidad del ciclo en la meseta castellana, donde bajo siembra primaveral existe el cultivo está expuesto a fotoperiodo largo durante todo el ciclo de este y a condiciones de vernalización debido a las bajas temperaturas de los primeros meses del ciclo (febrero, marzo). Así mismo se estudió el comportamiento de las mismas bajo los modelos AMMI explicados en el apartado anterior para cada una de las fases introducidas en el modelo utilizado para su selección.

### 2.3.4 Metodología para la detección de caracteres cuantitativos (Quantitative trait loci, QTL) en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa y sus interacciones

#### 2.3.4.1 Detección de QTL de las variables estudiadas y su interacción con el ambiente (QTLxE)

El mapeo de caracteres cuantitativos se considera una herramienta importante dentro de la mejora genética de plantas. Los QTL se detectan dentro del genoma de una población biparental basándose en la asociación entre los marcadores moleculares polimórficos y el fenotipo de los individuos de dicha población.

De esta manera, se han utilizado modelos mixtos para la detección de QTL para cada carácter estudiado mediante un análisis multi-ambiental para buscar, además de los principales QTL de cada carácter en cada ambiente, si la interacción ambiental de cada uno de ellos es significativa. Todos estos modelos fueron llevados a cabo en el programa estadístico GenStat12 (Payne et al, 2009a).

Para llevar a cabo los modelos mixtos para el análisis multi-ambiental de QTL era necesario calcular por un lado los predictores genéticos (genetic predictors) y por otro los mejores estimadores lineales insesgados (Best Linear Unbiased Predictors, BLUPs) para cada carácter en cada uno de los ambientes estudiados (todos los ensayos).

Por tanto, los predictores genéticos de los efectos aditivos genéticos se calcularon en todas las posiciones de los marcadores genéticos utilizados en la elaboración del mapa genético de la población de estudio. Estos se definen como las covariables genotípicas que reflejan la composición genotípica de un genotipo en una localización específica de un cromosoma (Lynch & Walsh 1998). Estos predictores genéticos fueron introducidos en todos los modelos mixtos de análisis de QTL como las variables explicatorias de la variación genética.

Por su parte, los BLUPs para cada carácter fueron calculados para cada ensayo de este estudio utilizando el criterio de máxima probabilidad restringida (Restricted Maximum Likelihood (REML)) que incorpora Genestat 12 (Payne et al, 2009b). Para ello se utilizaron los testigos y parentales como efectos fijos y como efectos aleatorios los datos obtenidos para cada línea de la población para cada carácter en cuestión, así como la disposición en columnas y filas de cada ensayo y la repetición.

En el modelo más sencillo para la estima de los efectos de un QTL el fenotipo (P) equivale a la suma de los efectos del genotipo y el error (e), donde e incluye todas las interacciones, lo cual significa que los efectos del ambiente (E) y la interacción de este con los efectos genotípicos está incluida en el error.

$$P = e + G$$

Para la detección de los principales QTL se utilizaron modelos mixtos lineales. En un análisis preliminar se calcularon los componentes de la varianza de cada carácter en todos los ambientes estudiados, así como las heredabilidades en sentido estricto para cada carácter. Estas fueron calculadas como la relación entre la varianza genética y la varianza ambiental, donde el genotipo fue ajustado como la variable aleatoria. A continuación, se llevó a cabo la detección de QTL mediante un análisis multi-ambiental. Todos los estos modelos mixtos y el análisis de varianza se llevaron a cabo utilizando el software estadístico GenStat12 (Payne et al, 2009b).

Para el uso de modelos mixtos en el análisis de la interacción genotipo por ambiente, las diferencias ambientales fueron tomadas como termino fijado mientras que las diferencias genotípicas entre las distintas líneas se tomaron como termino aleatorio, donde el fenotipo era el resultado de la suma de los efectos ambientales fijados (E), los efectos aleatorios genotípicos (G) y la interacción genotipo por ambiente (GxE). De este modo el fenotipo (P) se podría resumir como:

$$P = \mu + E + G + GxE + e$$

Por tanto, la búsqueda de QTL a través de un análisis multiambiental mediante la utilización de modelos mixtos, consistió en dos pasos.

En el primero de ellos, había que calcular los efectos del término GE. Para ello se eligió el mejor modelo varianza-covarianza de cada carácter a lo largo de todos los ambientes estudiados para cada uno de ellos utilizando el criterio de información Bayesiana (Bayesian information criterion, BIC) (Hastie et al, 2001) para poder seleccionar en cada caso concreto el mejor modelo de entre los descritos por Boer et al (2007) de estructura varianza-covarianza: compound symmetry (CS), diagonal (DG), uniform covariance and unequal variance (UCH) and first-order factor analytic model (FA1).

En un segundo paso, los predictores genéticos y las matrices de varianza-covarianza se utilizaron para un escaneo completo del genoma en busca de los QTL significativos para cada carácter. Para ello se realizó un análisis preliminar mediante mapeo por intervalo simple (“marker regression” o “Simple Interval Mapping, SIM), de manera que los QTL significativos en este análisis preliminar se tomaron como cofactores, añadiéndose como términos fijados, en el mapeo por intervalo compuesto (“Composite Interval Mapping”, CIM), para ajustarse al siguiente modelo:

$$y_{ijl} = \mu + E_j + \sum_{l \in L} x_{il} \alpha_{jl} + GxE_{ij}$$

donde  $y_{ijl}$  es el valor del carácter del genotipo (línea)  $i$  en el ambiente  $j$ ,  $L$  es el conjunto de QTL,  $E_j$  representa los principales efectos ambientales,  $x_{il}$  son los predictores genéticos aditivos del genotipo  $i$  para el locus  $l$  y  $\alpha_{jl}$  son sus efectos asociados. El término  $GxE_{ij}$  se asumió como la matriz varianza-covarianza que sigue una distribución multi-Normal que fue calculada para cada carácter según se ha descrito previamente.

El umbral de detección de QTL se calculó según lo describieron Cheverud (2001) y Li & Ji (2005). El intervalo de confianza corresponde a las posiciones correspondientes a:

$$[-\log_{10}(P_{\max})-2], -\log_{10}(P_{\max})+2].$$

#### 2.3.4.2 Búsqueda de interacciones entre los QTL detectados (QTLxQTL)

La búsqueda de interacciones entre QTL se realizó por separado en cada uno de los ensayos para cada carácter estudiado. Para ello se utilizaron modelos mixtos a través del procedimiento REML de Genstat 12.

De esta manera, se tomaron como efectos fijados los QTL que fueron significativos en el análisis multi ambiental de QTL de cada ensayo y los genotipos como efectos aleatorios para calcular los efectos mediante este procedimiento y posteriormente se fueron comprobando cuales de estas interacciones eran significativas, añadiendo éstas como elementos fijados.

Finalmente, se calcularon los efectos aditivos de las interacciones significativas tanto dentro del modelo, como la interacción por separado.

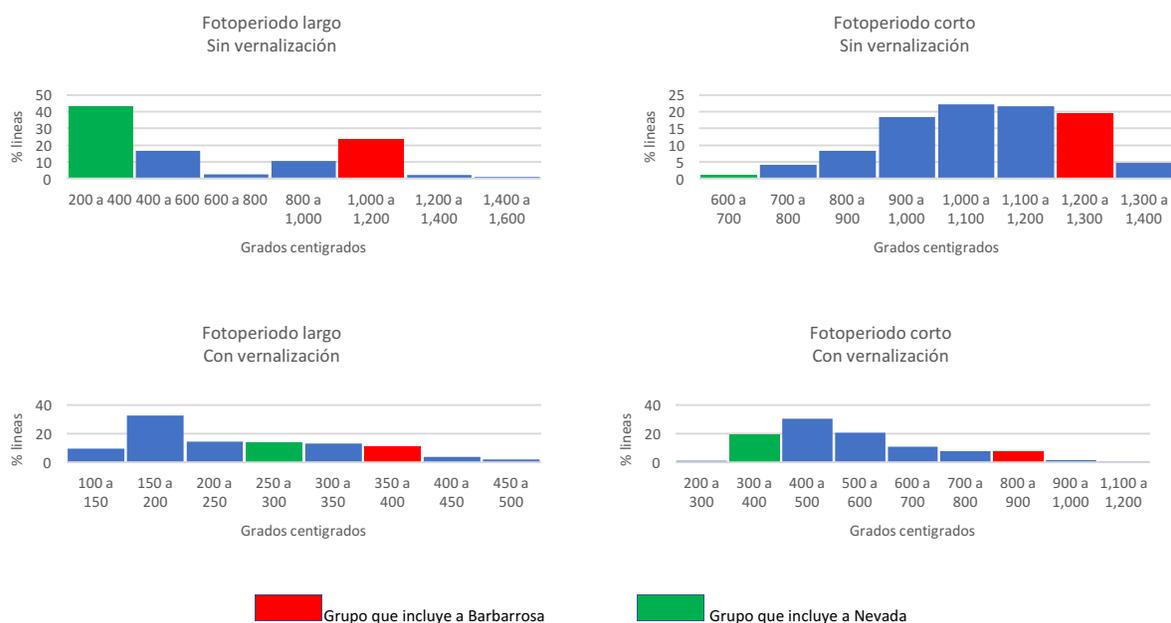
### 3. Resultados

#### 3.1 Resumen parámetros estudiados

Así como era de esperar el ambiente que condujo a una aceleración del desarrollo es VL, en el que todas las plantas completaron el desarrollo hasta espigado entre 6 y 9 hojas totales y espigaron en un tiempo térmico entre 525 y 1438°C. Las mayores diferencias se observaron en el ensayo L, ya que todas las plantas que no necesitan vernalizar se beneficiaron de la aceleración por fotoperiodo y espigaron a los 55-60 días (unos 700°C) y 6,7 hojas, mientras que las líneas invernales que necesitan vernalizar espigaron a los 1800°C (unos 133 días) con hasta 15 hojas. Esta dispersión de datos también queda reflejada en las mayores varianzas de este ambiente (tabla 8). Las condiciones menos inductivas para la floración correspondieron al ambiente S, en el que se observaron las líneas más tardías con tiempos térmicos de hasta 2000°C para espigado y 15 hojas.

De tal manera que los tiempos térmicos más cortos desde nascencia a encañado de la planta corresponden efectivamente al ambiente más inductivo, VL, y los más largos a VS, donde las plantas primaverales con sensibilidad a fotoperiodo largo llegaron a tener tiempos de encañado de hasta 1047°C con unas 6 hojas. En cuanto a los días necesarios desde la nascencia hasta el inicio de floración de cada una de las líneas este oscila entre 65 y 111, 107 y 159, 53 y 133 y entre 113 y 139 para VL, VS, L y S respectivamente.

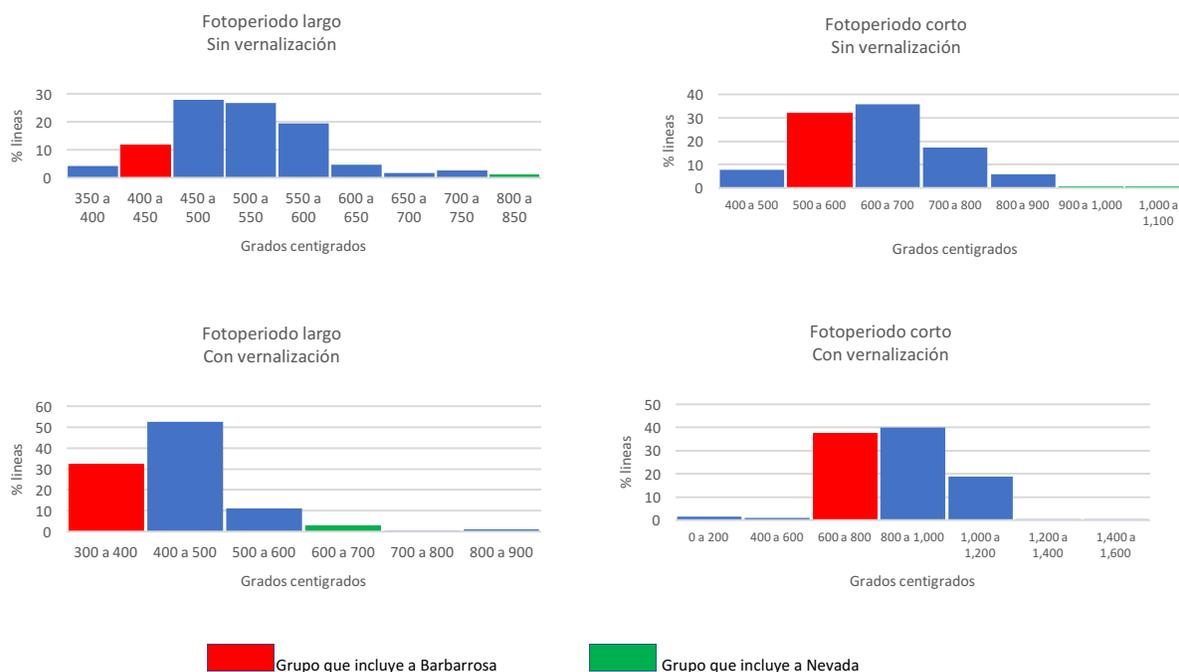
El resumen de los caracteres estudiados así como los valores para los dos parentales queda reflejado en la tabla 8.



**Gráfico 4.** Frecuencias relativas de del tiempo térmico del encañado de las plantas en los ensayos realizados bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo controlados.

Por tanto, si comparamos las distribuciones de las frecuencias relativas de cada uno de los parámetros medidos (gráficos 4 a 7), podemos observar que existe una segregación para cada uno de ellos, de manera que estos caracteres son válidos para su utilización para la detección de QTL responsables de dichos caracteres.

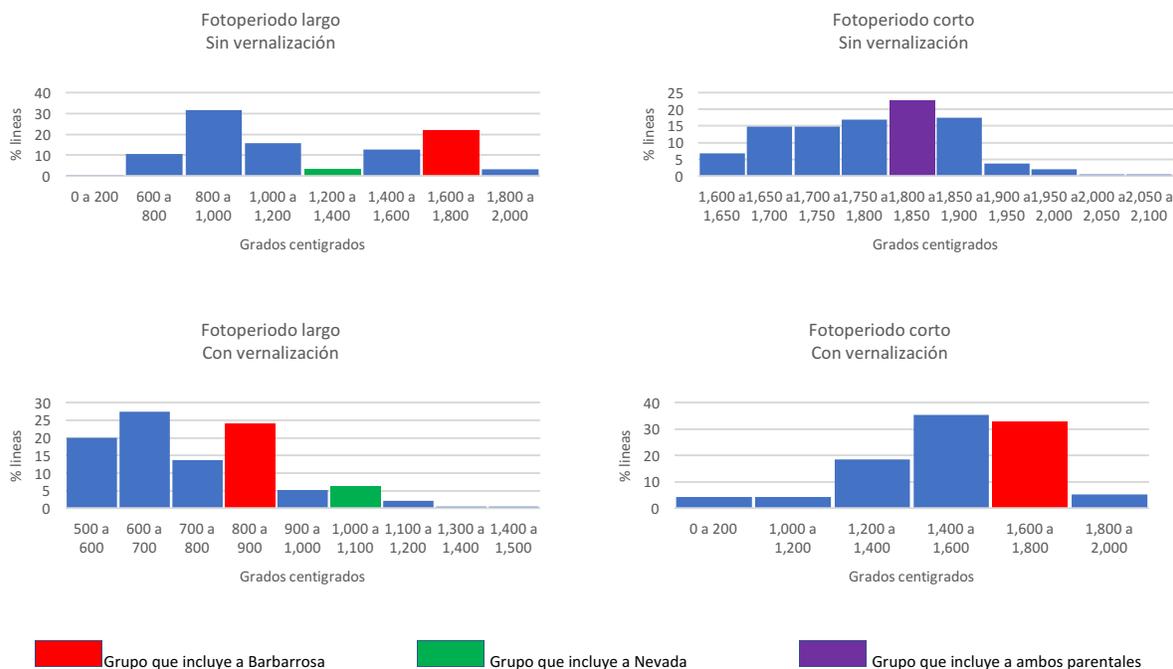
En este sentido nos encontramos que el ensayo sin vernalizar y fotoperiodo largo divide a las líneas en dos grupos para todos los caracteres analizados (gráficos 6 y 7), mientras que en el resto de ensayos existe una distribución normal para estos caracteres. Esto se le ha achacado principalmente a la necesidad o no que tienen las líneas de vernalizar para que se induzca la floración, de manera que las líneas situadas más próximas al hipotético grupo que incluye a Nevada corresponden a las líneas que no necesitan vernalizar, al igual que este parental, mientras que las líneas más próximas a Barbarrosa corresponderían a las líneas invernales.



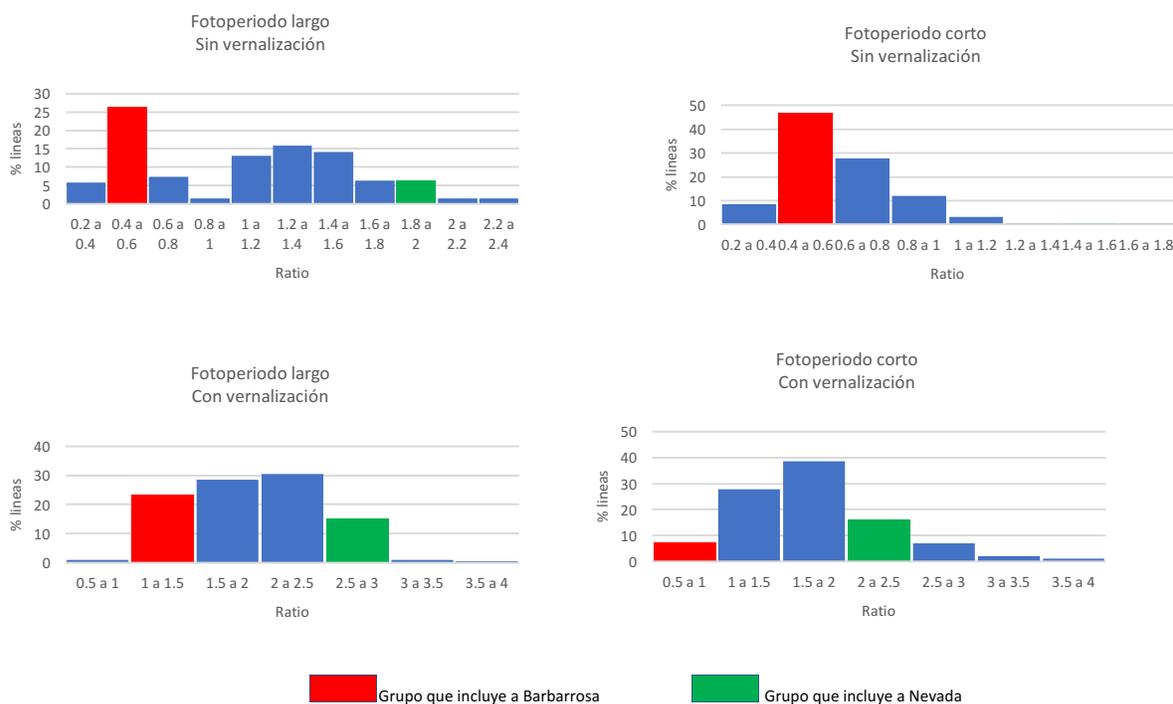
**Gráfica 5.** Frecuencias relativas de la integral térmica correspondiente al tiempo térmico de elongación del tallo principal de las plantas, que comprende desde el momento de encañado hasta el momento en el que este alcanza el estado de hoja bandera tomado en los ensayos de invernadero realizados bajo distintas condiciones de vernalización y fotoperiodo.

Aunque cabe destacar que para el carácter de tiempo térmico desde encañado hasta alcanzar el estado de hoja bandera en el tallo principal, tiempo térmico de elongación del tallo principal, no se detectó este efecto en este ambiente, ni en ningún otro, de manera que estas condiciones podrían ser válidas para detectar hábitos invernales o primaverales respecto a los demás caracteres, a excepción de este. Pero hemos de destacar que este efecto si fue detectado para el ratio entre la duración de la fase elongación del tallo principal y la de encañado (SE/J).

También nos encontramos que en el ambiente con fotoperiodo corto sin vernalización ambos parentales tienen tiempos similares de espigado, encontrándolos en el mismo grupo en el gráfico de frecuencia (gráfico 6).



**Gráfico 6.** Frecuencias relativas de la integral térmica correspondiente al tiempo térmico de floración del tallo principal de las plantas tomado en los ensayos de invernadero realizados bajo distintas condiciones de vernalización y fotoperiodo.



**Gráfico 7.** Frecuencias relativas del ratio entre la duración de la fase de elongación del tallo y la fase de encañado (SE/J) tomado en el ensayo de invernadero realizados bajo distintas condiciones de vernalización y fotoperiodo.

E	Caracter	Mínimo	Media	Máximo	Barbarrosa	Nevada	Rango	Desviación Standard	Error Standard de la media	Varianza	Coefficiente de variación
L	Hojas basales	2,191 hojas	5,03 hojas	10,42 hojas	9,64 hojas	3,58594 hojas	8,228	2,678	0,197	7,174	53,24
	Espigado	52,61 días	88,31 días	133,2 días	122,41 días	88,57 días	80,62	25,41	1,873	645,6	28,77
	Encañado	221,9 °C	634 °C	1497 °C	1156,58 °C	370,73 °C	1276	341,5	25,11	116647	53,87
	Fase de Elongación	427,4 °C	518,5 °C	639,3 °C	499,48 °C	681,66 °C	211,8	40,4	2,986	1632	7,791
	Espigado	685,5 °C	1201 °C	1850 °C	1688,68 °C	1204,42 °C	1165	366,9	27,05	134610	30,56
	Estado de hoja Bandera	648,3 °C	1140 °C	1756 °C	1607,7 °C	1201,96 °C	1108	366,2	27,07	134083	32,11
	Nº de hojas totales	6,116 hojas	9,825 hojas	15,82 hojas	14,85 hojas	11,61 hojas	9,702	3,227	0,237	10,41	32,84
	Nº de hojas Fase Elongación	3,66 hojas	4,822 hojas	6,386 hojas	5,05 hojas	6,97 hojas	2,726	0,508	0,0374	0,258	10,54
	SE/J	0,328	1,074	2,254	0,43	1,84	1,927	0,497	0,0367	0,247	46,23
	Filocrono	92,91 °C/Nº hojas	123,3 °C/Nº hojas	158,9 °C/Nº hojas	113,74 °C/Nº hojas	103,71 °C/Nº hojas	65,98	10,02	0,739	100,5	8,129
S	Hojas basales	4,887 hojas	7,291 hojas	9,373 hojas	9,11 hojas	4,71 hojas	4,486	0,973	0,0715	0,947	13,35
	Espigado	115,1 días	125,4 días	139,9 días	128,52 días	127,36 días	24,82	5,056	0,372	25,56	4,031
	Encañado	776,8 °C	1081 °C	1348 °C	1244,05 °C	690,81 °C	571,6	124,6	9,161	15524	11,53
	Fase de Elongación	489,5 °C	633,7 °C	832,5 °C	543,66 °C	991,55 °C	342,9	73,64	5,429	5423	11,62
	Espigado	1624 °C	1782 °C	2022 °C	1828,13 °C	1809,35 °C	398,2	77,51	5,699	6009	4,35
	Estado de hoja Bandera	1570 °C	1712 °C	1952 °C	1778,33 °C	1722,73 °C	382,1	73,2	5,396	5358	4,275
	Nº de hojas totales	10,83 hojas	13,01 hojas	14,91 hojas	14,64 hojas	13,01 hojas	4,087	1,031	0,0758	1,062	7,921
	Nº de hojas Fase Elongación	4,811 hojas	5,735 hojas	7,035 hojas	5,6 hojas	7,35 hojas	2,224	0,322	0,0237	0,104	5,611
	SE/J	0,374	0,602	1,072	0,44	1,44	0,697	0,139	0,0103	0,0195	23,17
	Filocrono	123,6 °C/Nº hojas	137,5 °C/Nº hojas	161,4 °C/Nº hojas	326,37 °C/Nº hojas	246,1 °C/Nº hojas	37,75	7,663	0,563	58,73	5,574

Tabla 8. Resumen de los parámetros estudiados en los distintos ambientes del estudio.

E	Caracter	Mínimo	Media	Máximo	Barbarrosa	Nevada	Rango	Desviación Standard	Error Standard de la media	Varianza	Coefficiente de variación
VL	Hojas basales	2,608 hojas	2,986 hojas	3,658 hojas	3,6 hojas	3,29 hojas	1,05	0,257	0,0189	0,0661	8,607
	Espigado	66,3 días	83,31 días	130,5 días	87,22 días	100,71 días	64,16	11,4	0,838	130	13,69
	Encañado	131,1 °C	246,5 °C	447,9 °C	372,87 °C	273,86 °C	316,8	81,55	5,996	6651	33,08
	Fase de Elongación	322,6 °C	445,1 °C	846,1 °C	376,96 °C	706 °C	523,5	74,02	5,472	5479	16,63
	Espigado	525,6 °C	757,5 °C	1438 °C	821,81 °C	1007,26 °C	912,1	155,7	11,44	24231	20,55
	Estado de hoja Bandera	499,5 °C	691,6 °C	1355 °C	744,22 °C	962,32 °C	855,6	150,5	11,13	22660	21,77
	Nº de hojas totales	6,015 hojas	6,881 hojas	9,124 hojas	7,45 hojas	7,69 hojas	3,108	0,67	0,0493	0,449	9,737
	Nº de hojas Fase Elongación	3,481 hojas	3,901 hojas	4,854 hojas	3,68 hojas	4,1 hojas	1,374	0,215	0,0158	0,0461	5,504
	SE/J	0,991	1,941	3,381	1,01	2,58	2,39	0,493	0,0364	0,243	25,39
	Filocrono	84,03 °C/Nº hojas	109,4 °C/Nº hojas	161,8 °C/Nº hojas	223,51 °C/Nº hojas	245,81 °C/Nº hojas	77,78	14,34	1,054	205,7	13,11
VS	Hojas basales	3,578 hojas	4,684 hojas	7,584 hojas	6,16 hojas	4,22 hojas	4,006	0,657	0,0483	0,432	14,03
	Espigado	114,4 días	135,8 días	155,5 días	143,71 días	135,9 días	41,1	8,868	0,663	78,64	6,53
	Encañado	335,9 °C	539,3 °C	1047 °C	789,99 °C	352,42 °C	711,1	133,8	9,834	17891	24,8
	Fase de Elongación	654,7 °C	867,2 °C	1264 °C	779,57 °C	867,05 °C	609,5	99,07	7,344	9816	11,42
	Espigado	1553 °C	1564 °C	1582 °C	1569,46 °C	1564,33 °C	29,05	4,722	0,353	22,3	0,302
	Estado de hoja Bandera	1184 °C	1433 °C	1743 °C	1533 °C	1432,53 °C	558,9	108,6	8,051	11796	7,578
	Nº de hojas totales	7,63 hojas	10,45 hojas	14,27 hojas	12,16 hojas	10,65 hojas	6,637	1,7	0,125	2,889	16,27
	Nº de hojas Fase Elongación	3,743 hojas	5,772 hojas	8,86 hojas	5,57 hojas	6,5 hojas	5,117	1,135	0,0834	1,287	19,66
	SE/J	0,625	1,696	3,106	0,99	2,46	2,481	0,437	0,0324	0,191	25,75
	Filocrono	110,1 °C/Nº hojas	152,7 °C/Nº hojas	205 °C/Nº hojas	282,01 °C/Nº hojas	240,65 °C/Nº hojas	94,95	24,45	1,828	598	16,01

Tabla 8. Continuación. Resumen de los parámetros estudiados en los distintos ambientes del estudio.

### 3.2 Correlaciones entre caracteres derivados de número de hojas y tiempo térmico

Las correlaciones entre número de hojas y duración de cada una de las fases resultaron significativamente altas, tal y como observamos en la tabla 9, sobre todo en la fase hasta alcanzar hoja bandera frente al número de hojas totales y en la fase hasta encañado frente al número de hojas basales. En el caso de la fase de elongación del tallo estas correlaciones tuvieron coeficientes más bajos, especialmente en los ensayos sin tratamiento de vernalización, pero en todos ellos se ha encontrado una correlación significativa, superior al 50%.

Hojas vs. tiempo térmico	L	S	VL	VS	General
Fase desde nascencia hasta encañado	0,982	0,9322	0,8889	0,9661	0,9664
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Fase de elongación del tallo	0,6636	0,5928	0,7255	0,7571	0,7681
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Fase hasta estado de hoja bandera	0,9753	0,7337	0,8499	0,9331	0,9366
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

**Tabla 9.** Correlaciones entre el parámetro número de hojas y duración en tiempo térmico en las fases desde nascencia hasta encañado de la planta, fase de elongación del tallo y la fase que va desde nascencia hasta alcanzar hoja bandera en cada uno de los ambientes estudiados. El valor superior corresponde al coeficiente de correlación mientras que el inferior corresponde a su grado de significación.

Por tanto, existe una correlación positiva entre número de hojas y duración de cada una de las fases independiente tanto de fotoperiodo como del tratamiento de vernalización.

### 3.3 Correlaciones entre fases de pre-espigado/espigado

Por el contrario, al observar la tabla 10, la cual muestra la correlación entre las distintas fases: hasta encañado frente fase de elongación del tallo principal y entre la duración de las fases hasta estado de hoja bandera y espigado, observamos que en el último caso la correlación positiva entre ambas fases es muy clara bajo todos los ambientes estudiados, mientras que entre las fases de pre-espigado esta correlación no es tan clara, de manera que se han obtenido resultados muy variables no sólo entre los ambientes de estudio, sino también en función de si hablamos del número de hojas de ambas fases o la duración en tiempo térmico de estas, a pesar de que las correlaciones entre tiempo térmico/número de hojas en cada fase de estas correlaciones fueran significativamente elevadas.

Esta correlación no es tan elevada entre estas dos fases especialmente bajo los tratamientos de fotoperiodo largo (L) y bajo fotoperiodo corto con tratamiento de vernalización (VS) para la duración en tiempo térmico de ambas fases. Dos ensayos totalmente opuestos en cuanto a los tratamientos aplicados, pero que además si nos fijamos en estas correlaciones para número de hojas entre ambas fases, estas fueron mucho mayores. Además, entre estas dos fases nos encontramos que tan sólo bajo día corto, sin vernalización (S) la correlación entre ambas fases es negativa, mismo efecto encontrado en lo que respecta a la duración del tiempo de elongación del tallo y tiempo total hasta espigado en este mismo ambiente. De tal manera que, bajo estas condiciones tan poco inductivas (ver tabla 8 donde se muestra los elevados valores obtenidos en la fase hasta encañado), el tiempo total de espigado no se vio afectado finalmente por esta falta de inducción del espigado, sino que ésta afectó a la fase de elongación del tallo en detrimento de ésta.

Correlaciones entre fases		L	S	VL	VS	General
Encañado vs Elongación	Hojas	0,564 <0,001	-0,2253 0,0019	0,8772 <0,001	0,9411 <0,001	0,9448 <0,001
	Duración	0,1828 0,0123	-0,8413 <0,001	0,5621 <0,001	0,181 <0,001	0,199 <0,001
Encañado vs espigado		0,9674 <0,001	0,7421 <0,001	0,8804 <0,001	0,8579 <0,001	0,8675 <0,001
Elongación del tallo vs espigado		0,3418 <0,001	-0,3013 <0,001	0,8334 <0,001	0,6146 <0,001	0,6162 <0,001
Hoja Bandera vs espigado		0,9891 <0,001	0,9699 <0,001	0,9716 <0,001	0,9874 <0,001	0,9886 <0,001
Ratio SE/J vs espigado		-0,9124 <0,001	-0,5072 <0,001	-0,5803 <0,001	-0,6542 <0,001	-0,6711 <0,001

**Tabla 10.** Correlaciones entre en las fases desde nascencia hasta encañado de la planta y fase de elongación del tallo, tanto para número de hojas como duración en tiempo térmico de cada una de ellas y entre la fase que va desde nascencia hasta alcanzar hoja bandera y el tiempo térmico total de espigado en cada uno de los ambientes estudiados, así como la correlación que existe con el tiempo de espigado con cada una de las fases estudiadas. El valor superior corresponde al coeficiente de correlación mientras que el inferior corresponde a su grado de significación.

Por otro lado, si observamos las correlaciones existentes entre el tiempo total de espigado y el ratio SE/J vemos que en todos los casos esta correlación es negativa, a pesar que estas correlaciones son positivas al analizar las distintas fases por separado. Por lo que un ajuste entre la duración de las fases elongación del tallo y encañado, en donde la duración de la elongación del tallo es superior, conlleva a una mayor precocidad en tiempo de espigado bajo estas condiciones, a pesar de que al aumentar por separado cada una de las fases supone un espigado más tardío.

### 3.4 ANOVA y AMMI: Análisis de variancia y sus interacciones

En cuanto a los resultados obtenidos al realizar el análisis de variancia, cabe destacar que en todos los casos el modelo explica más del 80% de la variancia, destacando el caso del espigado donde  $R^2$  alcanza el 98,37% de la explicación del modelo, mientras que son los parámetros relacionados con la elongación del tallo principal donde encontramos menores valores, teniendo el azar mayor peso en este análisis de variancia (tabla 11).

		df	SS	MS	F	F_prob	R2 %
Espigado	<b>Total</b>	2279	455335068	199796			
	<b>Modelo</b>	759	447917880	590142	113,37	0	98,37
	<b>Genotipos</b>	189	58404057	309016	59,36	0	12,83
	<b>Ambientes</b>	3	334676477	111558826	1280,76	0	73,5
	<b>Repeticiones</b>	8	696826	87103	16,73	0	0,15
	<b>GxE</b>	558	54837346	98275	18,88	0	12,04
	<b>Error</b>	1291	6720361	5206			1,48
Fase de Encañado	<b>Total</b>	2279	319105266	140020			
	<b>Modelo</b>	759	304736616	401498	43,49	0	95,5
	<b>Genotipos</b>	189	50987332	269774	29,22	0	15,98
	<b>Ambientes</b>	3	201547248	67182416	919,26	0	63,16
	<b>Repeticiones</b>	8	584667	73083	7,92	0	0,18
	<b>GxE</b>	567	52202036	92067	9,97	0	16,36
	<b>Error</b>	1493	13783983	9232			4,32
Fase de elongación del Tallo Principal	<b>Total</b>	2279	95500564	41905			
	<b>Modelo</b>	759	84896744	111853	14,68	0	88,9
	<b>Genotipos</b>	189	11147779	58983	7,74	0	11,67
	<b>Ambientes</b>	3	59512764	19837588	945,47	0	62,32
	<b>Repeticiones</b>	8	167854	20982	2,75	0,00509	0,18
	<b>GxE</b>	564	14236201	25241	3,31	0	14,91
	<b>Error</b>	1370	10435965	7617			10,93
Estado de Hoja Bandera	<b>Total</b>	2279	449172989	197092			
	<b>Modelo</b>	759	441107630	581169	108,6	0	98,2
	<b>Genotipos</b>	189	60224954	318651	59,55	0	13,41
	<b>Ambientes</b>	3	321116397	107038799	1201,42	0	71,49
	<b>Repeticiones</b>	8	712750	89094	16,65	0	0,16
	<b>GxE</b>	564	59766279	105969	19,8	0	13,31
	<b>Error</b>	1374	7352609	5351			1,64

**Tabla 11.** ANOVA para cada uno de los caracteres estudiados donde se muestra tanto los efectos del modelo, como los efectos de las variables genotípicas y ambientales por separado, como su interacción.

		df	SS	MS	F	F_prob	R2 %
<b>Nº de Hojas Basales</b>	<b>Total</b>	2279	11885	5,2			
	<b>Modelo</b>	759	11329	14,9	41,03	0	95,32
	<b>Genotipos</b>	189	2810	14,9	40,86	0	23,64
	<b>Ambientes</b>	3	5303	1767,6	1232,5	0	44,62
	<b>Repeticiones</b>	8	11	1,4	3,94	0,00013	0,09
	<b>GxE</b>	567	3216	5,7	15,59	0	27,06
	<b>Error</b>	1496	544	0,4			4,58
<b>Nº de Hojas Caulinares</b>	<b>Total</b>	2279	3941	1,73			
	<b>Modelo</b>	759	3273	4,31	9,67	0	83,05
	<b>Genotipos</b>	189	833	4,41	9,89	0	21,14
	<b>Ambientes</b>	3	1350	450,13	795,47	0	34,26
	<b>Repeticiones</b>	8	5	0,57	1,27	0,25532	0,13
	<b>GxE</b>	567	1089	1,92	4,31	0	27,63
	<b>Error</b>	1489	664	0,45			16,85
<b>Hojas Totales</b>	<b>Total</b>	2279	21376	9,4		*	
	<b>Modelo</b>	759	20523	27	48,02	0	96,01
	<b>Genotipos</b>	189	4603	24,4	43,25	0	21,53
	<b>Ambientes</b>	3	10823	3607,7	2987,46	0	50,63
	<b>Repeticiones</b>	8	10	1,2	2,14	0,02914	0,05
	<b>GxE</b>	567	5097	9	15,97	0	23,84
	<b>Error</b>	1497	843	0,6			3,94
<b>Filocrono</b>	<b>Total</b>	2279	714713	314			
	<b>Modelo</b>	759	604604	797	10,46	0	84,59
	<b>Genotipos</b>	189	104272	552	7,24	0	14,59
	<b>Ambientes</b>	3	351234	117078	168,72	0	49,14
	<b>Repeticiones</b>	8	5551	694	9,11	0	0,78
	<b>GxE</b>	564	149099	264	3,47	0	20,86
	<b>Error</b>	1373	104557	76			14,63
<b>Ratio SE/J</b>	<b>Total</b>	2279	1439,5	0,63			
	<b>Modelo</b>	759	1225,5	1,61	10,45	0	85,13
	<b>Genotipos</b>	189	307,4	1,63	10,52	0	21,35
	<b>Ambientes</b>	3	678,1	226,03	809,36	0	47,11
	<b>Repeticiones</b>	8	2,2	0,28	1,81	0,07168	0,18
	<b>GxE</b>	564	240	0,43	2,75	0	16,67
	<b>Error</b>	1370	211,8	0,15			14,71

**Tabla 11. Continuación.** ANOVA para cada uno de los caracteres estudiados donde se muestra tanto los efectos del modelo, como los efectos de las variables genotípicas y ambientales por separado, como su interacción

Por otro lado, si observamos la disección de los distintos componentes de la varianza, podemos ver como en todos los casos el factor ambiental tiene más peso que el genotípico, ya que los distintos

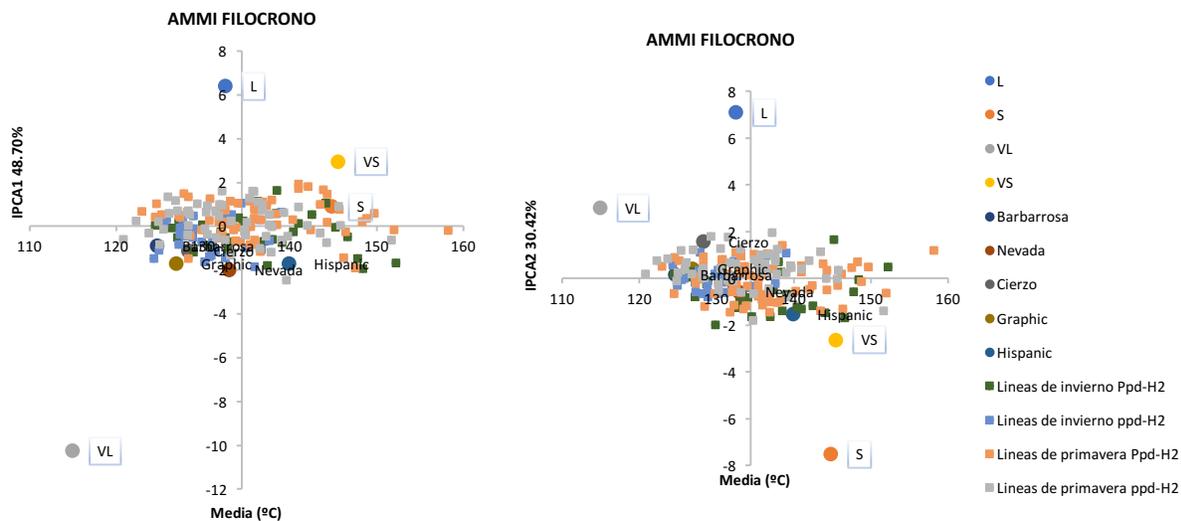
ambientes de este estudio fueron consistieron en una serie de ambientes extremos, lo cual queda reflejado con estos resultados. Únicamente para el ratio SE/J el porcentaje de explicación de la varianza por parte de los genotipos fue superior a la interacción de estos por el ambiente, mientras que en el otro sentido, para los parámetros relacionados con el número de hojas estas interacciones fueron más elevadas.

En este mismo sentido observamos que, incluso la interacción de los genotipos por la variable ambiental, tiene mayor peso que los propios genotipos por separado, y, así mismo, vemos reflejado este mismo efecto al observar los gráficos AMMI de cada uno de los caracteres. En este sentido observamos que tanto para la representación de los ejes IPCA1 como IPCA2 frente a las medias (IPCA0), nos encontramos con ambientes claramente diferentes, muy distantes en dichas representaciones (gráficos 8 a 13), pudiendo claramente definir las covariables ambientales: fotoperiodo y vernalización para cada carácter. Pero también encontramos una clara separación entre las líneas con necesidad a de vernalizar para espigar/encañar. Por este motivo en los gráficos de los distintos modelos AMMI se han añadido las covariables genéticas para cada línea en función de su necesidad de vernalización: líneas primaverales y líneas invernales. Además, dentro de cada uno de estos grupos se ha querido reflejar el alelo de *PPD-H2* que porta cada una de ellas.

Debido a la alta correlación existente en las distintas fases entre número de hojas y duración de las mismas en tiempo térmico, se ha optado por realizar la interpretación de los modelos AMMI solamente para la duración en tiempo térmico de distintas fases estudiadas, para una más fácil interpretación de los resultados en la comparativa con el tiempo térmico de la fase de tiempo total de espigado. Además, en cuanto a los gráficos, debido a la alta explicación de la interacción GxE del eje IPCA1 en todos los casos, estos se han realizado utilizando IPCA1 e IPCA2 frente a las medias poblacionales en el modelo IPCA0, cortando los primeros ejes en la media global de dichas medias poblacionales. Si observamos las medias poblacionales en la mayoría de los casos distinguimos una tendencia a la separación entre las líneas con genotipo primaveral frente a las que poseen genotipo invernal, de manera que, si observamos estas medias frente al IPCA1 especialmente de los caracteres de encañado, estado de hoja bandera y espigado percibimos una clara separación de los genotipos en dos grupos.

En estas gráficas, en general, podemos ver claramente que las medias ambientales quedan separadas en dos en función de la media poblacional. Los ambientes en los que se aplicó un tratamiento de fotoperiodo largo quedan al lado derecho de la media poblacional, mientras que las medias ambientales al aplicar fotoperiodo corto fueron muchos mayores, quedando al lado izquierdo a excepción de los caracteres de encañado y ratio entre elongación del tallo principal y encañado (SE/J), donde esta separación se produjo en función del tratamiento de vernalización como se describe más adelante.

Sin embargo, si nos fijamos en el filocrono estas gráficas tan solo nos sirven para ver lo distantes que son unos ambientes de otros, sin llegar a ningún tipo de conclusión en cuanto a los genotipos (gráficos 8). Aunque si observamos que bajo condiciones de fotoperiodo largo hay una tendencia a desarrollar una hoja en menor tiempo que bajo condiciones de fotoperiodo corto, a pesar de que el porcentaje de explicación tanto de IPCA1 e IPCA2 son relativamente elevados (48,7 y 30,42% respectivamente), algo similar a lo que ocurre con la elongación del tallo principal, como veremos más adelante. Además, estos dos parámetros coinciden con los que poseen menor explicación de la interacción GxE por parte de IPCA1.

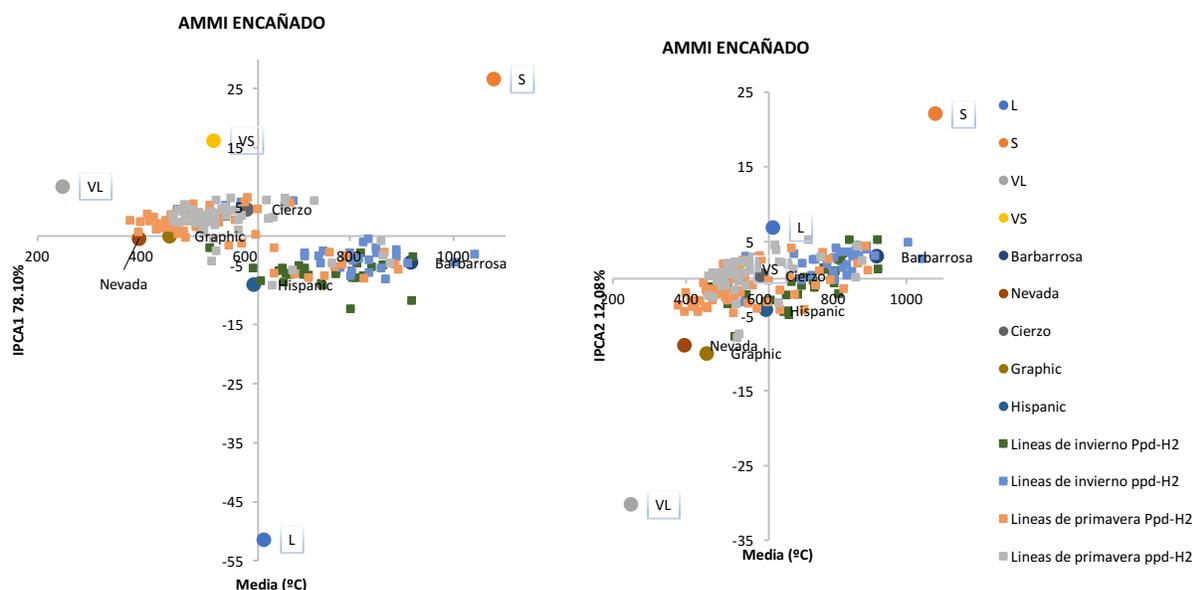


**Gráficos 8.** Graficas AMMI para filocrono, donde quedan representados tanto los distintos ambientes del estudio, como los parentales Nevada y Barbarrosa, los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic y las líneas procedentes de la población diferenciando las líneas en cuatro grupos: con genotipo invernal y ambos alelos de *PPD-H2* y genotipo primaveral haciendo esta misma distinción.

A diferencia de estos caracteres, si existió una explicación para el resto como se describe a continuación.

### 3.4.1 Interpretación AMMI para la duración de las fases desde nascencia a encañado y elongación del tallo principal

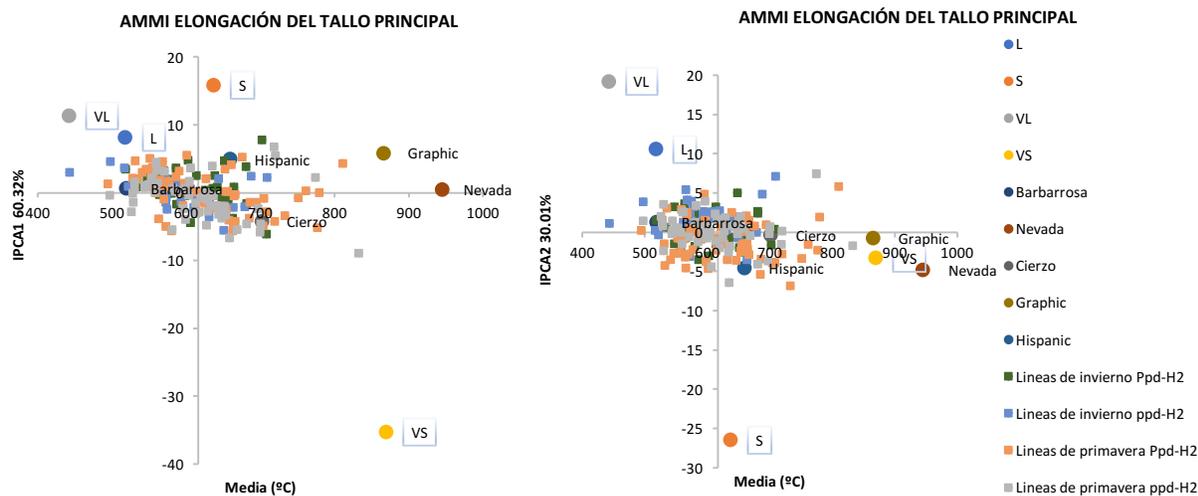
En el caso de encañado observamos una clara separación de las medias poblacionales del modelo separando las líneas con genotipo primaveral de las que poseen genotipo invernal (gráficos 9). Las líneas con genotipo típicamente primaveral tiene una tendencia más próxima a la media de los ambientes con tratamiento de vernalización, interaccionando con ambos ambientes independientemente del fotoperiodo, ya que prácticamente todas las líneas de este grupo se encuentran en el mismo cuadrante de la gráfica frente al IPCA1, el cual explica la mayoría de la interacción genotipo por ambiente, el 78,1%, frente al 12,08% de IPCA2. Además encontramos grandes diferencias entre los ambientes. Los ambientes con tratamiento de vernalización se encuentran más próximos entre sí, (mismo cuadrante, por debajo de la media poblacional). Mientras que en el caso de los ambientes sin vernalizar, las plantas alargaron el ciclo encontrándonos que las medias residuales ambientales se situaron por encima de la media. El ambiente sin vernalizar fotoperiodo largo (L) se sitúa en la parte más negativa de IPCA1 separando las variedades en dos grandes grupos las que precisan vernalizar en el segundo cuadrante y las que no en el cuarto..



**Gráficos 9.** Gráficas AMMI para la fase de tiempo térmico desde nascencia hasta encañado de las distintas, donde quedan representados tanto los distintos ambientes del estudio, como los parentales Nevada y Barbarrosa, los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic y las líneas procedentes de la población diferenciando las líneas en cuatro grupos: con genotipo invernal y ambos alelos de *PPD-H2* y genotipo primaveral haciendo esta misma distinción.

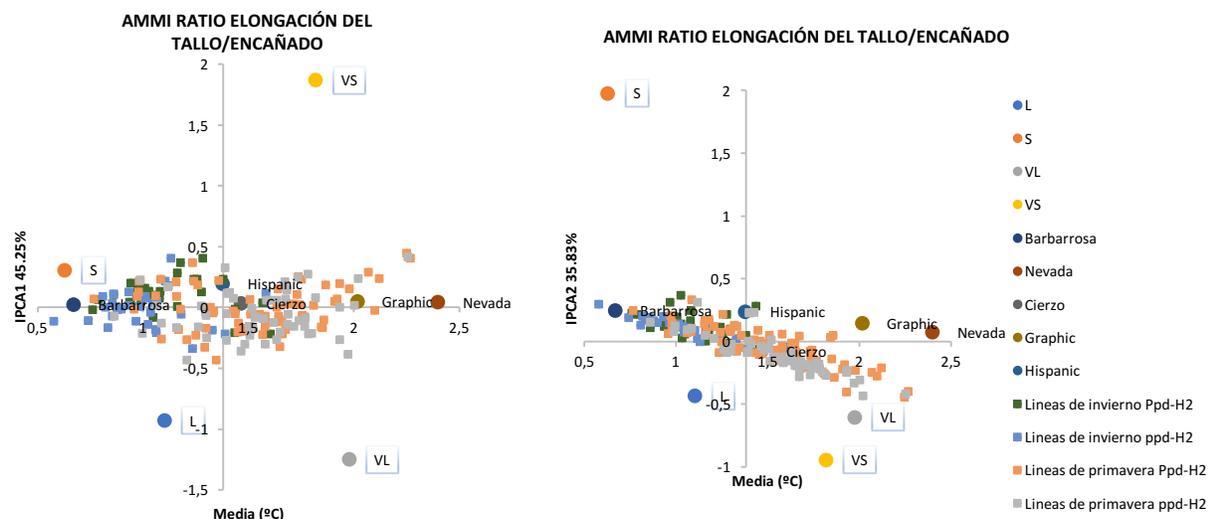
Por su parte, para la fase de elongación del tallo principal (Gráficos 10) no se encontró diferencia en cuanto a las medias residuales de la población frente IPCA1, el cual explica un 60,32% de la varianza, ni frente IPCA2, con 30,01%. Aunque si podemos observar que frente a ambos los ambientes con fotoperiodo largo se encuentran por debajo de la media residual poblacional y además más próximos entre sí, que si los comparamos con los ambientes donde se aplicó fotoperiodo corto, ya que estos aparte de encontrarse más distantes actúan de distinta manera al compararlos con IPCA1 o IPCA2. Encontramos

también que en esta fase los ambientes con fotoperiodo corto, se encuentran claramente separados, especialmente con tratamiento de vernalización frente a IPCA1.



**Gráficos 10.** Graficas AMMI para la duración en tiempo térmico de la fase de elongación del tallo principal, donde quedan representados tanto los distintos ambientes del estudio, como los parentales Nevada y Barbarrosa, los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic y las líneas procedentes de la población diferenciando las líneas en cuatro grupos: con genotipo invernal y ambos alelos de *PPD-H2* y genotipo primaveral haciendo esta misma distinción.

Finalmente, si observamos las gráficas AMMI para el ratio entre ambos caracteres (gráficos 11) vemos que, en función de la media poblacional, los ambientes se dividen según se aplica o no tratamiento de vernalización. Este mismo efecto ocurre también en lo que respecta a la fase de encañado, de manera que bajo condiciones de vernalización este ratio es superior, encontrándose más próximas a estos ambientes las líneas primaverales, tal como ocurría en la fase de encañado. En esta ocasión esta característica podría ir a favor de obtener mayores rendimientos, según hipótesis de Slafer et al, 2005, ya que, aunque no se han encontrado diferencias entre los genotipos para la elongación del tallo principal, este cociente podría darnos idea de la eficiencia de la planta a la hora obtener mayores rendimientos minimizando al máximo el tiempo de encañado sin modificar el tiempo de espigado, resultando favorables las mayores tasas entre elongación del tallo y encañado.



**Gráficos 11.** Graficas AMMI para los caracteres de encañado, elongación del tallo y ratio elongación del tallo/encañado, donde quedan representados tanto los distintos ambientes del estudio, como los parentales Nevada y Barbarrosa, los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic y las líneas procedentes de la población diferenciando las líneas en cuatro grupos: con genotipo invernal y ambos alelos de *PPD-H2* y genotipo primaveral haciendo esta misma distinción.

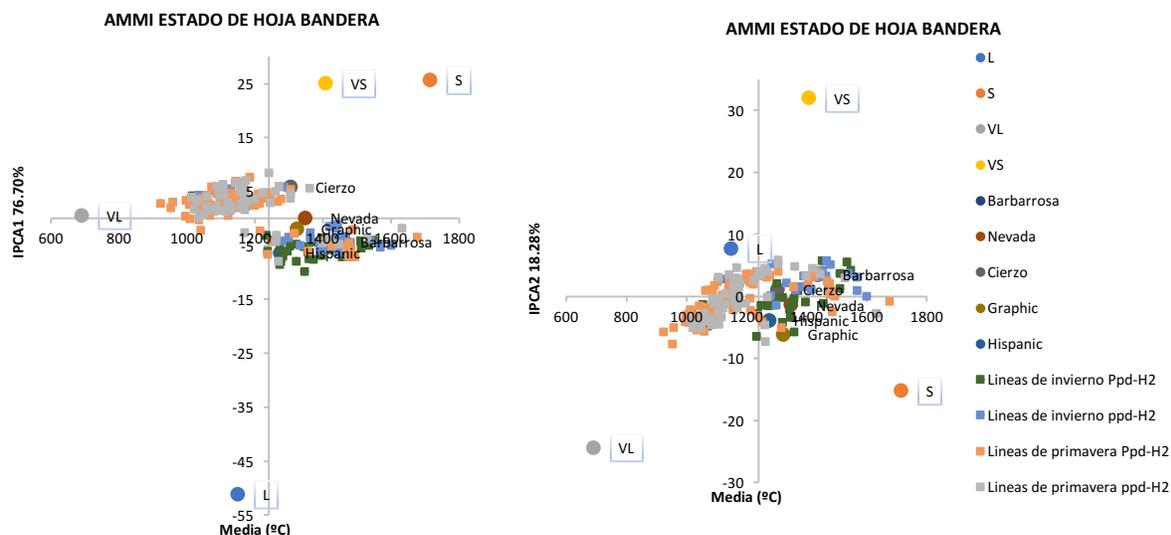
Por otro lado en cuanto a las dimensiones AMMI, nos encontramos con una explicación de 45,25% de la varianza para IPCA1, único caso junto al filocrono donde este eje adquirió valores inferiores al 60%. Este eje nos está dividiendo los ambientes según el signo: valores positivos para los ambientes con fotoperiodo corto y valores negativos para los ambientes donde se aplicó fotoperiodo largo. Esto no ocurre con IPCA2 (35,83% de explicación de la varianza para la interacción GxE), ya que, en este caso tan solo el ambiente sin vernalización y fotoperiodo corto adquiere valores positivos, mientras que ambos ensayos con tratamiento de vernalización se encuentran más próximos entre sí, y también más próximos a las medias residuales de las líneas primaverales de la población. En este caso encontramos una tendencia lineal en diagonal de todas las líneas, partiendo en la parte superior de las líneas invernales, principalmente con *PPD-H2* activo y por tanto sensibles a fotoperiodo corto, hasta la parte inferior de la gráfica donde se encuentran las líneas primaverales principalmente insensibles a fotoperiodo corto.

### 3.4.2 Interpretación AMMI para la duración de las fases desde nascencia hasta espigado y estado de hoja bandera

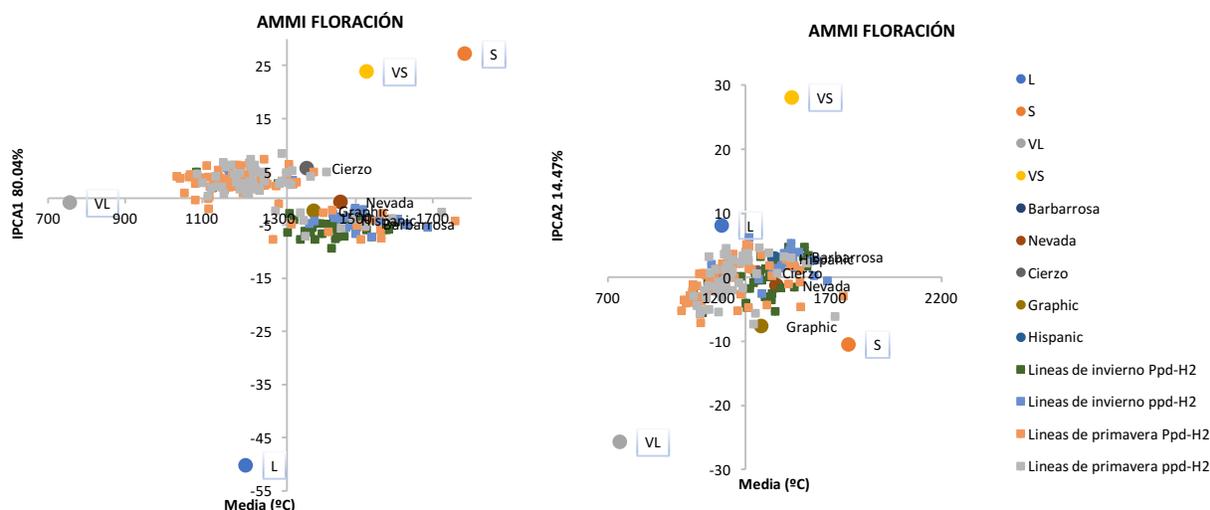
En este caso ambos caracteres tuvieron un similar comportamiento en las gráficas AMMI, tanto las líneas de la población como los ambientes teniendo IPCA1 la mayor parte de la explicación de la varianza para ambos caracteres, aunque IPCA2 frente a la media poblacional separa a cada uno de los ambientes en un cuadrante distinto (gráficos 12). Y, lo que es más, vemos una clara similitud, tanto en la disposición de las líneas, como la de los ambientes con la gráfica AMMI del tiempo térmico de encañado donde se representa IPCA1 frente a la media de este carácter (gráfico 9 izquierdo), similitud no encontrada en lo que respecta al tiempo térmico de elongación del tallo principal.

Para ambos las medias poblacionales fueron superiores a la media para las variedades invernales, y las medias de los ambientes con tratamiento de vernalización, encontrándonos a todos ellos a la

derecha de las gráficas, separando claramente IPCA1 líneas primaverales, con valores positivos, de las líneas invernales, con valores negativos, siendo únicamente el ensayo con fotoperiodo largo sin vernalizar el que posee valores negativos. Además, encontramos una clara separación de los ambientes: L frente IPCA1 y VL frente IPCA2. Lo cual es lógico, ya que el primero se trata del ambiente donde mayores diferencias se dieron, debido a la falta de vernalización y un fotoperiodo largo durante todo el ciclo, acelerándose en espigado las líneas primaverales y retrasándose las ambientales. Mientras que el segundo corresponde al que menores diferencias entre líneas se observaron, debido a ser el ambiente más inductivo para ambos tipos, invernales y primaverales.



**Gráficos 12.** Graficas AMMI para el tiempo térmico hasta alcanzar el estado de hoja bandera del tallo principal, donde quedan representados tanto los distintos ambientes del estudio, como los parentales Nevada y Barbarrosa, los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic y las líneas procedentes de la población diferenciando las líneas en cuatro grupos: con genotipo invernal y ambos alelos de *PPD-H2* y genotipo primaveral haciendo esta misma distinción.



**Gráfico 13.** Graficas AMMI para el tiempo térmico total hasta espigado el tallo principal, donde quedan representados tanto los distintos ambientes del estudio, como los parentales Nevada y Barbarrosa, los testigos Cierzo, Graphic e Hispanic y las líneas procedentes de la población diferenciando las líneas en cuatro grupos: con genotipo invernal y ambos alelos de *PPD-H2* y genotipo primaveral haciendo esta misma distinción.

### 3.5 Búsqueda de genotipos más adaptados a condiciones mediterráneas para un hipotético ajuste de las fases para optimizar el potencial de rendimiento

En este apartado, se ha tratado de buscar las líneas que, sin modificar el tiempo total de espigado posean un tiempo minimizado de encañado, frente a un mayor tiempo de elongación del tallo siguiendo la hipótesis de Slafer et al (2005). Según esta hipótesis estas líneas deberían poseer un mayor potencial de rendimiento. Para ello, a partir de los datos obtenidos en los ambientes VS y VL se ha construido un modelo hipotético como se explica en el apartado 2.3.3 de búsqueda de genotipos más adaptados a condiciones mediterráneas para un hipotético ajuste de las fases para optimizar el potencial de rendimiento de materiales y métodos de este mismo capítulo.

En primer lugar, se ha recalculado el ratio SE/J como se indica en el apartado de materiales y métodos de este capítulo. Para ello se han utilizado los BLUPs procedentes de los datos en el ensayo VS para el tiempo hasta encañado y los procedentes del ensayo VL para tiempo de elongación del tallo, obteniendo los valores resumidos en la tabla 12.

Para validar el nuevo ratio, en primer se han calculado las correlaciones entre el ratio ajustado para el modelo que se está tratando,  $SE_{VL}/En_{VS}$ , frente a las fases utilizadas para el modelo, resultando todas significativas (tabla 14): tiempo térmico total de espigado bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo (VL), fase de elongación del tallo para el mismo ensayo y fase de encañado para el ensayo que simula el comienzo del ciclo bajo latitudes mediterráneas, vernalizado con fotoperiodo corto. Así como las correlaciones entre este ratio  $SE_{VL}/J_{VS}$  y los ratios SE/J en los ensayos VS y VL y las fases de encañado VS, elongación del tallo en VL y espigado, tanto de la modelización como en el ensayo VL tabla 13.

Parámetros del modelo	desviación					
	mínimo	media	máximo	standard de la media	Nevada	Barbarrosa
Encañado (°C)	335,9	539,3	1047	133,8	352,42	789,99
Elongación del tallo (°C)	322,6	445,1	846,1	74,02	706,001	376,96
Hoja bandera (°C)	724,18	984,5	1623,72	168,5	1058,42	1166,95
Espigado (°C)	786,28	1050,78	1703,47	170,99	1103,36	1244,53
Ratio SE/J	0,444	0,864	1,424	0,203	2,003	0,477

**Tabla 12.** Resumen de los parámetros dentro del modelo hipotético, para los parámetros recalculados dentro de este, mostrándose tanto la media poblacional como el máximo y mínimo de estos caracteres, así como los valores para los dos parentales, Nevada y Barbarrosa dentro del modelo propuesto.

Por tanto, si observamos estas correlaciones obtenidas entre el ratio  $SE_{VL}/J_{VS}$  y las distintas fases del modelo simulado, observamos que en todos los casos estas son significativas, aunque la correlación existente entre este ratio ajustado y el espigado en el ensayo VL (0,1977) es menor que la calculada entre el ratio en VL con el tiempo térmico de espigado en este mismo ensayo y en sentido contrario, -0,5803 (ver tabla 14), siendo en el primer caso una correlación menor y con un grado de significación menor. Así

mismo se calculó la correlación entre el nuevo ratio y los ratios de los ambientes VS y VL, encontrando correlaciones positivas y elevadas, principalmente con el ratio SE/J del ensayo bajo fotoperiodo corto.

	Correlación
Ratio $SE_{VL}/J_{VS}$ vs. espigado (m)	-0,3918 <0,001
Ratio $SE_{VL}/J_{VS}$ vs. elongación del tallo (VL)	0,4654 <0,001
Ratio $SE_{VL}/J_{VS}$ vs. encañado (VS)	-0,7423 <0,001
Ratio $SE_{VL}/J_{VS}$ vs. hoja bandera (m)	-0,3836 <0,001
Ratio SE/J(m) vs. ratio SE/J(VS)	0,7157 <0,001
Ratio $SE_{VL}/J_{VS}$ vs. ratio SE/J(VL)	0,3513 <0,001

**Tabla 13.** Correlaciones de Pearson entre el ratio recalculado SE/J en el modelo propuesto ( $SE_{VL}/J_{VS}$ ) frente a la duración en tiempo térmico para la duración de las fases en dicho modelo, así como la correlación de este ratio frente al ratio SE/J de los ensayos utilizados para la modelización. Entre paréntesis se muestra si se refiere al modelo propuesto (m) o a los ambientes VS o VL. En valor superior nos muestra el coeficiente de correlación, mientras que el inferior indica su grado de significación.

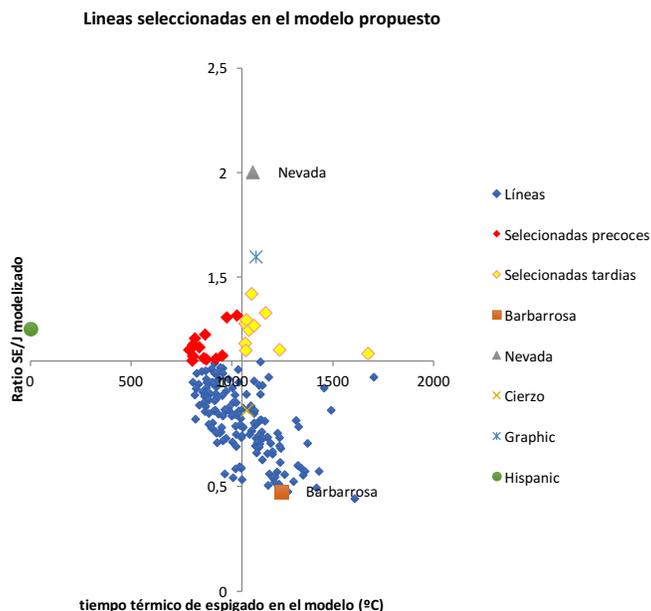
En todo caso, observamos una correlación positiva tanto para el tiempo de espigado como para el tiempo térmico de la fase de elongación del tallo, mientras que la correlación de este ratio ajustado es negativa respecto al tiempo para encañado en VS. Por su parte, comparándolo con las correlaciones del ensayo VL, que cubre las premisas de siembra primaveral bajo las condiciones mediterráneas en la meseta castellano leonesa, el ratio SE/J guarda una correlación negativa frente al espigado mientras que, entre la fase de espigado y las fases hasta encañado y elongación del tallo bajo estas condiciones las correlaciones son positivas.

Correlación entre fases del modelo	
Elongación del tallo vs. Encañado	0,1869 0,0098
Espigado vs. encañado	0,8764 <0,001
Espigado vs. elongación del tallo	0,5865 <0,001
Espigado vs. estado de hoja bandera	0,9762 <0,001

**Tabla 14.** Correlaciones de Pearson entre la duración en tiempo térmico de las distintas fases del modelo propuesto. En valor superior nos muestra el coeficiente de correlación, mientras que el inferior indica su grado de significación.

### 3.5.1 Selección de líneas bajo el modelo propuesto para un óptimo ajuste a las condiciones mediterráneas bajo siembra otoñal

Finalmente, viendo la relación que guarda este parámetro  $SE_{VL}/J_{VS}$ , principalmente con los ratios  $SE/J$  en los ensayos tanto VL como VS, se ha utilizado como criterio para la selección las líneas que potencialmente, bajo estas condiciones modelizadas, tienen un menor tiempo de encañado y mayor tiempo de elongación buscando las líneas que bajo esta premisa tienen tiempos de espigado inferiores a la media poblacional en el ensayo VL para hacer una división entre líneas precoces y más tardías dentro de las seleccionadas, viendo así como se comportarían las mismas bajo una siembra primaveral en condiciones de la meseta castellana.



**Gráfico 14.** Gráfica que muestra el tiempo de espigado propuesto en el modelo frente al ratio  $SE/J$  del mismo modelo ( $SE_{VL}/J_{VC}$ ), en donde el eje de ordenadas corta en el valor de la media poblacional del tiempo térmico de espigado del modelo y el eje de abscisas en el valor 1,1 del ratio, utilizado como criterio de selección de las líneas.

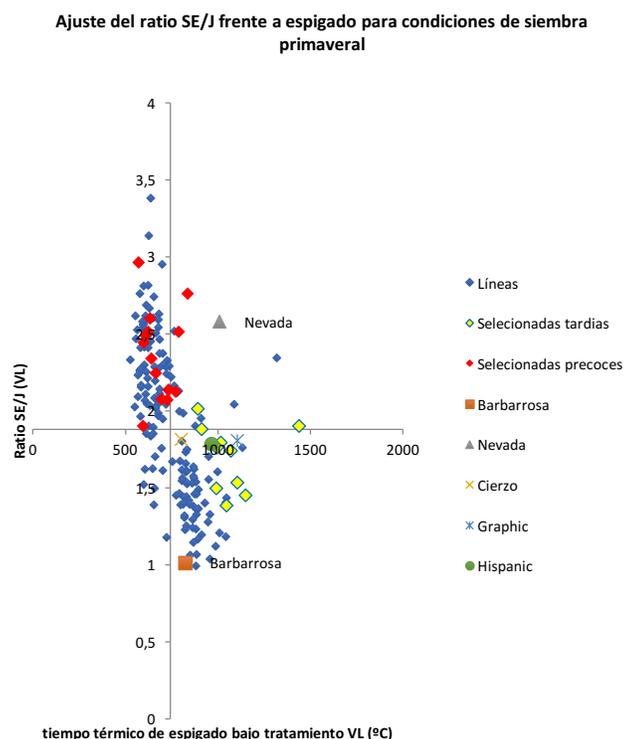
La tabla 15 nos muestra las líneas de la población NxBxB que tuvieron valores iguales o superiores a 1,1 así como su genotipo tanto por su necesidad o no de vernalizar, como su genotipo respecto a los genes de fotoperiodo y gen de precocidad intrínseca *eam6*. Eligiéndose por tanto aquellas líneas cuya fase de encañado tiene una duración una décima parte inferior a la fase de elongación del tallo y son más precoces para el espigado bajo este modelo (líneas seleccionadas precoces). También se ha comprobado el comportamiento de las más tardías, por encima de la media poblacional en VL, ya que bajo este modelo las líneas más precoces fueron todas con hábitos primaverales en lo que respecta a la necesidad o no a vernalizar y sensibles a fotoperiodo largo y todas ellas mayoritariamente sensibles también a fotoperiodo corto, con el alelo de *PPD-H2* procedente de Nevada.

Por tanto, en el gráfico 14 observamos a la izquierda las líneas seleccionadas, todas ellas con valores superiores a 1,1 para el ratio SE/J frente al tiempo de espigado en el modelo, mientras que en el gráfico 15 observamos el comportamiento de estas líneas en el ensayo VL (modelizando el comportamiento de las mismas bajo siembra primaveral en Castilla y León), donde todas las líneas seleccionadas más precoces obtuvieron ratios bajo estas mismas condiciones superiores a la media poblacional (1,88) de este mismo parámetro, que fue muy superior a la media del ratio ajustado cuyo valor más alto fue de 1,42, e incluso varias líneas tardías tuvieron valores superiores a 1,88 (líneas 41 y 160), ya que el resto de líneas seleccionadas como tardías, tienen valores de este ratio SE/J en VL inferiores a la media poblacional como vemos en la tabla 15.

	Líneas	Necesidad de vernalizar	<i>Eam6</i>	<i>PPD-H1</i>	<i>PPD-H2</i>	ratio $SE_{VL}/J_{VC}$	ratio SE/J (VL)
Líneas más precoces	R061	NO	N	B	N	1,32	2,76
	R034	NO	N	B	B	1,31	2,51
	R149	NO	B	B	N	1,23	2,07
	R015	NO	B	B	N	1,21	2,34
	R146	NO	B	B	N	1,18	1,9
	R086	NO	B	B	B	1,17	2,51
	R053	NO	B	B	N	1,17	2,6
	R194	NO	B	B	N	1,16	2,96
	R001	NO	B	B	B	1,13	2,12
	R107	NO	N	B	N	1,12	2,49
	R147	NO	B	B	N	1,12	2,07
	R014	NO	B	B	B	1,11	2,13
	R263	NO	N	B	N	1,11	2,24
	R138	NO	B	B	N	1,1	2,44
Líneas más tardías	R227	SI	B	N	N	1,42	1,53
	R245	NO	B	N	B	1,33	1,74
	R041	SI	B	B	N	1,3	2,01
	R046	NO	B	B	B	1,28	1,38
	R267	SI	N	B	N	1,27	1,76
	R103	NO	N	B	N	1,25	1,79
	R121	SI	B	B	N	1,19	1,5
	R010	NO	N	N	N	1,15	1,45
	R160	NO	B	B	B	1,15	1,88
	R050	NO	N	N	B	1,14	1,9

**Tabla 15.** Líneas seleccionadas precoces y líneas seleccionadas más tardías respecto al modelo propuesto, ratio SE/J del modelo superior a 1,1. Se muestra también el alelo que portan cada una de ellas respecto a los principales genes de fotoperiodo y precocidad intrínseca *Eam6* (B alelo de Barbarrosa, N alelo de nevada), así como su necesidad de vernalizar o no según los alelos que portan de los genes de vernalización *VRN-H1* y *VRN-H2*.

Cabe destacar que tan solo cuatro de ellas poseen la necesidad de vernalizar, teniendo todas el alelo de *PPD-H2* procedente de Nevada y el alelo de Barbarrosa para *PPD-H1*, a excepción de la línea 227 que porta el alelo de Nevada en este último caso. Además, de todas las líneas seleccionadas, tan solo 6 de las líneas (1, 14, 15, 194 y 263) son portadoras del alelo *denso*, perteneciendo todas ellas al grupo de las seleccionadas como precoces.



**Gráfico 15.** Gráfico del tiempo térmico de espigado en el ensayo VL frente al ratio SE/J en este mismo ensayo, mostrándose el comportamiento de las líneas seleccionadas bajo estas condiciones. El eje de ordenadas corta en el valor de la media poblacional del tiempo térmico de espigado en este ambiente y el eje de abscisas en el valor 1,88, media poblacional del ratio SE/J bajo estas condiciones,

Por su parte, si observamos el comportamiento de estas líneas seleccionadas bajo los modelos AMMI respecto a las fases de tiempo de espigado, fase hasta encañado y fase de elongación del tallo nos encontramos en primer lugar que estas líneas seleccionadas más precoces tienen todos valores positivos frente al eje IPCA1, que recordemos posee un 80,04% de explicación de la interacción GxE, al igual que la mayoría de las líneas primaverales y los ensayos bajo condiciones de fotoperiodo corto, aunque estos se encontraban con valores medios muy por encima de la media poblacional del modelo AMMI para tiempo de espigado (gráfico 16). Tan solo las líneas 1 y 34 del grupo de líneas seleccionadas precoces poseen valores de tiempo térmico de espigado ligeramente superiores a la media del modelo AMMI, coincidiendo estas mismas líneas con valores positivos respecto a IPCA2, el cual sostiene el 14,47% de la explicación de la interacción genotipo por ambiente.

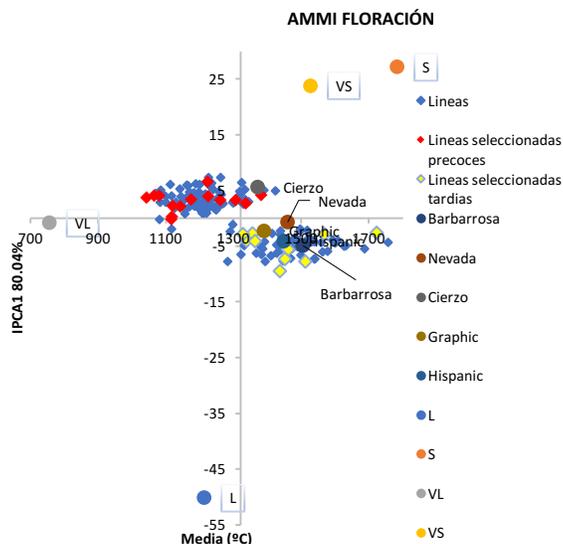


Gráfico 16. Modelo AMMI para tiempo térmico total de espigado, mostrándose el comportamiento de las líneas seleccionadas en el modelo propuesto.

Respecto al comportamiento de estas líneas seleccionadas frente al tiempo de encañado (ver gráfico 17), nos encontramos que las seleccionadas más precoces poseen las medias más bajas respecto a las medias de tiempo de encañado de este modelo, poseyendo todas ellas valores de IPCA1 positivos para este carácter, al igual que los ambientes con tratamiento de vernalización (también S, pero este con valores medios muy superiores a la media poblacional del modelo).

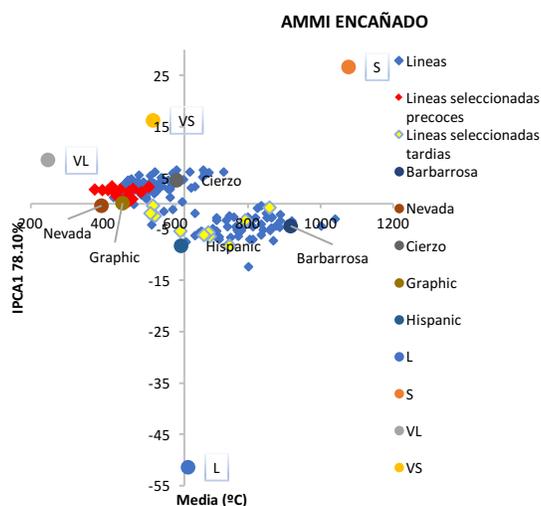


Gráfico 17. Comportamiento de las líneas seleccionadas en el modelo propuesto bajo el modelo AMMI para el tiempo térmico de la fase de encañado.

Con valores positivos para IPCA1 nos encontramos también las líneas con hábitos primaverales como vemos en la gráfico 9 (AMMI encañado), mientras que con valores negativos para este mismo eje nos encontramos las líneas seleccionadas como más tardías, y por encima de la media poblacional de este modelo AMMI, encontrándonosos cuatro de estas líneas (41, 245, 46 y 267) con un tiempo térmico hasta

encañado ligeramente inferior a la media del modelo AMMI, situando a tres de las mismas más próximas al grupo donde se incluyen las líneas primaverales, a pesar de que tanto la línea 41 como la 267 son líneas con genotipo invernal. Aunque como observamos en el gráfico 9 (AMMI para tiempo térmico de encañado) izquierda, existe un pequeño grupo de líneas primaverales con valores IPCA1 negativos.

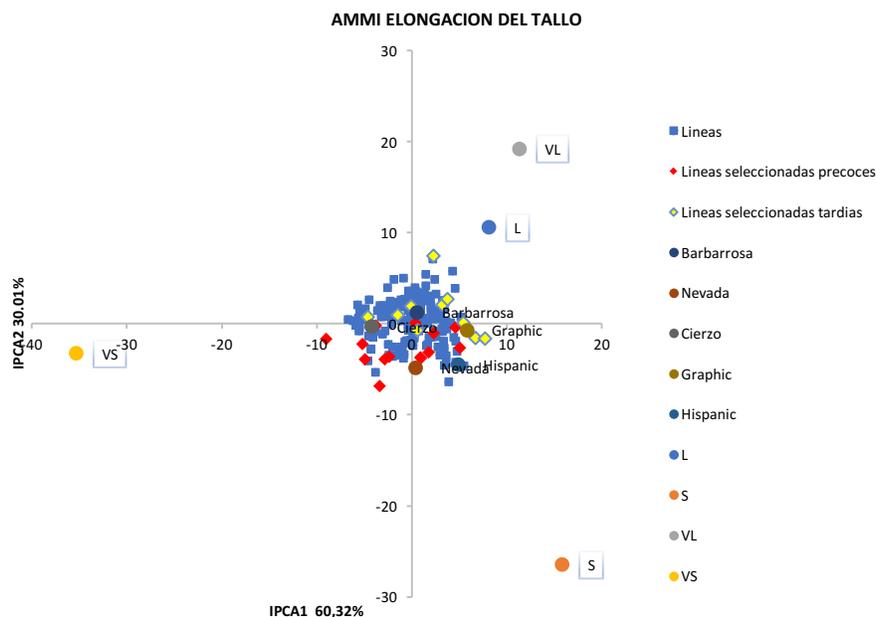


Gráfico 18. Modelo AMMI para tiempo térmico de la fase de elongación del tallo mostrándose el comportamiento de las líneas seleccionadas.

Finalmente, destacar que frente al modelo AMMI para el tiempo térmico de la fase de elongación del tallo (gráfico 18) todas las líneas seleccionadas más precoces tuvieron valores negativos frente al eje IPCA2 de este modelo, el cual en este caso posee una mayor explicación de la interacción genotipo por ambiente que en los casos anteriores (30,01%), interaccionando estas líneas positivamente respecto a este eje con los ambientes bajo condiciones de fotoperiodo corto.

En el siguiente capítulo de esta tesis, se tratará sobre el comportamiento de estas líneas seleccionadas bajo distintas condiciones en varios ensayos de campo frente al rendimiento y distintos parámetros del mismo.

### 3.6 Principales QTL detectados y sus interacciones

Los QTL detectados en este estudio para cada uno de los caracteres estudiados se recogen en la tabla 16, así como su heredabilidad, la cual fue notablemente alta para todos los caracteres, posición de dichos QTL, LOD máximo y los efectos aditivos de estos, así como si fue significativa o no su interacción con el factor ambiental. La distribución de QTL detectados, sus posiciones en el mapa genético de la población y sus intervalos de confianza, se representan en la figura 11.

Debemos señalar que los principales marcadores intragénicos de los genes de vernalización *VRN-H1* y *VRN-H2* y también los genes de fotoperiodo, *PPD-H1* y *PPD-H2*, fueron detectados en los ambientes que permitían su expresión diferencial de acuerdo a los modelos de regulación actualmente en vigor. Destaca también que todos los QTL detectados en la región de *VRN-H2* fueron detectados sólo en los ensayos realizados bajo condiciones de fotoperiodo largo (L y VL), pero en ningún caso bajo condiciones de día corto, siendo los alelos de Barbarrosa los responsables de incrementar todos los parámetros (a excepción del ratio SE/J, donde fueron los de Nevada) y además sus efectos fueron significativos para todos los caracteres, menos para el filocrono.

También se detectó otro QTL en la región donde se encuentra el gen de precocidad intrínseca *Eam6* en todas las fases, a excepción de la fase de encañado donde éste no fue detectado, ni para número de hojas ni para tiempo térmico.

Además, se encontró otro QTL en 1H para número de hojas del tallo principal (*SEL\_1*), el cual no coincide con *PPD-H2*, ya que el LOD máximo se encuentra desplazado 21,6 cM y su intervalo de confianza no alcanza la posición del marcador intragénico *HvFT3*, gen candidato para *PPD-H2*, al igual que ocurre con el QTL detectado en 1H para tiempo térmico de este mismo carácter (*SE\_1*), aunque en esta ocasión *PPD-H2* sí se encuentra en el intervalo de confianza de este QTL.

De esta misma manera, se encontró otro QTL que no coincide con ninguno de los nombrados anteriores en el grupo 2H1 para número de hojas desarrolladas en el momento de encañado (*TL\_2*), el cual sólo fue significativo en el ensayo bajo condiciones de fotoperiodo corto, aumentando los alelos de Nevada este carácter, no coincidiendo su estrecho intervalo de confianza con la posición ni de *PPD-H1* ni de *Eam6*.

A mayores se detectó otro QTL en el cromosoma 3H que no coincide con el gen de semienanismo *denso* el cual no fue significativo para ninguna de las fases bajo con condiciones controladas.

Carácter	Nombre QTL	Nombre del Marcador	Cromosoma	Posición	-Log10(P) P-valor max.	Intervalo de Confianza	L	S	VL	VS	QTLxE
							Efec. Adi.	Efec. Adi.	Efec. Adi.	Efec. Adi.	F pr
Espigado (°C)  h <sup>2</sup> =0,5472	F_1	HvFT3	1H	121,6	15,34	119,16 - 130,79	-	-38,52	-	-1,284	<0,001
	F_2	SNP22	2H1	21,9	21,64	21,42 - 22,50	112,2	23,16	149,79	-	<0,001
	F_3	bPb_3677	2H1	63,9	6,93	59,75 - 66,56	-	21,42	41,24	1,3612	<0,001
	F_4	Bmag0006	3H	71,3	5,13	66,37 - 80,83	-62,9	-23,45	-18,76	-	<0,001
	F_5	ZCCTHa	4H	98,3	16,12	95,62 - 100,07	-200,8	-	-59,73	-	<0,001
	F_6	VRN_H1	5H	210	19	207,33 - 213,52	-213	-	-68,11	-0,7773	<0,001
Encañado (°C)  h <sup>2</sup> =0,6319	J_1	HvFT3	1H	121,6	13,82	118,45 - 124,48	-	-60,15	3,95	-29,07	<0,001
	J_2	SNP22	2H1	21,9	5,24	19,71 - 25,06	-	-	46,57	-	<0,001
	J_3	ZCCTHa	4H	98,3	13,62	95,31 - 100,53	-175,8	-	-29,26	-	<0,001
	J_4	VRN_H1	5H	210	30,18	208,31 - 212,21	-215,2	-31,07	-48,03	-77,9	<0,001
Elongación del Tallo Principal (°C)	SE_1	bPb_4832	1H	125,3	6,85	116,96 - 129,26	-	25,43	-	-14,12	<0,001
h <sup>2</sup> =0,4387	SE_2	SNP22	2H1	21,9	20,62	21,36 - 22,48	23,07	20,2	88,47	-	<0,001
	SE_3	bPb_5449	2H1	62	14,91	60,95 - 64,41	19,91	28,39	28	50,64	<0,001
	SE_4	ZCCTHa	4H	98,3	6,25	90,99 - 102,99	-13,94	-	-22,57	-	<0,001
	SE_5	VRN_H1	5H	210	6,18	202,74 - 221,10	-	17,82	-14,17	22,47	<0,001
Estado de Hoja Bandera (°C)	FL_1	HvFT3	1H	121,6	13,16	118,56 - 132,47	-	-34,11	-	-23,93	<0,001
h <sup>2</sup> =0,5947	FL_2	SNP22	2H1	21,9	18,15	21,25 - 22,65	127,57	24,69	143,59	-	<0,001
	FL_3	bPb_5449	2H1	62	9,33	58,44 - 64,57	-	31,55	31,55	31,55	n.s.
	FL_4	Bmag0006	3H	71,3	4,69	66,34 - 73,93	-14,63	-14,63	-14,63	-	n.s.
	FL_5	ZCCTHa	4H	98,3	13,71	95,28 - 100,57	-199,75	-	-54,31	-	<0,001
	FL_6	VRN_H1	5H	210	17,93	207,65 - 213,74	-214,05	-9,5	-62,91	-18,91	<0,001
Nº Hojas Basales	TL_1	HvFT3	1H	121,6	17,4	119,34 - 124,76	-	-0,5011	-	-0,1454	<0,001
h <sup>2</sup> =0,4999	TL_2	bPb_2230	2H1	33,9	3,51	33,58 - 35,37	-	-0,243	0,05744	-	<0,001
	TL_3	ZCCTHa	4H	98,3	11,73	94,90 - 100,59	-1,3028	-	-0,08402	-	<0,001
	TL_4	VRN_H1	5H	210	33,12	208,43 - 212,02	-1,7215	-0,1969	-0,17657	-0,3998	<0,001
	Nº Hojas del Tallo principal	SEL_1	bPb_9656	1H	100	4,51	91,48 - 103,42	-	-0,0963	-	-0,2188
h <sup>2</sup> =0,4184	SEL_2	SNP22	2H1	21,9	5,48	19,62 - 25,32	-	-	0,12793	-	n.s.
	SEL_3	bPb_5449	2H1	62	10,6	59,75 - 63,50	0,2096	0,1483	0,06405	0,5316	<0,001
	SEL_4	ZCCTHa	4H	98,3	13,82	95,52 - 100,18	-0,2942	-	-0,0784	-	<0,001
	SEL_5	VRN_H1	5H	210	11,01	206,52 - 216,25	-0,1643	0,1094	-0,03498	-	<0,001

**Tabla 16.** Resultados QTL ensayos invernadero. Ensayos: L fotoperiodo largo, S corto, V tratamiento de vernalización. Efectos aditivos: signo negativo efectos asociados al alelo de Barbarrosa, positivo los de Nevada.

Carácter	Nombre QTL	Nombre del Marcador	Cromosoma	Posición	-Log10(P) P-valor max.	Intervalo de Confianza	L	S	VL	VS	QTLxE
							Efec. Adi.	Efec. Adi.	Efec. Adi.	Efec. Adi.	F pr
Nº Hojas Totales  h <sup>2</sup> =0,5858	TL_1	HvFT3	1H	121,6	16,02	119,14 - 125,91	-	-0,5433	-	-0,4428	<0,001
	TL_2	SNP22	2H1	21,9	6,74	19,95 - 24,65	-	-0,0459	0,3887	-	<0,001
	TL_3	bPb_5449	2H1	62	4,64	56,98 - 64,03	-	0,1407	0,1407	0,1407	n.s.
	TL_4	ZCCTHa	4H	98,3	13,51	95,63 - 100,30	-1,7091	-	-0,2745	-	<0,001
	TL_5	VRN_H1	5H	210	20,14	207,54 - 213,45	-1,9473	-	-0,3315	-0,5097	<0,001
Filocrono (°C/Nº hojas)  h <sup>2</sup> =0,2675	PHY_1	HvFT3	1H	121,6	8,93	116,86 - 129,82	-	2,92	-	6,34	<0,001
	PHY_2	SNP22	2H1	21,9	10,6	19,93 - 23,15	5,172	2,834	13,76	-	<0,001
	PHY_3	VRN_H1	5H	210	7,22	208,60 - 219,34	-	-	-3,853	7,071	<0,001
ratio  SE/J  h <sup>2</sup> =0,732	SE/J_1	HvFT3	1H	121,6	8,73	115,75 - 123,54	-	0,05933	-	0,0434	<0,001
	SE/J_2	ZCCTHa	4H	98,3	12,41	94,27 - 100,31	0,2333	-	0,1441	-	<0,001
	SE/J_3	VRN_H1	5H	210	51,99	208,22 - 211,08	0,3679	-	0,3339	0,2942	<0,001

**Tabla 16. Continuación.** Resultados QTL ensayos invernadero. Ensayos: L fotoperiodo largo, S corto, V tratamiento de vernalización. Efectos aditivos: signo negativo efectos asociados al alelo de Barbarrosa, positivo los de Nevada.

### 3.6.1 Resumen de los QTL detectados en cada ensayo realizado para este estudio

#### 3.6.1.1 Ensayo con fotoperiodo largo (L)

En este ensayo no fue significativo para ninguno de los caracteres estudiados *Eam6* ni el gen de fotoperiodo *PPD-H2*, de sensibilidad a fotoperiodo corto, sino solamente el gen de sensibilidad a fotoperiodo largo *PPD-H1*, como cabía de esperar. Además, este fue el máximo responsable del filocrono para este ensayo, ya que PHY\_2 es el único QTL significativo para este carácter. En cuanto al encañado resultaron significativos bajo estas condiciones tanto *VRN-H1* como *VRN-H2*, misma situación que se dio para el ratio entre elongación del tallo principal y el encañado, a diferencia de la elongación del tallo donde además de los dos genes anteriores fueron significativos los QTL SE\_2 en la región del gen *PPD-H1*, aunque solamente para tiempo térmico de esta fase, y SE\_3 en la región de *eam6*.

Por su parte los QTL significativos bajo estas condiciones de fotoperiodo largo para alcanzar el estado de hoja bandera y espigado fueron tanto los genes de vernalización y *PPD-H1*, este sólo para tiempo térmico en el caso de estado de hoja bandera, como el QTL en 3H mencionado anteriormente tanto para espigado (F\_4) como para alcanzar el estado de hoja bandera (FL\_4).

#### 3.6.1.2 Ensayo con fotoperiodo corto (S)

Bajo estas condiciones cabe destacar el hecho de que QTL en la región de *PPD-H1*, de sensibilidad a fotoperiodo largo, fuera significativo para diversos caracteres como son el tiempo térmico de elongación del tallo principal, filocrono, espigado y hoja bandera, destacando que para el ratio entre elongación del tallo principal y encañado este fue el único QTL significativo, el cual no es significativo para

la fase de encañado, sino el QTL en 1H para TL\_2 para número de hojas desarrolladas en esta fase. Siendo también significativos en esta fase los QTL localizados en las regiones de *PPD-H2* y *VRN-H1*. Mientras que para la fase de elongación del tallo principal *PPD-H2* sólo fue significativo para el tiempo térmico de esta fase, ya que para el número de hojas el QTL significativo en 1H fue SEL\_1, nombrado anteriormente, además de *VRN-H1* como en la fase anterior y a mayores los QTL en *eam6*.

En cuanto al filocrono resultaron significativos bajo día corto sin tratamiento de vernalización ambos genes de fotoperiodo, los cuales también resultaron significativos para las últimas dos fases estudiadas además de *Eam6* y los QTL en 3H, aunque para este en el caso del carácter de estado de hoja bandera sólo fue significativo en el caso de tiempo térmico para alcanzar dicho estado, como ocurre con *VRN-H1* que además no fue significativo para espigado en este ensayo.

### 3.6.1.3 Ensayo con fotoperiodo largo y tratamiento previo de vernalización (VL)

En esta ocasión *PPD-H2* no fue significativo para ninguno de los caracteres tal como era de esperar, mientras que QTL en la región de *PPD-H1* de sensibilidad a fotoperiodo largo, fueron significativos para todos los caracteres a excepción del ratio entre elongación del tallo principal y encañado, donde fueron significativos tan solo los QTL en las regiones de los genes de vernalización. Por su parte para encañado estos también fueron significativos, además *PPD-H1* para tiempo térmico y BL\_2 en 2H1 para número de hojas desarrolladas en dicha fase, mientras que para la elongación del tallo principal además de los nombrados para encañado, fue significativo *Eam6*.

Para las dos últimas fases resultaron significativos todos los genes diana, a excepción de *PPD-H2* y finalmente para filocrono resultaron significativos en esta fase tanto QTL en *PPD-H1* como en *VRN-H1*.

### 3.6.1.4 Ensayo con fotoperiodo corto y tratamiento previo de vernalización (VS)

Para este último ensayo bajo condiciones de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización no resultaron significativos ningún QTL en las regiones de *PPD-H1*, *VRN-H2* ni el QTL en 3H para espigado y estado de hoja bandera.

De manera que tanto para encañado y ratio elongación del tallo principal y encañado fueron significativos tanto QTL en la región *PPD-H2* como *VRN-H1*, mientras que para la elongación del tallo estos sólo fueron significativos para el tiempo térmico de esta fase, siendo además significativo los QTL en *eam6*, además del QTL en 1H SEL\_1 para número de hojas.

Por su parte el filocrono se encuentra controlado en este ensayo por los mismos genes que el ratio elongación/Encañado, mientras que las dos últimas fases estudiadas de encuentran controladas por estos dos y *Eam6* a mayores, aunque en el caso del espigado los efectos de *PPD-H2* fueron los más elevados como observamos en la tabla 16.

### 3.6.2 QTL para cada una de las fases estudiadas y sus interacciones

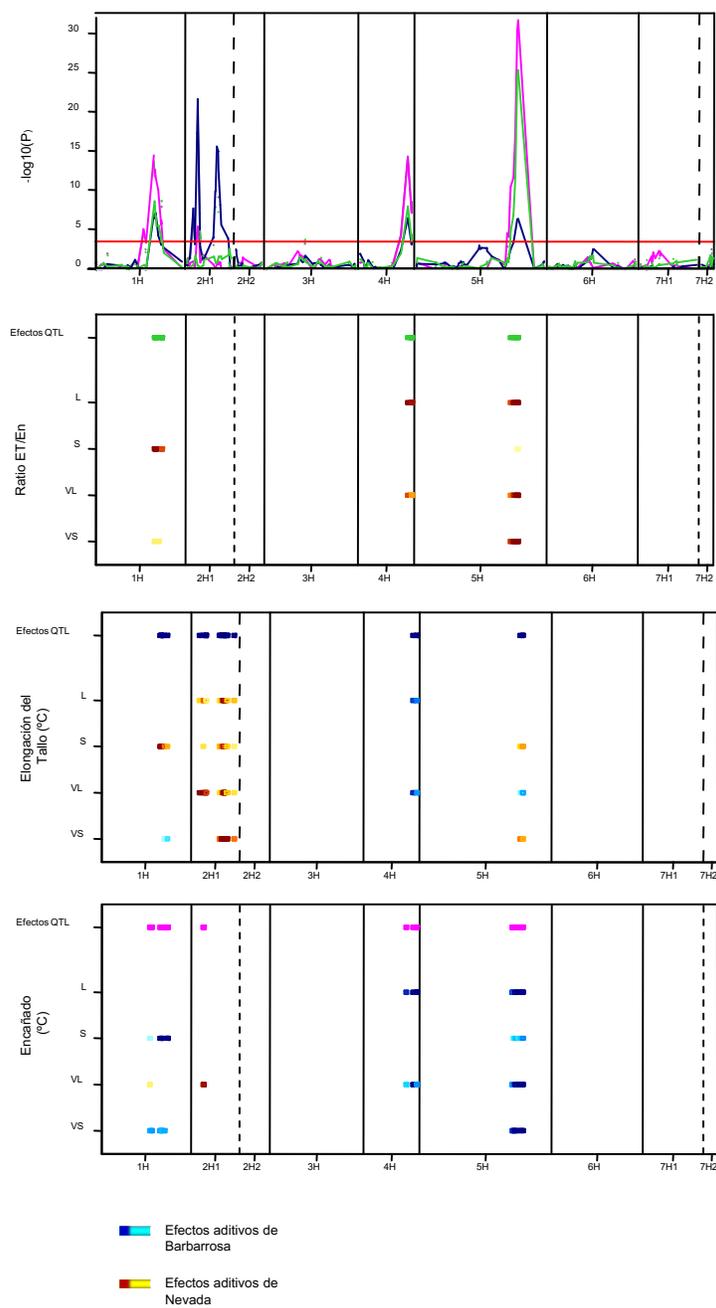
#### 3.6.2.1 Fase desde nascencia a encañado

En esta fase fueron detectados QTL tanto en los genes de vernalización que segregan en la población de estudio *VRN-H1* y *VRN-H2*, como los genes de fotoperiodo *PPD-H1* y *PPD-H2*. Cabe destacar que la heredabilidad fue ligeramente superior (0,6) para el tiempo térmico de esta fase que para el número de hojas (0,5).

Ambos genes de vernalización fueron significantes en los mismos ambientes para los dos parámetros estudiados para esta fase: tiempo térmico y número de hojas. De esta manera dos QTL fueron detectados en *VRN-H1*, J\_4 para tiempo térmico y BL\_4 para número de hojas siendo ambos significantes en todos los ambientes estudiados, especialmente en el ambiente sin tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo (L), donde los efectos aditivos procedentes de Barbarrosa fueron los más elevados con una gran diferencia. Por su parte los QTL detectados en las inmediaciones de *VRN-H2*, J\_3 y BL\_3, fueron significantes en los dos ambientes donde se aplicó fotoperiodo largo (L y VL).

Por otro lado, en cuanto al gene de fotoperiodo, *PPD-H2* fue detectado para ambos parámetros en los ensayos en los que se aplicó fotoperiodo corto (S y VS), aunque también fue significativo bajo fotoperiodo largo y tratamiento de vernalización (VL) para el tiempo térmico de esta fase, siendo en este caso sus efectos aditivos mucho menores que en los otros ambientes detectados y en este caso fueron los alelos de Barbarrosa los que producían un alargamiento de esta fase, mientras que en los otros ambientes eran los alelos de Nevada los que producían este alargamiento de la fase de encañado.

Respecto a *PPD-H1* este sólo fue significativo para tiempo térmico, J\_2, bajo condiciones de fotoperiodo largo y tratamiento de vernalización (VL), ya que en el caso de número de hojas el QTL detectado en el grupo 2H1, BL\_2, se sitúa en la posición entre 33,58 y 35,37 cM, mientras que J\_2 se sitúa entre los 19,71 y los 25,06 cM de este mismo grupo de ligamiento encontrándose SNP22, marcador intragénico para *PPD-H1* y LOD máximo de este QTL, en la posición 21,9. Además BL\_2 tan solo fue significativo bajo condiciones de día corto y sin tratamiento de vernalización (S), siendo los alelos de Barbarrosa los que producen un mayor número de hojas durante esta fase, al contrario que ocurre con los efectos de J\_2 bajo tratamiento VL, donde los alelos de Nevada alargan el tiempo térmico hasta encañado. Por tanto, J\_2 y BL\_2 no corresponden al mismo QTL, difiriendo ambos caracteres, número de hojas y tiempo térmico, durante la fase de encañado en estos QTL.



**Figura 9.** En esta figura se muestran las gráficas de QTL detectados bajo un análisis multiambiental para el ratio entre la duración de la elongación del tallo principal y el tiempo térmico de encañado (SE/I), comparándola con los QTL detectados para cada una de las fases por separado. En la gráfica superior se muestra el LOD de cada uno de los parámetros y en las inferiores los efectos aditivos en cada uno de los ambientes estudiados.

### 3.6.2.2 Fase de elongación del tallo principal

Durante esta fase cabe destacar la significación en todos los ambientes de los QTL tanto para número de hojas como tiempo térmico en la región donde se localiza *eam6*, SE\_3 y SEL\_3, siendo alelos de Nevada quienes aumentan los parámetros de esta fase, especialmente bajo condiciones de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización (VS).

*VRN-H2* fue significativo de la misma manera que lo fue en la fase de encañado. Por su parte, *VRN-H1* durante esta fase fue significativo bajo día corto (S) incrementando el tiempo térmico y número de hojas los alelos procedentes de Nevada, SE\_ y SEL\_ (para tiempo térmico también bajo tratamiento de vernalización, VS), pero también fue significativo bajo condiciones de día largo, tanto con tratamiento de vernalización como sin ello (L y VL) aunque en estos, al contrario de lo que ocurre bajo fotoperiodo corto, son los alelos de Barbarrosa los que incrementan dichos caracteres.

Respecto *PPD-H1* también se encontraron QTL significantes para ambos parámetros SE\_2 y SEL\_2, especialmente bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo (VL) aunque SE\_2 para tiempo térmico de la fase fue también significativo para los dos ensayos realizados sin tratamiento de vernalización (L y S), aunque en menor medida. En todos los casos los alelos de Nevada incrementan estos parámetros.

Por el contrario, *PPD-H2* sólo fue detectado para tiempo térmico bajo condiciones de día corto, SE\_1, con efectos distintos en ambos ensayos ya que sin tratamiento de vernalización (S) son los alelos de Nevada los que alargan la fase de elongación del tallo principal, mientras que con tratamiento de vernalización (VS) son los de Barbarrosa. Destaca también que el LOD máximo se encuentra desplazado 4,3 cM del marcador intragénico para *PPD-H2*, aunque el intervalo de confianza incluye su posición. Al contrario ocurre con el QTL SEL\_1 en 1H para número de hojas desarrolladas durante esta fase y significativo también bajo ambos ensayos con fotoperiodo corto (S y VS), el cual es un QTL diferente ya que su LOD máximo se encuentra desplazado 21,6 cM del marcador para *PPD-H2* no abarcando en este caso su intervalo de confianza la posición de dicho gen.

### 3.6.2.3 Ratio elongación del tallo principal/encañado (SE/J)

En este caso tan sólo los genes de vernalización y *PPD-H2* fueron significativos, de manera que en todos los casos los alelos de Nevada provocaban que este ratio fuera mayor, por tanto contribuyendo al alargamiento de la fase de elongación del tallo frente a la de encañado. De esta manera SE/J\_2 situado en la región de *VRN-H2* se detectó bajo condiciones de día largo (L y VL) y SE/J\_3 para *VRN-H1* en todos los ambientes menos en sin vernalizar y fotoperiodo corto.

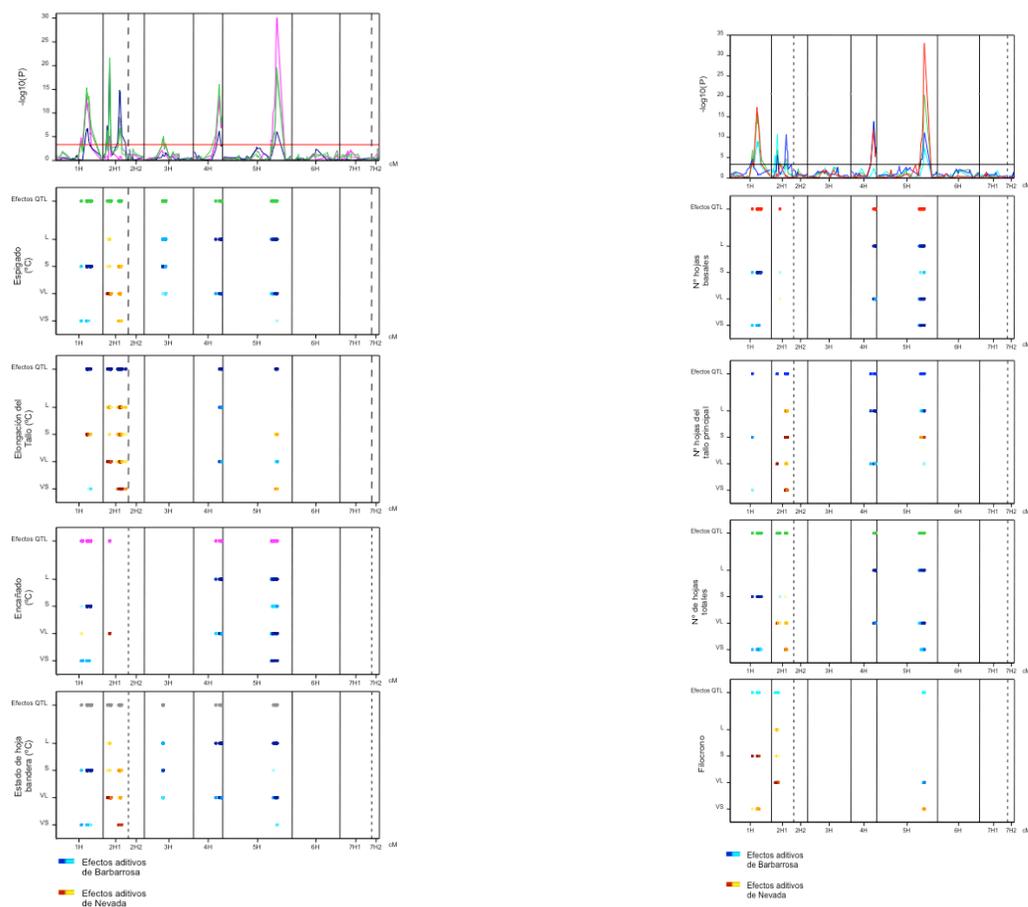
Por su parte sólo *PPD-H2* fue detectado para este ratio (SE/J\_1) en los ensayos bajo fotoperiodo corto, L y VL.

Destaca también la heredabilidad de este carácter, 0,73, la más alta de todos los caracteres estudiados en este trabajo.

### 3.6.2.4 Filocrono

Este carácter se caracteriza por tener la heredabilidad más baja de todos los estudiados en esta tesis, ya que esta es tan sólo de 0,27.

En este caso resultaron significativos ambos genes de fotoperiodo, *PPD-H2*, *PHY\_1*, para ambos ensayos bajo fotoperiodo corto (S y VS), mientras que *PPD-H1*, *PHY\_2*, lo fue en los ensayos bajo fotoperiodo largo (L y VL), especialmente bajo tratamiento de vernalización, así como en el ensayo con fotoperiodo corto (S). De manera que en ambos casos fueron los alelos de Nevada, típicamente primaverales, es decir sensibilidad a fotoperiodo corto e insensibilidad a fotoperiodo largo los que aumentaron el tiempo térmico para que se desarrollara una hoja. Mientras que si observamos el otro QTL significativo para este carácter, *PHY\_3*, situado en la región de *VRN-H1* vemos que este tan solo es significativo bajo tratamiento de vernalización, con efectos contrarios ya que los alelos de Nevada incrementan este carácter bajo fotoperiodo corto, mientras que bajo fotoperiodo largo son los alelos invernales de Barbarrosa los que incrementan el tiempo térmico para que se desarrolle una hoja.



**Figura 10.** En esta figura se muestran los QTL detectados bajo un análisis multiambiental a la derecha para el tiempo térmico de cada una de las fases estudiadas: espigado, elongación del tallo principal, encañado y estado de hoja bandera; y a la izquierda para los caracteres relacionados con número de hojas: tanto totales, como basales (antes de encañado) y número de hojas del tallo principal, así como los QTL detectados para filocrono. En la gráfica superior se muestra el LOD de cada uno de los parámetros y en las inferiores los efectos aditivos en cada uno de los ambientes estudiados.

### 3.6.2.5 Fase de estado de hoja bandera

Para esta fase ambos genes de vernalización y fotoperiodo fueron significativos para ambos parámetros, tiempo térmico y número de hojas, además de *Eam6* y un QTL a mayores para el tiempo térmico en el 3H, FL\_4, que no corresponde con *denso*, el cual segrega en la población. Este QTL fue detectado para todos los ambientes estudiados (menos S) y resultó no significativa su interacción con el ambiente, es decir, que en todos los ensayos tuvo los mismos efectos aditivos, de manera que los alelos de Barbarrosa provocan un incremento en el tiempo térmico total para alcanzar el estado de hoja bandera en igual manera independientemente del tratamiento aplicado.

Este mismo efecto se ha encontrado para los QTL detectados en *Eam6* (QTLxE no significativo) para esta fase, tanto para tiempo térmico FL\_3, como para número de hojas TL\_3, significativos ambos para todos los ensayos. Siendo los alelos de Nevada los que incrementan en igual medida en todos los ensayos los dos caracteres.

En cuanto los genes de vernalización, alelos de Barbarrosa, típicamente invernales fueron los que alargaron el tiempo térmico y número de hojas para alcanzar el estado de hoja bandera, principalmente bajo condiciones de día largo, para los QTL en la región de *VRN-H2*, FL\_5 y TL\_4, y también para los QTL en la región de *VRN-H1*, FL\_6 y TL\_5, siendo estos últimos también significativos bajo condiciones de fotoperiodo corto y vernalización (VS), e incluso FL\_6 para tiempo térmico, fue significativo (aunque con un efecto mucho menor) bajo condiciones e fotoperiodo corto sin vernalización (S).

En este caso los efectos de *PPD-H2* se hicieron notar bajo condiciones de día corto para ambos caracteres, FL\_1 y TL\_1, incrementando los alelos de Barbarrosa de insensibilidad a fotoperiodo corto estos caracteres.

Sin embargo, en cuanto a los efectos de *PPD-H1*, el tiempo térmico (FL\_2) se vio incrementado por los alelos de Nevada de insensibilidad e fotoperiodo largo en ambos ensayos bajo fotoperiodo largo (L y VL), e incluso fue significativo bajo día corto (S) aunque con un efecto mucho menor. Mientras que para el parámetro de número de hojas, el QTL TL\_2, fue significativo con los mismos efectos que para tiempo térmico sólo bajo condiciones de fotoperiodo largo y tratamiento de vernalización (VL), ya que este fue tan solo significativo en el ensayo nombrado anteriormente y bajo condiciones de fotoperiodo corto (S) pero en este caso el número de hojas para alcanzar el estado de hoja bandera se ve incrementado por los alelos de Barbarrosa aunque en menor medida que los efectos causados por los alelos de Nevada vistos en VL para este mismo carácter.

### 3.6.2.6 Espigado/Floración

En cuanto al espigado, nos encontramos con una heredabilidad similar a la encontrada para los caracteres de hoja bandera, entre 0,5 y 0,6, y unos efectos de los principales genes de floración muy similares a los descritos para tiempo térmico para alcanzar el estado de hoja bandera como se resume a continuación.

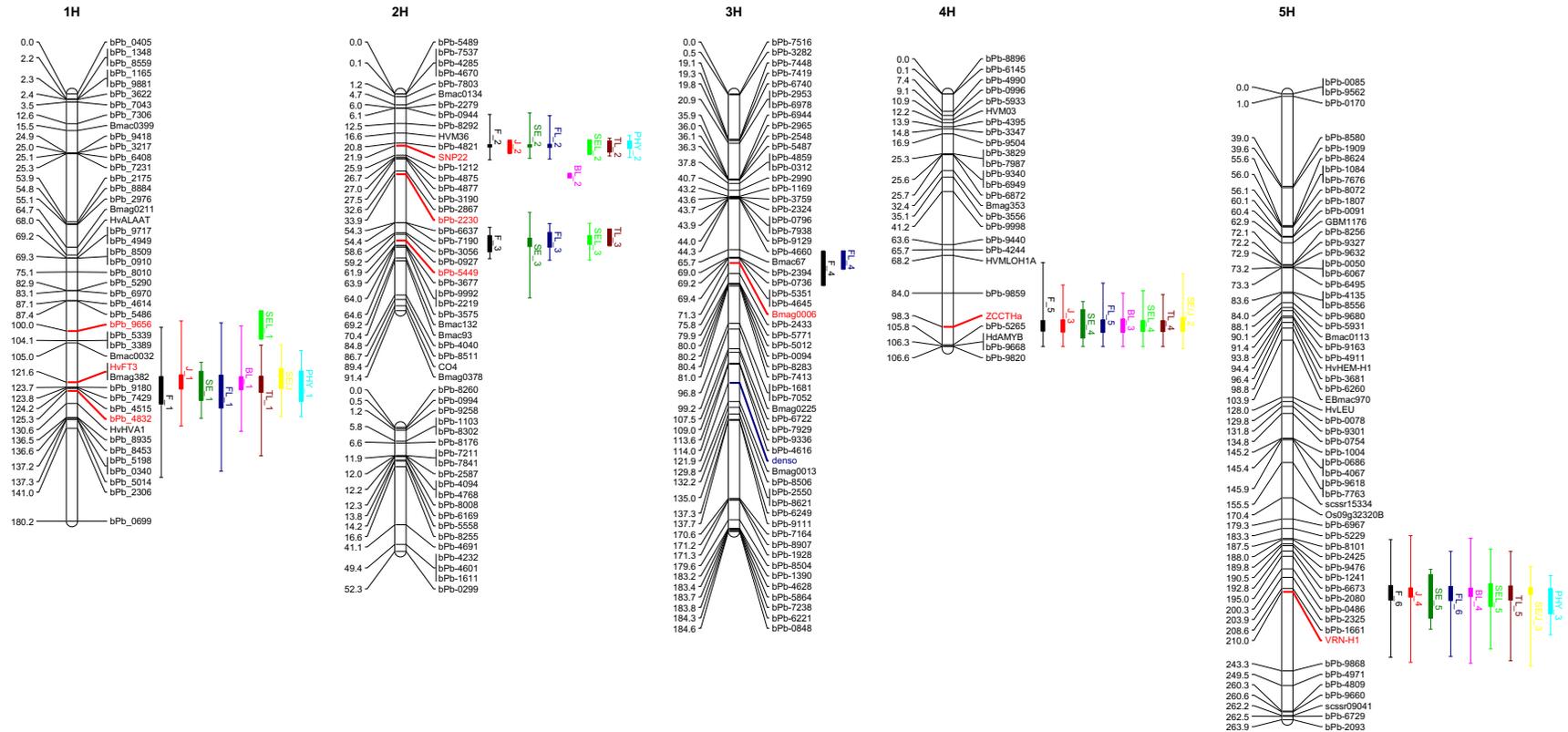
Ambos genes de vernalización fueron significativos (F\_5 para *VRN-H2* y F\_6 para *VRN-H1*) alargando los alelos invernales el tiempo de espigado bajo condiciones de día largo (L y VL), especialmente en condiciones sin vernalizar. En esta ocasión F\_6, en la región de *VRN-H1*, fue también

significativo con igual efecto de los alelos de Barbarrosa, aunque en mucha menor medida en el ensayo realizado bajo condiciones de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización (VS).

Por su parte los genes de fotoperiodo se comportaron de la misma manera que para tiempo térmico, QTL en 1H F\_1 en *PPD-H2* y F\_2 en 2H1 para *PPD-H1* para alcanzar el estado de hoja bandera y en los mismos ensayos como podemos ver al observar la figura 10 y la tabla 16, aunque en este caso los efectos aditivos de F\_1 en el ensayo con fotoperiodo corto donde fue significativo (VS), fueron mucho menores que en el caso de estado de hoja bandera.

Algo similar ocurre con el QTL detectado en la región de *Eam6*, F\_3, donde alelos de Nevada retrasan la fecha de espigado en los mismos ensayos que FL\_3 para el estado de hoja bandera (L, VL y VS), pero en este caso la interacción QTL por el ambiente si resulto significativa, tal y como vemos al observar los efectos aditivos de Nevada en cada uno de los ensayos, siendo mucho menores estos en el ensayo bajo condiciones de día corto (VS).

De igual manera que para tiempo térmico para alcanzar el estado de hoja bandera, nos encontramos un QTL para espigado en 3H, F\_4, el cual se sitúa en la misma posición que FL\_3, siendo también significativo en ambos ensayos sin vernalizar y el ensayo con tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo (L, S y VL), aunque en este caso, siendo también los alelos de Barbarrosa los que incrementan el tiempo total para floración, los efectos fueron distintos según el ensayo, siendo mayores los efectos de este bajo condiciones de día largo y sin tratamiento de vernalización (L).



**Figura 11** Mapa genético NxByB donde se muestra la posición de la mayoría de los caracteres cuantitativos (QTL) estudiados en dicha población. Se muestra en barra gruesa el intervalo de confianza y en forma de línea el intervalo hasta el límite de detección de QTL establecido en 3,34, mostrándose cada carácter analizado en un color: F en negro, J en rojo, SE verde oscuro, FL azul marino, BL rosa, SEL en verde claro, TL marrón, SE/J amarillo y PHY en azul claro. En el mapa aparecen marcados en rojo los marcadores que poseen el  $-\log_{10}(p)$  máximo de cada QTL detectado.

### 3.6.3 Interacciones QTLxAmbiente (QTLxE)

En todos los casos la interacción con el ambiente fue significativa a pesar de la baja explicación de la varianza que existió para GxE en cada carácter estudiado.

Sin embargo, cabe destacar que esta interacción QTLxE no fue significativa para los QTL detectado en la región donde se sitúa *Eam6* para el número de hojas totales y el número de días hasta alcanzar el estado de hoja bandera, parámetros para los que tampoco resultó significativa esta interacción para el QTL detectado en el grupo de ligamiento 3H en los alrededores del marcador Bmag6, tabla 16.

Mientras que en el extremo opuesto nos encontramos con los QTL para J\_1 en 1H, TL\_2 en 2H1, SEL\_5 y especialmente SE\_1 en 1H y SE\_5 en 5H en donde los efectos de los alelos de Nevada y Barbarrosa fueron contrarios en función del tratamiento aplicado. Especialmente destacan los dos últimos, debido a que en estos los efectos de uno u otro alelo tienen elevados efectos aditivos según el tratamiento aplicado, al contrario de lo ocurrido con los otros QTL donde se menciona este efecto.

### 3.6.4 Interacciones QTLxQTL en ambiente controlado

Fueron significativas múltiples interacciones con el QTL detectado en las inmediaciones del gen de precocidad intrínseca *Eam6*, así como múltiples interacciones entre los QTL situados en los genes de vernalización *VRN-H1* y *VRN-H2* mientras que las interacciones entre los QTL situados en las regiones donde se sitúan los dos genes de fotoperiodo tan solo fue significativa para filocrono, y tan solo bajo condiciones de fotoperiodo corto, cuando no es significativo ninguno de los genes de vernalización (ver tabla 17).

Por tanto, las principales interacciones entre QTL se pueden resumir de la siguiente manera:

- *VRN-H1* x *VRN-H2*, bajo fotoperiodo largo (L y VL) cuya interacción resultó significativa para todos los caracteres, excepto los parámetros de elongación del tallo (ni tiempo térmico, ni número de hojas caulinares).
- *VRN-H1* x *PPD-H2*, la cual fue significativa para parámetros de encañado tan solo bajo condiciones de fotoperiodo corto y vernalización (VS).
- Interacciones con QTL de la región donde se encuentra *Eam6*:
  - a. *Eam6* x *PPD-H1*, interacción significativa para espigado y estado de hoja bandera bajo condiciones de fotoperiodo corto sin vernalizar (S) y de fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización (VL). Esta interacción también es significativa para los parámetros de elongación del tallo (hojas y tiempo térmico) bajo condiciones de fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización (VL).
  - b. *Eam6* x *VRN-H1*, solo significativo bajo condiciones de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización (VS) para el tiempo térmico hasta espigado, alcanzar hoja bandera y el de elongación del tallo.
  - c. *Eam6* x *PPD-H2* para alcanzar estado de hoja bandera bajo condiciones de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización (VS).

Caracter	QTLxQTL	Marcadores	Ambientes			
			L	S	VL	VS
Espigado	F_2 x F_3	SNP22xbPb_3677	-	+	+	-
	F_3 x F_6	bPb_3677xVRN_H1	-	-	-	+
	F_5 x F_6	ZCCTHaxVRN_H1	+	-	+	-
Fase de Encañado	J_3 x J_4	ZCCTHaxVRN_H1	+	-	+	-
	J_1 x J_4	HvFT3xVRN_H1	-	-	-	+
Fase de Elongación del Tallo Principal	SE_2 x SE_3	SNP22xbPb_5449	-	-	+	-
	SE_3 x SE_5	bPb_5449xVRN_H1	-	-	-	+
Estado de Hoja Bandera	FL_2 x FL_3	SNP22xbPb_5449	-	+	+	-
	FL_5 x FL_6	ZCCTHaxVRN_H1	+	-	+	-
	FL_1 x FL_3	HvFT3xbPb_5449	-	-	-	+
	FL_3 x FL_6	bPb_5449xVRN_H1	-	-	-	+
Nº Hojas Basales	TL_2 x TL_3	bPb_2230xZCCTHa	-	-	+	-
	TL_3 x TL_4	ZCCTHaxVRN_H1	+	-	+	-
	TL_1 x TL_4	HvFT3xVRN_H1	-	-	-	+
Nº Hojas del Tallo Principal	SEL_2 x SEL_3	SNP22xbPb_5449	-	-	+	-
Filocrono	PHY_1 x PHY_2	HvFT3xSNP22	-	+	-	-

**Tabla 17.** Interacciones calculadas usando modelos mixtos, primero utilizando como elementos fijados los QTL significativos para cada carácter en cada uno de los ensayos por separado y a continuación añadiendo al modelo la/las interacciones QTLxQTL por separado.

## 4. Discusión

A consecuencia de los resultados obtenidos, y de estudios previos de otros autores como (Borràs-Gelonch et al, 2012) podemos decir que las fases de pre-espigado están altamente influenciadas por los principales genes de fotoperiodo y vernalización. Como hemos visto anteriormente los genes *VRN-H1*, *VRN-H2*, *PPD-H1* y *PPD-H2* se sitúan donde fueron significativos los principales QTL detectados bajo todas las condiciones de este estudio. Además del gen de precocidad per sé *Eam6*, tal y como ocurre en estudios de otras poblaciones como Steptoe x Morex (Borràs-Gelonch et al, 2012) en la cual *Eam6* resultó débilmente significativo en la fase hasta encañado de la planta. En esta ocasión, sólo un QTL en una región distinta a las regiones de estos genes en el grupo 3H fue detectado a mayores para tiempo total de espigado y tiempo para alcanzar el estado de hoja bandera. Esto se puede deber tanto a la selección a la que se vio sometida esta población, como a la más baja resolución del mapa obtenido con la población de estudio que el utilizado para estudios similares con otras poblaciones de cebada.

Por su parte, el alelo *denso*, el cual se ha descrito retrasa la floración (Sears et al, 1981; Saville et al, 2012), no fue significativo en ninguna de las fases estudiadas bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo, ni siquiera para el tiempo total de espigado.

Como cabe esperar *VRN-H2* y *VRN-H1* se detectaron en todas las fases bajo condiciones de día largo incluso en condiciones sin vernalizar, lo que podría afirmar la teoría de que estos genes de vernalización están interactuando con los genes del ciclo circadiano (Mulkin et al, 2016), ya que aún sin vernalizar sus efectos son significativos. Aunque su interacción directa con *PPD-H1* no fuese significativa directamente en este estudio. De manera que bajo tratamiento VL tampoco se llegaron a ajustar la duración de las distintas fases entre las líneas que necesitaban vernalizar y las que expresaban constitutivamente *VRN-H1*, a pesar de haberse satisfecho las necesidades de vernalización, teniendo como resultado que *VRN-H1* fuera bajo ambos ambientes con fotoperiodo largo, pudiendo achacar en este caso las pequeñas diferencias a la represión de *VRN-H2* por parte de *PPD-H1*, expresándose *VRN-H1* antes de finalizar la vernalización, y, por tanto, causando diferencias entre las líneas el alelo invernal de *VRN-H1* en función del alelo de *PPD-H1* que porten.

En la fase de encañado tampoco fue significativo el gen de fotoperiodo *PPD-H1*, aunque si lo es bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo, ya que su función como inductor de la floración bajo estas condiciones según todos los autores es cuándo es más notable por inducir a *HvFT1*, responsable directo de la floración (Faure et al, 2007). Mientras que *PPD-H2* tuvo grandes efectos en todas las fases bajo día corto, aunque en la fase de elongación del tallo este QTL se encuentra desplazado cuatro cM.

En lo que respecta a las interacciones QTLxQTL, múltiples interacciones con *Eam6* fueron significativas, como son las interacciones con *PPD-H1* bajo día largo y vernalización (VL) para todas las fases después de producirse el encañado. Y con *VRN-H1* bajo condiciones de vernalización y día corto (VS) cuando *PPD-H1* no es significativo, por lo que podemos concluir que *Eam6* está potenciando la floración acelerándola una vez esta está inducida. Además la interacción entre ambos genes de vernalización resultó significativa en todas las fases estudiadas tal como se esperaba.

En esta población en concreto (NxBxB), similar a lo encontrado por Gisela et al (2012) en la población Steptoe x Morex, los efectos de *Eam6* no fueron detectados en la fase de encañado, sino que sus efectos sólo fueron significativos cuando la floración ya estaba inducida (a partir de la fase de elongación del tallo), de tal manera que el alelo invernal procedente de Barbarrosa aceleraba todas las demás fases. Por lo que Barbarrosa es el parental portador del alelo de precocidad intrínseca tan

determinante en condiciones mediterráneas de sequía extrema al final del ciclo del cultivo según diversos autores (Cuesta-Marcos et al, 2009; Comadrán et al, 2011) para el ajuste final de correcto espigado/llenado de grano bajo dichas condiciones.

En condiciones mediterráneas, el espigado tiene que producirse en un momento adecuado para escapar de los accidentes ambientales que pueden mermar la producción. Por un lado, debe ser suficientemente tardía para escapar de las heladas tardías primaverales, que pueden conducir a aborto de flores si se dan durante la floración. Sin embargo, espigados precoces favorecen un mayor periodo de llenado de grano antes de que la sequía terminal conduzca hacia la madurez fisiológica. Por tanto, la adaptación a las condiciones ambientales de Castilla y León requiere de un compromiso de precocidad en el momento de la floración. Diversos autores han propuesto alternativas para optimizar el rendimiento sin cambiar la fecha de floración, que para la mayoría de las variedades utilizadas en nuestra tierra sucede entre el 15 de abril y la primera semana de mayo. Se ha propuesto adelantar la fecha de encañado para permitir un mayor tiempo de elongación del tallo (Slafer et al, 2005; Fischer, 2007, 2008; Miralles y Slafer, 2007)

#### 4.1 Control genético de la fase de espigado y estado de hoja bandera

Una alta correlación entre ambas fases se encontró en este estudio bajo distintas condiciones tanto de fotoperiodo como de vernalización (tabla 10), además de una gran similitud en ambas fases en los QTL encontrados (tabla 16, figuras 9, 10 y 11), lo que nos da idea que este estado está bajo un mismo control genético.

Entre ambas fases, tan solo el QTL en el grupo 3H de la región próxima al SSR *bmag6* detectado para espigado (*F\_4*) difiere, al no ser este detectado para el número de hojas totales, pero sí para el tiempo térmico necesario para alcanzar el estado de hoja bandera (*FL\_4*). En este último caso, la interacción QTLxE no fue significativa, poseyendo los mismos efectos en los tres ambientes donde resultó significativo. En una región similar se encuentran los genes de floración *HvFT2* y *HvGI* (Faure et al, 2007; Dunford et al, 2005; Kikuchi et al, 2009). Hayes et al (1993) encontró un QTL en una región similar para espigado en la población Steptoe x Morex con pequeños efectos, siendo Steptoe, al igual que Barbarrosa en la población de este estudio, el que producía retrasos en el tiempo total de espigado. También Borràs-Gelonch et al (2012) detectaron este mismo QTL para dicha población para la fase de elongación del tallo y espigado y en otra población en una región próxima Borràs-Gelonch et al (2010) detectaron también este QTL para floración, aunque no para las fases de pre-espigado, al igual que sucede en este estudio.

Pequeñas diferencias se encontraron entre los QTL detectados en los distintos ambientes para número de hojas totales y espigado, encontrando diferencias en el QTL significativo en la región de *PPD-H1*, ya que este lo fue únicamente para número de hojas totales bajo condiciones de fotoperiodo largo sin vernalización, cuando éste debería haber causado diferencias, al tener una tan alta correlación genética con el tiempo térmico para alcanzar el estado de hoja bandera (tabla 9) y ser estas condiciones en las cuales las diferencias alélicas de la sensibilidad o no a fotoperiodo largo causadas por el gen *PPD-H1* las más indicadas para causar diferencias (Turner et al, 2005). Aunque sí fue detectado este QTL para hojas totales en el otro ambiente con condiciones de fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización, encontrándonos que bajo condiciones de fotoperiodo largo sin vernalización el número de hojas totales se encuentra controlado genéticamente por los genes de vernalización (*VRN-H1* y *VRN-H2*)

y la interacción entre estos. Sin embargo *PPD-H1* sí fue significativo, tanto para el tiempo térmico para alcanzar el estado de hoja bandera como para el tiempo de espigado, encontrando que este fue significativo no sólo en los dos ensayos bajo fotoperiodo largo, sino también, aunque con efectos mucho menores, bajo condiciones de fotoperiodo corto sin tratamiento previo de vernalización, lo cual es interesante ya que bajo condiciones de fotoperiodo corto no debería haber tenido efecto alguno (Laurie et al, 1994, Cuesta-Marcos et al, 2008a), aunque Borràs-Gelonch et al (2012) encontró un efecto similar a lo ocurrido en la población *NxBxB* en la población *Steptoe x Morex* atribuyendo estos efectos de *PPD-H1* bajo fotoperiodo corto a la interacción con la temperatura, como otros estudios anteriores, los cuales sugerían que la respuesta al fotoperiodo podría variar entre las distintas fases de desarrollo y la temperatura (Slafer y Rawson 1996). Otra explicación posible es que el ensayo sin vernalizar fotoperiodo corto, al desarrollarse las plantas en condiciones tan poco inductivas, fue el ensayo que más se alargó en es tiempo, permitiendo que los fotoperiodos naturales se alargasen suficientemente para acelerar el espigado.

Por su parte, mutaciones de *PPD-H2* causando inactividad del mismo se encuentran típicamente en variedades invernales (Faure et al, 2007; Casao et al 2011b), como es el caso de Barbarrosa. Este resultó significativo para ambos caracteres únicamente bajo condiciones de fotoperiodo corto, causando diferencias en la fecha de floración (Laurie et al, 1995; Boyd et al, 2003), alargando los alelos de Barbarrosa el tiempo tanto de floración como para alcanzar el estado de hoja bandera.

En cuanto a los genes de vernalización, nos encontramos diferencias entre ambos de manera que *VRN-H2* resultó significativo bajo condiciones de fotoperiodo largo, mientras que *VRN-H1* fue significativo en estos mismos ensayos bajo fotoperiodo largo, pero también para el otro ensayo bajo tratamiento de vernalización y fotoperiodo corto. Además Mientras que este también podría estar interaccionando como represor de *PPD-H2* como propusieron Casao et al (2011a), ya bajo condiciones de fotoperiodo largo, cuando *VRN-H2* se está expresando, *PPD-H2* no resulto en ningún caso significativo.

QTL en la región de *Eam6* fueron detectados también tanto para número de hojas, como para el tiempo térmico hasta alcanzar el estado de hoja bandera y el tiempo térmico total para espigado, encontrándonos que este fue significativo para todos los ensayos a excepción del ensayo con tratamiento de fotoperiodo largo (L), para el cual este QTL sí fue significativo en el otro parámetro donde sus efectos fueron detectados, fase de elongación del tallo principal. En el caso que nos ocupa, fueron los alelos de Barbarrosa, parental con genotipo invernal, los que causan precocidad per sé, pero no existen diferencias en función del fotoperiodo como observaron Cuesta-Marcos et al (2008a), ya que QTL en esta región fueron significativos indistintamente del tratamiento de fotoperiodo, y, lo que es más, los efectos de estos para alcanzar el estado de hoja bandera son los mismos en los tres ensayos donde éste fue significativo, como observamos en la tabla 16, donde vemos que la interacción de *FL\_3* con el ambiente (QTL x E) no es significativa.

## 4.2 Control genético de las fases hasta encañado y elongación del tallo principal. Fraccionamiento de las fases de pre-espigado.

El control genético de estas dos fases resultó claramente diferente según los resultados obtenidos, de manera que, a pesar de que ambas fases se encuentran controladas principalmente por los genes de vernalización y fotoperiodo, existen diferencias entre ambas fases.

No se han encontrado grandes QTL que difieran de los QTL detectados para el tiempo total hasta estado de hoja bandera o espigado, pero se han encontrado diversos QTL ligeramente alejados su LOD máximo de los genes de respuesta al fotoperiodo *PPD-H1* y *PPD-H2*. De manera que en la fase de elongación del tallo el LOD máximo de los QTL detectados en 1H (*SE\_1* y *SEL\_1*), donde se encuentra *PPD-H2* en ningún caso coincidió con el marcador intragénico utilizado para este gen, sino que se encontraron desplazados, destacando sobre todo que en el caso del número de hojas en la fase de elongación del tallo, el intervalo de confianza de *SEL\_1*, ni siquiera engloba la posición de este gen, a pesar de que ambos fueron detectados únicamente bajo condiciones de fotoperiodo, al igual que todos los QTL detectados para este gen, lo que nos indica que posiblemente los efectos de estos no son directamente los efectos causados por *PPD-H2* en esta fase. Esto mismo fue detectado por et al, 2012 en la población Steptoe x Morex, donde los efectos de *PPD-H2* no fueron significativos en la fase de elongación del tallo, aunque sí para la fase hasta encañado de las plantas, al igual que lo encontrado en la población de este estudio NxBxB.

Mientras que el otro QTL significativo distinto a los anteriores (*TL\_2*) se sitúa en el grupo 2H1, alejado tanto de *PPD-H1* como de *Eam6*, siendo solamente detectado bajo condiciones de fotoperiodo corto sin tratamiento de vernalización (S) para número de hojas en la fase de encañado, siendo los alelos de Barbarrosa los que aumentan el número de hojas en esta fase, al contrario de lo que ocurre con el QTL (*J\_2*) para duración desde nacimiento a encañado en *PPD-H1*. Al haber sido significativo *PPD-H1* para la duración de la fase de encañado, se considera que este sí juega un papel relevante en esta fase.

En cuanto a la interacción de los distintos ambientes con los genotipos de esta población, nos encontramos con porcentajes de explicación de la varianza superiores al porcentaje explicado por los genotipos en ambas fases (tabla 11) de manera que esta interacción es importante en ambas fases, igual que lo encontrado por otros autores (Borràs et al, 2009; Borràs-Gelonch et al, 2012), incluso de mayor importancia que al analizar el tiempo total hasta espigado, puesto que en este caso, la explicación de la varianza de G (genotipo) y GxE (interacción de este con los ambientes) tiene valores similares. Observamos también que la respuesta de las líneas durante las distintas fases es bien distinta: mientras durante la fase de encañado existe una interacción positiva de las líneas primaverales frente a los ambientes con tratamiento con vernalización, por lo que encontramos una tendencia general en las líneas invernales a alargar esta fase cuando no se les aplica este tratamiento (ver gráfico izquierdo 9 del modelo AMMI), como cabría esperar ya que estas necesitan de ello para que *VRN-H1* se active y así inducirse la floración y por tanto finalizar esta fase (Yan et al, 2003; Sasani et al, 2009); por su parte, para el tiempo total hasta espigado, encontramos una situación similar, pero en este caso condicionado no por el tratamiento de vernalización aplicado, sino por la longitud del fotoperiodo, de manera que en este caso la aplicación de fotoperiodos largos se traduce en mayores tiempos totales de espigado por parte de las líneas con genotipo invernal, y, por tanto, mayor precocidad de estas bajo fotoperiodo corto; mientras que en cuanto a la elongación del tallo no existe una tendencia tan clara entre las líneas primaverales e invernales, pero se observa bajo el modelo AMMI para esta fase una clara división de los

ambientes en función de la longitud del fotoperiodo aplicado, especialmente frente al eje IPCA2 (ver graficas 10).

Según diversos estudios, las correlaciones entre las fases de pre-espigado no son significantes o no son consistentes entre estudios (Appleyard et al, 1982; Whitechurch et al, 2007; Borràs et al, 2009). Sin embargo, si nos fijamos en la tabla 10, en este estudio las correlaciones genéticas entre la fase hasta encañado y de elongación del tallo sí fueron significativas, variando enormemente estas correlaciones en función de si hablamos de número de hojas desarrolladas en cada fase o del tiempo térmico necesario para que se desarrolle y, además, con graves diferencias entre los distintos tratamientos. De manera que según estos resultados y en este fondo genético concreto, existe una dependencia entre ambas fases, lo cual es interesante a nivel agronómico para el ajuste de ambas sin variar el tiempo total de espigado, mejorando el rendimiento en grano (Slafer et al, 2005).

Sin embargo, el complejo control genético y, unido a la fuerte interacción GxE en ambas fases, dificultan conseguir un ajuste óptimo entre estas para adaptar el tiempo de espigado a estas condiciones. De manera que, viéndose menores interacciones GxE utilizando el ratio (SE/J) resultante entre la duración de la fase de elongación del tallo entre la duración de la fase de encañado (Borràs et al, 2009), se ha introducido en este estudio, encontrándonos que, aunque la interacción GxE encontrada entre los genotipos y el ambiente es similar a la de estas fases por separado, tienen un mayor peso la explicación de los genotipos por separado que su interacción con los ambientes (tabla 11), por lo que al igual que lo encontrado por Borràs et al (2009) este ratio tiene un fuerte control genético. Lo que, es más, al igual que Borràs et al (2009 y Borràs-Gelonch et al, 2012, una alta heredabilidad, 0,732 (tabla 16), fue detectada para este carácter, mayor que para las fases que le definen por separado, de manera que en esta población también está justificada la detección de QTL para este parámetro, y, además, su posible utilización en los planes de mejora genética de cebada. En este sentido, los únicos QTL significativos se sitúan en 1H en el gen *PPD-H2* y en los genes de vernalización *VRN-H1* en 5H y *VRN-H2* en 4H (tabla 16).

Por tanto, el control genético de éste se encuentra determinado en función del fotoperiodo aplicado, ya que bajo condiciones de fotoperiodo largo este se encuentra controlado por los genes de vernalización, mientras que bajo día corto el papel de *PPD-H2* es crucial, de manera que bajo tratamiento S este fue el único QTL significativo, aunque con fotoperiodo corto y vernalización también resulto significativo *VRN-H1*. Aunque con estos resultados podemos afirmar que *PPD-H2* juega un papel de vital importancia en las fases de pre-espigado como se trata más adelante. Cabe destacar que ni *PPD-H1* ni *Eam6* fueron significativos en lo que respecta a este ratio.

Haciendo una disección bajo estas condiciones de cómo afectan al control genético de ambas fases, la combinación de estos tratamientos tan extremos de fotoperiodo y vernalización, y que difieren tanto de las condiciones típicamente mediterráneas en donde se obtuvo la población NxBxB de este estudio, y con el fin de obtener líneas potencialmente útiles para el programa de mejora genética de donde se extrajo, en este trabajo se han buscado líneas potencialmente precoces y con un tiempo minimizado para encañar, de manera que el tiempo para llenado de grano se ajuste de la mejor manera posible a los recursos disponibles bajo un ambiente en el que el ciclo concluye con una sequía terminal y, en consecuencia, el llenado de grano tiene que ocurrir lo más temprano posible para poder obtener unos rendimientos óptimos del cultivo.

Por lo que nos encontramos que la combinación de condiciones ambientales/optimización de las fases estudiadas que se adaptan al ciclo bajo condiciones mediterráneas corresponderían a la mayor precocidad de encañado bajo tratamiento VS, con vernalización y fotoperiodo corto, ajustándonos a las condiciones climatológicas y de fotoperiodo de las latitudes que nos ocupan y con una fase de elongación del tallo/estado de hoja bandera bajo VL lo suficientemente corto para salvar esa sequía

terminal bajo siembra otoñal. De manera que, bajo este modelo, las correlaciones entre las distintas fases fueron similares a las encontradas entre fases en los ensayos L y VS, con condiciones totalmente opuestas el uno del otro, siendo menores las correlaciones existentes entre las fases de encañado y la fase de elongación del tallo principal, mientras que otros estudios no han encontrado correlaciones genéticas entre estas dos fases de pre-espigado (Borràs et al, 2009; Borràs-Gelonch et al, 2010). Mientras que, en lo que respecta a la correlación entre el espigado estimado en el modelo propuesto frente al ratio del mismo  $SE_{VL}/J_{VS}$  (tabla 13), fue negativa de igual manera que para en el resto de los ensayos realizados (tabla 10). De tal manera que las líneas más adaptadas en cuanto a un ajuste optimizado para obtener tiempos de elongación del tallo superiores mejorando parámetros de rendimiento sin variar el tiempo total hasta espigado (Slafer et al, 2005), optando por las líneas potencialmente más precoces en la población NxNxB bajo el modelo propuesto, poseen todas ellas el alelo *vrn-H1* procedente de Nevada utilizando como criterio de selección el ratio SE/J, el cual fue el QTL más significativo para este parámetro en este estudio. Sin embargo, ningún QTL se detectó para este cociente en el gen de sensibilidad a fotoperiodo largo *PPD-H1*, el cual sí es significativo en la duración de las fases que lo componen, pero en esta ocasión todas las líneas seleccionadas, tanto las más precoces como las más tardías portan el alelo de Barbarrosa, sin la mutación que causa insensibilidad a fotoperiodo largo (Turner et al, 2005). Por tanto, aunque éste no fue significativo para este cociente, al poseer importancia en ambas fases e incluso para el tiempo de espigado, en esta población resultó más ventajoso frente al modelo propuesto el carácter de sensibilidad a fotoperiodo largo, e incluso al observar el comportamiento de estas líneas frente al ensayo con fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización (gráfico 15) estas se comportaron de forma ventajosa dentro del grupo con comportamiento típicamente primaveral las seleccionadas como precoces, mientras que las más tardías se encontraban junto a las invernales, cuando estas condiciones son las más próximas a las condiciones bajo siembra primaveral en las latitudes de la meseta castellana.

Sin embargo, en el caso de sensibilidad a fotoperiodo corto *PPD-H2*, mayoritariamente predominaron las líneas sensibles a fotoperiodo corto, aunque una serie de ellas poseían el alelo de insensibilidad a fotoperiodo corto procedente de Barbarrosa. Cabe destacar, que, aun buscando líneas precoces en cuanto al tiempo total de espigado, seis de las líneas son portadoras del alelo *denso*, el cual retrasa la floración en campo (Jia et al., 2009), pero en este caso no llegó a ser significativo en ninguno de los ambientes propuestos.

### 4.3 Papel de *PPD-H2*

*PPD-H2*, cuyo gen candidato es *HvFT3* (Faure et al, 2007; Kikuchi et al, 2009) fue significativo en todas las fases estudiadas, con distintos efectos según el tratamiento aplicado, siendo solo significativo bajo fotoperiodo corto. Sin embargo, en la fase de elongación del tallo principal, este no fue significativo, sino que, tanto para número de hojas desarrolladas en esta fase, como para la duración de esta, los QTL detectados en 1H no tuvieron su máxima significación en el gen *HvFT3*, mientras que para la fase de encañado este fue uno de los principales QTL para esta fase bajo día corto, al igual que para el ratio entre ambos parámetros.

Ha sido descrito que este gen causa diferencias en la fecha de espigado en condiciones de día corto (entre 8 y 12 horas) y bajo siembras otoñales (Laurie et al, 1995; Cuesta-Marcos et al, 2008a), aunque se han encontrado también sus efectos en altas latitudes como el Norte de América o Escocia

bajo siembras primaverales (Ramsey et al, 2008), detectándose una posible interacción de este con *VRN-H2*, el cual solo se expresa bajo día largo y podría estar actuando como represor de *PPD-H2* (Casao et al, 2011a).

En la población  $N \times B \times B$  *PPD-H2* ha correspondido con uno de los principales QTL detectados tanto para tiempo total de espigado, como para encañado e incluso para el filocrono de las plantas tan sólo bajo condiciones de día corto encontrándose interacciones tanto con *VRN-H1* para la duración de la fase de encañado como con *Eam6* para alcanzar el estado de hoja bandera, detectando sus interacciones siempre bajo condiciones de vernalización, de manera que los efectos de éste fueron mayores sin condiciones de vernalización, ya que bajo estas condiciones fue el principal QTL detectado, sin ser significativas dichas interacciones con otros QTL detectados en ese ambiente.

Destaca también que en la fase de encañado se detectara una fuerte interacción de *PPD-H2* con el ambiente, en el sentido de que fue detectado en este caso no sólo bajo condiciones de fotoperiodo largo, sino también bajo fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización aunque en este caso sus efectos aditivos fueron mucho menores, siendo el alelo inactivo de Barbarrosa el que producía un alargamiento de esta fase, mientras que bajo fotoperiodo corto este incremento de tiempo se debe al alelo activo de Nevada.

En lo que respecta a las diferencias entre las fases hasta encañado y de elongación del tallo, los distintos efectos de *PPD-H2* podrían deberse a diferencias intrínsecas entre las dos fases, ya que, en lo que respecta al QTL *SE\_1* localizado en 1H para la duración de esta fase, nos encontramos que, aunque este fue significativo tan solo bajo condiciones de fotoperiodo corto, existió una fuerte interacción genotipo por ambiente. En este caso los efectos de los alelos de Barbarrosa no fueron los que alargaron esta fase en ambos ensayos bajo estas condiciones, sino que sin tratamiento de vernalización este incremento de duración de la fase se debe a los alelos de Nevada.

Posiblemente este no corresponda directamente con el gen *PPD-H2*, sino que podría deberse a efectos pleiotrópicos de este, lo que explicaría que en esta fase, tanto para número de hojas como para duración en tiempo térmico el  $-\log_{10}(p)$  máximo de ambos QTL se encuentre desplazado del marcador intragenico utilizado para *PPD-H2*. Aunque hemos de destacar que para la fase de elongación del tallo tan sólo se usaron los datos procedentes del tallo principal, por lo que esto pudo ser una limitación a la hora de ver los efectos tanto de *PPD-H2* como del resto de los QTL detectados para esta fase. Y, además, en la metodología aplicada para el tratamiento de fotoperiodo corto, al final del ciclo de las plantas se aplicaron fotoperiodos naturales, que en las latitudes donde se llevó a cabo este ensayo corresponde a fotoperiodos largos. Por tanto, durante el tiempo correspondiente a la fase de elongación del tallo en los ambientes S y VS, el fotoperiodo no habría sido corto, pudiendo esto haber afectado a los QTL detectados en la región de *PPD-H2* especialmente a esta fase.

Sin embargo, estos resultados obtenidos en la fase de elongación del tallo respecto a *PPD-H2* guardan relación con los resultados obtenidos por Kikuchi et al (2009) respecto a los niveles de expresión de este gen en estas fases, de manera que los más altos niveles de expresión de este fueron detectados hasta alcanzar las 3-4 hojas (de un total de 7) en Morex, variedad portadora del alelo de sensibilidad a fotoperiodo corto (Hayes et al, 1993).

*Capítulo cuarto:*

*Detección de caracteres cuantitativos (QTL)  
de rendimiento en una población BC1F5 de  
cebada bajo condiciones Mediterráneas*

# Detección de caracteres cuantitativos (QTL) de rendimiento en una población BC1F5 de cebada bajo condiciones mediterráneas

---

## 1. *Introducción: El control genético del rendimiento y sus parámetros*

Conseguir incrementar el rendimiento de un cultivo es la meta de cualquier programa de mejora genética. Sin embargo, la mejora de caracteres complejos, como es el caso del rendimiento en condiciones de sequía terminal, como es el caso de los ambientes mediterráneos, u otros estreses abióticos, es extremadamente complicado, ya que la magnitud de la interacción del genotipo con el ambiente (GxE) es enorme en comparación con los principales efectos genotípicos (Voltas et al. 2002, Slafer 2003). Otra complicación es la gran cantidad de caracteres cuantitativos (QTL) que pueden estar implicados en el control del rendimiento y sus parámetros, las interacciones entre dichos caracteres cuantitativos (QTLxQTL) y la sensibilidad de cada QTL por separado a las condiciones ambientales.

Por tanto, el rendimiento final del cultivo es el producto de múltiples procesos de crecimiento y desarrollo que ocurren a lo largo del ciclo del cultivo, con muchos genes implicados con efectos directos o indirectos en el rendimiento (Slafer et al, 2003). Los caracteres cuantitativos determinan los caracteres favorables para unas condiciones ambientales particulares, pudiendo estos ser debidos a efectos indirectos en el rendimiento, como ocurre por ejemplo con los genes de semienanismo (Jia et al, 2009) o la respuesta al fotoperiodo (Laurie et al, 1994).

Por otro lado, el ajuste fenológico es una de las claves para la adaptación bajo condiciones limitantes de agua y es una de las principales contribuciones a la interacción genotipo por ambiente (GxE) en cereales, siendo los principales factores que afectan a la fenología del cultivo de la cebada la sensibilidad al fotoperiodo y la necesidad de vernalizar. Ambos tienen una influencia directa en la adaptación y en la distribución geográfica de los cultivares (Boyd, 1996). Además, estos factores, como se ha explicado anteriormente, tienen un impacto tanto en el rendimiento, como en sus componentes.

De manera que los distintos componentes del rendimiento: número de espigas/granos por metro cuadrado, número de granos por espiga y peso de mil semillas se determinan secuencialmente a lo largo del desarrollo de la planta. Así, el número de espigas y número de granos por espiga se determinan durante la fase previa a antesis y otros como el tamaño de grano se determinan entre la antesis y la madurez (García del Moral y Ramos, 1989). Por tanto, los distintos componentes del rendimiento se van desarrollando secuencialmente a lo largo del desarrollo de la planta, lo que, en el caso de los cereales, proporciona la capacidad de compensar efectos adversos logrando equilibrar la cosecha bajo una gran diversidad de ambientes y circunstancias (García del Moral y Ramos, 1989). Por tanto, las fases de pre-espigado son cruciales a la hora de determinarse estos componentes y por tanto

el rendimiento, influenciado siempre por los ambientes y los distintos factores que puedan afectar al cultivo.

Esta es una de las razones que explican la elección de los cereales como cultivos desde tiempo muy antiguo, también condiciona la aparición de mecanismos de compensación de forma que un componente del rendimiento tiende a estar negativamente correlacionado con los que se desarrollan posteriormente. (García del Moral y Ramos, 1989).

Una consideración importante en relación a la definición de un ideotipo adaptado a determinadas condiciones ambientales, es que el efecto sobre el rendimiento de uno o pocos caracteres suele ser pequeño (Loss y Siddique, 1994), influyendo en su expresión un gran número de genes, cuantitativos y cualitativos, y sus interacciones, tanto epistáticas como ambientales (Pérez de la Vega et al, 2011). Por consiguiente, para definir correctamente un ideotipo, se debería considerar el mayor número posible de caracteres que puedan influir en la expresión del rendimiento, incluyendo en los estudios orientados a la definición del ideotipo variabilidad genética suficiente que permita detectar la posible influencia de su expresión en el carácter rendimiento (Acevedo y Ceccarelli, 1989).

En este capítulo se tratará de dilucidar cuales son los factores tanto genéticos como ambientales que están involucrados de alguna manera en el control del rendimiento y sus componentes bajo un ambiente muy determinado, como es el caso de la meseta castellano leonesa, sometida a una serie de factores tales como, un corto periodo libre de heladas, periodos de sequía durante el ciclo más frecuentes en la fase terminal o los cambios de fotoperiodo a lo largo del ciclo. Para ello se realizará la detección de caracteres involucrados en la adaptación y expresión del rendimiento y, en consecuencia, se buscará el ideotipo adecuado que, bajo las condiciones ambientales de la meseta castellana y leonesa, con características típicas de condiciones climatológicas mediterráneas bajo el fondo genético de la población de estudio Nx BxB posee un mayor potencial de rendimiento.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Población y material vegetal utilizados

La población de estudio es la población NxBxB objeto de esta tesis, descrita en materiales y métodos del capítulo dos, consistente en 185 líneas BC1F5 obtenidas entre las variedades Nevada y Barbarrosa. El mapa genético para este estudio fue el obtenido en el trabajo detallado de ese mismo capítulo.

### 2.2 Caracterización fenológica y ambientes del estudio

Para el estudio fenológico se realizaron seis ensayos de campo, con tres repeticiones cada uno de ellos, con un diseño en bloques completos al azar. Los caracteres medidos fueron los que posteriormente se utilizaron para su análisis y posterior detección de QTL.

Estos ensayos de campo, se llevaron a cabo en la Finca Zamadueñas (Valladolid) durante las campañas 2005/2006 (2006), 2007/2008 (2008), dos durante la campaña 2008/2009 con dos fechas de siembra diferentes (otoñal, 2009\_Winter, y primaveral, 2009\_spring). De esta manera, al tener dos fechas de siembra diferentes, siendo una muy tardía, se podrán corroborar los resultados obtenidos en invernadero, en cuanto a la sensibilidad a vernalización de cada una de las líneas. Los dos últimos se realizaron en la campaña 2010/2011, uno de ellos, al igual que el resto, en la Finca Zamadueñas, 2011\_Z, y el otro en la localidad vallisoletana de Peñafior de Hornija, 2011\_P. Este último se situó en un ambiente ligeramente diferente respecto a las condiciones físicas, ya que esta zona se encuentra en un páramo más venteado y con un terreno más pedregoso que la finca donde se realizaron todos los demás.

Así de los cinco ensayos sembrados en Zamadueñas (41,71°N, 4,69°O y una altitud de 702m), uno se diferenció en la fecha de siembra, de manera que 2006, 2008, 2009\_Winter y 2011\_Z se sembraron el 24, 19, 26 y 23 de noviembre respectivamente, mientras que 2009\_spring se sembró el 10 de febrero, estando expuestas las plantas sólo a fotoperiodos largos. Por su parte, el ensayo 2011\_P se llevó a cabo en la localidad de Peñafior de Hornija (41,75°N, 4,91 °O y una altitud de 847m) situado a 15 km de la primera localidad y con una altitud de 145 m mayor. Este último fue sembrado también en otoño, el 25 de noviembre.

En todos los casos se sembraron en campo las 185 líneas en parcelas de 4 metros cuadrados con un diseño en bloques completos al azar. Cada uno de los ensayos constaba de tres repeticiones y tres testigos. Cierzo, Graphic e Hispanic en los ensayos 2009\_Winter, 2009\_spring, 2011\_Z y 2011\_P y 82033/A1, Cierzo y Monlón en los ensayos 2006 y 2008. En todos ellos se sembraron además los dos parentales, Nevada y Barbarrosa.

En estos ensayos se evaluó los días de espigado como la diferencia entre la fecha en que en el 50% de la parcela se observara en la planta al menos dos centímetros de las barbas de la espiga y la fecha de siembra. Calculándose posteriormente la integral térmica de espigado como la suma de la temperatura media diaria en grados centígrados desde la fecha de siembra hasta la de espigado. Para ello se utilizaron los datos registrados por la estación meteorológica de la finca Zamadueñas y de Medina de Rioseco para el ensayo de Peñaflor de Hornija.

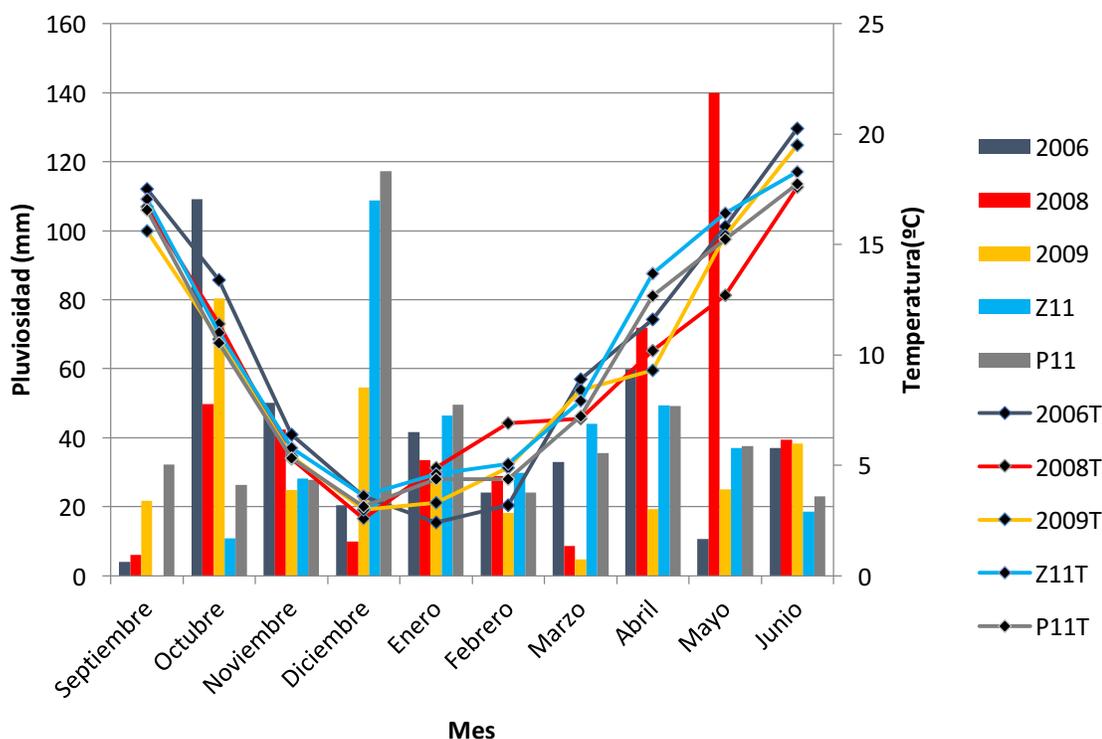
Se tomaron también datos de la altura de las plantas en cada parcela, midiendo desde el suelo hasta el collar de la espiga, posibles enfermedades y el grado de encamado en una escala del 1 al 10, donde el valor 1 equivale a las plantas totalmente erguidas y 10 tumbadas. Además, antes de la cosecha, se recogieron cinco espigas de cada una de las parcelas para estimar el número de granos por espiga y la longitud de estas. Esto último no se pudo realizar en los dos ensayos de la campaña 2008/2009.

Posteriormente se cosechó con micro-cosechadora y se obtuvo el peso del grano de cada parcela en todos los ensayos, y se calculó el rendimiento propiamente dicho, considerando  $4,5 \text{ m}^2$  la superficie de todas las parcelas. Las unidades utilizadas en este estudio para rendimiento fueron  $\text{g/m}^2$ , ya que las unidades del sistema internacional fueron las elegidas para realizar la detección de QTL en esta población, y con el fin de unificar el criterio se utilizaron para el resto de los análisis. Se anotó también el fenotipo *denso*, que claramente se observaba tanto por la altura como por el retraso de la floración.

Se obtuvieron también otros parámetros relacionados con la calidad de grano como son el peso específico y el peso de mil semillas. El número de granos por metro cuadrado, que integra los componentes de rendimiento previos a antesis, se calculó en base a los datos de cosecha, a excepción de los dos ensayos de la campaña 2010/2011, 2011\_P y 2011\_Z.

### 2.2.1 Condiciones climáticas de cada ambiente de estudio

Como vemos en la gráfica 15, las condiciones climatológicas en los seis ensayos tuvieron grandes diferencias. No hubo grandes diferencias en lo que respecta a la cantidad de lluvia en ambas localidades, aunque con ligeras diferencias, puesto que los meses de octubre, diciembre y enero fueron ligeramente más lluviosos en el ambiente 2011\_P, mientras que febrero y marzo se caracterizaron por lo contrario. Sin embargo, en esa misma campaña, el ensayo 2011\_Z también fue bastante lluvioso en los primeros meses del ciclo del cultivo, a pesar de encontrarse en otra localidad.



**Gráfico 19.** Se muestra tanto la pluviosidad (histograma) como la variación de temperatura (gráfica lineal) de cada una de las campañas/ambiente incluidas en este estudio. Los datos fueron recogidos a partir de la estación meteorológica situada en la finca Zamadueñas durante los años 2006, 2008 y 2011, así como los datos de 2011 de la estación meteorológica instalada en la localidad vallisoletana de Medina de Rioseco, para obtener los datos climáticos del ensayo realizado en 2011 en la localidad de Peñaflor de Hornija (P11).

Respecto a este parámetro, cada uno de ellos tuvo distintas particularidades, de manera que como observamos en la gráfica 19 el ambiente de 2008 se caracterizó por la ausencia de la sequía terminal tan típica de ambientes mediterráneos, que como veremos posteriormente repercutió positivamente en los rendimientos obtenidos en este ambiente.

Los años 2006 y 2009 se caracterizaron por elevadas precipitaciones de otoño-invierno, y muy escasas de primavera con fuerte estrés hídrico terminal. En 2006 las precipitaciones de abril mitigaron parcialmente el problema, aunque mayo y junio fueron especialmente secos y esto se tradujo en un llenado de grano muy deficiente. La primavera extraordinariamente seca de 2011 afectó en mayor manera a la siembra de primavera, ya que el desarrollo de las plantas era menor al salir del invierno.

Las temperaturas también distaron entre ambientes como vemos al observar las medias mensuales en el gráfico 19, pero cabe destacar que todos ellos tuvieron unas medias mensuales en el periodo invernal (diciembre, enero y febrero) inferiores a 8 grados centígrados de manera que la vernalización pudo completarse en todos ellos. Las variedades de invierno en el ensayo 2009\_spring se desarrollaron con normalidad y completaron vernalización ya que los meses de marzo, con una media 8,4 grados centígrados, y especialmente abril con una media de 9,4 grados centígrados fueron especialmente fríos.

## 2.3 Metodología de los análisis estadísticos empleados

### 2.3.1 Análisis preliminares: Estadística descriptiva

De igual manera que en el estudio en condiciones controladas de invernadero a la que se le ha dedicado el capítulo tres de la presente tesis, se han realizado una serie de análisis estadísticos preliminares. Por ello se han calculado la media poblacional, desviación standard, máximo y mínimo, así como las medias de los dos parentales, Barbarrosa y Nevada.

Se ha realizado un análisis de frecuencias de cada uno de los parámetros medidos para la descomposición del rendimiento representando los histogramas correspondientes para cada parámetro/ambiente.

Así mismo, se ha realizado un estudio de las correlaciones de los distintos caracteres estudiados en cada ambiente calculándose el coeficiente de correlación de Pearson entre los distintos parámetros.

### 2.3.2 Análisis de varianza: interacciones entre los distintos componentes de la varianza

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de varianza multi-ambiental (ANOVA) para cada carácter estudiado. A continuación, se llevó a cabo para cada carácter un modelo que incluía los principales efectos del análisis de varianza junto los efectos de la interacción multiplicativa del análisis de componentes principales (AMMI) con el fin de detectar los principales efectos genotípicos, ambientales y la interacción entre ambos, utilizando la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos del capítulo tres de esta tesis.

### 2.3.3 Metodología para la detección de caracteres cuantitativos (*Quantitative trait loci*, QTL) en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa y sus interacciones

En este caso, al igual que en el estudio descrito anteriormente, se realizó una detección de QTL bajo un análisis multi-ambiental mediante modelos mixtos, tal como se explica en el capítulo tres de la presente tesis, utilizando del mismo modo el paquete estadístico Genestat 12 (Payne 2009), utilizando el mapa genético obtenido como se describe en el capítulo dos de la población NxBxB objeto de este estudio.

De igual modo se calcularon las interacciones con el ambiente (QTLxE) y su significación. Para los distintos QTL significativos en cada ensayo se buscaron las interacciones QTLxQTL mediante modelos mixtos, utilizando REML incluido en Genstat 12 (Payne 2009) como queda descrito en el apartado material y métodos del capítulo tres.

#### 2.4 Selección de genotipos de alto rendimiento

Finalmente, utilizando los datos obtenidos tanto de los QTL como de los datos genotípicos de las líneas de los marcadores moleculares utilizados para la realización del mapa genético de la población Nx BxB, se seleccionaron aquellos marcadores altamente significativos para el rendimiento y sus parámetros, seleccionando las líneas que poseían el alelo que producía ventajas en cuanto al rendimiento, con el fin de buscar genotipos que puedan ser válidos para su introducción en el programa de mejora genético de cebada del que derivó esta población.

Para ayudar a definir el ideotipo correcto, se han considerado los caracteres o genes que puedan influir en la expresión del rendimiento, así como desglosar la interacción genotipo x ambiente para identificar qué variables ambientales son las que más interactúan con los genes, analizándose el modelo AMMI de rendimiento, para intentar aclarar el comportamiento de estas líneas bajo las condiciones estudiadas, así como para los parámetros más estables en cuanto heredabilidad y más alto componente genético frente a su variabilidad ambiental.

Se comparó también el comportamiento de las líneas seleccionadas en el capítulo anterior, como líneas con alto potencial para el llenado de grano, tanto con las líneas con genotipo de alto rendimiento seleccionadas en el capítulo que nos ocupa respecto al modelo AMMI de rendimiento, con el fin de comprobar si estas líneas tienen o no un aumento del potencial de rendimiento y bajo qué ambientes.

### 3. Resultados

#### 3.1 Resumen parámetros estudiados

Entre los seis ensayos de campo hemos de diferenciar uno de ellos: el ensayo llevado a cabo en la campaña 2008/2009 realizado en siembra primaveral, ya que esto afecta a todos los parámetros estudiados debido a la presencia de genotipos plenamente invernales en la población de estudio.

Así mismo, basándonos en una estadística totalmente descriptiva (ver tabla 18) podemos observar que todos los parámetros estudiados son positivamente superiores en el ensayo de 2008, lo cual es debido a la elevada pluviosidad que hubo en la región de estudio durante aquella campaña como observamos en las gráficas climáticas. Se observa que los rendimientos máximos y mínimos de dicha campaña llegan a duplicar a los respectivos de la mayoría de los demás ensayos llevados a cabo para este estudio. El desarrollo vegetativo de las líneas del estudio fue mucho mayor en el ensayo 2008, como se ve al observar la altura media de la población en donde esta alcanza los 87,94 cm. Valores intermedios se alcanzaron en el resto de ensayos de siembra otoñal, siendo 76,98cm, 72.66cm, 64,54cm y 56,57 cm las medias poblacionales de los ensayos 2006, 2011 en la Finca Zamadueñas y en Peñaflor de Hornija, y 2009 Invierno. El ensayo de siembra primaveral fue significativamente el que presentó una altura media poblacional menor con 43,99 cm. De esta manera podemos atribuir el incremento significativamente mayor del rendimiento del ensayo de 2008 a un mayor crecimiento vegetativo y, por tanto, un incremento de número de hijuelos/espigas por pie de planta al observar el parámetro de número de granos por metro cuadrado donde en el caso del ensayo de 2008 es significativamente superior al del resto de los ensayos en los que se pudo medir.

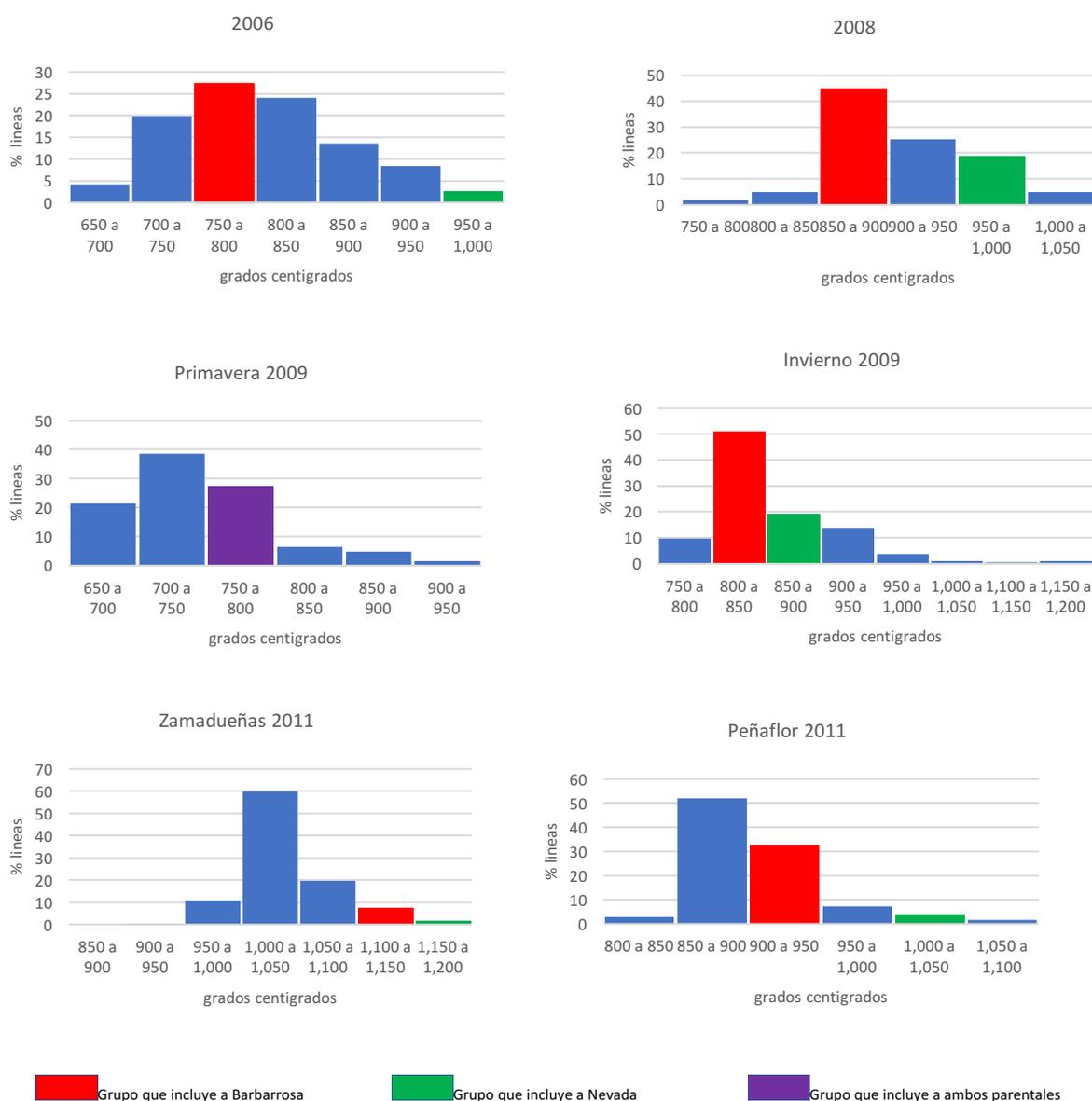
Aunque este incremento medio del rendimiento también se le puede atribuir al mayor llenado de grano que tuvo lugar en el 2008 respecto al ensayo del 2006, tal y como observamos al comparar las medias de peso específico y peso de mil semillas de uno y otro, cuyas medias son de 676,3 gramos por hectolitro y de 32,15 gramos por mil semillas de cebada en el caso del ensayo 2008, mientras que en ensayo de 2006 estos parámetros tuvieron una media de 477,6 y 23,83 gramos respectivamente. No obstante, no parecen diferencias tan significativas en estos parámetros de llenado de grano respecto al resto de los ensayos donde estos pudieron ser estudiados. Ni siquiera en el ensayo de 2009 con siembra primaveral, donde las medias de estos fueron de 664,2 gramos por hectolitro y de 32,14 gramos las mil semillas. Incluso podemos observar que, bajo las mismas condiciones meteorológicas, estos parámetros son ligeramente superiores, tal y como observamos en el ensayo que se llevó a cabo en la misma finca y la misma campaña, pero en siembra otoñal, donde estas medias fueron de 636,9 y 27,33 gramos respectivamente.

Por tanto, este incremento de rendimiento en el ensayo de 2008 puede achacarse al mayor desarrollo vegetativo y ahijamiento que tuvo lugar en las plantas debido a la mayor pluviosidad y condiciones meteorológicas positivamente más favorables para el desarrollo de éstas durante dicha campaña.

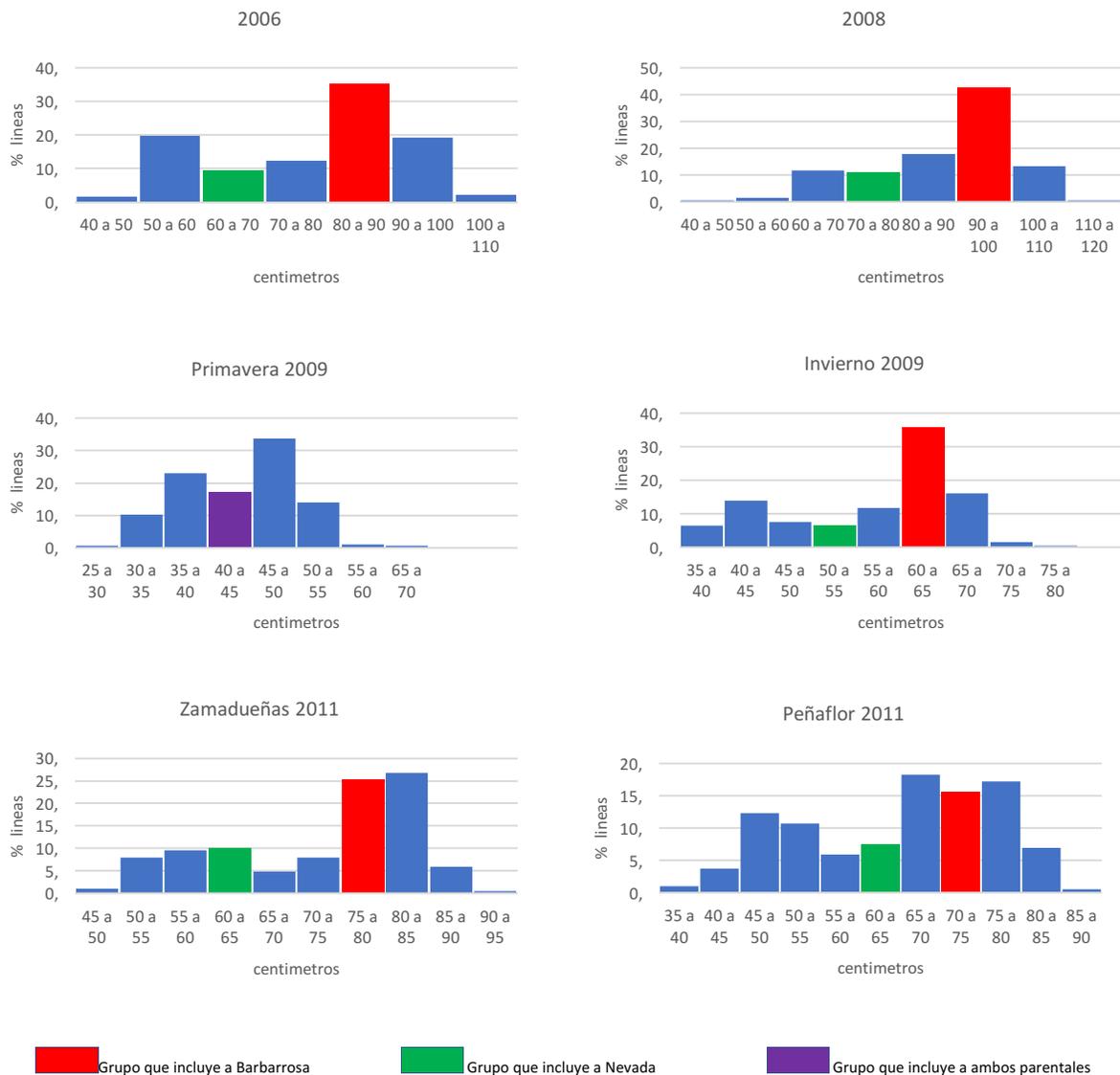
Ambiente	Caracter								Desviación Standard	Error Standard de la media		Coeficiente of variación
		Mínimo	Media	Máximo	Barbarrosa	Nevada	Rango	Varianza				
2006	Espigado (días)	148 días	156,3 días	167,7 días	154,794 días	168,303 días	19,75	4,361	0,322	19,02	2,79	
	Espigado (°C)	689,9 °C	800,1 °C	955,4 °C	772,632 °C	965,57 °C	265,5	58,14	4,298	3380	7,266	
	Altura	48,06 cm	76,98 cm	107,2 cm	838,205 cm	645,023 cm	59,19	14,78	1,09	218,4	19,2	
	Rendimiento	293,7 g/m <sup>2</sup>	400,4 g/m <sup>2</sup>	500 g/m <sup>2</sup>	398,002 g/m <sup>2</sup>	391,931 g/m <sup>2</sup>	206,3	38,79	2,86	1505	9,688	
	Peso específico	414,5 g/l	477,6 g/l	522,3 g/l	473,055 g/l	496,981 g/l	107,8	23,48	1,731	551,5	4,917	
	Peso de mil semillas	17,19 g	23,83 g	31 g	22,55 g	33,69 g	13,81	2,971	0,219	8,825	12,47	
	Granos por metro cuadrado	13564 granos/m <sup>2</sup>	16985 granos/m <sup>2</sup>	20396 granos/m <sup>2</sup>	17529,5 granos/m <sup>2</sup>	12730 granos/m <sup>2</sup>	6831	1270	93,59	1611780	7,475	
	Granos por espiga	37,27 granos	61,1 granos	85,51 granos	57,27 granos	33,61 granos	48,24	8,385	0,618	70,31	13,72	
	Longitud de la Espiga	53,8 mm	73,04 mm	98,56 mm	703,083 mm	115,005 mm	44,75	8,698	0,641	75,65	11,91	
2008	Espigado (días)	128 días	134,2 días	144,2 días	133,011 días	139,651 días	16,15	3,531	0,26	12,47	2,631	
	Espigado (°C)	830,2 °C	912,7 °C	1046 °C	897,558 °C	985,308 °C	215,6	45,12	3,317	2036	4,943	
	Altura	55,88 cm	87,94 cm	113,8 cm	953,165 cm	743,275 cm	57,88	12,13	0,891	147	13,79	
	Rendimiento	835,7 g/m <sup>2</sup>	1006 g/m <sup>2</sup>	1190 g/m <sup>2</sup>	1116,93 g/m <sup>2</sup>	858,584 g/m <sup>2</sup>	354,3	73,77	5,423	5441	7,331	
	Peso específico	638,2 g/l	676,3 g/l	698,4 g/l	686,01 g/l	678,901 g/l	60,22	9,806	0,721	96,15	1,45	
	Peso de mil semillas	24,4 g	32,15 g	37,69 g	34,53 g	348,2 g	13,3	2,552	0,188	6,512	7,938	
	Granos por metro cuadrado	25642 granos/m <sup>2</sup>	31555 granos/m <sup>2</sup>	36379 granos/m <sup>2</sup>	31742,6 granos/m <sup>2</sup>	27419,5 granos/m <sup>2</sup>	9384	1609	118,3	2587273	7,629	
	Granos por espiga	44,65 granos	65,46 granos	85,64 granos	64,36 granos	32,41 granos	40,99	7,49	0,551	56,1	11,44	
	Longitud de la Espiga	52,33 mm	68,47 mm	94 mm	704,877 mm	852,741 mm	41,67	8,848	0,651	78,29	12,92	
2009_spring	Espigado (días)	82,59 días	87,56 días	100,6 días	885,233 días	898,494 días	18,02	3,341	0,246	11,16	3,815	
	Espigado (°C)	668,9 °C	744,5 °C	943,1 °C	761,996 °C	783,084 °C	274,2	51,42	3,78	2644	6,906	
	Altura	31,67 cm	43,99 cm	57,2 cm	430,995 cm	40,304 cm	25,53	5,812	0,427	33,78	13,21	
	Rendimiento	152,5 g/m <sup>2</sup>	283,3 g/m <sup>2</sup>	376,5 g/m <sup>2</sup>	287,261 g/m <sup>2</sup>	239,897 g/m <sup>2</sup>	224	35,59	2,617	1267	12,57	
	Peso específico	638,6 g/l	664,2 g/l	695 g/l	668,057 g/l	678,888 g/l	56,41	9,976	0,733	99,53	1,502	
	Peso de mil semillas	25,17 g	32,14 g	36,5 g	33,47 g	37,79 g	11,34	2,469	0,182	6,098	7,683	
	Granos por metro cuadrado	4785 granos/m <sup>2</sup>	8949 granos/m <sup>2</sup>	11760 granos/m <sup>2</sup>	8650,36 granos/m <sup>2</sup>	6617,97 granos/m <sup>2</sup>	6975	1,281	94,19	1,641,286	14,32	
	Granos por espiga	47,79 granos	57,94 granos	70,38 granos	52,86 granos	30,29 granos	22,59	5015	0,369	25,15	8655	
	2009_Winter	Espigado (días)	147,8 días	153,4 días	170,5 días	152,071 días	155,859 días	22,73	3,348	0,246	11,21	2,183
Espigado (°C)		795,7 °C	853,5 °C	1080 °C	839,649 °C	875,882 °C	284	36,91	2,714	1362	4,324	
Altura		38,63 cm	56,57 cm	71,28 cm	639,365 cm	536,349 cm	32,65	8,691	0,639	75,53	15,36	
Rendimiento		408,9 g/m <sup>2</sup>	471,7 g/m <sup>2</sup>	538,3 g/m <sup>2</sup>	464,374 g/m <sup>2</sup>	511,399 g/m <sup>2</sup>	129,4	25,58	1,881	654,6	5,424	
Peso específico		587,4 g/l	636,9 g/l	686,7 g/l	636,882 g/l	661,661 g/l	99,31	16,25	1,194	263,9	2,551	
Peso de mil semillas		20,68 g	27,33 g	34,29 g	26,73 g	36,56 g	13,61	2,582	0,19	6,666	9,446	
Granos por metro cuadrado		13686 granos/m <sup>2</sup>	17404 granos/m <sup>2</sup>	21126 granos/m <sup>2</sup>	17573,9 granos/m <sup>2</sup>	14870,4 granos/m <sup>2</sup>	7440	1294	95,11	1673463	7,433	
Granos por espiga		51,74 granos	64,37 granos	80,78 granos	66,44 granos	38,93 granos	29,04	5,126	0,377	26,28	7,964	
2011_P		Espigado (días)	146,5 días	152,8 días	163,3 días	152,941 días	160,663 días	16,85	3,498	0,257	12,24	2,29
	Espigado (°C)	826,6 °C	907,7 °C	1052 °C	908,216 °C	1012,75 °C	225,5	46,17	3,403	2131	5,086	
	Altura	42,03 cm	64,54 cm	83 cm	731,663 cm	629,471 cm	40,96	10,39	0,764	107,9	16,1	
	Rendimiento	329 g/m <sup>2</sup>	454,9 g/m <sup>2</sup>	548,6 g/m <sup>2</sup>	501,888 g/m <sup>2</sup>	459,887 g/m <sup>2</sup>	219,6	43,02	3,163	1851	9,457	
	Granos por espiga	57,41 granos	69,44 granos	85,11 granos	67,41 granos	39,94 granos	27,69	5,468	0,406	29,9	7,875	
	Longitud de la Espiga	62,88 mm	72,02 mm	85,96 mm	700,278 mm	839,687 mm	23,08	4,566	0,336	20,85	6,34	
2011_Z	Espigado (días)	152,8 días	157,2 días	164,4 días	156,461 días	164,981 días	11,67	2,47	0,182	6,1	1,571	
	Espigado (°C)	978,7 °C	1035 °C	1152 °C	1024,48 °C	1143,62 °C	172,9	33,77	2,482	1140	3,263	
	Altura	48,8 cm	72,66 cm	89,77 cm	784,348 cm	641,241 cm	40,97	10,24	0,753	104,8	14,09	
	Rendimiento	487,5 g/m <sup>2</sup>	633,5 g/m <sup>2</sup>	743,8 g/m <sup>2</sup>	725,791 g/m <sup>2</sup>	555,436 g/m <sup>2</sup>	256,3	54,53	4,009	2973	8,608	
	Granos por espiga	61,85 granos	72,07 granos	88,07 granos	71,07 granos	35,90 granos	26,21	5,399	0,397	29,15	7,491	
	Longitud de la Espiga	68,6 mm	77,9 mm	97,04 mm	759,732 mm	894,919 mm	28,45	4,99	0,367	24,9	6,406	

Tabla 18. Resumen de los parámetros estudiados en los distintos ensayos de la población NxxB, mostrando tanto la media poblacional con su desviación estándar, el valor máximo y mínimo de la población, como los valores de cada parámetro de ambos parentales, Nevada y Barbarrosa.

A continuación, se muestran las gráficas de frecuencias en cada uno de los ambientes estudiados para cada parámetro utilizado en este estudio (gráficos de 20 a 26). En estas gráficas observamos como existe una segregación de los caracteres en los distintos ambientes, viendo que el parental Nevada espigó más tarde que Barbarrosa en todos los ambientes estudiados, a excepción del ambiente 2009\_spring, donde el tiempo térmico de espigado fue más corto, de manera que ambos parentales se encuentran en el mismo grupo.

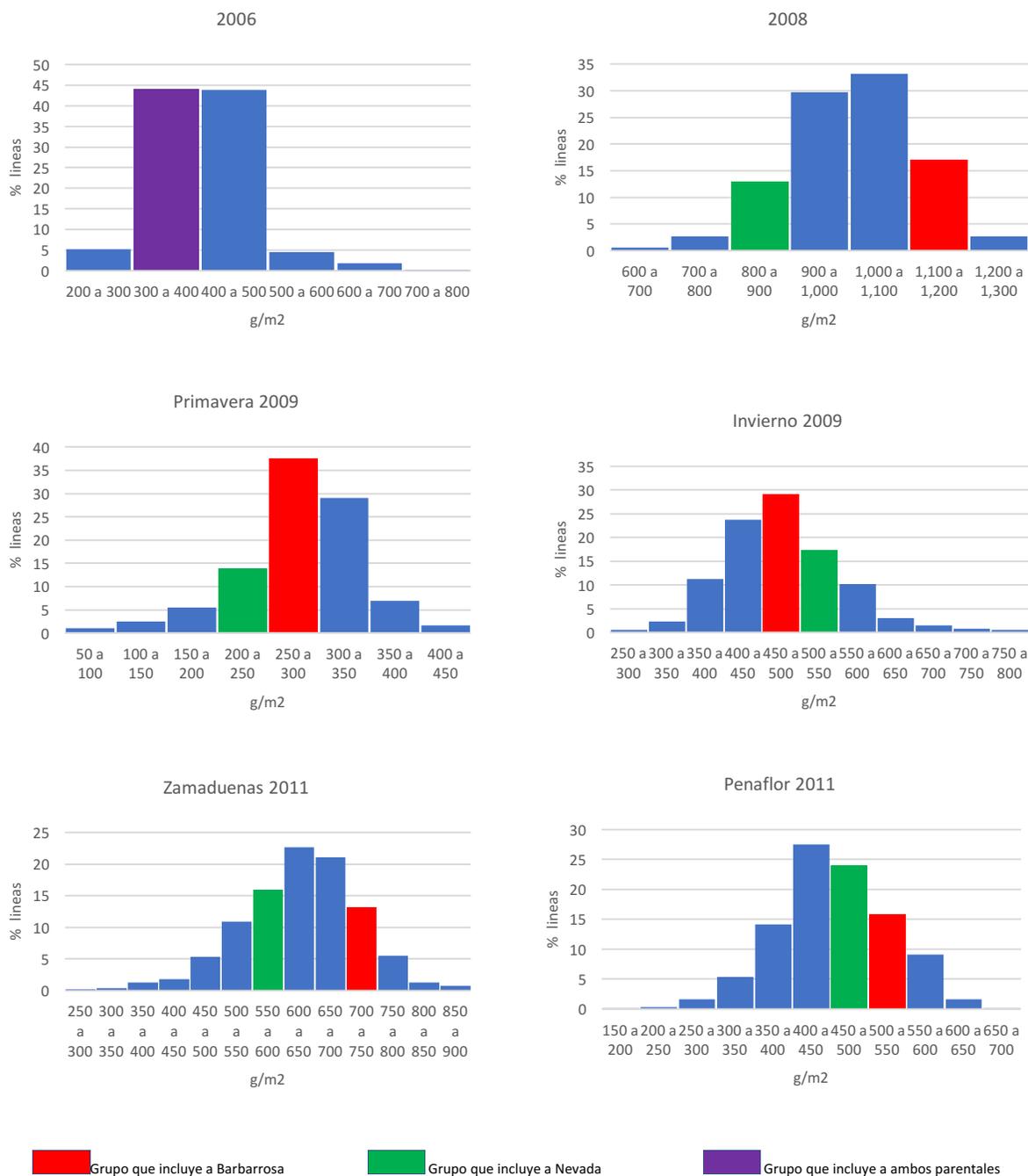


Gráficos 20. Frecuencias relativas de tiempo térmico a floración en los ensayos de campo realizados en este estudio.



Gráficos 21. Frecuencias relativas de las alturas totales de planta tomadas en centímetros en los ensayos de campo.

De la misma manera encontramos una segregación transgresiva en cuanto a altura de las plantas, observando dos grupos claramente diferenciados: con alelo *denso*, donde se encuentra Nevada entre las más altas de este grupo, y sin *denso*, donde se encuentra Barbarrosa entre las de menor talla (gráficos 21).



Gráficos 22. Frecuencias relativas del rendimiento de las líneas tomado en g/m<sup>2</sup> para cada ensayo de campo.

Por su parte encontramos que Barbarrosa obtuvo en general mayores rendimientos en todos los ambientes estudiados, existiendo en todos ellos una distribución normal de este carácter (gráficos 22), mientras que en cuanto a parámetros de llenado de grano/calidad del mismo, Nevada obtuvo mejores valores, a excepción de en el ambiente 2008, el cual se caracterizó por mayores precipitaciones favoreciendo el llenado de grano (gráficos 23 y 24). Sin embargo, Barbarrosa, variedad de seis carreras

obtuvo mayor número de espiguillas que Nevada, la cual es una variedad de dos carreras, mientras que la longitud de la espiga es mayor en Nevada en todos los ambientes estudiados (gráficos 25 y 26).

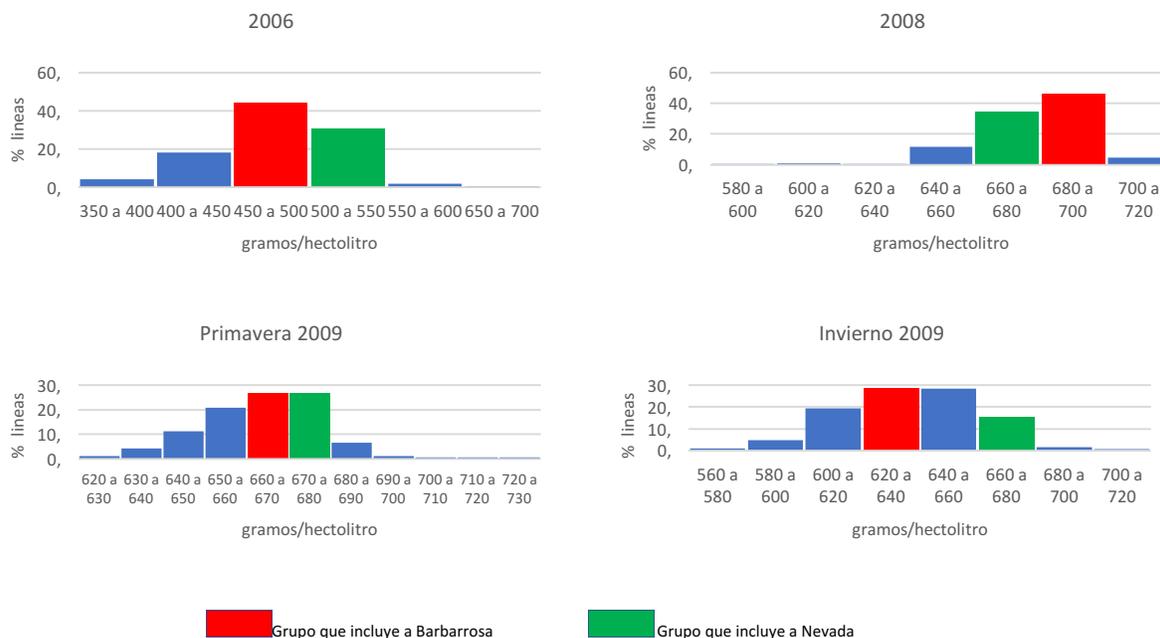
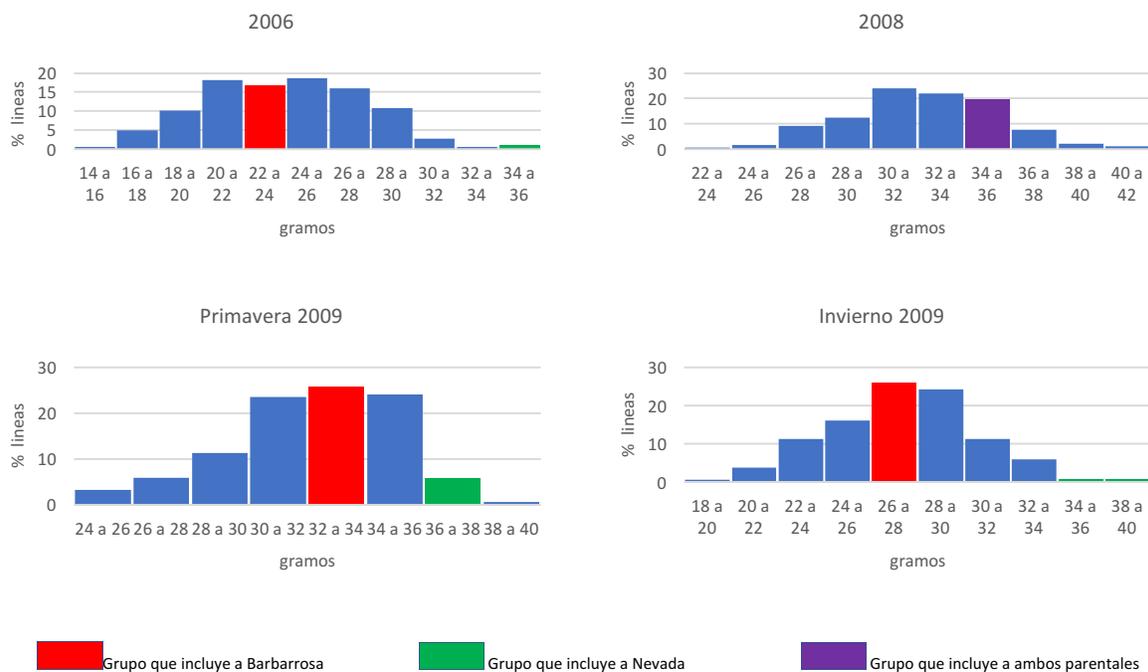


Gráfico 23. Frecuencias relativas del peso específico de las líneas tomado en gramos por hectolitro para cada ensayo de campo en el que este parámetro del rendimiento pudo ser tomado.



Gráficos 24. Frecuencias relativas del peso de mil semillas de las líneas tomado en gramos para cada ensayo de campo en el que este parámetro del rendimiento pudo ser tomado.

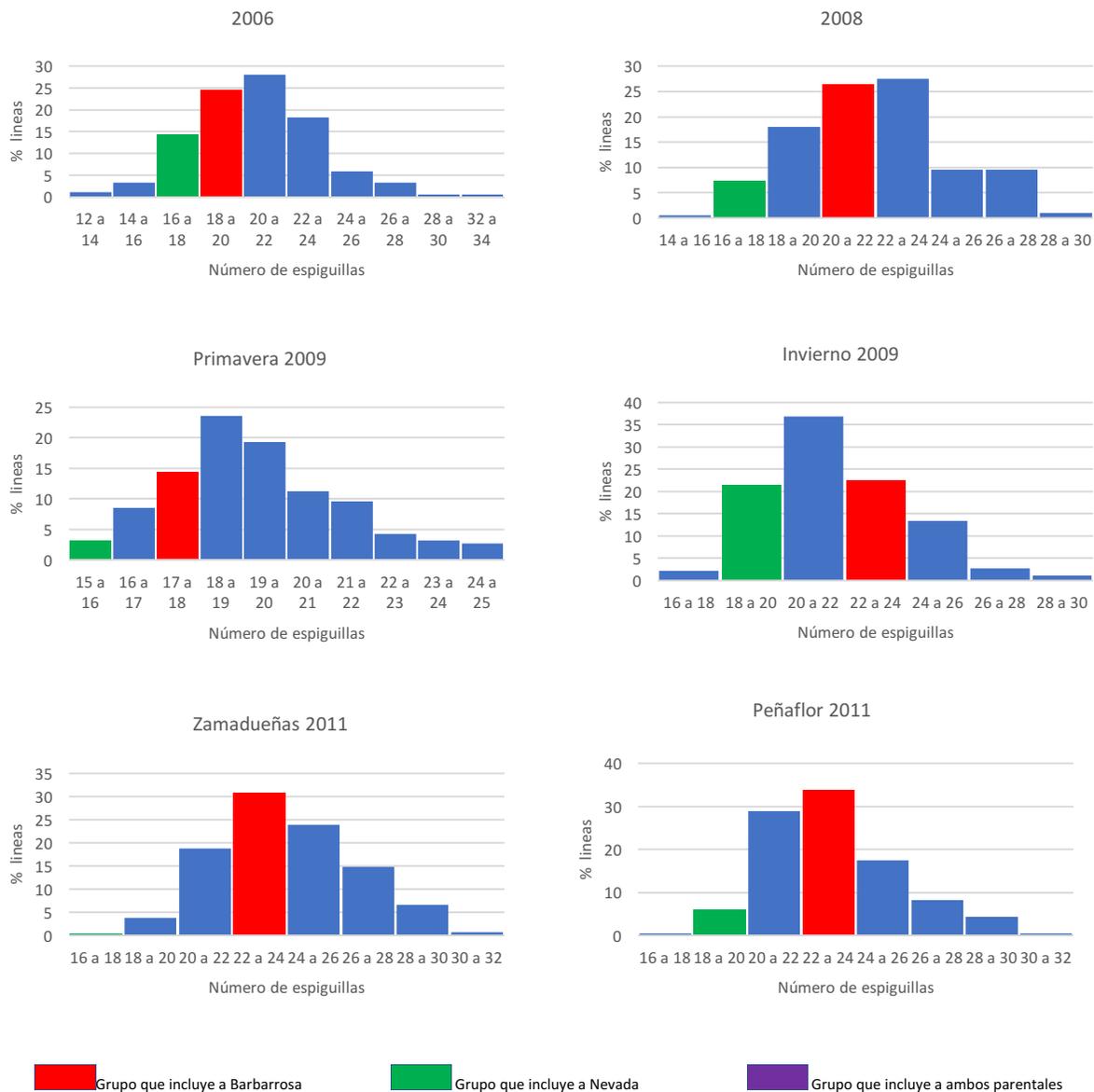
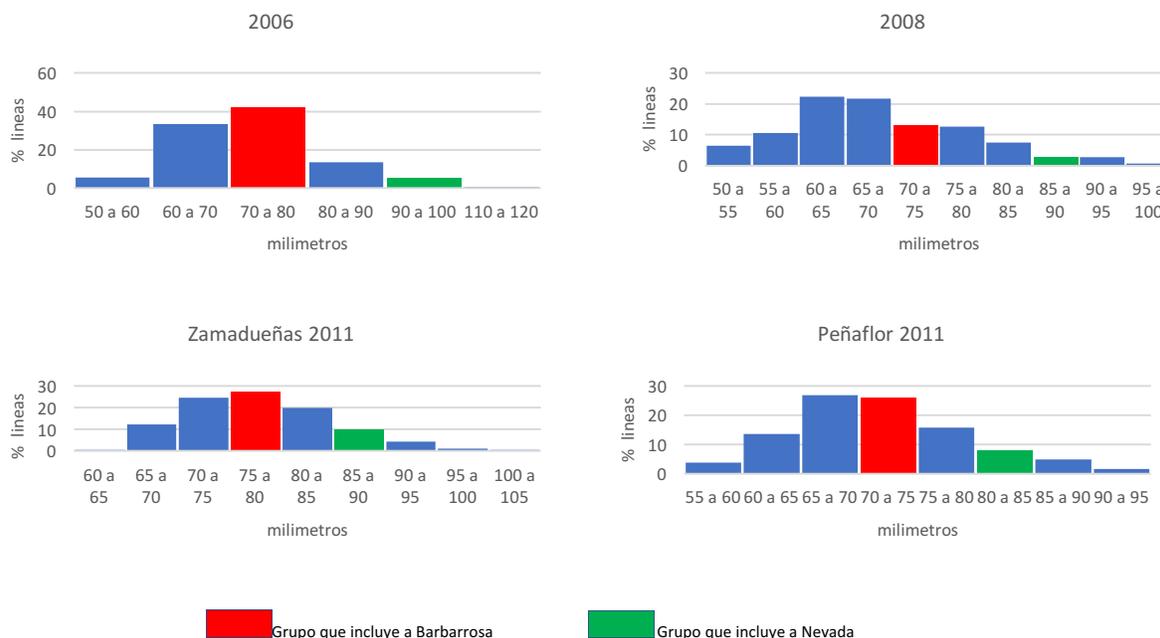


Gráfico 25. Frecuencias relativas del número de espiguillas de cada línea.



**Gráfico 26.** Frecuencias relativas de la longitud de la espiga de cada línea tomado en milímetros para cada ensayo de campo en el que este parámetro pudo ser tomado.

Así mismo, se calcularon las correlaciones Pearson de cada parámetro estudiado respecto al rendimiento, tomándose como significativas aquellas correlaciones con un grado de significación inferior a 0,05. La tabla 19 nos muestra cada una de estas correlaciones en cada ambiente estudiado, de manera que, a excepción del número de granos por espiga, cuya correlación con el rendimiento no fue significativa en ninguno de los casos, todos los parámetros tuvieron una cierta correlación con el rendimiento.

Hay que destacar que en 2009\_winter las correlaciones tanto con el tiempo hasta espigado como con la altura no fueron significativas, así como la correlación existente entre peso de mil semillas (TKW) en el ambiente 2009\_spring donde esta correlación no fue significativa y donde, además, la correlación con el peso específico (SW), aunque sí resultó significativa, tal y como vemos en la gráfica, esta lo fue débilmente. Por tanto, en este ambiente, correspondiente al único realizado bajo siembra primaveral no existe una clara correlación entre el rendimiento obtenido y los dos parámetros que nos miden el correcto llenado de grano.

Además, sólo en uno de los ambientes, 2011\_P, hubo una débil correlación entre el número de granos por espiga y el rendimiento, sí siendo significativa dicha correlación con la longitud de la espiga en los ambientes estudiados, siendo esta correlación en sentido negativo. De tal manera que en este caso una mayor longitud de la espiga conlleva a rendimientos más bajos, existiendo esta misma tendencia respecto al número de granos por espiga en 2011\_P. Por su parte, esta correlación respecto al número de granos por metro cuadrado resultó positiva a pesar de la tendencia a ser negativa en cuanto a los parámetros por espiga, muy especialmente en el ambiente con siembra primaveral, 2009\_spring,

dándonos idea de que el número de hijuelos obtenidos por planta juega un papel importante en cuanto al rendimiento se refiere.

En todo caso, estas correlaciones nos indican como vemos en la tabla 19 que existen correlaciones negativas con el rendimiento en cuanto al tamaño de la espiga y positivas respecto a parámetros para el correcto llenado de grano, peso de mil semillas y peso específico, siendo también positivas respecto al mayor desarrollo vegetativo de las plantas, como observamos al ver las correlaciones tanto de granos por metro cuadrado, explicada anteriormente, como la altura de las plantas.

Mientras que si observamos el efecto de tiempo de espigado sobre el rendimiento observamos una tendencia a obtener mayores rendimientos en las líneas más tempranas que en las más tardías, lo que se podría deber a la presencia del alelo *denso* en la población, retrasando la floración y perjudicando el rendimiento, así como a la sequía terminal que se observó en todos los ambientes a excepción del ambiente 2008, aunque en este caso la correlación negativa entre ambos parámetros fue de las más altas obtenidas.

	Espigado	Altura	TKW	SW	LS	GS	Gm2
<b>2006</b>	-0,5505	0,4522	0,6857	0,4528	-	-0,0971	0,2385
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,3551	0,1884*	0,0011
<b>2008</b>	-0,599	0,2921	0,5222	0,3318	-	-0,0158	0,3655
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,2066	0,8285*	<0,001
<b>2009_spring</b>	-0,5566	0,4627	0,0088	0,1751	-	-0,0303	0,8353
	<0,001	<0,001	0,9045*	0,0157	-	0,6784	<0,001
<b>2009_winter</b>	-0,0556	0,0612	0,466	0,3162	-	-0,1687	0,3227
	0,4462	0,4014*	<0,001	<0,001	-	0,02	<0,001
<b>2011_P</b>	-0,6649	0,617	-	-	-0,254	-0,2151	-
	<0,001	<0,001	-	-	<0,001	0,0032	-
<b>2011_Z</b>	-0,5149	0,561	-	-	-	-0,0775	-
	<0,001	<0,001	-	-	0,2654	0,2879*	-

\* probabilidad igual o superior a 0,05

**Tabla 19.** Correlaciones entre el rendimiento frente al tiempo de espigado y los distintos parámetros del rendimiento estudiados para cada uno de los ensayos realizados. El valor superior corresponde al coeficiente de correlación, mientras que el inferior corresponde a su grado de significación.

Mientras, lo que respecta a las correlaciones entre los distintos parámetros estudiados (tabla 20), observamos que las correlaciones más altas corresponden a las correlaciones entre peso específico y peso de mil semillas (parámetros de llenado de grano) y las correlaciones entre longitud de espiga y granos por espiga.

Así mismo, encontramos correlaciones negativas entre el número de granos por metro cuadrado y los parámetros de llenado de grano, aunque estas son más débiles o incluso no significativas frente al peso específico. Mientras que el parámetro granos por metro cuadrado apenas guardó correlación con los parámetros relacionados con la espiga, a excepción de los ambientes de 2009 que guardaron una débil correlación con el número de granos por espiga.

		2006	2008	2009_spring	2009_winter	2011_P	2011_Z
PMS vs. Peso específico		0,5523	0,3718	0,4426	0,6237	-	-
		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-	-
PMS vs. Granos/m2		-0,5294	-0,5534	-0,4697	-0,6199	-	-
		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-	-
PMS vs. Granos/Espiga		-0,1012	-0,1049	-0,4807	-0,4251	-	-
		0,1703*	0,1496*	<0,001	<0,001	-	-
PMS vs. Longitud Espiga		-0,1924	-0,1473	-	-	-	-
		0,0087	0,0426	-	-	-	-
Peso específico vs. Granos/m2		-0,2115	-0,0836	-0,0575	-0,3697	-	-
		0,0039	0,2517*	0,4303*	<0,001	-	-
Peso específico vs. Granos/Espiga		-0,1055	0,0803	-0,2242	-0,1315	-	-
		0,1529*	0,271*	<0,001	0,0705*	-	-
Peso específico vs. Longitud Espiga		-0,101	0,0857	-	-	-	-
		0,1713*	0,2395*	-	-	-	-
Granos/m2 vs. Granos/Espiga		-0,0041	0,0934	0,1671	0,2653	-	-
		0,9554*	0,271*	0,0212	<0,001	-	-
Granos/m2 vs. Longitud Espiga		-0,1355	-0,064	-	-	-	-
		0,0659*	0,3805*	-	-	-	-
Granos/Espiga vs. Longitud Espiga		0,5697	0,6065	-	-	0,5283	0,3904
		<0,001	<0,001	-	-	<0,001	<0,001

\* probabilidad igual o superior a 0,05

**Tabla 20.** Correlaciones entre los distintos parámetros del rendimiento estudiados para cada uno de los ensayos realizados. El valor superior corresponde al coeficiente de correlación de Pearson, mientras que el inferior corresponde a su grado de significación.

En cuanto a las correlaciones entre parámetros de llenado y los parámetros relacionados con la espiga vemos que estas fueron débiles o incluso no significativas, aunque en los casos que resultaron significativas, prácticamente todas ellas con peso de mil semillas fueron negativas, a excepción de en 2009\_spring donde la correlación entre peso específico y granos por espiga fue significativa.

Por tanto, de manera general, nos encontramos que, al incrementarse el número de granos por metro cuadrado y también, aunque en menor medida, los parámetros de espiga, tanto granos por espiga como longitud de la misma, disminuyen los parámetros de llenado de grano, peso de mil semillas y peso específico. Encontrándose por tanto efectos compensatorios, como vemos especialmente en el ambiente con siembra primaveral (2009\_spring).

### 3.2 Análisis de varianza (ANOVA) y modelización AMMI de los parámetros estudiados

En todos los casos el modelo explica un alto porcentaje de la varianza, de manera que como observamos en la tabla 21,  $r^2$  oscila entre el 99,6% para el tiempo de espigado y del 87,5% para los parámetros del rendimiento, peso de mil semillas y longitud de la espiga, siendo del 95,5% para el rendimiento.

Cabe destacar que la mayor parte de la explicación de estos modelos se debe en todos los casos al factor ambiental (E) teniendo un peso mucho menor el genotipo (G) e incluso la interacción genotipo por ambiente (GxE). En este sentido, si analizamos los resultados observamos que en el caso del rendimiento el porcentaje de explicación de la varianza para la interacción entre el genotipo y ambiente (GxE) es similar al porcentaje debido al azar siendo de 3,8% y 3,9% respectivamente, mientras que si observamos parámetros como granos por metro cuadrado o peso de mil semillas podemos ver que este efecto es mucho mayor (tabla 21). Siendo el factor puramente ambiental en estos casos el mayor responsable de la explicación de la varianza, dejando muy poco porcentaje de explicación del modelo para el genotipo (G) y su interacción por el ambiente (GxE).

		df	SS	MS	F	F_prob	R <sup>2</sup> (%)
<b>Espigado</b>	<b>Total</b>	3419	2162554	633			
	<b>Modelo</b>	1139	2154399	1891	372,55	0	99,62
	<b>Genotipos</b>	189	36977	196	38,54	0	1,71
	<b>Ambientes</b>	5	2103569	420714	7592,12	0	97,27
	<b>Repeticiones</b>	10	554	55	10,91	0	0,03
	<b>GxE</b>	937	13853	15	2,91	0	0,64
	<b>Error</b>	1497	7600	5			0,35
<b>Altura</b>	<b>Total</b>	3419	1193099	349			
	<b>Modelo</b>	1139	1139587	1001	42,27	0	95,51
	<b>Genotipos</b>	189	346100	1831	77,37	0	29,01
	<b>Ambientes</b>	5	707133	141427	338,37	0	59,27
	<b>Repeticiones</b>	12	5016	418	17,66	0	0,42
	<b>GxE</b>	939	86355	92	3,89	0	7,24
	<b>Error</b>	2049	48496	24			4,06
<b>Rendimiento</b>	<b>Total</b>	3419	4213	1,23			
	<b>Modelo</b>	1139	4040	3,55	49,62	0	95,89
	<b>Genotipos</b>	189	106	0,56	7,87	0	2,52
	<b>Ambientes</b>	5	3771	754,14	659,54	0	89,51
	<b>Repeticiones</b>	12	14	1,14	16	0	0,33
	<b>GxE</b>	939	163	0,17	2,42	0	3,87
	<b>Error</b>	2231	159	0,07			3,77

Tabla 21. Tabla donde se muestran los resultados del análisis de la varianza para cada uno de los parámetros analizados.

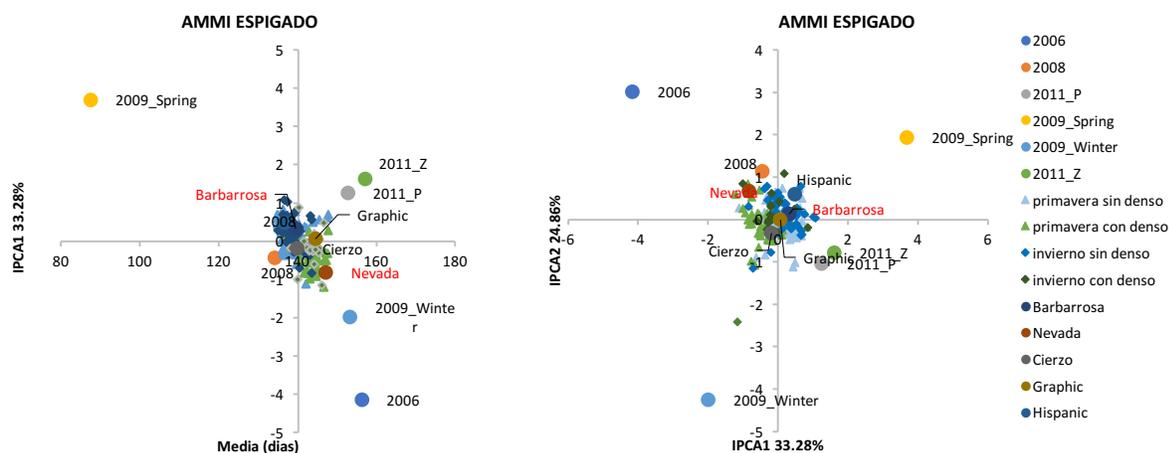
		df	SS	MS	F	F_prob	R <sup>2</sup> (%)
<b>Peso Específico</b>	<b>Total</b>	2279	18026235	7910			
	<b>Modelo</b>	759	16290529	21463	18,37	0	90,37
	<b>Genotipos</b>	189	742013	3926	3,36	0	4,12
	<b>Ambientes</b>	3	14527570	4842523	2048,01	0	80,59
	<b>Repeticiones</b>	8	18916	2364	2,02	0,04056	0,1
	<b>GxE</b>	561	1020946	1820	1,56	0	5,66
	<b>Error</b>	1469	1716791	1169			9,52
<b>Peso de Mil Semillas</b>	<b>Total</b>	2279	60752	26,7			
	<b>Modelo</b>	759	53151	70	13,66	0	87,49
	<b>Genotipos</b>	189	18968	100,4	19,58	0	66,91
	<b>Ambientes</b>	3	28347	9448,9	2478,41	0	46,66
	<b>Repeticiones</b>	8	31	3,8	0,74	0,06527	0,11
	<b>GxE</b>	561	5836	10,4	2,03	0	9,61
	<b>Error</b>	1477	7570	5,1			12,46
<b>Granos/m2</b>	<b>Total</b>	2279	1,71E+11	75027670			
	<b>Modelo</b>	759	1,63E+11	214568871	39,64	0	95,25
	<b>Genotipos</b>	189	4959991744	26243343	4,85	0	3,25
	<b>Ambientes</b>	3	1,53E+11	50921818154	2412,89	0	89,34
	<b>Repeticiones</b>	8	168832796	21104100	3,9	0,00014	0,11
	<b>GxE</b>	561	5132327003	9148533	1,69	0	3
	<b>Error</b>	1471	7961454042	5412273			4,66
<b>Granos/Espiga</b>	<b>Total</b>	3419	368976	108			
	<b>Modelo</b>	1139	327468	288	11,99	0	88,75
	<b>Genotipos</b>	189	172751	914	38,12	0	46,82
	<b>Ambientes</b>	5	80646	16129	112,04	0	21,86
	<b>Repeticiones</b>	9	1296	144	6	0	0,35
	<b>GxE</b>	939	74071	79	3,29	0	20,07
	<b>Error</b>	1677	40212	24			10,90
<b>Longitud de la Espiga</b>	<b>Total</b>	2279	220151	96,6			
	<b>Modelo</b>	759	192621	253,8	8,7	0	87,50
	<b>Genotipos</b>	189	102553	542,6	18,6	0	46,58
	<b>Ambientes</b>	3	25116	8372	122,1	0	11,41
	<b>Repeticiones</b>	5	343	68,6	2,35	0,03917	0,15
	<b>GxE</b>	561	64952	115,8	3,97	0	29,50
	<b>Error</b>	932	27187	29,2			12,35

Tabla 21. Continuación. Tabla donde se muestran los resultados del análisis de la varianza para cada uno de los parámetros analizados.

### 3.2.1 Modelo AMMI respecto al tiempo de espigado y altura: covariable genética denso

Respecto al modelo para el tiempo de espigado podemos ver una tendencia respecto a la media respecto a las líneas portadoras del alelo *denso* o no, de manera que las que son portadoras del alelo se sitúan al lado derecho de esta (gráfico 27), mientras que esta división no existe bajo este modelo respecto a su necesidad o no de vernalizar, ya que no existen diferencias entre las líneas con genotipo primaveral e invernal.

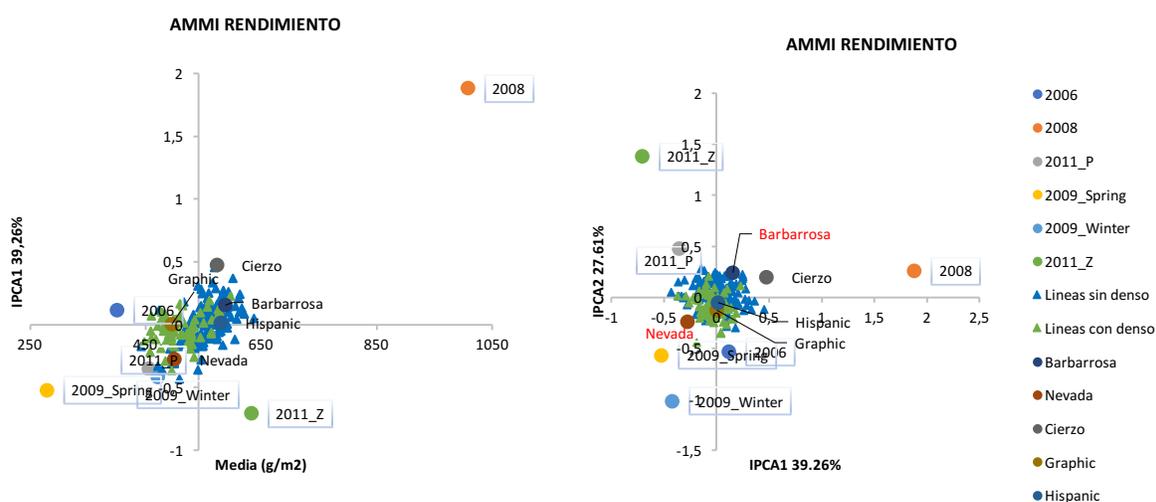
Sin embargo, para este carácter la interacción GxE resultó significativamente baja, siendo el componente ambiental (E) el mayor responsable de la varianza del espigado con un 97,27% de explicación de la varianza del modelo. Principalmente, en el modelo AMMI podemos destacar la disposición respecto a los ejes IPCA1 e IPCA2 de los distintos ambientes estudiados (gráfico 27). Si nos fijamos en la disposición de los ambientes nos encontramos, como es de esperar, que todos ellos se sitúan por encima de la media, a excepción del 2009\_spring, el cual se sitúa por debajo y además significativamente alejado de esta (gráfico 27 izquierdo), lo que se debe a que es el único ensayo con siembra primaveral, y por tanto un menor tiempo hasta la fecha de espigado. Sin embargo, al fijarnos en la disposición de estos ambientes respecto a los ejes IPCA1 e IPCA2 nos encontramos con comportamientos similares de los ambientes 2011\_Z y 2011\_P 2 (gráfico 27 derecho), lo que podría deberse a que en estos ambientes las lluvias invernales a las que estuvieron sometidas las plantas aceleraron el desarrollo, explicando este hecho que ambos posean valores IPCA1 positivos al igual que el ambiente con siembra primaveral 2009\_spring.



**Gráfico 27.** Modelo AMMI para tiempo de espigado. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en ambos las líneas que portan el alelo *denso* y las que no, así como la división entre líneas primaverales o invernales.

### 3.2.2 Modelo AMMI para el rendimiento

Para este modelo se han seleccionado dos ejes IPCA1, con un 39,26% de la explicación de la interacción entre el genotipo, y el ambiente e IPCA2, con un 27,61% de explicación (ver gráfico 28), Destaca que dentro del modelo sólo un 3,87% de la explicación de la varianza se debe a dicha interacción en este modelo (tabla 21).



**Gráfico 28.** Modelo AMMI para rendimiento. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en ambos las líneas que portan el alelo *denso* y las que no.

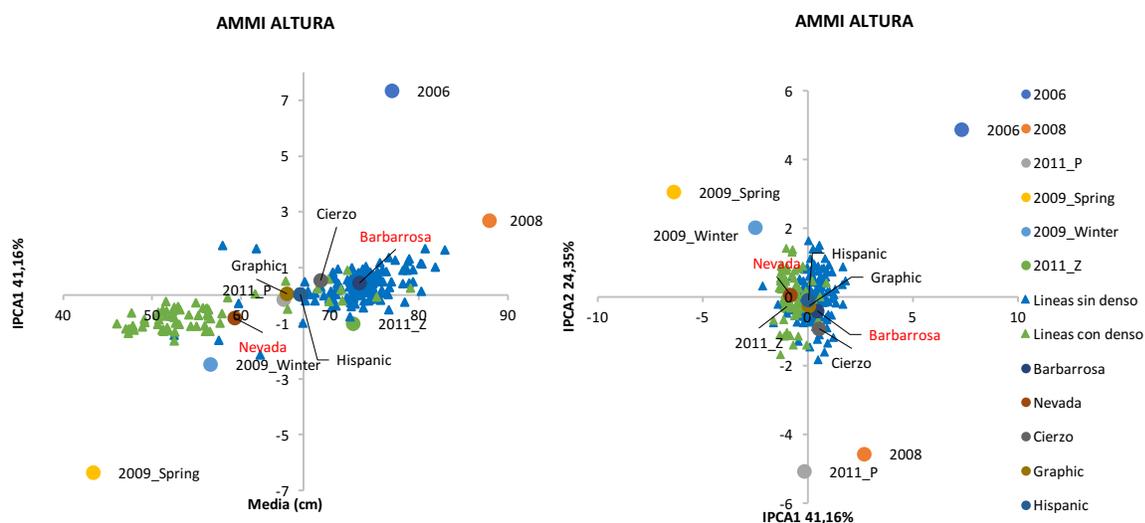
Pero, así y todo, nos encontramos muy alejados entre sí a ambos parentales (ver gráficos 28), ya que Barbarrosa obtiene valores positivos para ambos ejes, al igual que el ambiente 2008 por lo que interacciona para ambos ejes positivamente con este ambiente, mientras que sólo respecto al eje IPCA2 interacciona positivamente para los ambientes 2011\_P y 2011\_Z. Por su parte la respuesta de Nevada es todo lo contrario ya que adquiere valores negativos tanto para el eje IPCA1 como para IPCA2, interaccionando positivamente con todos los ensayos a excepción de 2008 respecto a IPCA1 y con 2006, 2009\_spring y 2009\_Winter respecto a IPCA2, de manera que los rendimientos de Barbarrosa se vieron favorecidos según este modelo principalmente en el ambiente 2008, aunque también en los dos de 2011, mientras que los rendimientos de Nevada en estos ensayos fueron más desfavorables.

En cuanto a las líneas de la población, merece la pena destacar que, si introducimos la covariable genética *denso*, las líneas portadoras de este alelo poseen una tendencia a situarse por debajo de la media poblacional del modelo AMMI, mientras que sólo los ambientes 2011\_Z y, especialmente, 2008 se sitúan por encima de esta.

### 3.2.3 Modelo AMMI para los distintos parámetros del rendimiento: covariables genéticas.

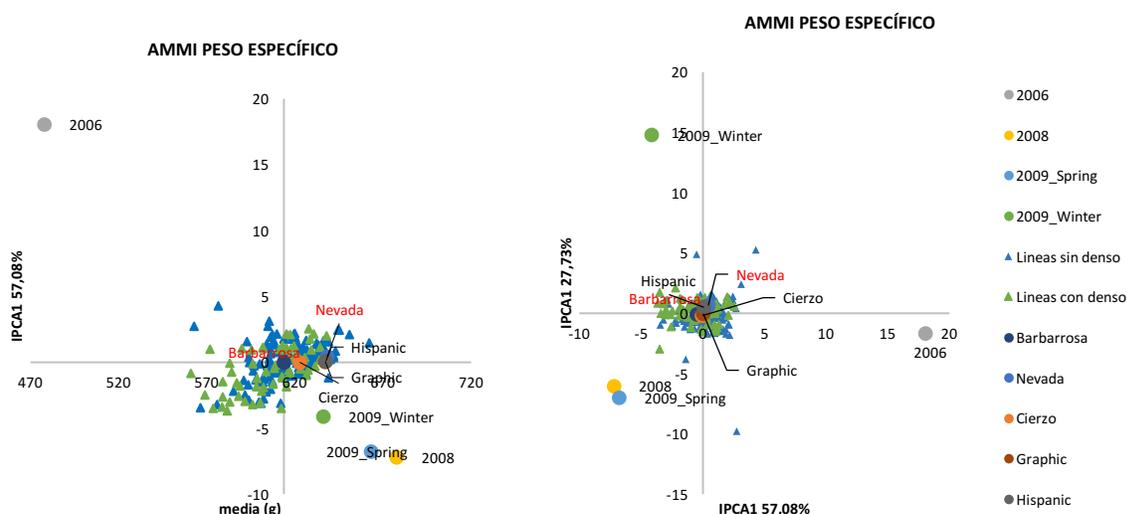
En lo que respecta a la talla de las plantas, nos encontramos una clara separación de la mayoría de las plantas portadoras del alelo *denso* en función tanto de la media del modelo AMMI como en función del eje IPCA1 (que representa al 41,16% de la explicación de la interacción GxE), teniendo en cuenta que la interacción GxE para la altura representa sólo un 7,24% de explicación de la varianza del modelo, mientras que para genotipo (G) y ambiente (E) por separado representan un 29,01% y 59,27% de explicación respectivamente.

Por tanto, podemos observar la disposición de los distintos ambientes, de manera que las mayores alturas de planta se obtuvieron en el ambiente 2008, ambiente más lluvioso y por tanto con mayor desarrollo vegetativo de las plantas, y las más bajas en 2009\_spring, con siembra primaveral y por tanto menor tiempo para el desarrollo vegetativo de las plantas. Mientras que si tenemos en cuenta IPCA1 e IPCA2 (24,35% de explicación GxE) (gráfico 29 derecho), nos encontramos a las líneas sin *denso* interaccionan positivamente con los ambientes 2006 y 2008, muy separados entre sí en función de IPCA2, (con el ambiente 2011\_P próximo a 2008 aunque con valores IPCA2 negativos), y las líneas portadoras de *denso* interaccionan negativamente con estos mismos ambientes. Destaca también de la proximidad de los ambientes 2009\_spring y 2009\_Winter en este mismo gráfico, debido seguramente a que ambos estuvieron sometidos a las mismas condiciones meteorológicas, aunque con distintas fechas de siembra, lo que queda reflejado en la media de estos ambientes en el modelo AMMI.



**Gráfico 29.** Modelo AMMI para la altura de las plantas para los distintos ambientes del estudio. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en ambos las líneas que portan el alelo *denso* y las que no.

En el caso del peso específico esta separación de ambos parentales no es tan clara, de manera que nos encontramos que, a pesar de ser variedades tan distintas, poseen comportamientos similares en los ambientes estudiados respecto al peso específico, a pesar de que existe una clara segregación en la población en cuanto a este carácter. Destaca también, que en este caso al igual que en el caso del modelo AMMI para rendimiento,  $R^2$  para la interacción GxE es especialmente baja (5,66%) si la comparamos con el valor de la explicación de la varianza por parte de los ambientes estudiados (80,59%), pero ligeramente superior al porcentaje de explicación de la varianza por parte de los genotipos (4,12%), existiendo en todo caso un mayor porcentaje de explicación debido al azar, 9,52% (ver tabla 21).



**Gráfico 30.** Modelo AMMI para peso específico. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente a IPCA2 para estos mismos, mostrándose en ambos las líneas que portan el alelo *denso* y las que no.

Sin embargo, a pesar de lo explicado anteriormente, bajo este modelo AMMI para el parámetro peso específico, encontramos un ambiente claramente diferenciado de todos los demás, 2006, en el cual los pesos específicos tendieron a ser inferiores que en el resto de los ambientes estudiados. Nos encontramos también que respecto al eje IPCA1 de este modelo (57,08% de explicación de GxE) es el único que adquiere valores positivos, de manera que si analizamos las condiciones climatológicas de este ambiente (gráfico 19), observamos que este ambiente se vio sometido a una sequía terminal más fuerte que el resto de ambientes, aunque en este sentido los ambientes 2009\_spring y 2009\_winter estuvieron sometidos a las mismas condiciones, pero aunque se encuentran próximos respecto a los valores obtenidos para el eje IPCA1, es 2009\_spring el que más próximo se encuentra de 2008, ambiente con menor sequia terminal. Mientras que frente a IPCA2 (27,73% de la explicación GxE) el ambiente

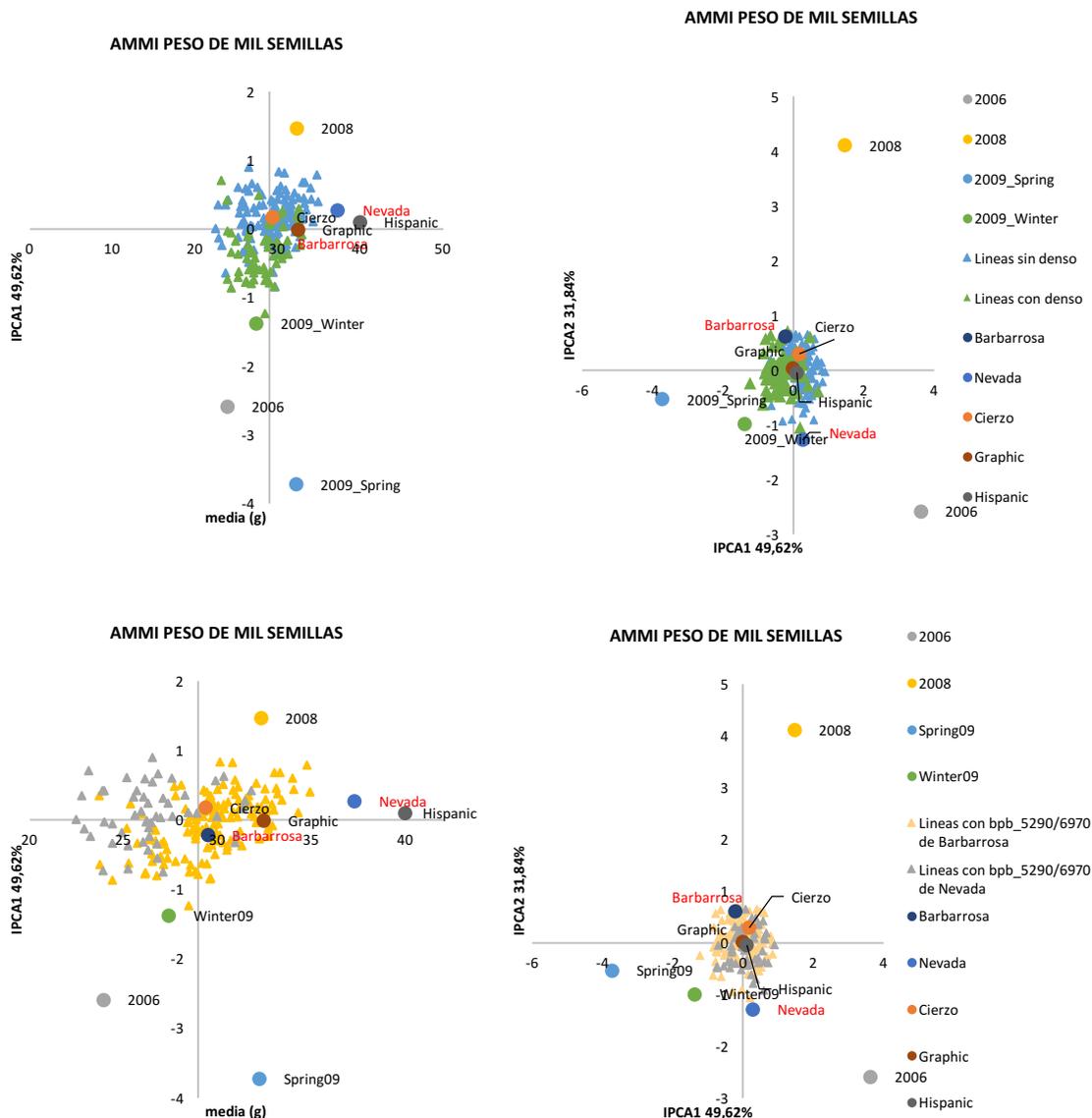
2006 adquiere valores negativos al igual que los ambientes 2008 y 2009\_spring, de los cuales se encuentra más alejado respecto al eje IPCA1 (gráfico 30).

Por tanto, IPCA1 en el modelo AMMI para peso específico podría estar indicándonos la repercusión de esta sequía terminal para este carácter, marcando las diferencias del ambiente 2006 frente al resto de ambientes estudiados.

Destaca también, que bajo este modelo AMMI la covariable genética de portar o no el alelo *denso*, no tiene ningún tipo de repercusión en peso específico, mientras que para peso de mil semillas esta covariable genética se vio reflejada en el eje IPCA1 del modelo, de manera que las líneas que portan este alelo poseen una tendencia a adquirir valores negativos frente a este eje (49.62% de explicación GxE, gráficos 31 superiores).

Pero, sin embargo, si nos paramos a analizar el análisis de la varianza para peso de mil semillas observamos que en esta ocasión el mayor porcentaje de explicación de la varianza corresponde a los genotipos, seguido por el factor ambiental dejando tan solo un 9,61% de explicación de la varianza a la interacción GxE siendo este porcentaje menor al explicado por mero azar (12,46%) (tabla 21). Pero, así y todo, encontramos al ambiente 2008 claramente separado del resto tanto si le observamos respecta al eje IPCA1, como respecto a IPCA2, el cual posee un 31,84% de explicación de la interacción, encontrando una clara interacción positiva entre las líneas sin *denso* y este ambiente, especialmente en función del eje IPCA1 del modelo.

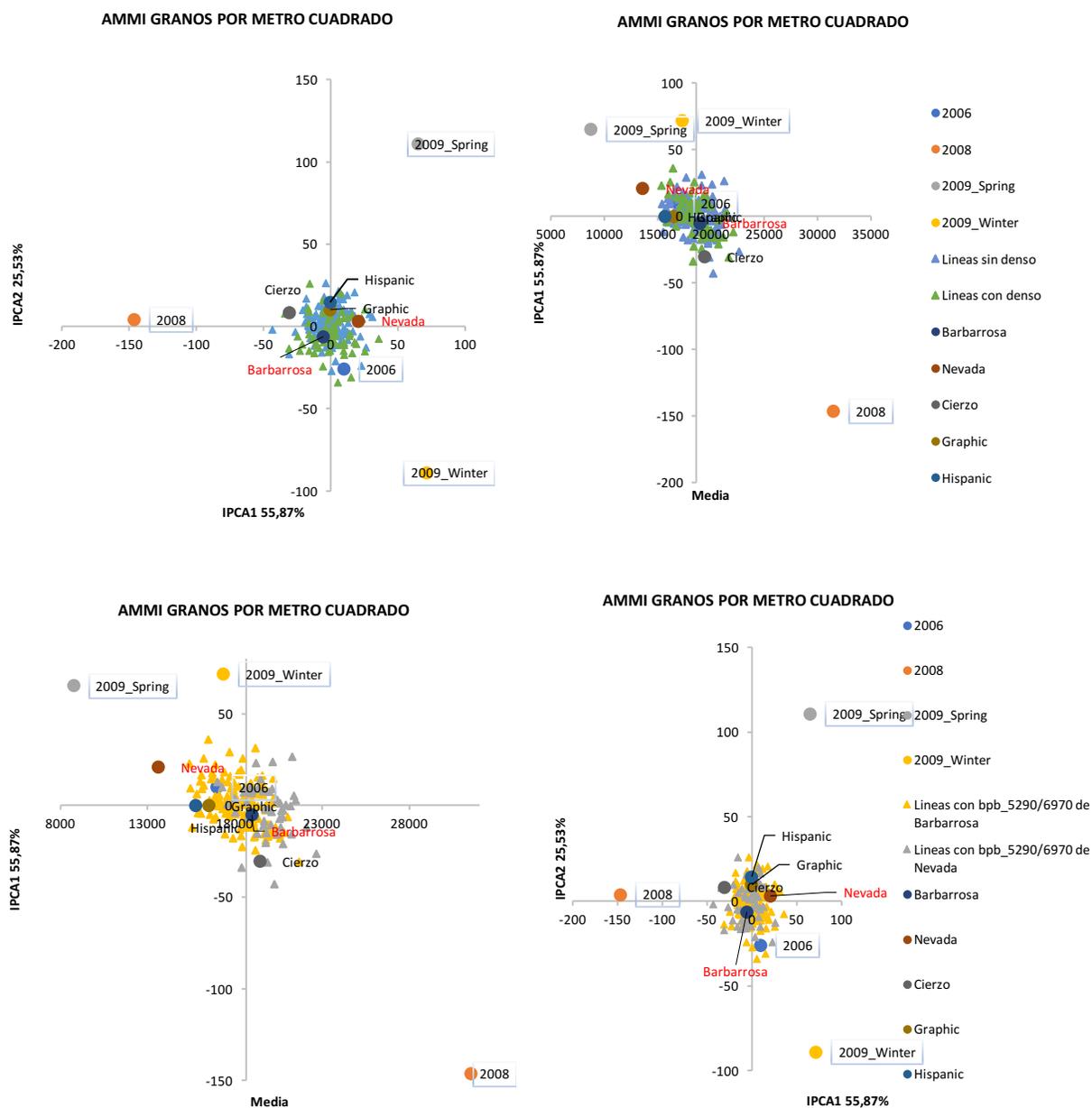
Así mismo, debemos destacar, que bajo este mismo modelo para peso de mil semillas se detectó otra covariable genética en función del alelo que portaban las líneas de los marcadores bPb\_5290 y bPb\_6970, situado en el grupo 1H del mapa genético NxBxB, de manera que las líneas que poseen los alelos procedentes de Nevada poseen, en general, medias en este modelo para peso de mil semillas inferiores a las de las líneas que portan el alelo de Barbarrosa, a pesar de que Nevada tiene un peso de mil semillas superior (gráfico 31 inferior izquierdo), lo que podría achacarse a que Nevada es una variedad de dos carreras (al igual que Hispanic), mientras que las líneas procedentes de la población NxBxB son todas de seis carreras.



**Gráficos 31.** Modelo AMMI para peso de mil semillas. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en las superiores las líneas que portan el alelo *denso* y las que no y en las inferiores el alelo que portan respecto a los marcadores bPb5290 y bPb\_6970.

Esta misma covariable genética fue detectada también en el modelo AMMI para granos por metro cuadrado (gráficos 32), aunque la presencia de *denso* no tuvo ninguna repercusión en este caso en el modelo. En este caso se encontró también una clara tendencia en función de la media del modelo, pero en este caso los valores superiores procedieron de las líneas con el alelo procedente de Nevada, encontrándonos en este caso a este parental muy por debajo de la media del modelo (gráficos 32 inferiores). Bajo este modelo encontramos también al ambiente claramente diferenciado del resto, aunque en esta ocasión su media se encuentra más próxima a las líneas portadoras del alelo de Nevada

que el de Barbarrosa, ya que en este ambiente los valores para número de granos por metro cuadrado también fueron superiores que en el resto de los ambientes de estudio.



**Gráficos 32.** Modelo AMMI para el número de granos por metro cuadrado. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en las superiores las líneas que portan el alelo *denso* y las que no y en las inferiores el alelo que portan respecto a los marcadores bPb5290 y bPb\_6970.

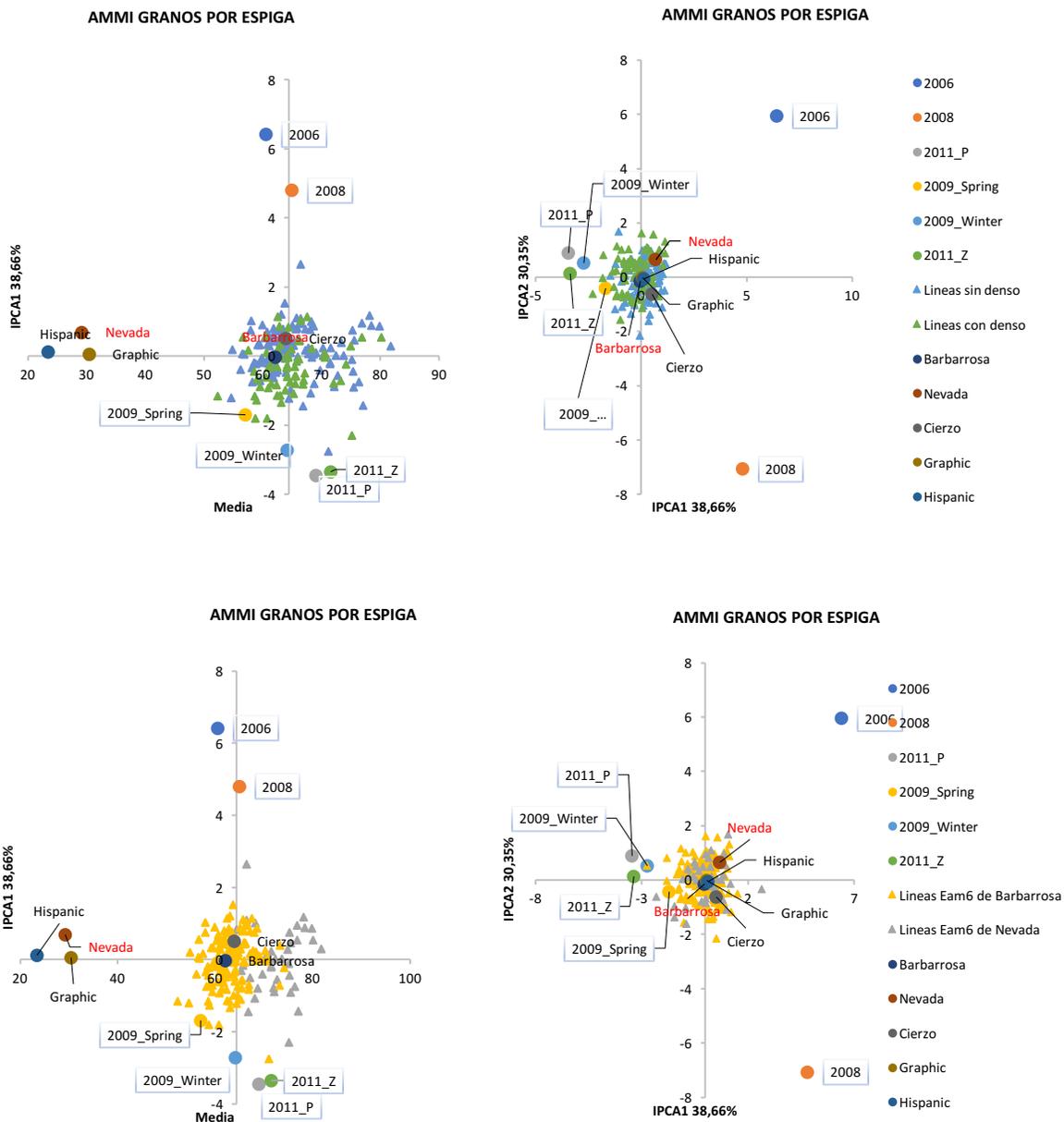
Sin embargo, si nos fijamos en la tabla 21 observamos que para granos por metro cuadrado la mayor explicación de la varianza se debe a los distintos ambientes del estudio, mientras que tanto los genotipos como la interacción GxE adquieren valores muy bajos similares entre sí, en torno al 3% de la

explicación de la varianza, mientras que un 4.66% de explicación de la misma se debe al azar bajo este modelo AMMI.

Esto no ocurre en el caso de los parámetros estudiados en relación con la espiga, granos por espiga y longitud de la misma, como vemos al observar la tabla 21. En estos dos casos la mayor parte de la explicación de la varianza correspondió a los genotipos (en torno al 46% de la explicación de la varianza en ambos casos), en donde a pesar de que el porcentaje debido al azar explicado en ambos modelos es del orden del 10-12%, el porcentaje de explicación de los modelos de la interacción GxE fue superior al resto de los parámetros: 20,07% para número de granos por espiga y de 29,50% para la longitud de la espiga, encontrando una escasa relación de ambos modelos con la covariable genética de portar o no el alelo *denso* (gráficos 33 y 34 superiores), pero si con el alelo que portan para el gen de precocidad intrínseca, *Eam6* (gráficos 33 y 34 inferiores), analizado según el alelo que portan para los marcadores bPb\_3677 y bPb\_5449. En este sentido se encontraron medias para ambos caracteres inferiores de estos caracteres para las líneas con *Eam6*, con el alelo procedente de Barbarrosa, aunque las medias más bajas en el modelo para granos por espiga correspondieron evidentemente a las variedades de dos carreras, entre ellas Nevada.

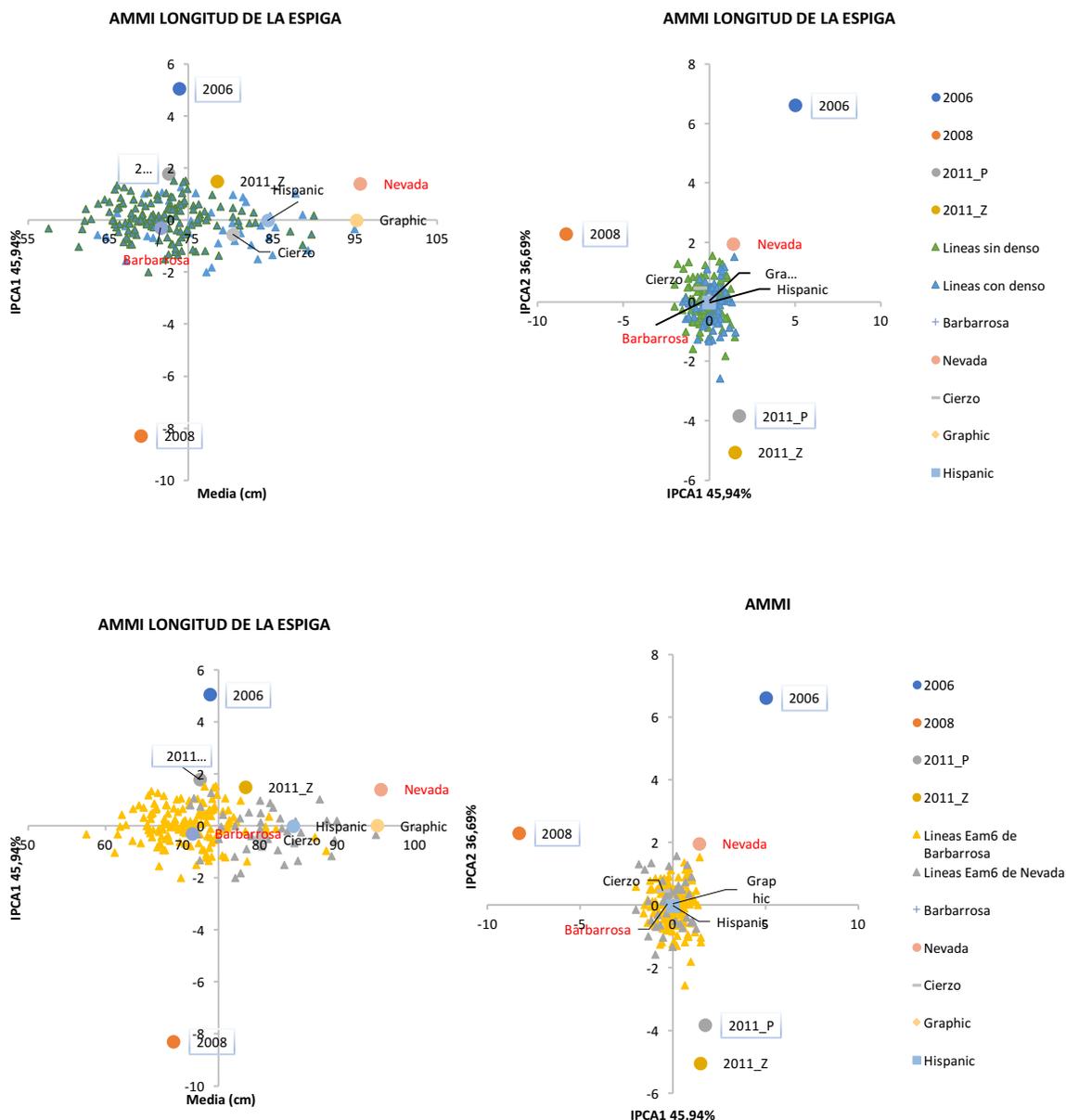
Sin embargo, en lo que respecta a la longitud de la espiga, Nevada está incluida junto a las líneas que portan su alelo de no precocidad per sé.

Volviendo a la disección de los modelos en función de la interacción GxE, nos encontramos con que en el caso del número de granos por espiga los ejes IPCA1 e IPCA2 poseen un 38,66% y 30,35% de explicación de la interacción, de manera que si analizamos los gráficos 32 derechos que enfrentan a ambos ejes del modelo, observamos que los ambientes 2011\_P, 2011\_Z y 2009\_Winter se encuentran muy próximos entre sí, seguido muy de cerca por el ambiente 2009\_spring, pero en el caso de este último es el único con valores negativos respecto al eje IPCA2. Mientras que en lo que respecta a 2006 y 2008, estos se encuentran claramente separados de los otros cuatro y entre ellos, a pesar de que ambos poseen valores positivos y elevados para IPCA1.



**Gráfico 33.** Modelo AMMI para número de granos por espiga. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en las superiores las líneas que portan el alelo *denso* y las que no y en las inferiores el alelo que portan respecto a *Eam6*.

Sin embargo, en lo que respecta a la longitud de la espiga, estos ambientes, a pesar de encontrarse también claramente separados del resto y entre ellos, es para el eje IPCA1 (45,94% de la explicación GxE) para el que obtienen valores más alejados entre ambos ensayos, 2006 y 2008, encontrándose el ambiente 2006 más próximo a los otros dos ambientes, 2011\_Z y 2011\_P para los que se midió este parámetro, respecto a este mismo eje.



**Gráficos 34.** AMMI para longitud de espiga. Modelo AMMI para número de granos por espiga. Las gráficas nos muestran las medias de las líneas, parentales y testigos en el modelo AMMI frente al eje IPCA1 a la izquierda, mientras que a la derecha se muestra la gráfica del eje IPCA1 frente IPCA2 para estos mismos, mostrándose en las superiores las líneas que portan el alelo *denso* y las que no y en las inferiores el alelo que portan respecto a *Eam6*.

Por tanto, en vista de estos resultados, los ambientes 2008 y 2006 son los ambientes que más separados de los otros en cuanto al comportamiento en los distintos modelos AMMI analizados en este estudio, y además claramente alejados el uno del otro, lo cual se puede achacar a las grandes diferencias en cuanto a la lluvia registrada en uno y otro a lo largo del ciclo del cultivo, y por tanto de la disponibilidad de agua en las distintas fases de inducción de espigado, desarrollo de la espiga y maduración de la misma (llenado de grano), viéndose beneficiado en cuanto rendimiento general el ambiente 2008.

Así mismo, se han determinado diversas covariables genéticas, principalmente la presencia de *denso*, las cuales dividen en dos grupos a las líneas de la población en los distintos modelos AMMI estudiados: *denso* para tiempo de espigado, talla de las plantas, rendimiento y peso de mil semillas, el alelo que portan del marcador bPb\_5290/bPb\_6970 en 1H para este último y número de granos por metro cuadrado y la presencia o no de *Eam6* para los modelos AMMI respecto a granos por espiga y longitud de la misma.

### 3.3 QTL de rendimiento y sus parámetros

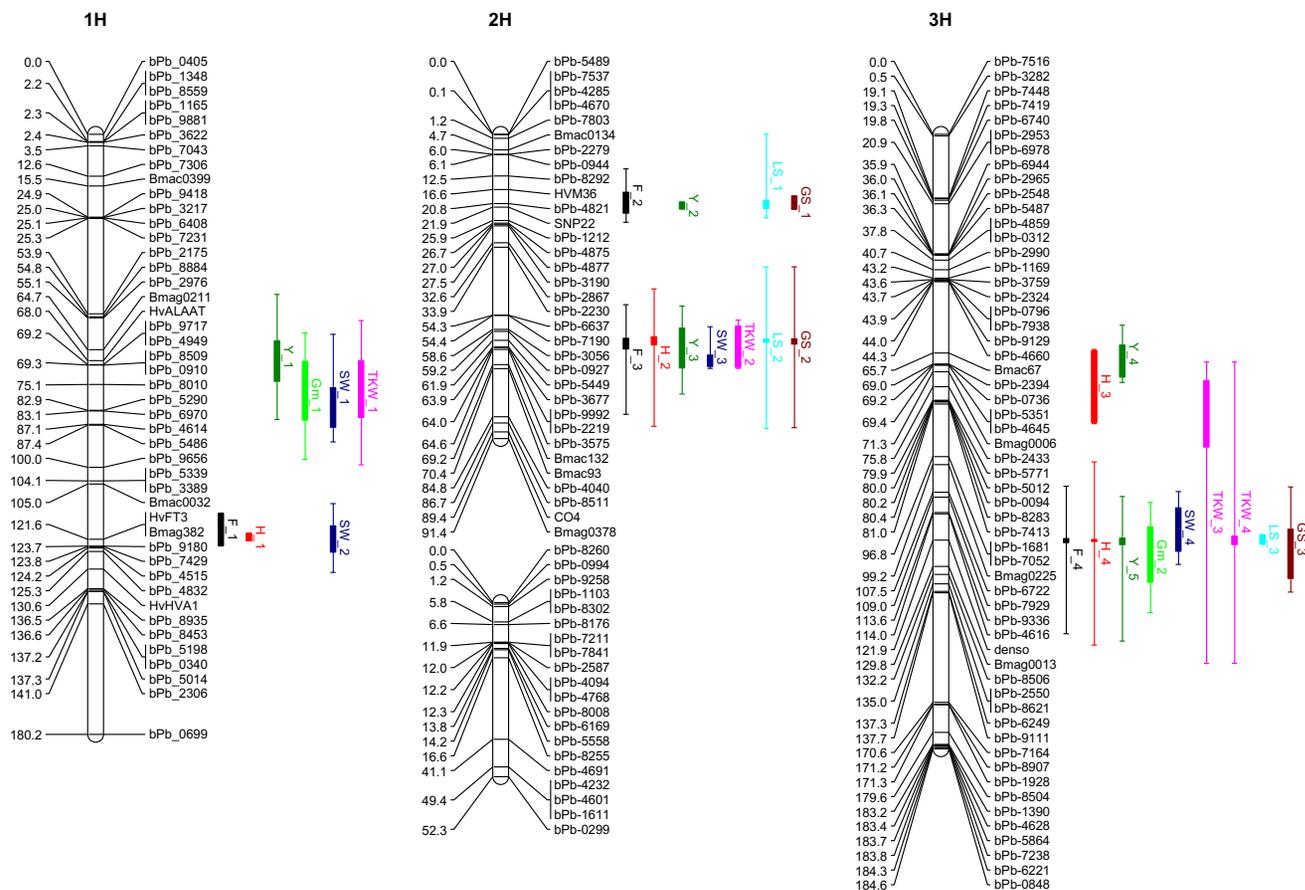
Los principales QTL detectados comunes a la mayoría de caracteres estudiados corresponden mayoritariamente a QTL detectados en la región de *denso*, próximos a *PPD-H1* y a *Eam6*, aunque también se han encontrado QTL ligados al rendimiento próximos a *PPD-H2* y *VRN-H1*, además de otros QTL como se detalla a continuación.

Carácter	Nombre del QTL	Nombre del Marcador	GL	Pos.	- Log10(P) P-valor max.	Intervalo de Confianza	2006 Efec. Adi.	2008 Efec. Adi.	2009 Spring Efec. Adi.	2009 Winter Efec. Adi.	2011_P Efec. Adi.	2011_Z Efec. Adi.	QTLxE F pr		
Espigado (días)	F_1	HvFT3	1H	121,6	5,4	114,04 - 123,54	-0,695	0,6945	-0,695	-0,6945	0,6945	0,6945	n.s.		
	F_2	SNP22	2H1	21,9	8,06	17,37 - 23,73	-	-	1,628	-	11,761	0,4087	<0,001		
	h <sup>2</sup>	F_3	bPb_3677	2H1	63,9	15,25	61,31 - 64,45	1,791	16,145	1,754	12,911	15,804	0,6744	<0,001	
	0,9182	F_4	denso	3H	122	33,09	121,36 - 122,62	2,41	23,098	1,179	17,976	15,671	14,609	<0,001	
		F_5	VRN_H1	5H	210	16,9	206,19 - 214,05	-0,778	0,5771	-1,403	-0,3974	-	-	<0,001	
		F_6	bPb_9702	6H	80,4	3,88	61,00 - 81,31	0,527	-	-	-	-	-	-	
Altura (cm)	H_1	HvFT3	1H	121,6	3,65	119,92 - 122,06	-	-	1,1	-	-	-	-		
	h <sup>2</sup>	H_2	bPb_5449	2H1	62	12,94	60,76 - 63,17	-	4,339	-	-	2,475	-	<0,001	
	0,9389	H_3	Bmag0006	3H	71,3	5,4	65,03 - 86,48	-0,212	-1,672	-	-	-1,694	-1,275	<0,001	
		H_4	denso	3H	122	68,81	121,71 - 122,28	-	-8,938	-3,934	-6,945	-6,738	-7,339	<0,001	
Rendimiento (g//m2)	h <sup>2</sup>	Y_1	bPb_0910	1H	69,3	6,75	62,05 - 74,17	-	-22,17	-	-5,51	-7,938	-	<0,001	
	0,7104	Y_2	bPb_4821	2H1	20,8	3,6	20,43 - 22,42	-	-	-11,007	-11,007	-	-	n.s.	
		Y_3	Bmac132	2H1	69,2	9,34	58,17 - 70,18	13,854	-28,86	-	-	-5,897	-	<0,001	
		Y_4	bPb_2394	3H	69	6,72	63,33 - 72,90	6,733	-	6,733	6,733	6,733	6,733	n.s.	
		Y_5	denso	3H	122	26,59	121,25 - 123,18	17,704	-35,09	-12,951	-	-	25,044	25,128	<0,001
		Y_6	bPb_9998	4H	41,2	3,81	35,05 - 45,27	6,056	-	-9,44	-	-	-	<0,001	
		Y_7	VRN_H1	5H	210	17,15	206,85 - 213,97	4,756	9,2	8,335	6,525	-	-	20,317	<0,001
		Y_8	bPb_2348	7H1	87,7	5,21	72,82 - 99,52	-	-	-	-	10,077	-	-	

**Tabla 22.** Resultados de los QTL obtenidos para cada carácter junto con su heredabilidad mediante modelos mixtos bajo un análisis multiambiental. En ella se muestra el nombre del QTL, junto con su  $-\log_{10}(p)$  máximo y el marcador más próximo junto con su localización en el mapa NxXB. Así como su intervalo de confianza y los efectos aditivos de estos QTL, signo negativo efectos asociados al alelo de Barbarrosa y positivo los de Nevada. También se muestra si la interacción de cada QTL con el ambiente resulto significativa (QTLxE).

Carácter	Nombre del QTL	Nombre del Marcador	GL	Pos.	-Log10(P) P-valor max.	Intervalo de Confianza	2006	2008	2009	2009	2011_P	2011_Z	QTLxE
							Efec. Adi.	Efec. Adi.	Spring Efec. Adi.	Winter Efec. Adi.	Efec. Adi.	Efec. Adi.	
Granos por metro cuadrado (N granos/m <sup>2</sup> ) h <sup>2</sup> 0,6017	Gm_1	bPb_5290	1H	82,9	10,33	68,18 - 85,79	478,1	478,1	478,1	478,1	-	-	n.s.
	Gm_2	bPb_8506	3H	132,2	8,15	117,88 - 134,49	259,8	-	-407,8	140,4	-	-	<0,001
	Gm_3	bPb_8580	5H	39	4,54	28,49 - 43,83	370,8	-	457,4	-	-	-	<0,001
	Gm_4	bPb_4911	5H	93,8	3,63	91,15 - 93,94	-364,2	-678,8	-	-	-	-	<0,001
	Gm_5	bPb_5229	5H	183,3	3,82	182,05 - 195,68	-226,3	-264,2	286	-	-	-	<0,001
Peso Especifico (g) h <sup>2</sup> 0,6385	SW_1	bPb_5290	1H	82,9	6,96	76,09 - 88,04	-3,12	-3,12	-3,12	-3,12	-	-	n.s.
	SW_2	HvFT3	1H	121,6	8,65	117,57 - 125,54	-	2,787	3,2	-	-	-	<0,001
	SW_3	Bmac132	2H1	69,2	7,74	66,26 - 69,70	-3,278	-3,278	-3,278	-	-	-	n.s.
	SW_4	denso	3H	122	7,81	112,17 - 125,22	-7,701	-3,67	-1,219	-3,127	-	-	<0,001
	SW_5	bPb_6145	4H	0,1	5,79	0,00 - 8,61	3,48	-	2,571	7,106	-	-	<0,001
	SW_6	bPb_2080	5H	195	4,69	193,20 - 198,02	2,383	-	2,383	2,383	-	-	n.s.
Peso de Mil Semillas (g) h <sup>2</sup> 0,8775	TKW_1	bPb_6970	1H	83,1	21,46	67,95 - 84,97	-	-	-16,524	-13,176	-	-	<0,001
	TKW_2	Bmac132	2H1	69,2	6,18	57,61 - 69,95	10,113	13,344	-	-	-	-	n.s.
	TKW_3	bPb_5012	3H	80	6,05	74,00 - 93,85	0,6673	0,6673	-0,6673	-0,6673	-	-	n.s.
	TKW_4	denso	3H	122	26	120,73 - 123,24	0,0906	0,4419	0,5142	0,1441	-	-	<0,001
	TKW_5	bPb_9998	4H	41,2	6,1	36,12 - 50,14	-	-	-	-0,6679	-	-	<0,001
	TKW_6	bPb_2080	5H	195	10,83	190,40 - 198,39	15,891	0,9921	-	0,5339	-	-	<0,001
Granos por Espiga (N de granos) h <sup>2</sup> 0,8183	GS_1	bPb_4821	2H1	20,8	4,88	18,62 - 22,51	4,474	1,761	-	-	3	1,881	<0,001
	GS_2	bPb_5449	2H1	62	36,41	61,36 - 62,96	4,234	4,321	2,879	3,56	4,163	4,139	<0,001
	GS_3	denso	3H	122	8,79	11,86 - 13,33	-	-1,741	-0,55	1,051	-	0,895	<0,001
	GS_4	bPb_9504	4H	16,9	6,57	14,48 - 22,44	2,61	-	1,37	-	-	1,37	<0,001
Longitud de la Espiga (mm) h <sup>2</sup> 0,7229	LS_1	bPb_4821	2H1	20,8	12,55	19,86 - 22,30	3,343	3,343	-	-	3,343	3,343	n.s.
	LS_2	bPb_5449	2H1	62	38,63	61,53 - 62,47	4,652	5,407	-	-	3,18	3,072	0,003
	LS_3	denso	3H	122	3,8	120,32 - 123,14	-	-	-	-	0,578	1,368	0,005
	LS_4	bPb_3829	4H	25,3	3,47	16,44 - 29,22	0,855	-	-	-	-	0,855	n.s.
	LS_5	bPb_2058	6H	27	4,4	11,27 - 28,44	-0,982	-0,982	-	-	-0,982	-0,982	n.s.

**Tabla 22. Continuación.** Resultados de los QTL obtenidos para cada carácter junto con su heredabilidad mediante modelos mixtos bajo un análisis multi-ambiental. En ella se muestra el nombre del QTL, junto con su  $-\log_{10}(p)$  máximo y el marcador más próximo junto con su localización en el mapa NxByB. Así como su intervalo de confianza y los efectos aditivos de estos QTL, signo negativo efectos asociados al alelo de Barbarrosa y positivo los de Nevada. También se muestra si la interacción de cada QTL con el ambiente resulto significativa (QTLxE).



**Figura 12.** Distribución de los QTL detectados para espigado, rendimiento y sus distintos parámetros estudiados bajo un análisis multi-ambiental, mostrándose en negro los QTL detectados para espigado, verde oscuro rendimiento, verde claro para granos/m<sup>2</sup>, azul oscuro para peso específico, rosa peso de mil semillas, azul claro para granos por espiga y marrón para la longitud de la espiga. En todos ellos se muestra en barra sólida el intervalo de confianza ( $-\log_{10}(p)_{\max}-2$ ,  $-\log_{10}(p)+2$ ), y línea para el intervalo de detección significativa con  $-\log_{10}(p)$  igual o superior a 3.4, umbral detección de QTL en este estudio.

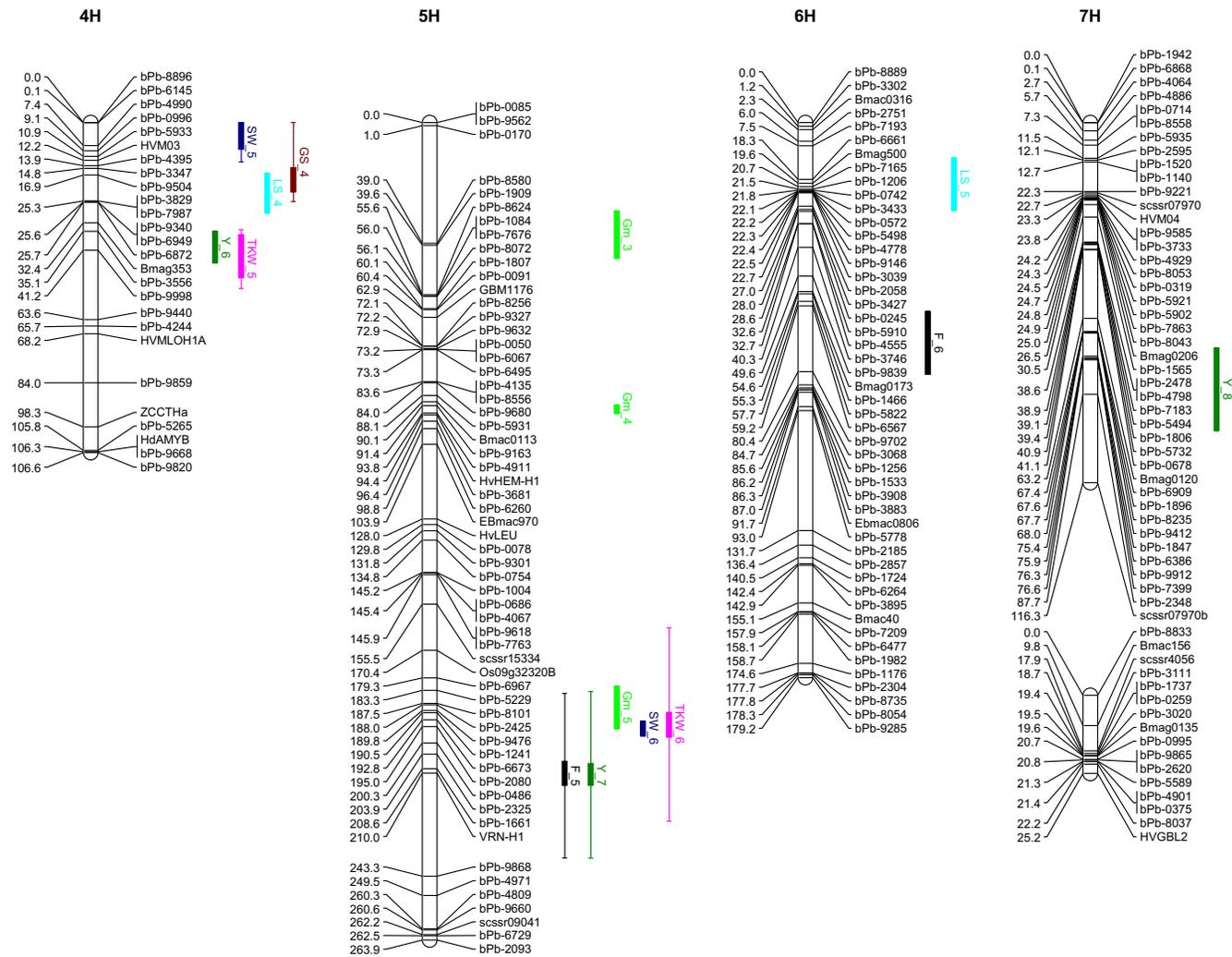


Figura 12. Continuación.

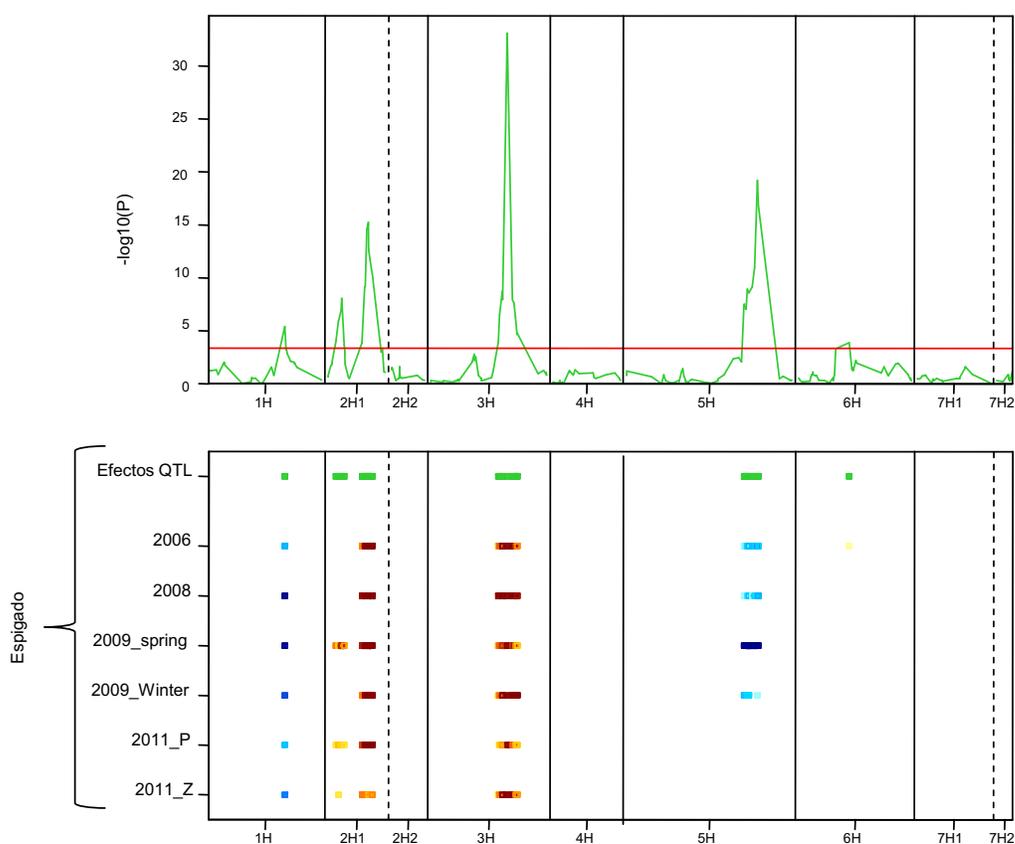
### 3.3.1 QTL detectados para floración

Los principales genes de floración segregantes en la población fueron detectados para días de espigado, a excepción de *VRN-H2* el cual no fue significativo en ningún caso (ver figura 13).

Por su parte *VRN-H1* (F\_5) resultó altamente significativo para todos los ensayos salvo para los realizados en el año 2011, mientras que *PPD-H1*(F\_2) lo fue tan solo, aunque en menor medida, en estos dos y el ensayo con siembra primaveral. Esto podría estar relacionado con lo observado en el modelo AMMI de floración respecto al eje IPCA1, de manera que estos tres ambientes poseían valores positivos frente a este eje. Esto ser debido a que las lluvias invernales registradas en los ambientes de 2011 pudieron ralentizar el crecimiento vegetativo de las plantas, provocando que las plantas se desarrollaran bajo fotoperiodos más largos, provocando que en ambos, 2011\_Z y 2011\_P, los efectos de *PPD-H1* fueran significativos con ocurre con 2009\_spring.

Todos los demás, *PPDH2*(F\_1), *Eam6*(F\_3) y *denso*(F\_4) resultaron significativos en todos los ensayos del presente estudio, siendo *denso* el más significativo, con un  $-\log_{10}(p)$  cercano a 40 y *PPD-H2* el que tiene el  $-\log_{10}(p)$  más bajo (ver tabla 22). Un QTL más fue detectado para floración en el grupo 6H (F\_6) en el ensayo de 2006.

En cuanto a los efectos de los alelos nos encontramos que los alelos invernales procedentes de Barbarrosa de *VRN-H1* y *PPD-H2* alargan el tiempo de floración, mientras que los alelos primaverales procedentes de Nevada de *PPD-H1* y *eam6* retrasan la floración, así como la presencia del alelo *denso*.



**Figura 13.** QTL detectados en los ensayos de campo para espigado. En el cuadro superior nos encontramos la gráfica del  $-\log_{10}(p)$  con un límite de detección de 3.4, mientras que en el cuadro inferior nos encontramos tanto con los QTL detectados en verde como los efectos aditivos en cada ambiente, representados en color amarillo-rojo los efectos aditivos procedentes de Nevada y en tonos azules los procedentes de Barbarrosa.

### 3.3.2 QTL detectados para rendimiento y sus parámetros

#### a. QTL para rendimiento y sus parámetros relacionados con los genes de floración

En cuanto a los genes de vernalización segregantes en la población de estudio, *VRN-H1* y *VRN-H2*, tan solo QTL en las inmediaciones de *VRN-H1* en 5H fueron detectados para rendimiento para todos los ensayos del estudio, aunque con diferencias en los efectos de éste según el ensayo. El alelo invernal de Barbarrosa de *VRN-H1*, quien retrasó la fecha de floración (ver figura 13 floración y 14), fue en detrimento del rendimiento, siendo el alelo primaveral de Nevada el que aumentó el rendimiento en estos ensayos. Mientras que en ambos ensayos realizados en la campaña 2011 (2011\_P y 2011\_Z) en donde este QTL no fue significativo para floración, fue el alelo de Barbarrosa el que provocó un incremento del rendimiento (figura 14), aunque el LOD para ambos parámetros fue similar. En ambos, existió una mayor pluviosidad en invierno que en el resto de ambientes, de manera que a pesar de que este gen no provocó diferencias en cuanto a fecha de floración se refiere, sí lo hizo en rendimiento en uno de ellos, 2011\_Z, pero en esta ocasión el rendimiento se vio incrementado por los alelos invernales.

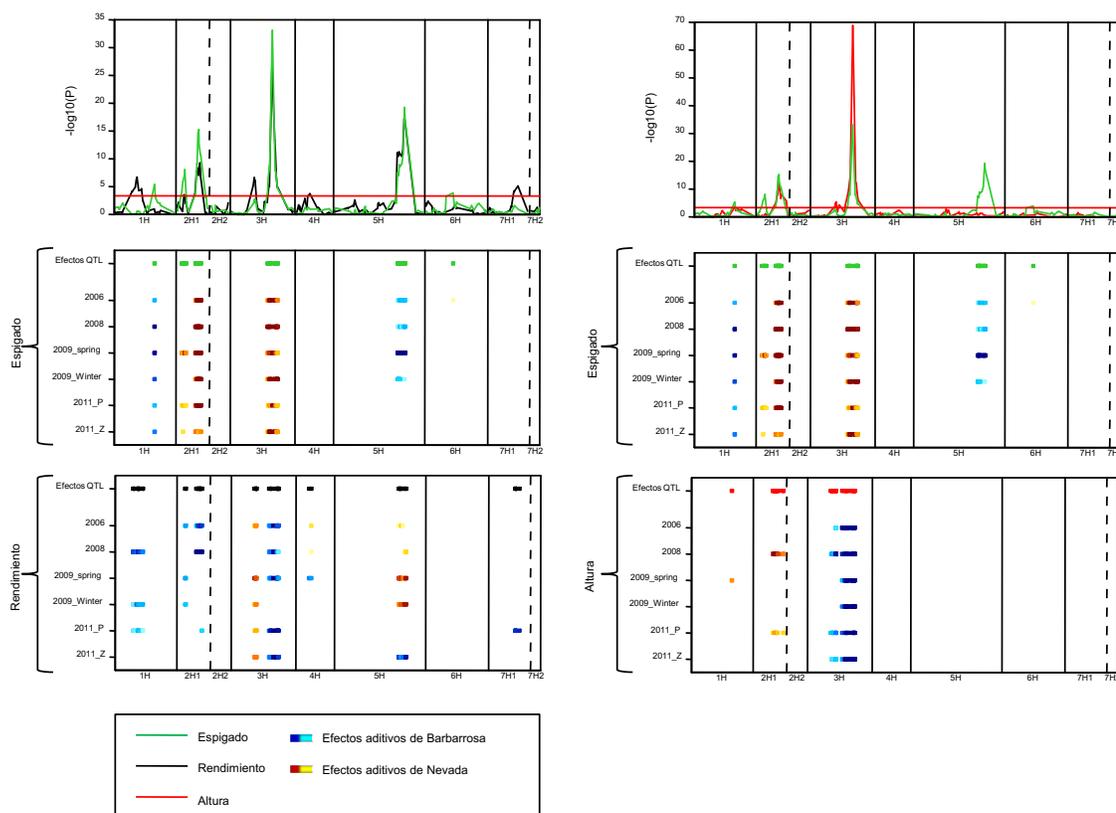
En cuanto a los genes de responsables de la respuesta a fotoperiodo, sí se encontraron QTL en las inmediaciones de ambos. Los QTL detectados en *PPD-H1* para floración, se encontraron tan sólo en tres de los ensayos, mientras que para parámetros del rendimiento el marcador intragénico para este, no fue el marcador que obtuvo el LOD máximo, sino un DArT cercano bPb-4821, situado a 1.1 cM del primero (tabla 22), pero en todos los casos el intervalo de confianza incluye a este marcador intragénico. Éste fue significativo para rendimiento (2006 y los dos ensayos del 2009, 2009\_spring y 2009\_Winter) y para el número de granos por espiga y longitud de la misma para todos los ensayos a excepción de los dos realizados en el 2009 (ver figuras 12 y 17)

Por su parte *PPD-H2*, para el cual fueron significativos QTL para espigado en esta misma región para todos los ensayos, tan sólo fue significativo para altura en el ensayo de siembra primaveral de 2009 y también para peso específico en este mismo ensayo y también en el de 2008, por lo que este podría tener cierto interés a la hora del llenado de grano.

También se encontraron QTL significativos en la región donde se encuentra *Eam6*, tanto para altura (sólo para 2008 y 2011\_P) como para todos los ensayos donde se tomaron los datos de granos por espiga y longitud de la misma. Así mismo, también fueron significativos QTL cuyo LOD máximo corresponde al marcador Bmac132 para rendimiento (2006, 2008 y 2011\_P), peso específico (para todos los ensayos donde se tomó el dato menos en el de siembra de primavera) y todos los ensayos donde se tomó el peso de mil semillas, marcador que Cuesta-Marcos et al (2009) proponen como marcador diagnóstico para este gen.

También se detectaron QTL para la altura de la parcela en todos los ensayos a excepción de los dos realizados en la campaña de 2009, en el grupo 3H en la región del marcador microsatelite bmag6, donde para esta misma población se detectaron QTL para floración bajo condiciones controladas de fotoperiodo y vernalización (capítulo tres de esta misma tesis). Próximo a este, e incluyendo a este marcador SSR en su intervalo de confianza se detectó un QTL (Y\_2) para rendimiento en todos los ensayos menos en el de 2008.

Por su parte QTL en el gen *denso* fueron altamente significativos no sólo para floración, provocando este mismo un retraso de la misma, sino para todos los parámetros del rendimiento estudiados, a excepción del número de granos por metro cuadrado. En este caso la presencia de *denso* disminuye tanto el rendimiento, como los parámetros de llenado de grano, mientras que este aumenta el número de granos por espiga y la longitud de la misma.

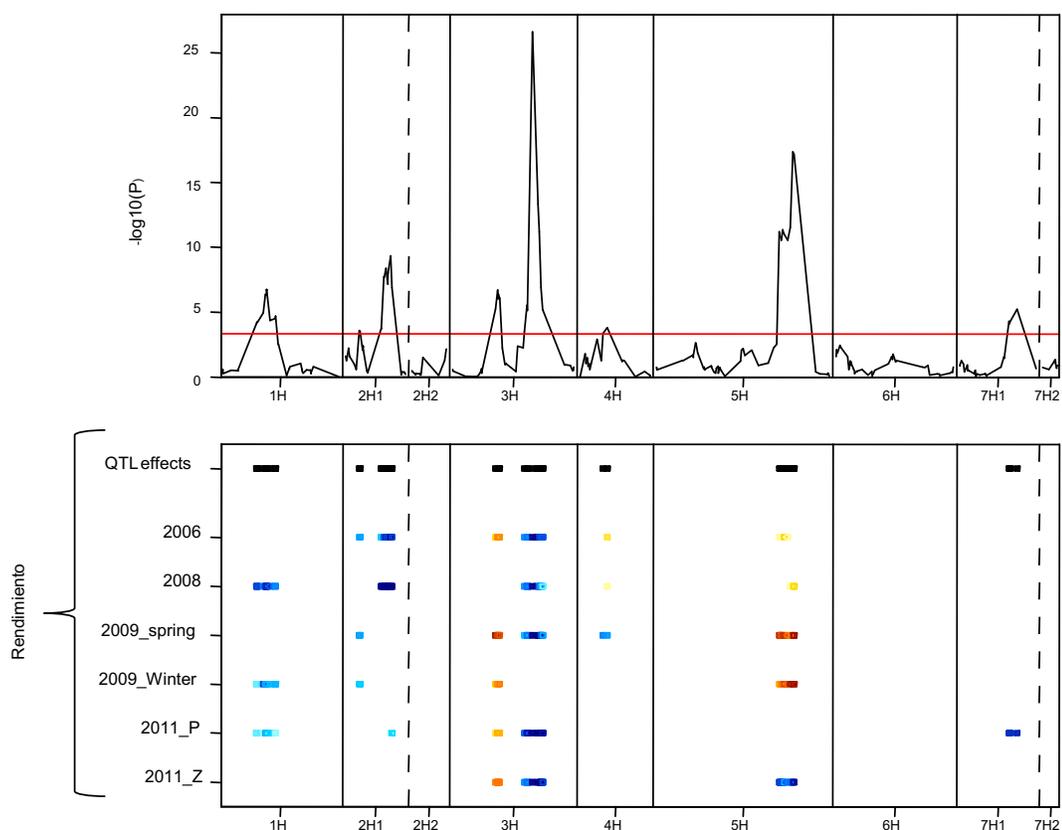


**Figura 14.** Comparativa de los QTL detectados para espigado y rendimiento en el lado derecho y para espigado y altura en el lado izquierdo. En los cuadros superiores nos encontramos las gráficas del LOD con un límite de detección de 3.4 en ambos casos, mientras que en los inferiores nos encontramos tanto con los QTL detectados, como los efectos aditivos en cada ambiente, representados en color amarillo-rojo los efectos aditivos procedentes de Nevada y en tonos azules los procedentes de Barbarrosa.

### b. QTL detectados para rendimiento

Para rendimiento, además de los QTL mencionados anteriormente relacionados con genes de floración, se encontraron otra serie de QTL:

- Y\_1 en 1H para ambos ambientes de 2009 y de 2008. En este caso son los alelos de Barbarrosa los que incrementan el rendimiento.
- Y\_6 en 4H. Este QTL fue detectado en dos de los ambientes de estudio encontrándonos con efectos contrarios, ya que en el ensayo de 2006 son los alelos de Nevada los que incrementan este carácter mientras que en el ensayo 2009\_spring son los de Barbarrosa los que incrementan el rendimiento.
- Y\_8 en 7H1, el cual sólo fue significativo en uno de los ensayos, 2011\_P, en el cual los alelos e Barbarrosa aumentan el rendimiento.



**Figura 15.** QTL detectados en los ensayos de campo para Rendimiento. En el cuadro superior nos encontramos la gráfica del LOD con un límite de detección de 3,4, mientras que en el cuadro inferior nos encontramos tanto con los QTL detectados en color negro, como los efectos aditivos en cada ambiente, representados en color amarillo-rojo los efectos aditivos procedentes de Nevada y en tonos azules los procedentes de Barbarrosa.

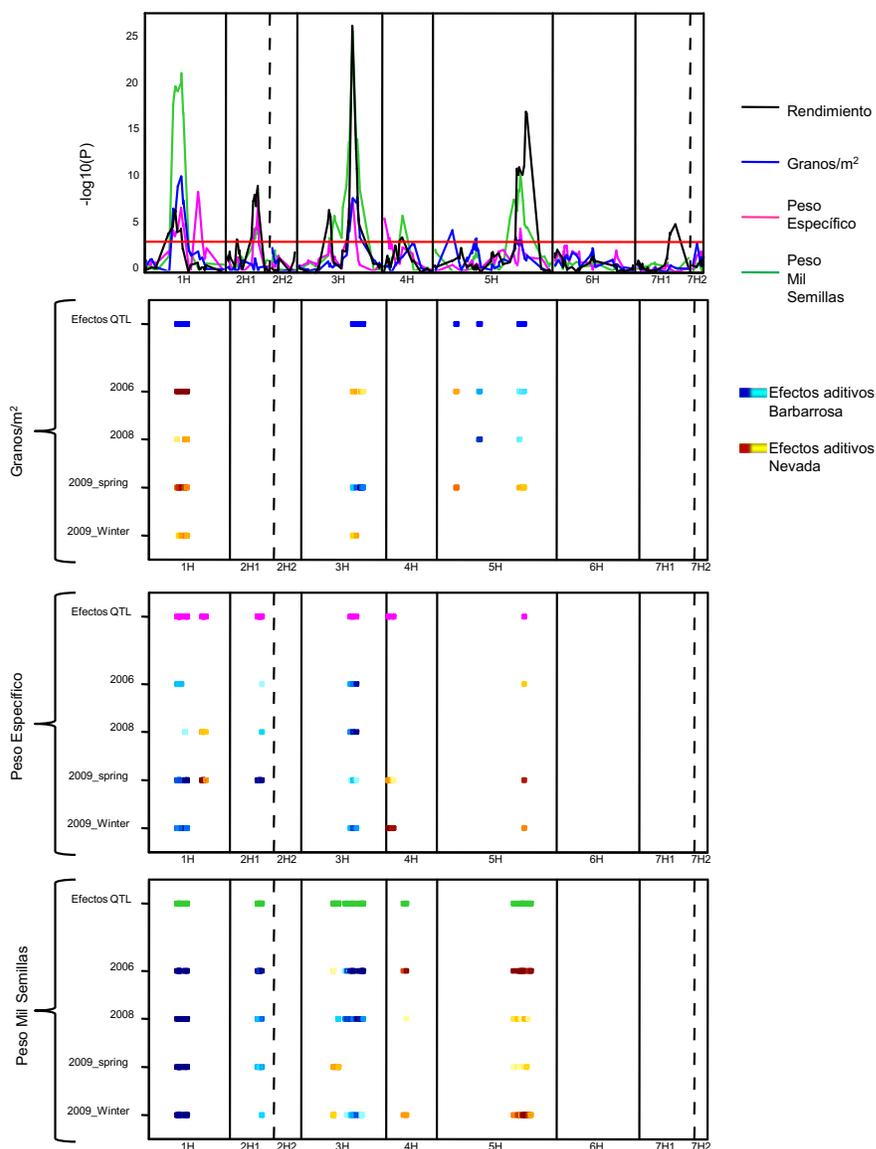
*c. QTL para parámetros de rendimiento relacionados con el llenado de granos*

En cuanto a peso específico y peso de mil semillas tanto *denso* como *eam6* fueron significativos para ambos caracteres de manera que SW\_4 para peso específico en la región de *denso* fue detectado en todos los ensayos donde se midió este carácter, mientras que SW\_3 en la región de *Eam6* lo fue en todos a excepción de 2009\_winter, aumentando en ambos casos los alelos de Barbarrosa este carácter. Por su parte, TKW\_4 en la región de *denso* no fue detectado en el ensayo 2009\_spring pero sí en todos los demás mientras que TKW\_2 en la región de *eam6* fue detectado para peso de mil semillas en todos los ensayos donde se midió este parámetro, encontrándonos que, al igual que en el caso del peso específico, son los alelos de Barbarrosa para ambos QTL los que aumentan este parámetro.

En este caso se detectó el QTL SW\_2 en la región donde se encuentra *PPD-H2*, aumentando los alelos de Nevada de sensibilidad a fotoperiodo corto el peso específico en los dos ensayos donde este fue significativo, 2008 y 2009\_spring, siendo además el QTL con mayor LOD para este carácter.

Se han detectado además otros dos QTL coincidentes para ambos caracteres, uno de ellos en 1H (SW\_1 y TKW\_1) en donde los alelos de Barbarrosa aumentan ambos caracteres, y otro en 5H (SW\_6 y TKW\_6) siendo en este caso los alelos de Nevada los que aumentan estos caracteres. Además, ambos fueron detectados en todos los ensayos del estudio a excepción de SW\_6 que no fue detectado en el ambiente 2008. Cabe destacar que en el caso de los QTL en 5H estos podrían coincidir con Y\_7 ya que como vemos en la gráfica 16, este tiene un “satélite” que coincide con la posición de estos QTL tanto de peso de mil semillas como de peso específico.

Otros QTL para estos parámetros se detectaron en distintos ensayos (ver tabla 22 y figura 16) como son SW\_5 para peso específico y TKW\_4 en el grupo 4H cuyos alelos de Nevada aumentan ambos caracteres y TKW\_3 en 3H también para peso de mil semillas, pero en este caso los alelos de Nevada aumentan este carácter en los dos ensayos de 2009 y en el de 2006, mientras que los de Barbarrosa aumentan este carácter en el ensayo de 2008.



**Figura 16.** Comparativa de los QTL detectados para rendimiento y los distintos parámetros de este: Granos/m<sup>2</sup>, peso específico y peso de mil semillas. En la gráfica superior nos encontramos la gráfica del LOD con un límite de detección de 3.4, mientras que en los inferiores nos encontramos tanto con los QTL detectados, como los efectos aditivos en cada ambiente, representados en color amarillo-rojo los efectos aditivos procedentes de Nevada y en tonos azules los procedentes de Barbarrosa.

*d. QTL para parámetros de rendimiento relacionados con el número de granos*

Para el número de granos por espiga y longitud de la misma resultaron significativos QTL similares, de manera GS\_1 para número de granos por espiga y LS\_1 para la longitud de espiga se encuentran ambos en la región de *PPD-H1* y para ambos los alelos primaverales de Nevada aumentan dichos parámetros siendo ambos significativos para los dos ensayos de 2011 y para los ensayos de 2006 y 2008,

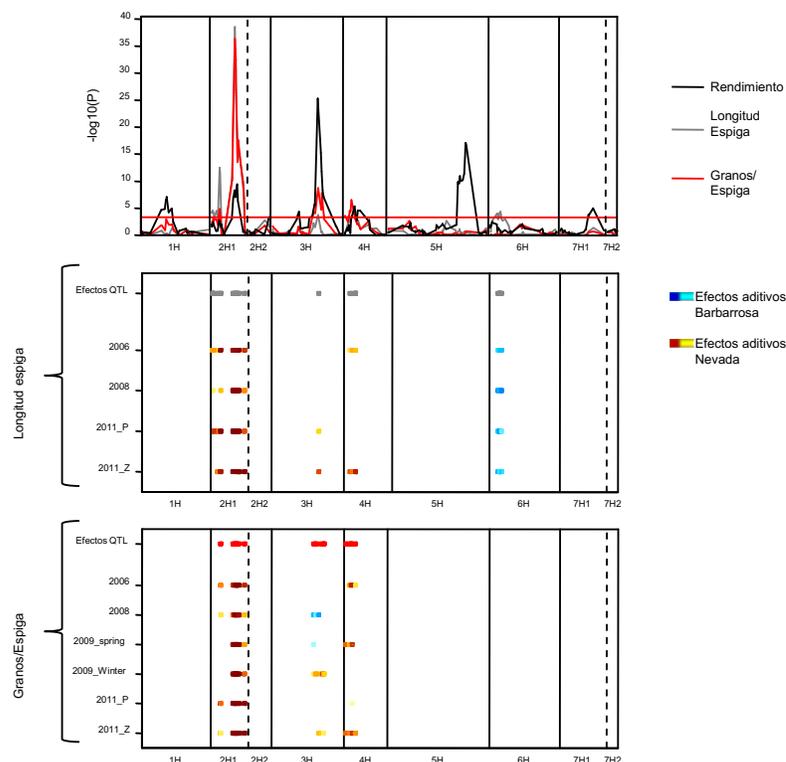
mientras que en la región de *Eam6* LS\_2 es significativo para estos mismos ambientes, GS\_2 es significativo para todos los ambientes de este estudio, teniendo ambos los mismos efectos que los anteriores.

También coinciden, aunque no la posición del LOD máximo, los QTL detectados para ambos caracteres en el grupo 4H GS\_4 y LS\_4, los cuales fueron significativos para los ambientes 2006 y 2011\_Z, aunque GS\_4 también lo fue para 2009\_spring, aumentando ambos parámetros los alelos de Nevada en todos los casos.

Cabe destacar que los efectos de *denso* no fueron los más significativos para estos caracteres, ya que en ambos casos fueron los QTL en la región de *Eam6*, LS\_2 y GS\_2. Además, los QTL en la región de *denso*, GS\_3 y LS\_3 no fueron significativos en los mismos ensayos, de manera que para la longitud de la espiga LS\_3 sólo fue significativo para los ensayos de 2011 (2011\_P y 2011\_Z) mientras que para el número de granos por espiga GS\_3 no fue significativo ni para 2011\_P ni para 2006. Pero en ambos casos (GS\_3 y LS\_3) los alelos de Nevada aumentan estos dos parámetros en el ensayo 2011\_Z y en los ensayos 2011\_P (LS\_3) y 2009\_winter (GS\_3), mientras que el número de granos se ve incrementado por los alelos de Barbarrosa (sin *denso*) en los ambientes 2008 y 2009\_spring.

Además, otro QTL para la longitud de espiga se detectó en el grupo 6H, LS\_5, en todos los ensayos donde se tomó este carácter, de manera que en este caso los alelos de Barbarrosa aumentan la longitud de la espiga.

Sin embargo, los QTL detectados para número de granos por metro cuadrado nada tuvieron que ver con los anteriores (tabla 22, figuras 12 y 16), destacando la ausencia de *denso* y el QTL Gm\_1, ya que coincide con los QTL detectados para llenado de grano SW\_1 para peso específico y TKW\_1 para peso de mil semillas, aunque en este caso son los alelos de Nevada los que aumentan este carácter. Esto podría deberse a la mayor relación de este parámetro con el número de espigas, y por tanto número de hijuelos, que con el número/tamaño de una única espiga.



**Figura 17.** Comparativa de los QTL detectados para rendimiento y los parámetros relacionados con la espiga: longitud de esta y número de granos. En el gráfico superior nos encontramos las gráficas del LOD con un límite de detección de 3.4, mientras que en los inferiores nos encontramos tanto con los QTL detectados, como los efectos aditivos en cada ambiente, representados en color amarillo-rojo los efectos aditivos procedentes de Nevada y en tonos azules los procedentes de Barbarrosa.

### 3.3.3 Interacciones QTLxAmbiente (QTLxE)

En este caso cabe destacar que múltiples QTL detectados tanto para rendimiento tuvieron los mismos efectos en los distintos ambientes del presente estudio, de manera que la interacción QTL x ambiente (QTLxE) no fue significativa, lo que tiene una gran importancia en este tipo de estudios debido a que tanto el ambiente como la interacción genotipo x ambiente suele tener un gran peso en el análisis de varianza de estos parámetros.

De este modo como vemos en la tabla 22 estos son los QTL cuyos efectos fueron iguales en todos los ambientes detectados:

- Y\_2 y LS\_1 cuyo LOD máximo se sitúan para ambos en el marcador bPb\_4821, próximo a PPD-H1, para rendimiento y longitud de la espiga respectivamente.
- Y\_4 en 3H para rendimiento.
- Gm\_1, y SW\_1 cuyos LOD máximo se sitúan en el marcador bPb\_5290 en 1H para granos por metro cuadrado y peso específico, pero la interacción con el ambiente (QTLxE) sí resultó significativa en el caso peso de mil semillas (TKW\_1) cuando el marcador más significativo

corresponde con bPb\_6970, pero las diferencias entre los efectos de ese son bastante pequeñas por lo que esta interacción también lo es.

- Los QTL detectados próximos a *Eam6* en 2H1 para peso específico (SW\_3) y peso de mil semillas (TKW\_2), en los cuales el LOD máximo se sitúa en el SSR Bmag132.
- Tampoco fue significativa esta interacción para los QTL de longitud de espiga LS\_4 en el grupo 4H y LS\_5 en el 6H.

Sin embargo, en el otro extremo nos encontramos varios QTL los cuales los alelos de Nevada o Barbarrosa aumentan el carácter según el ambiente donde es medido, por lo que el componente GxE (genotipo por ambiente) es muy fuerte en este caso, por lo que el factor ambiental es importante en estos casos. En esta situación nos encontramos con Gm\_2, TKW\_3 y GS\_3 en el grupo 3H y conY\_7 y Gm\_5 en 5H.

### 3.3.4 Principales interacciones QTLxQTL: Interacciones más relevantes entre QTL

Como vemos en la tabla 23, múltiples interacciones entre QTL fueron significativas, pero estas no fueron iguales ni entre caracteres ni entre ensayos. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de ellas fueron interacciones con los QTL detectados en la región de *denso* y con los QTL detectados en la región de *Eam6*.

Caracter	QTLxQTL	Marcadores	Ambientes						
			2006	2008	2009_Spring	2009_Winter	2011_P	2011_Z	
Espigado	F_1xF_3	HvFT3x x bPb_3677	-	-	-	-	-	+	
	F_2xF_3	SNP22 x bPb_3677	-	-	-	-	+	-	
	F_2xF_4	SNP22 x denso	-	-	-	-	+	-	
	F_3xF_5	bPb_3677 x VRN_H1	+	-	-	-	-	-	
Altura	H_2xH_4	bPb_5449 x denso	-	+	-	-	-	-	
	H_3xH_4	Bmag0006 x denso	+	-	-	-	+	+	
Rendimiento	Y_2xY_4	bPb_4821 x bPb_2394	-	-	+	-	-	-	
	Y_3xY_5	Bmac132 x denso	-	+	-	-	-	-	
	Y_3xY_8	<i>Bmac132</i> x bPb_2348	-	-	-	-	+	-	
	Y_5xY_4	denso x bPb_2394	-	-	-	-	+	-	
Granos/m2	Gm_1xGm_2	<i>bPb_5290</i> x bPb_8506	-	-	-	+	-	-	
	Gm_2xGm_5	bPb_8506 x bPb_5229	+	-	-	-	-	-	
	Gm_4xGm_5	bPb_4911 x bPb_5229	-	+	-	-	-	-	
Peso específico	SW_1xSW_2	<i>bPb_5290</i> x HvFT3x	-	+	-	-	-	-	
	SW_1xSW_4	<i>bPb_5290</i> x denso	-	+	-	-	-	-	
	SW_2xSW_4	HvFT3x x denso	-	-	+	-	-	-	
	SW_3xSW_4	Bmac132 x denso	+	-	-	-	-	-	
	SW_4xSW_5	denso x bPb_6145	-	-	+	-	-	-	
Peso de mil semillas	TKW_1xTKW_3	<i>bPb_6970</i> x bPb_5012	+	-	-	-	-	-	
	TKW_2xTKW_4	Bmac132 x denso	-	-	-	+	-	-	
	TKW_2xTKW_6	<i>Bmac132</i> x bPb_2080	-	-	+	-	-	-	
Granos/Espiga	GS_2xGS_4	bPb_5449 x bPb_9504	+	-	-	-	-	-	
Longitud Espiga	LS_3xLS_4	denso x bPb_3829	-	-	-	-	-	+	
	LS_4xLS_5	bPb_3829 x bPb_2058	+	-	-	-	-	-	

**Tabla 23.** Resumen de las interacciones QTLxQTL significativas para cada carácter en cada uno de los ambientes estudiados. Se muestran sólo las interacciones que fueron significativas utilizando modelos mixtos, para más detalle de los resultados obtenidos ver tabla en anexos.

### 3.4 Análisis del rendimiento obtenido por las líneas de la población NXBxB según su genotipo

En función de los datos obtenidos en los apartados anteriores de este capítulo, se han seleccionado las líneas cuyo genotipo corresponde a un mayor potencial de rendimiento, utilizando como herramienta para la selección los datos de los marcadores más significativos y próximos a los QTL más relevantes para rendimiento y sus parámetros en la población NxBxB.

Por tanto, se trata de seleccionar las líneas que, según los resultados obtenidos, tienen mayor potencial de rendimiento en los ambientes estudiados, por lo que se tratará de comprobar el comportamiento de estas frente al rendimiento, tanto en los distintos ambientes de este estudio, como bajo el modelo AMMI de rendimiento explicado anteriormente en este mismo capítulo.

Posición	2006		2008		2009_Winter		2009_spring		2011_P		2011_Z	
	Línea	Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	Línea	Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	Línea	Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	Línea	Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	Línea	Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	Línea	Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )
1	<b>R022</b> <sup>*i</sup>	499,94	R258*	1190,01	R268	538,284	<b>R066</b>	376,485	<b>R228</b> <sup>*i</sup>	548,591	R069 <sup>id</sup>	743,807
2	<b>R231</b> *	485,094	R053*	1169,62	<b>R066</b>	532,621	<b>R024</b> *	360,413	<b>R031</b> *	541,819	R131 <sup>i</sup>	737,567
3	R130	484,951	R213 <sup>*i</sup>	1157,9	R118 <sup>d</sup>	526,551	<b>R022</b> <sup>*i</sup>	354,25	<b>R105</b> <sup>i</sup>	534,599	<b>R028</b> <sup>i</sup>	727,745
4	R146*	478,075	<b>R132</b> <sup>d</sup>	1142,08	<b>R128</b> <sup>i</sup>	523,593	R198*	341,741	R248	530,203	<b>R251</b> <sup>i</sup>	727,256
5	<b>R149</b> *	475,795	R124*	1140,9	R181 <sup>*i</sup>	517,33	<b>R132</b> <sup>d</sup>	338,349	R153 <sup>i</sup>	530,085	<b>R031</b> *	724,528
6	R206 <sup>*i</sup>	471,885	<b>R105</b> <sup>i</sup>	1139,18	R148	515,862	R216	337,887	R135 <sup>i</sup>	525,97	R121 <sup>*i</sup>	724,451
7	<b>R066</b>	468,854	<b>R091</b> *	1127,45	R194 <sup>*d</sup>	512,589	R261 <sup>*d</sup>	337,67	R120*	523,331	R224	721,626
8	R036*	467,907	<b>R028</b> <sup>i</sup>	1124,49	R092 <sup>d</sup>	511,129	R184 <sup>*d</sup>	337,238	<b>R251</b> <sup>i</sup>	519,863	<b>R228</b> <sup>*i</sup>	717,468
9	<b>R024</b> *	466,908	<b>R231</b> *	1124,03	R106 <sup>d</sup>	509,635	<b>R149</b> *	335,679	R190 <sup>i</sup>	516,52	R178	716,05
10	<b>R091</b> *	466,817	R264	1123	R160	507,705	R169*	334,595	<b>R128</b> <sup>i</sup>	513,154	R010*	713,99

<sup>d</sup> Líneas portadoras del alelo *denso*, procedente de Nevada.

\*Líneas con *PPD-H2* activo. Alelo procedente de Nevada.

<sup>i</sup> Genes de vernalización sin deleciones. Los procedentes de Barbarrosa tanto para *VRN-H1* como para *VRN-H2*.

**Tabla 24.** Ranking de las 10 mejores líneas en cada uno de los ambientes en función de su rendimiento. Marcadas es negrita las líneas que se repiten en más de un ambiente.

En primer lugar, se ha comprobado cuales eran las 10 mejores líneas en cuanto al rendimiento utilizando los mejores estimadores lineales insesgados (BLUPs) en cada uno de los ambientes incluidos en este estudio mostradas en la tabla 24, por tanto, el 5% del total de las líneas. Se ha visto que sólo algunas de ellas se encuentran en más de un ambiente en este ranking. Mientras que, si comparamos con las 10 líneas con mayores medias del rendimiento bajo el modelo de los efectos aditivos principales e interacciones multiplicativas (modelo AMMI), observamos que todas ellas se encuentran entre las diez mejores líneas de alguno de los ambientes como cabría esperar (tabla 25).

Posición	Línea	Modelo AMMI		
		Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	IPCA1	IPCA2
1	R228* <sup>i</sup>	636,888	0,05112	0,18405
2	R066	620,888	0,08481	-0,22488
3	R028 <sup>i</sup>	616,666	0,12948	0,12334
4	R213* <sup>i</sup>	613,555	0,244	0,16469
5	R153 <sup>i</sup>	611,999	0,10192	0,0981
6	R231*	610,888	0,20921	-0,05394
7	R022* <sup>i</sup>	607,555	0,04629	-0,08902
8	R190 <sup>i</sup>	604,888	0,14549	0,13654
9	R031*	604,666	-0,11805	0,15746
10	R258*	601,333	0,36669	-0,03866
<b>Ambiente</b>				
	<b>2006</b>	400,444	0,11721	-0,53409
	<b>2008</b>	1007,555	188,185	0,25916
	<b>2009_Spring</b>	278,889	-0,52143	-0,56894
	<b>2009_Winter</b>	471,111	-0,41812	-101,878
	<b>2011_P</b>	455,111	-0,35139	0,48005
	<b>2011_Z</b>	632,666	-0,70812	13,826

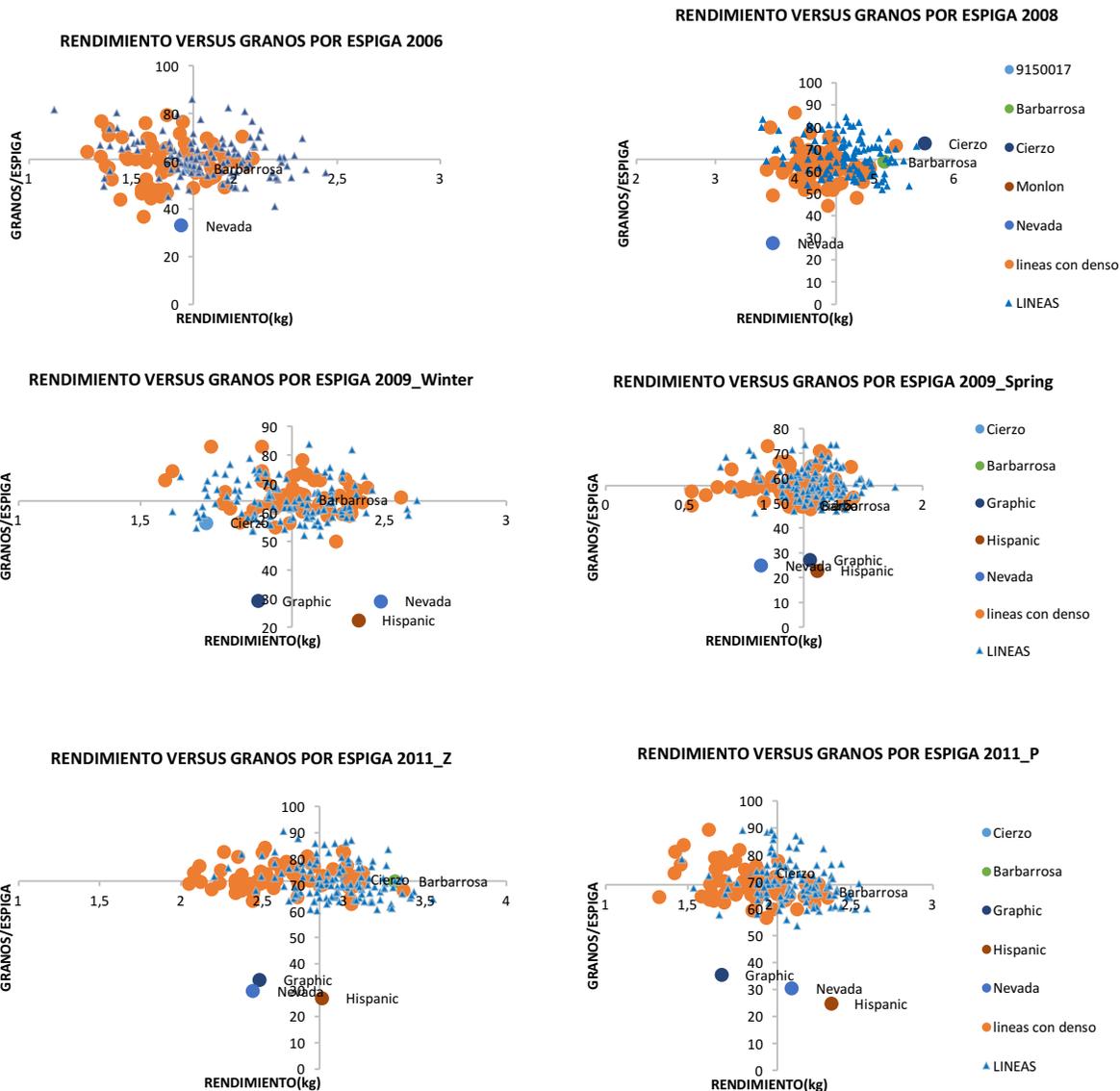
<sup>i</sup> Líneas portadoras del alelo *denso*, procedente de Nevada.

\* Líneas con *PPD-H2* activo. Alelo procedente de Nevada.

<sup>1</sup> Genes de vernalización sin delecciones. Los procedentes de Barbarrosa tanto para *VRN-H1* como para *VRN-H2*.

**Tabla 25.** Ranking de las 10 líneas con mayores rendimientos en el modelo AMMI. Se muestra tanto la media de estas bajo el modelo, como los valores IPCA1 e IPCA2 para cada una de ellas, mostrándose también en la parte inferior dichos valores para cada uno de los ambientes estudiados.

Destaca el hecho de que en las diez mejores para cada ambiente todas aquellas que poseían el gen *PPD-H2* activo, con el alelo procedente del parental primaveral Nevada, poseen el gen *VRN-H2* activo, alelos procedentes del parental típicamente invernal Barbarrosa. Además, en el ambiente con siembra primaveral, donde *PPD-H2* correspondió a uno de los QTL detectados para peso específico *SW\_2*, fue uno de los ambientes donde más líneas con *PPD-H2* activo se encontraron en este ranking del rendimiento (ocho de diez), a pesar que, bajo las condiciones de siembra de este ensayo, las plantas no estuvieran expuestas a fotoperiodo corto. Llegados a este punto, hemos de recalcar que 36 líneas de las 185 (19,46% de ellas) portan los alelos de Nevada tanto para *PPD-H2* como para *VRN-H2*, supuesto represor del primero bajo condiciones de día largo (Casao et al, 2011a), de un total de 98 líneas (52,97% de las líneas) que portan el alelo de Nevada para *PPD-H2*, y, por tanto, sensibilidad a fotoperiodo corto. Por tanto, existen muchas más líneas de las esperadas con *PPD-H2* activo, ya que al proceder de un retrocruzamiento lo esperado sería una proporción 3:1, pero en este caso se acerca más a una proporción 1:1. Esta distorsión de la segregación podría deberse a posible deriva genética por el pequeño tamaño poblacional en el origen.



**Gráfico 35.** Rendimiento frente al número de granos por espiga en cada uno de los ensayos donde este último parámetro se midió. Mostrándose en todos los casos las líneas con y sin el alelo *denso*. El corte de las coordenadas corresponde a la media poblacional de cada uno de los caracteres.

En el caso del alelo *denso*, esto fue diferente, puesto que a pesar de sí encontrarnos líneas portadoras de éste entre las diez primeras con mayor rendimiento en alguno de los ambientes estudiados, especialmente en los dos llevados a cabo en la campaña de 2009 (tabla 24), en las diez mejores bajo el modelo AMMI no nos encontramos ninguna, aunque es innegable en vista de los resultados obtenidos para los QTL de rendimiento y sus componentes, la gran repercusión que tuvo este en la población.

Además, como hemos visto anteriormente, *denso* no repercutió negativamente en todos sus parámetros (aunque sí en el rendimiento), sino que este fue beneficioso para parámetros como número de granos por espiga o longitud de la misma (ver efectos aditivos de GS\_3 y LS\_3).

Al observar el comportamiento de las líneas en los distintos ambientes estudiados, observamos una tendencia a obtener mayores rendimientos las líneas sin el alelo *denso*, gráficos 35, 36 y 37. Pero respecto a los distintos parámetros esto es más variable.

De manera que si observamos los gráficos 35, observamos que a pesar de que existe una tendencia por parte de las líneas sin el alelo *denso* a tener mayores rendimientos totales y las líneas portadoras del alelo *denso* a obtener mayores granos por espiga, existen grandes excepciones, existiendo líneas portadoras de *denso* con altos rendimientos, especialmente en los ambientes 2009\_Spring y 2009\_Winter, pero estos altos rendimientos se encuentran penalizados por un menor número de granos por espiga.

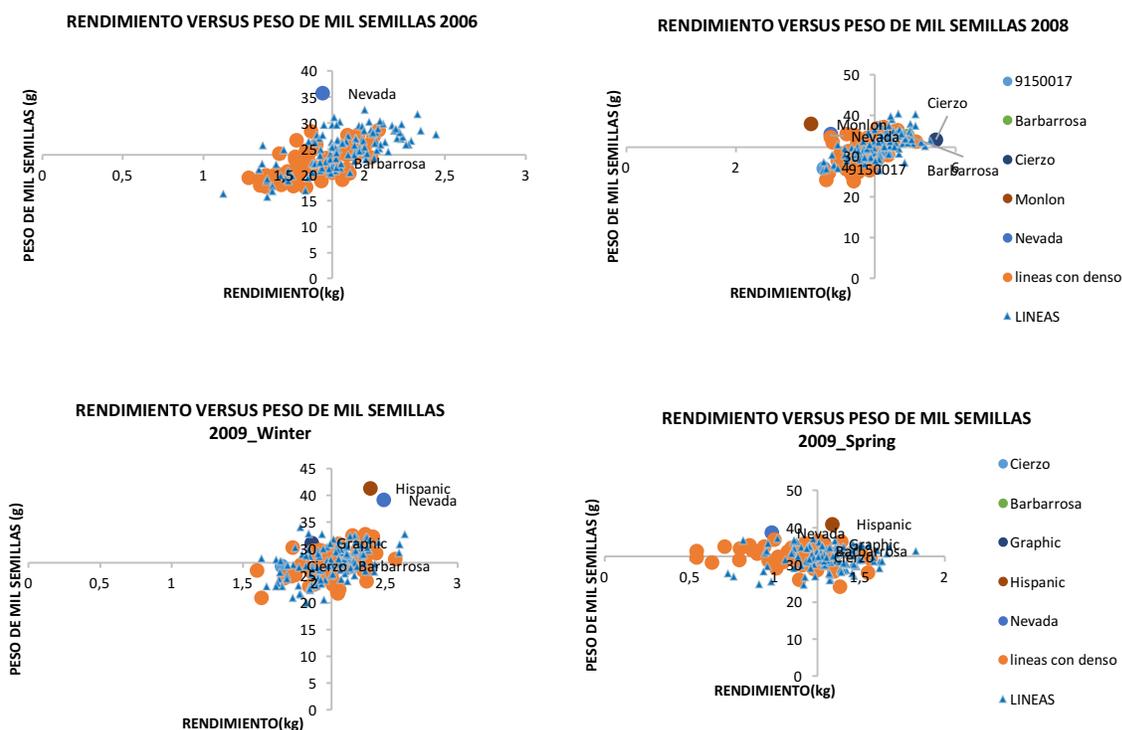
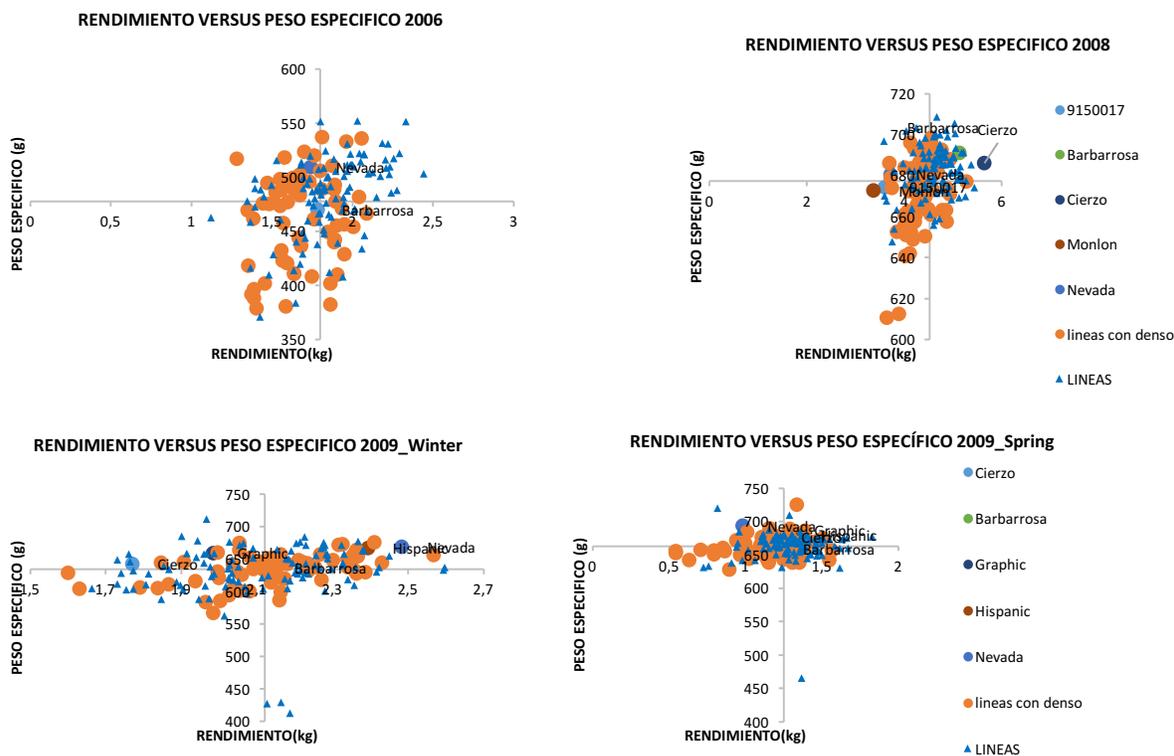


Gráfico 36. Rendimiento frente al peso de mil semillas en cada uno de los ensayos donde este último parámetro se midió. Mostrándose en todos los casos las líneas en con y sin el alelo *denso*.



**Gráfico 37.** Rendimiento frente al peso de específico en cada uno de los ensayos donde este último parámetro se midió. Mostrándose en todos los casos las líneas en con y sin el alelo *denso*.

Por el contrario, si observamos el rendimiento frente a los parámetros de llenado de grano, peso de mil semillas en los gráficos 36 y peso específico (calidad de grano) gráficos 37, observamos claramente la correlación positiva que existe entre estos parámetros con el rendimiento, observando en esta ocasión que el alelo *denso* se encuentra en líneas con altos valores para estos dos caracteres.

### 3.4.1 Selección de genotipos de alto rendimiento en función de los QTL para rendimiento obtenidos

Debido a que esta población NxBxB fue elegida para este estudio por su segregación transgresiva en altura con otros efectos además del alelo *denso*, no se utilizó este locus como criterio para realizar la selección de genotipos potencialmente de alto rendimiento. Esto se debe a que existen líneas portadoras del mismo con buenos resultados en los distintos ambientes, tanto para el rendimiento como para sus distintos componentes, y a pesar que los resultados de los QTL obtenidos demuestran que éste tiene efectos negativos en la población, tanto para rendimiento como para algunos de sus parámetros (a excepción de los que implican granos y longitud de la espiga) este podría traer consigo otros beneficios, como son la reducción de encamado.

Además, dentro de esta selección se han diferenciado también las líneas en función del alelo del gen de sensibilidad a fotoperiodo corto, *PPD-H2*, ya que, aunque sólo dos QTL de rendimiento fueron detectados en la región de este (ver tabla 22), podría ser de gran importancia en cuanto a la adaptación del cultivo en las latitudes que nos ocupan, además de encontrarse activo en muchas de las diez mejores líneas en cuanto el rendimiento para los distintos ambientes y bajo el modelo AMMI.

Por tanto, para la selección de líneas con genotipo potencialmente de alto rendimiento, se han escogido los marcadores más próximos a los QTL más estables encontrados para los distintos parámetros. Por tanto, han sido seleccionados para llenado de grano los QTL SW\_1 y TKW\_1 en 1H cuyos marcadores más próximos son bPb-5290 y bPb-6970 respectivamente, encontrándose ambos muy próximos en el mapa de ligamiento, siendo los alelos de Barbarrosa los que incrementan estos caracteres.

Para llenado de grano se han elegido también los alelos de *Eam6* procedentes de Barbarrosa, ya que en este caso se ha visto que para el rendimiento los alelos de este tienen la mayor contribución, mientras que para número de grano y para longitud de espiga son los alelos de Nevada los que aumentan esos parámetros, pero, en estos ambientes, se ha visto, que a la hora de obtener mejores rendimientos estos parámetros se correlacionan negativamente con el rendimiento (tabla 19), mientras que el llenado de grano, como son peso de mil semillas y peso específico se correlacionan positivamente con este. En esta ocasión, se ha utilizado el marcador Bmac132, como marcador más próximo de los QTL en esta región para peso específico y peso de mil semillas (SW\_2 y TKW\_2), e incluso para rendimiento (Y\_3), en vez de bPb-3677, marcador más próximo para espigado en la región de *Eam6* o bPb-5449 en este caso marcador más próximo a los QTL GS\_2 y LS\_2 y también a los QTL de las fases de pre-espigado donde se detectaron QTL en la región de *Eam6*.

También para llenado de grano se han elegido los QTL SW\_6 y TKW\_6 en 5H, cuyo marcador más próximo es bPb-2080, siendo en esta ocasión los alelos de Nevada los que incrementan este carácter.

Así mismo, bajo estos criterios de selección, nos encontramos con que todas las líneas resultantes poseen el gen de sensibilidad a fotoperiodo largo activo, siendo los alelos de *PPD-H1* procedentes de Barbarrosa para todas ellas. Sin embargo, GS\_1 y LS\_1, QTL, situado en la región de *PPD-H1*, cuyo marcador más próximo es bPb-4821, mientras que en Y\_1 para rendimiento son los de Barbarrosa los que lo incrementan, observándose también esta correlación negativa entre rendimiento y parámetros relacionados con la espiga. Por tanto, resulta beneficiosa la selección forzosa hacia alelos de Barbarrosa para *PPD-H1*/bPb-4821 en lo que se refiere a rendimiento según los resultados obtenidos para QTL de rendimiento.

Finalmente, un total de 38 líneas cumplen los requisitos descritos (20,54% del total de la población), de las cuales 13 poseen *PPD-H2* activo, con alelos procedentes del parental primaveral Nevada, y 16 del total portan el alelo *denso* (3 de ellas con *PPD-H2* activo) como muestra la tabla

	Línea	VRN-H1	VRN-H2	g/m <sup>2</sup> **	IPCA1	IPCA2	Ratio SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>	Ratio SE/J (VL)
<b>PPD-H2 ACTIVO</b>	R015* <sup>d</sup>	N	N	521,56	-0,06874	-0,18507	1,21	2,34
	R041*	B	B	572,22	0,09359	0,09086	1,30	2,01
	R061*	N	B	546,89	0,09487	-0,28637	1,32	2,76
	R072	N	B	549,56	0,0991	-0,01879	1,07	2,22
	R104 <sup>d</sup>	N	B	513,78	0,14866	-0,21082	0,87	2,62
	R120	N	B	561,33	0,17376	-0,01132	0,95	2,56
	R124	N	B	570,67	0,28876	-0,08117	1,04	2,56
	R134	B	B	558,89	-0,01718	0,0776	0,87	1,54
	R149*	N	B	573,55	0,15959	-0,07201	1,23	2,07
	R169	N	B	583,55	0,07813	0,21511	1,02	2,46
	R171 <sup>d</sup>	N	B	476,22	-0,19035	-0,43909	0,85	2,16
	R177	B	B	570,67	0,04887	0,09286	0,87	1,25
	R247	N	B	582,67	0,14289	-0,06517	1,09	2,63
	<b>PPD-H2 INACTIVO</b>	R029	N	B	580	0,00504	0,06578	0,66
R063		N	B	497,78	-0,15705	-0,20414	0,88	2,27
R064		N	B	508,89	0,16341	-0,20914	0,76	1,73
R066		N	B	620,89	0,08481	-0,22488	0,93	2,08
R068		N	B	498,22	0,04346	-0,34358	1,01	2,11
R087 <sup>d</sup>		B	B	533,33	-0,25819	-0,05464	0,52	2,14
R092		N	B	574,22	0,07197	0,04497	1,05	3,14
R106		N	B	544,22	0,09506	-0,11211	1,04	3,38
R111 <sup>d</sup>		B	B	527,78	-0,03727	0,02126	0,70	1,67
R118 <sup>d</sup>		N	B	564,44	0,04044	-0,05165	0,93	2,67
R119 <sup>d</sup>		N	B	503,11	-0,02152	-0,24988	0,89	2,26
R129		N	B	558,67	-0,07001	-0,0777	1,05	1,89
R130		N	B	566	0,33182	-0,11591	1,06	1,83
R139 <sup>d</sup>		N	N	513,56	-0,08139	-0,06256	0,95	2,76
R148		N	B	597,55	0,0574	0,03656	0,90	2,24
R157 <sup>d</sup>		N	B	560,44	0,19108	-0,15198	0,88	2,25
R160*		N	B	570	-0,00266	0,06374	1,15	1,88
R209		N	B	540,89	0,04934	-0,11697	1,05	2,81
R216		N	B	583,55	-0,16224	-0,02323	0,86	2,81
R224		N	N	575,55	0,00513	0,22816	0,78	2,25
R234		N	N	563,78	0,05599	-0,07761	0,99	2,45
R238 <sup>d</sup>		N	B	575,11	0,1183	-0,11771	1,04	2,37
R259 <sup>d</sup>		N	B	490,22	-0,09162	-0,10513	0,84	1,45
R264		N	B	584,22	0,27269	-0,01979	0,97	2,07
R268	N	B	580,44	-0,00843	-0,15849	0,94	2,46	

\*Líneas seleccionadas en función de su ratio SE<sub>VL</sub>/J<sub>VC</sub> en capítulo anterior.

<sup>d</sup> Líneas portadoras del alelo *denso* procedente de Nevada

\*\* Media del rendimiento bajo el modelo AMMI de cada línea en g/m<sup>2</sup>

**Tabla 26.** Líneas seleccionadas portadoras de los alelos de Barbarrosa respecto a Bmac132 en 2H1 y bPb-5290/bPb-6970 en 1H y con el alelo de Nevada respecto al marcador bPb-2080 en 5H. En esta tabla se muestran tanto su necesidad o no de vernalizar en función de si llevan o no los alelos de Nevada (N) o Barbarrosa (B) para los genes *VRN-H1* y *VRN-H2*. También nos muestra si estas líneas son portadoras de *denso*, así como si *PPD-H2* lo presentan activo (alelos de Nevada) o no (alelos procedentes de Barbarrosa). La tabla nos muestra también los valores medios de rendimiento de cada una de estas líneas en el modelo AMMI, así como los valores de los ejes IPCA1 e IPCA2 para cada una de ellas. Además, se muestra el valor del ratio entre el tiempo térmico de elongación del tallo principal frente al tiempo térmico hasta encañado (SE/J) obtenido por cada una de ellas tanto bajo el modelo explicado en el capítulo 3 (encañado bajo condiciones de fotoperiodo corto y elongación del tallo bajo fotoperiodo largo, ambos con tratamiento de vernalización) y este mismo bajo condiciones de fotoperiodo largo y tratamiento de vernalización.

Haciendo una comparativa de estas líneas con las líneas con mayores rendimientos, nos encontramos que, bajo el modelo AMMI, tan solo la línea 66 se encuentra en esta selección, encontrándose en el segundo puesto en el ranking de rendimiento bajo este modelo, a pesar de que la línea 148 ocupa el puesto 11, mientras que esta primera se encuentra también entre las diez mejores de los ambientes 2006, 2009\_Spring y 2009\_Winter, mientras que la línea 148 ocupa el sexto puesto

únicamente en el ambiente 2009\_Winter. De manera que, sólo cuatro de las 10 mejores en el modelo AMMI poseen los alelos de Barbarrosa para *PPD-H2*, incluyendo la línea 66, por lo que el resto poseen el gen *PPD-H2* activo, coincidiendo además todas ellas con la posesión de los alelos de Barbarrosa para *VRN-H2*, por lo que estas 6 líneas con *PPD-H2* activo poseen activo el supuesto represor del mismo, *VRN-H2* (Casao et al, 2011a).

Línea	<i>VRN_H1</i>	<i>VRNH-2</i>	Línea	<i>VRN_H1</i>	<i>VRNH-2</i>
R005 <sup>d</sup>	N	B	R151 <sup>d</sup>	N	B
R013	B	N	R172 <sup>d</sup>	N	B
R022	B	B	R180	B	B
R035	B	B	R182	B	B
R045	B	N	R193	B	B
R059	N	B	R194 <sup>d</sup>	N	N
R073	B	N	R195	N	B
R084	B	B	R210	B	N
R093d	B	B	R213	B	B
R097 <sup>d</sup>	B	B	R228	B	B
R108	B	N	R231	N	B
R121	B	B	R258	N	B
R143 <sup>d</sup>	B	N	R262	B	B

<sup>d</sup>Líneas portadoras del alelo *denso* procedente de Nevada.

**Tabla 27.** Genotipos respecto a los genes de vernalización de las líneas que poseen *PPD-H2* activo procedente de Nevada y los alelos de Barbarrosa respecto a Bmac132 en 2H1, bPb-5290/bPb-6970 en 1H y bPb-2080 en 5H. N alelos procedentes de Nevada y B alelos procedentes de Barbarrosa.

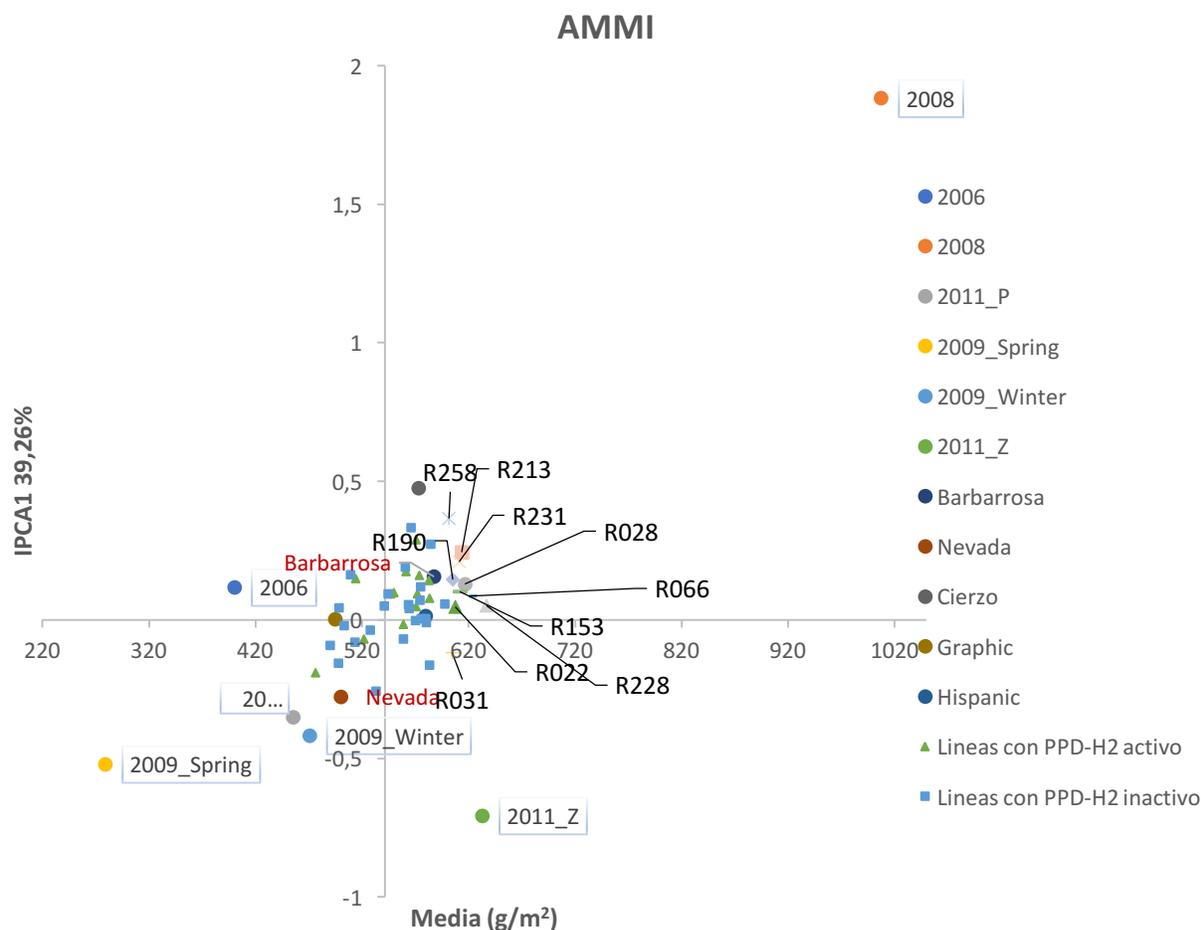
Sin embargo, si no tenemos en cuenta el marcador en 5H bPb-2080, nos encontramos que ocho de las diez líneas con mayores medias para el rendimiento en este modelo AMMI, poseen el genotipo seleccionado. Tan solo las líneas 153 y 31 difieren del criterio elegido. La primera porta los alelos de Nevada para los marcadores bPb-5290/bPb-6970 en vez de los de Barbarrosa y *PPD-H2* inactivo (alelos de Barbarrosa), mientras que la segunda porta los alelos de Nevada para todos los marcadores criterio de selección, incluidos bPb-2080 y *PPD-H2*, excepto para *PPD-H1*. Por tanto, el genotipo de las otras ocho líneas coincide con el perfil genotípico considerado de alto rendimiento sin tener en cuenta los QTL de llenado de grano SW\_6 y TKW\_6 en el grupo de ligamiento 5H, siendo precisamente este el único que tiene en común la línea 31 con el criterio elegido como genotipo de alto rendimiento.

### 3.4.2 AMMI para rendimiento de las líneas según su genotipo

Anteriormente se ha tratado sobre el modelo AMMI para rendimiento puntualizando la influencia de la covariable genética *denso* y el comportamiento de todos los genotipos teniendo en cuenta esta covariable respecto a los distintos ambientes estudiados. En esta ocasión se han introducido para el análisis tanto las líneas con mayores rendimientos bajo este modelo (tabla 25), como las líneas portadoras de los alelos favorables para rendimiento y sus parámetros de los QTL resultantes de este estudio (tabla 26).

Haciendo una comparativa de las 10 líneas con mayores medias de rendimiento (IPCA0) en el gráfico de estas frente IPCA1, lo que supone el 5% de las líneas, observamos que todas ellas poseen valores positivos para IPCA1, excepto la línea 31, la cual como hemos visto posee el genotipo más alejado respecto a los marcadores y genes analizados. Por tanto, estas líneas se encuentran en su mayoría más próximas al ambiente 2008, ambiente en el cual se obtuvieron los rendimientos más altos (ver gráfico 38), mientras que la línea 31 se encuentra más próxima de ambientes con valores IPCA1 negativos, como 2011\_Z y 2011\_P, ambientes donde esta línea se sitúa entre las diez primeras con mayores rendimientos.

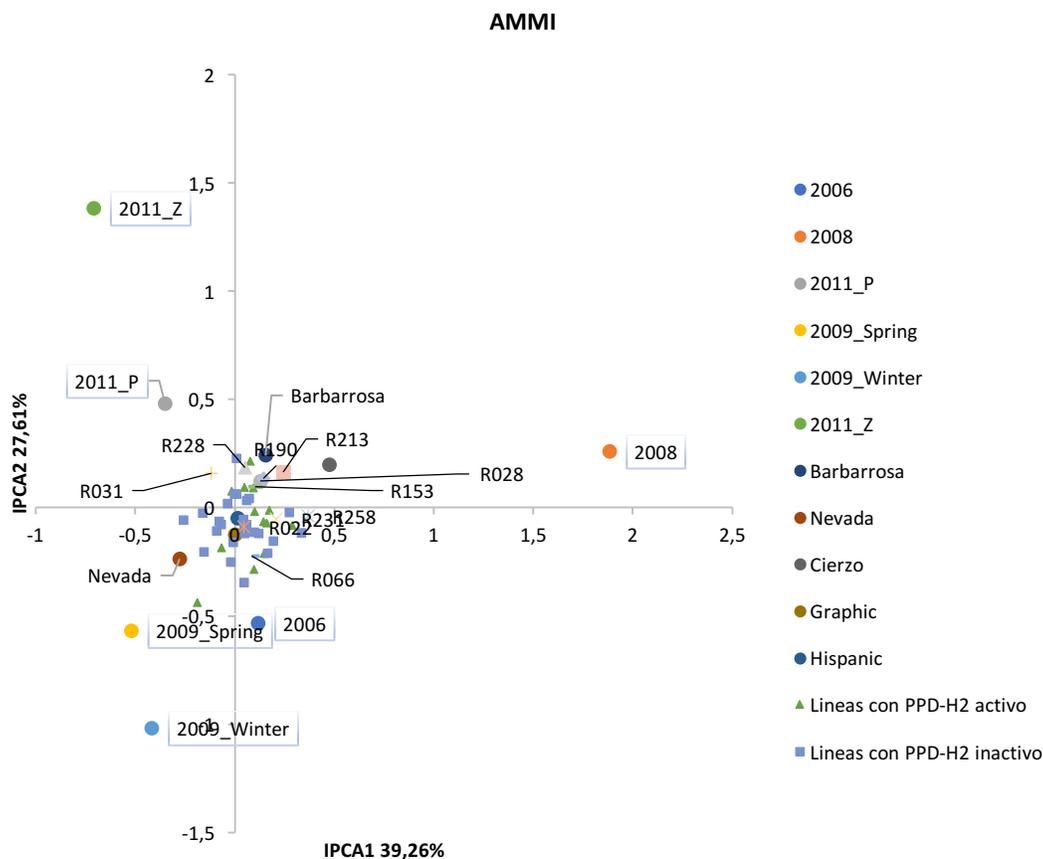
En este sentido, si observamos las líneas seleccionadas que poseen el genotipo en función de los resultados de los QTL seleccionados de alto rendimiento, observamos que las líneas con *PPD-H2* activo poseen también en su mayoría valores de IPCA1 positivos (gráfico 38). Por tanto, estas poseen un comportamiento similar en el modelo AMMI respecto a este eje, el cual explica un 39,26% de la interacción entre el genotipo y el ambiente (GxE). Tan solo tres de ellas poseen valores para IPCA1 negativos, dos de las tres líneas portadoras del alelo *denso*, 15 y 171, y la otra una de las tres líneas con genotipo invernal, con los alelos de Barbarrosa de los genes de vernalización *VRN-H1* y *VRN-H2*, la línea 134. Mientras que la tercera línea portadora del alelo *denso*, 104 junto con las otras dos, 15 y 171, es la única de este grupo en estar por debajo de la media poblacional del modelo.



**Gráfico 38.** Modelo AMMI para rendimiento mostrándose las medias del modelo (IPCA0) frente a IPCA1 para rendimiento para todos los ambientes estudiados mostrando solamente las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento, donde se muestran tanto las líneas con *PPD-H2* activo como inactivo. Se muestran también las 10 líneas con mayores medias de rendimiento en el modelo AMMI.

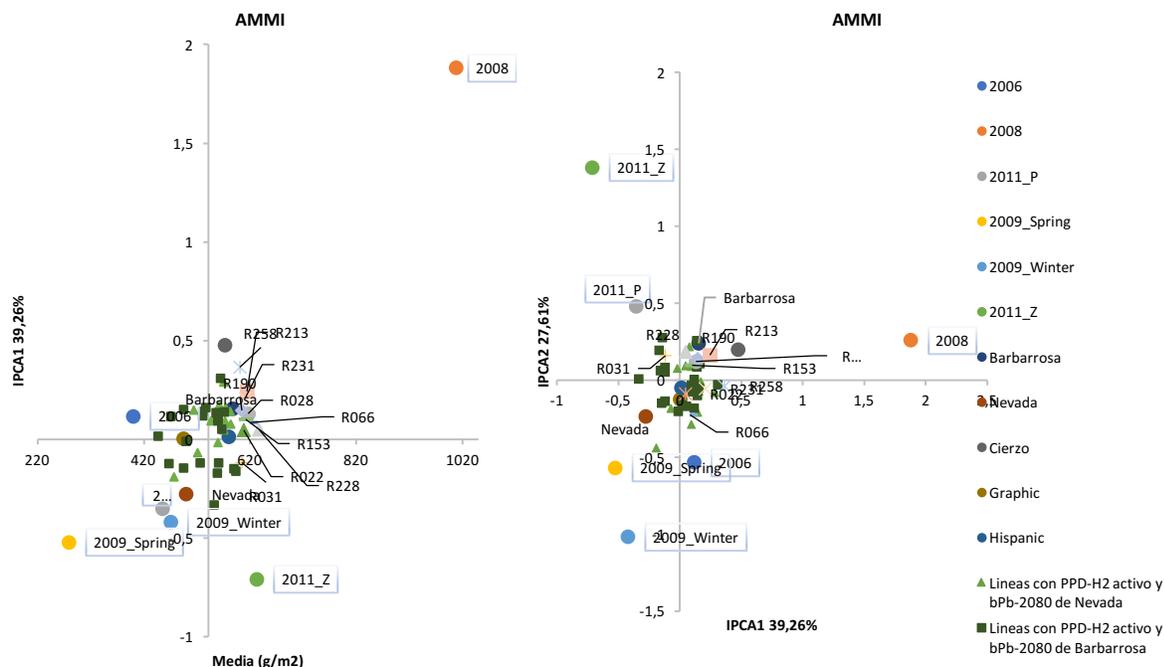
Siguiendo con las líneas invernales con *PPD-H2* activo dentro de esta selección de líneas, nos encontramos que las tres 134, 41 y 177 poseen junto con la línea 169 valores positivos para el eje IPCA2, el cual explica un 27,61% de la interacción GxE (ver gráfico 39). Por lo que todas las demás poseen valores negativos para este eje. Mientras que respecto este eje sólo cuatro de las líneas con mejores medias de rendimiento en el modelo AMMI poseen valores negativos para este eje, coincidiendo tres de ellas con las líneas que no portan ambos alelos de los genes de vernalización *VRN-H1* y *VRN-H2* de Barbarrosa, 66, 231 y 258, además de la 22, que sí lleva los alelos invernales de Barbarrosa para estos genes.

Por su parte todas las líneas que cumplen los requisitos de selección según los resultados de QTL de rendimiento que portan el alelo *denso* poseen valores negativos para IPCA2, a excepción de la línea invernal 111, que es portadora del alelo inactivo de *PPD-H2* procedente de Barbarrosa.



**Gráfico 39.** Modelo AMMI para rendimiento mostrándose IPCA1 frente a IPCA2 para todos los ambientes estudiados mostrando solamente las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento, donde se muestran tanto las líneas con *PPD-H2* activo como inactivo. Se muestran también las 10 líneas con mayores medias de rendimiento en el modelo AMMI.

En cuanto al resto de las líneas con *PPD-H2* inactivo, no se ha encontrado ninguna relación con el modelo AMMI del rendimiento (gráficos 38 y 39). Sin embargo, si observamos el comportamiento de las líneas que poseen *PPD-H2* activo y portan los alelos de Barbarrosa para *Bmac132*, *PPD-H1*, *bPb-5290/bPb-6970* y también para *bPb-2080* en 5H observamos que existe una tendencia también a obtener valores negativos respecto al eje IPCA2, excepto las líneas invernales que adquieren valores positivos para este (con tres excepciones una de ellas portadora de *denso*) al igual que las que portan el alelo de Nevada para *bPb-2080*.



**Gráfico 40.** Modelo AMMI para rendimiento mostrándose las medias del modelo (IPCA0) frente a IPCA1 e IPCA1 frente a IPCA2 para todos los ambientes estudiados mostrando solamente las líneas seleccionadas con genotipo potencialmente de alto rendimiento con *PPD-H2* activo y las líneas con *PPD-H2* activo, alelos de *Bamac132*, *PPD-H1*, *bPb-5290/bPb-6970* de Barbarrosa y también los alelos de *bPb-2080* en 5H procedentes de Barbarrosa. Se muestran también las 10 líneas con mayores medias de rendimiento en el modelo AMMI.

Mientras que respecto a IPCA1 también tienen una tendencia a obtener valores positivos, a excepción de alguna de las líneas invernales. Por tanto, el comportamiento de estas líneas bajo el modelo AMMI de rendimiento es más similar que el de las líneas seleccionadas con los alelos de *PPD-H2* de insensibilidad a fotoperiodo corto y alelos de *bPb-2080* procedentes de Nevada, obteniendo además las primeras mayores rendimientos medios en el modelo AMMI, quedando de manifiesto la relevancia del gen *PPD-H2* en esta población respecto al rendimiento, a pesar de que sólo se detectaran QTL en la región de este gen para peso específico.

### 3.4.3 Rendimiento y sus parámetros en las líneas seleccionadas según el ratio $SE_{VL}/J_{VC}$

Se ha tratado de comprobar si la hipótesis propuesta por Slafer et al (2005) es válida para la población de estudio bajo las condiciones ensayadas. Según esta hipótesis, se podría optimizar el rendimiento alargando el tiempo de elongación del tallo, potenciando de esta manera los parámetros del rendimiento, sin variar el tiempo total de espigado.

Para ello, se han tomado las líneas seleccionadas bajo el criterio de Slafer et al (2005) en el capítulo tercero de esta tesis (seleccionadas usando como criterio de selección un ratio  $SE_{VL}/J_{VC}$  superior a 1,1, por tanto, tiempos de elongación del tallo superiores a los tiempos térmicos de encañado, dividiendo estas en líneas precoces y tardías) y se ha comprobado su genotipo respecto a los marcadores seleccionados según los QTL de rendimiento explicados en el apartado anterior, así como su comportamiento bajo el modelo AMMI de rendimiento en los ambientes propuestos en este estudio.

La tabla 28 nos muestra dichos genotipos, de manera que observamos que cinco de ellas coinciden con el genotipo señalado, con tan solo una portando el alelo de Barbarrosa para *PPD-H2*, la línea 160 o tres líneas si no tenemos en cuenta el QTL en 5H para llenado de grano, la línea 1 entre las precoces y las líneas 46, 160 y 245 entre las más tardías.

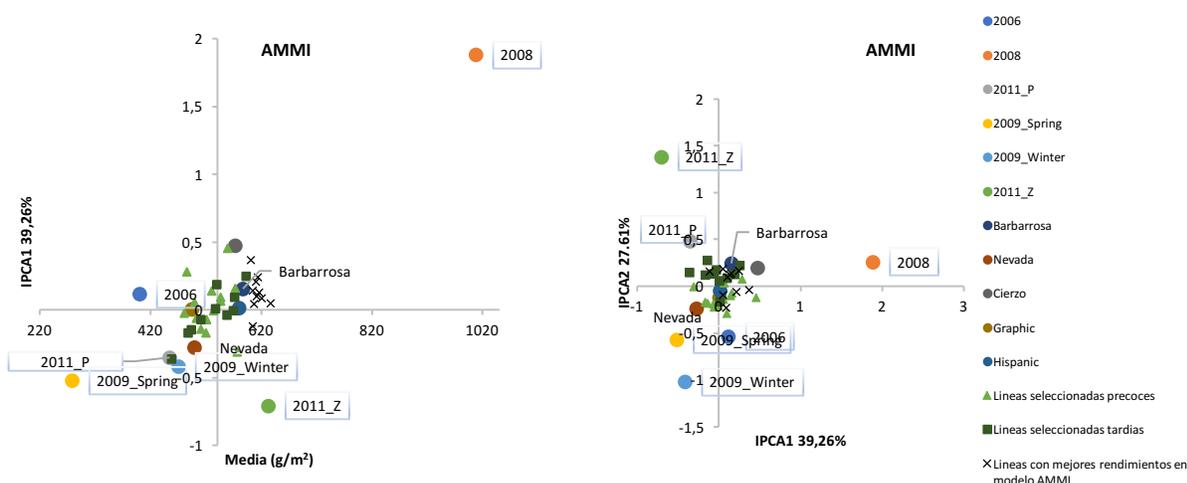
En cuanto las líneas que portan *PPD-H2* activo nos encontramos la línea 15 (portadora de *denso*), 61 y 149 dentro de las precoces y la 149, también con *denso* con alelos de Barbarrosa para bPb-2080 en 5H y tan solo la 41 y 121 entre las precoces, la segunda de ellas sólo con alelos de Barbarrosa para bPb-2080, pero ambas invernales. Destaca el hecho que las seleccionadas como precoces, recordemos, portan todas alelos de *PPD-H1* procedentes de Barbarrosa y un genotipo para *VRN-H1* primaveral, es decir los alelos de Nevada para este último, mientras que las mientras que entre las tardías nos encontramos con líneas con hábitos invernales y primaverales.

	Líneas	<i>VRN-H1</i>	<i>VRN-H2</i>	<i>PPD-H1</i>	<i>PPD-H2</i>	bPb_5290/bPb_6970	Bmac132	bPb_2080
Precoces	R015* <sup>d</sup>	N	N	B	N	B	B	N
	R014 <sup>d</sup>	N	B	B	B	B	N	N
	R053	N	B	B	N	N	B	B
	R086	N	B	B	B	N	B	B
	R107	N	N	B	N	B	N	B
	R138 <sup>d</sup>	N	B	B	N	B	N	N
	R146	N	B	B	N	N	N	N
	R147	N	B	B	N	N	B	N
	R149*	N	B	B	N	B	B	N
	R194 <sup>d</sup>	N	N	B	N	B	B	B
	R263 <sup>d</sup>	N	N	B	N	B	N	N
	R001 <sup>d</sup>	N	B	B	B	B	B	B
	R034	N	B	B	B	B	N	N
	R061*	N	B	B	N	B	B	N
Tardías	R041*	B	B	B	N	B	B	N
	R160*	N	B	B	B	B	B	N
	R010	N	N	N	N	B	N	B
	R046	N	N	B	B	B	B	B
	R050	N	N	N	B	N	N	B
	R103	N	B	B	N	B	N	N
	R121	B	B	B	N	B	B	B
	R227	B	B	N	N	N	B	B
	R245	N	N	N	B	B	B	B
	R267	B	B	B	N	B	N	B

\* Líneas seleccionadas en este capítulo como líneas con genotipo de alto rendimiento.

<sup>d</sup> Líneas portadoras del alelo *denso* procedente de Nevada.

**Tabla 28.** Tabla que muestra el genotipo respecto a los marcadores que han sido criterio de selección por ser marcadores próximos a los QTL más relevantes del rendimiento y sus parámetros en este estudio en las líneas que obtuvieron ratios entre el tiempo térmico de elongación del tallo principal y del encañado bajo el modelo encañado bajo fotoperiodo corto y elongación del tallo bajo fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización en ambos casos superior a 1,1. N referido a los alelos procedentes de Nevada y B a los alelos del parental Barbarrosa. Se muestra también su genotipo respecto a los genes de vernalización segregantes en la población *VRN-H1* y *VRN-H2* donde Nevada porta los alelos inactivos con deleciones para ambos y también su genotipo respecto a los genes de sensibilidad a fotoperiodo *PPD-H1* y *PPD-H2*.



**Gráficos 41.** Modelo AMMI para rendimiento mostrándose las medias del modelo (IPCA0) frente a IPCA1 e IPCA1 frente a IPCA2 para todos los ambientes estudiados mostrando solamente las líneas seleccionadas según su ratio SE/J bajo el modelo encañado (En) bajo fotoperiodo corto y elongación del tallo principal (ET) bajo fotoperiodo largo con tratamiento de vernalización en ambos casos superior a 1,1. Se muestran también las 10 líneas con mayores medias de rendimiento en el modelo AMMI.

Posición	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>
1	R228 <sup>ai</sup>	1,07	0,74
2	R066	2,08	0,93
3	R028 <sup>i</sup>	1,46	0,88
4	R213 <sup>ai</sup>	1,39	0,63
5	R153 <sup>i</sup>	1,52	0,56
6	R231 <sup>*</sup>	1,12	0,86
7	R022 <sup>ai</sup>	1,29	0,83
8	R190 <sup>i</sup>	1,55	0,73
9	R031 <sup>*</sup>	2,29	0,86
10	R258 <sup>*</sup>	2,62	1,00

<sup>a</sup> Líneas portadoras del alelo *denso*, procedente de Nevada.

<sup>\*</sup> Líneas con *PPD-H2* activo. Alelo procedente de Nevada.

<sup>i</sup> Genes de vernalización sin delecciones. Alelos procedentes de Barbarrosa tanto para *VRN-H1* como para *VRN-H2*.

**Tabla 29.** Valores de los ratios obtenidos entre el tiempo térmico de elongación del tallo principal y de encañado bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo largo y en el modelo de tiempo térmico de encañado bajo tratamiento de vernalización y fotoperiodo corto y elongación del tallo con tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo para las diez líneas que obtuvieron mejores rendimientos medios y el modelo AMMI para rendimiento.

Sin embargo, ninguna coincide con los más altos rendimientos bajo el modelo AMMI (gráficos 41), aunque sí encontramos que frente a IPCA2 (27,61% de explicación de la interacción GxE) las líneas tardías tienden a poseer valores positivos, por tanto con interacciones positivas hacia los ambientes 2008, 2011\_P y 2011\_Z, a excepción de la línea 66, única coincidente en genotipo con los QTL de alto rendimiento escogidos para el análisis de las líneas, que posee valores negativos para este eje junto otras tres de las líneas con más alto rendimiento en el modelo, líneas 22, 231 y 258. Si observamos los valores del ratio SE/J de estas cuatro líneas (incluyendo la línea 66), observamos que son las que poseen valores más altos para esto entre las 10 mejores bajo el modelo AMMI (ver tabla 29), e incluso bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo (simulando las condiciones de siembra primaveral en

nuestras latitudes), aunque en este caso destaca también la línea 31, línea que más difiere del genotipo buscado, y con más altos rendimientos en los ambientes de 2011\_P y 2011\_Z (tabla 24), caracterizados con una mayor pluviosidad invernal.

Posición	2006			2008			2009_Winter		
	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>
1	R022* <sup>i</sup>	1,29	0,83	R258*	2,62	1,00	R268	2,46	0,94
2	R231*	1,12	0,86	R053*	2,60	1,17	R066	2,08	0,93
3	R130	1,83	1,06	R213* <sup>i</sup>	1,39	0,63	R118 <sup>d</sup>	2,67	0,93
4	R146*	1,90	1,18	R132 <sup>d</sup>	2,13	0,75	R128 <sup>i</sup>	1,44	0,76
5	R149*	2,07	1,23	R124*	2,56	1,04	R181* <sup>i</sup>	1,62	0,91
6	R206* <sup>i</sup>	1,30	0,71	R105 <sup>i</sup>	1,60	0,74	R148	2,24	0,90
7	R066	2,08	0,93	R091*	2,41	0,99	R194* <sup>d</sup>	2,96	1,16
8	R036*	2,41	1,01	R028 <sup>i</sup>	1,46	0,88	R092 <sup>d</sup>	3,14	1,05
9	R024*	2,27	0,76	R231*	1,12	0,86	R106 <sup>d</sup>	3,38	1,04
10	R091*	2,41	0,99	R264	2,07	0,97	R160	1,88	1,15
Posición	2009_spring			2011_P			2011_Z		
	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>	Línea	SE/J (VL)	SE <sub>VL</sub> /J <sub>VC</sub>
1	R066	2,08	0,93	R228* <sup>i</sup>	1,07	0,74	R069 <sup>id</sup>	1,36	0,60
2	R024*	2,27	0,76	R031*	2,29	0,86	R131 <sup>i</sup>	1,40	0,74
3	R022* <sup>i</sup>	1,29	0,83	R105 <sup>i</sup>	1,60	0,74	R028 <sup>i</sup>	1,46	0,88
4	R198*	1,62	0,82	R248	1,40	0,57	R251 <sup>i</sup>	2,23	0,71
5	R132 <sup>d</sup>	2,13	0,75	R153 <sup>i</sup>	1,52	0,56	R031*	2,29	0,86
6	R216	2,81	0,86	R135 <sup>i</sup>	1,53	0,68	R121* <sup>i</sup>	1,50	1,19
7	R261* <sup>d</sup>	0,99	0,54	R120*	2,56	0,95	R224	2,25	0,78
8	R184* <sup>d</sup>	2,09	0,69	R251 <sup>i</sup>	2,23	0,71	R228* <sup>i</sup>	1,07	0,74
9	R149*	2,07	1,23	R190 <sup>i</sup>	1,55	0,73	R178	1,67	0,70
10	R169*	2,46	1,02	R128 <sup>i</sup>	1,44	0,76	R010*	1,45	1,15

<sup>d</sup> Líneas portadoras del alelo *denso*, procedente de Nevada.

\* Líneas con *PPD-H2* activo. Alelo procedente de Nevada.

<sup>i</sup> Genes de vernalización sin deleciones. Los alelos procedentes de Barbarrosa tanto para *VRN-H1* como para *VRN-H2*.

**Tabla 30.** Valores de los ratios obtenidos entre el tiempo térmico de elongación del tallo principal y de encañado bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo largo y en el modelo de tiempo térmico de encañado bajo tratamiento de vernalización y fotoperiodo corto y elongación del tallo con tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo para las diez líneas que obtuvieron mejores rendimientos en cada uno de los ambientes estudiados.

Por su parte como observamos en la tabla 30, varias líneas de las seleccionadas en función de su ratio se encuentran entre las líneas con mejores rendimientos en los distintos ambientes, destacando la línea 149, portadora de los alelos de los QTL de alto rendimiento con *PPD-H2* activo, la cual está entre las 10 mejores de los ambientes más extremos en cuanto a sequía terminal se refiere como fueron los ambientes 2006 y 2009\_Spring (tablas 24 y 30), y además esta, es la primera que nos encontramos en lo que a rendimiento nos referimos en el ranking de rendimiento en el modelo AMMI, ocupando el puesto treinta y ocho.

Finalmente, hemos de hacer una consideración sobre este ratio en el modelo propuesto, ya que como observamos en la tabla 31, no se han encontrado correlaciones directas de este con el rendimiento, pero si con alguno de los parámetros del rendimiento, encontrándonos con correlaciones positivas respecto a parámetros de llenado de grano, peso específico y peso de mil semillas, y también con la longitud de la espiga, pero negativas respecto al número de granos por espiga y granos por metro cuadrado. Sin embargo, no se han encontrado correlaciones con los parámetros estudiados y el ratio entre tiempo de elongación del tallo principal y el de encañado de las plantas bajo condiciones que simulan las condiciones de siembra primaveral bajo latitudes mediterráneas (tabla 31), pero si para peso específico de las medias del mismo en el modelo AMMI en los cuatro ambientes combinando tratamientos de vernalización y longitud de fotoperiodo.

	SE <sub>vu</sub> /J <sub>vc</sub>	SE/J (VL)	SE/J (AMMI)
<b>Rendimiento</b>	-0,0294 0,6869*	-0,0908 0,213*	-0,122 0,0936*
<b>Peso específico</b>	0,2571 <0,001	0,1411 0,0522*	0,2235 0,0019
<b>Peso de mil semillas</b>	0,2149 0,0029	0,1044 0,1516*	0,1209 0,0967*
<b>Granos/m2</b>	-0,1888 0,0091	-0,0433 0,553*	-0,0896 0,2188*
<b>Granos/Espiga</b>	-0,1511 <0,001	0,1 0,2036*	0,0619 0,3962*
<b>Longitud espiga</b>	0,2652 <0,001	0,0926 0,2036*	0,1954 0,0069

\* Grado de significación superior a 0,05.

**Tabla 31.** Tabla que muestra las correlaciones del ratio entre el tiempo térmico de elongación del tallo principal y el encañado tanto en el modelo donde se utilizaron los tiempo térmicos de elongación del tallo en condiciones de fotoperiodo largo y los de encañado bajo fotoperiodo corto con tratamientos de vernalización, este en condiciones de vernalización y fotoperiodo largo y bajo el modelo AMMI en los cuatro ensayos combinando fotoperiodo y vernalización frente a la media en los modelos AMMI del rendimiento y de los parámetros de este. El valor superior muestra el valor de la correlación de Pearson obtenida y el inferior su grado de significación.

#### 4. Discusión

Las condiciones habituales de las siembras de campo de la cebada en Castilla y León son mayoritariamente siembras de otoño, en las que la siembra de la cebada se inicia a partir de Santa Teresa (15 de octubre) en las zonas más frías y en el mes de noviembre en las más cálidas hasta mediados de diciembre. En este tipo de siembra las condiciones ambientales producen una completa saturación de la respuesta a vernalización. Los fotoperiodos inicialmente son decrecientes hasta el solsticio de invierno y progresivamente crecientes a medida que progresa el invierno.

Cuando los agricultores, por diversos motivos, no pueden sembrar en las fechas anteriormente citadas, en un pequeño porcentaje de superficie se siembra cebada, habitualmente entre mediados de enero y finales de febrero. En este tipo de siembra, los agricultores no utilizan variedades de invierno, sino que se decantan por variedades de primavera, que no tienen requerimientos de vernalización. En Castilla y León, por la experiencia acumulada de años de siembras de todo tipo de respuesta en primavera, podemos mencionar que las variedades de invierno acumulan suficiente frío para florecer, siempre que no se supere las fechas de finales de febrero.

Cuando se supera esta fecha, las variedades con mayores requerimientos de vernalización pueden no llegar a florecer antes del verano, manteniéndose en estado vegetativo. En este tipo de siembras, aunque lleguen a florecer, esta no se produce sin un cierto retraso, lo que observamos al detectarse los QTL de floración en el gen de vernalización *VRN-H1* bajo siembra primaveral (2009\_spring). Además, bajo estas circunstancias, los efectos detectados en los genes *denso* (Jia et al, 2009) y *Eam6* (Cuesta-Marcos et al, 2008a) se conservan.

Los ambientes de este estudio fueron altamente representativos de las condiciones mediterráneas, donde el final del ciclo del cultivo se caracteriza por un fuerte déficit hídrico (Cuesta-Marcos 2008<sup>a</sup>) por lo que la necesidad de que la cosecha se adelante para conseguir adaptar la fase de llenado de grano a la disponibilidad de agua por parte del cultivo es crucial. En este sentido, cinco de los seis ambientes incluidos en este estudio tuvieron una sequía terminal extrema, mientras que el ambiente 2008, a pesar de llevarse a cabo en la misma localidad que la mayoría de ellos, se caracterizó por todo lo contrario. Por tanto, en este ambiente se pueden contrastar los efectos de los distintos QTL detectados frente al resto donde la sequía terminal fue extrema. Dentro de los ensayos con estrés hídrico hubo variabilidad en cuanto al momento e intensidad de este., ya que, por ejemplo, los ambientes 2011\_P y 2011\_Z, realizados en la misma campaña pero distintas localidades, tuvieron mayor disponibilidad de agua durante los primeros meses del ciclo, viendo respuestas parecidas en los modelos AMMI de algunos de los parámetros del rendimiento definidos en ese periodo. Mientras que 2006 se caracterizó por una fuerte sequía en toda la campaña. Se distingue también claramente el ambiente 2009\_spring el cual se llevó a cabo bajo siembra primaveral, y consecuentemente bajo condiciones de fotoperiodo más largo, condujo a una reducción de la duración del ciclo.

#### 4.1 La complejidad del control genético del rendimiento y su interacción con el ambiente

El rendimiento es un carácter poligénico afectado por muchos genes y que a su vez estos están fuertemente influenciados por el ambiente, de manera que, bajo el efecto de diferentes factores agroclimáticos una misma línea o variedad puede variar enormemente su rendimiento (García del Moral et al, 2002; Voltas et al. 2002; Slafer, 2003). Por este motivo, en cuanto al rendimiento, no se encontró ningún QTL que explicara un elevado porcentaje de explicación de la varianza genética y a su vez se repitiera en todos los ensayos. Ambas variedades, a pesar de ser genéticamente muy diferentes, han sido utilizadas comercialmente en Castilla y León, y presentan un adecuado nivel de adaptación a nuestras condiciones de cultivo. En este sentido, debemos destacar que en los análisis de varianza multiambientales, los propios ambientes son los que mayor porcentaje de explicación de la varianza poseen (89,51%), dejando en segundo plano tanto el factor genotípico (2,52%) como a la interacción GxE, la cual tuvo ligeramente mayor porcentaje de explicación de la varianza del modelo en los ambientes estudiados (3,87%), sin olvidarnos que el propio azar tuvo una representación similar a este mismo y ligeramente superior al factor genético (3,77%).

A pesar de ello, distintos QTL se han detectado para el rendimiento, destacando los QTL detectados en la región de *denso*, el gen de vernalización *VRN-H1* y de precocidad per sé *Eam6*, aunque otros QTL menores fueron también detectados como trataremos a continuación.

El alelo *denso* corresponde a mutaciones en uno de los genes *GA-20 oxidasa*, *Hv20ox2* (Jia et al, 2009), y causa, además de semienanismo, enormes cambios pleiotrópicos en el cultivo (Franckowiak y Lundqvist, 2012; Saville et al, 2012). Tuvo los mayores efectos en el rendimiento y otros parámetros incluidos en este estudio. La presencia de éste en la población llegó a causar diferencias de hasta 35 g/m<sup>2</sup> en el ambiente 2008, donde por las condiciones agroambientales se obtuvieron los mayores rendimientos del estudio, en donde Barbarrosa obtuvo rendimientos de 1117 g/m<sup>2</sup> mientras que Nevada, parental portador del alelo *denso*, sus rendimientos no llegaron a los 900 g/m<sup>2</sup>. Mientras que en el resto de ambientes sus efectos fueron variados, aunque éste siempre en detrimento del rendimiento e incluso, llegando a no ser significativo en uno de los ambientes.

El siguiente mayor QTL de rendimiento correspondió al gen de vernalización *VRN-H1*, *Y\_7*, el cual también fue detectado en todos los ambientes a excepción de 2011\_P, existiendo una fuerte interacción de este QTL con los ambientes estudiados. Curiosamente, debemos destacar, que los mayores efectos de este corresponden precisamente al otro ensayo realizado en esta campaña, 2011\_Z, donde *VRN-H1* no fue significativo para floración. Bajo estas circunstancias los alelos invernales para este gen procedentes de Barbarrosa, que confieren a las plantas la necesidad de vernalizar, fueron los que produjeron diferencias de hasta 20 g/m<sup>2</sup> (la presencia o no del alelo *denso* causaba diferencias de unos 25 g/m<sup>2</sup> en este mismo ambiente), cuando en este ambiente los rendimientos oscilaron entre 487,5 g/m<sup>2</sup> y 743,8 g/m<sup>2</sup>, mientras que para el resto de los ambientes fueron los alelos procedentes de Nevada los que provocaron un incremento en el rendimiento de entre unos 4 y 8 g/m<sup>2</sup>, por tanto diferencias muy inferiores a las observadas por parte de los alelos de Barbarrosa en 2011\_Z. En los ambientes donde los alelos de Nevada aportaron un incremento en el rendimiento, fueron los alelos de

Barbarrosa para *VRN-H1* los que provocaron un retraso en la fecha de espigado. Por tanto, en esta ocasión los efectos provocados por *VRN-H1* en rendimiento, podrían ser debidos a otros parámetros no medidos en la población como son el número de hijuelos, de manera que habría que profundizar en ello abarcando más parámetros para realmente ver los efectos de *VRN-H1*.

Además, hemos de tener en cuenta también dos cosas: la primera de ellas, la proximidad de este a uno de los dos genes de tolerancia a frío *Fr-H1* (Akar et al, 2009; Rizza et al, 2011) y, segundo, la diversidad alélica dentro de los alelos invernales para *VRN-H1*. En cuanto a esto último, se han descrito diversos alelos de *VRN-H1* (Hemming et al, 2009), de manera que se ve modificado el grado de frío necesario para cubrir las necesidades de vernalización en función del alelo que porten, correspondiendo estos a los distintos grados de delección del intrón 1 de dicho gen. En este sentido, bajo condiciones mediterráneas los alelos que mejor responden a estas condiciones corresponden a los alelos 4 y 6 (Igartua et al, 2010; Casao et al, 2011c) mientras que los parentales de esta población portan los alelos 1 (intrón 1 completo de este gen) por parte de Barbarrosa y el alelo 2 primaveral por parte de Nevada (delección completa de este intrón). Por lo que según la bibliografía los alelos que segregan en la población no son los más adecuados para nuestras condiciones.

El siguiente QTL más significativo para rendimiento corresponde al detectado en las inmediaciones de *Eam6* (gen candidato *HvCEN*, Comadrán et al, 2012). En este caso los alelos de Barbarrosa son los que provocan un mayor rendimiento en tres de los ambientes estudiados como vemos en los efectos de Y\_3, desplazada la máxima probabilidad al marcador Bmac132, el cual Cuesta-Marcos et al (2008a) propuso como marcador diagnóstico para *Eam6* en la población Beka x Mogador, donde también se encontró este QTL para *Eam6*, tanto para rendimiento como para espigado. Igualmente que en lo descrito por estos autores, este QTL para rendimiento se detectaba también para espigado, provocando los alelos del parental que causaba mayores rendimientos, una precocidad en la fecha de espigado bajo condiciones mediterráneas, como es el caso que nos ocupa. Aunque en este caso en el ambiente 2008, en el que menor sequía terminal se registró, donde causó diferencias de rendimiento mayores, siendo el segundo QTL en importancia detectado. Además, este se vio involucrado en múltiples interacciones con otros QTL, especialmente con el alelo *denso*.

Para rendimiento, otros QTL menores se detectaron en posiciones diferentes de los principales genes de floración estudiados, destacando Y\_2 en 2H1, significativo en tres de los ambientes estudiados, e Y\_4 en 3H, significativo en todos los ambientes excepto en 2008, ya que estos, independientemente del ambiente, tuvieron los mismos efectos en cuanto al rendimiento en todos los ensayos donde fueron detectados, resultando no significativa la interacción de estos con el ambiente. Además, en regiones próximas a este QTL Cuesta-Marcos et al (2009) encontró QTL en una región similar a Y\_4 (en grupo 3H) para granos por metro cuadrado y longitud de la espiga, al igual que von Korff et al (2006), quienes encontraron QTL en esta misma región para peso de las semillas.

También debemos destacar el QTL detectado en 1H, tercero en importancia para el ambiente 2008, provocando los alelos de Barbarrosa un incremento de 22,17 g/m<sup>2</sup>, cuando el QTL en *Eam6* provocaba diferencias en rendimiento de 28,86 g/m<sup>2</sup>. De este QTL, Y\_1, trataremos más adelante.

El mayor determinante de la variación en altura de esta población es, sin duda alguna, la presencia o no del alelo *denso*, ya que al causar un desarreglo tan grande en la síntesis de las giberelinas (Jia et al, 2009), fitohormona responsable del elongamiento del tallo, la presencia de este causa un cambio morfológico enorme en las plantas que lo portan, de manera que la población de estudio se encuentra dividida en dos subpoblaciones respecto a la altura: plantas que portan el alelo *denso* y plantas que no lo portan. Además, existe segregación en altura dentro de estas dos subpoblaciones como observamos en las gráficas de las frecuencias de altura (gráficos 17) e incluso en el modelo AMMI (gráficos 29) para este carácter, pero los posibles QTL para este carácter quedan enmascarados por el enorme efecto del alelo *denso*, llegando a causar diferencias de entre 4 y cerca de 12 centímetros en la población NxBxB. En este sentido, tan solo otros tres QTL para altura fueron detectados en alguno de los ambientes, estando todos ellos relacionados con genes de floración. Destaca el ambiente 2009\_winter en donde sólo *denso* fue significativo para altura.

En cuanto a los parámetros de rendimiento, no se encontró ningún QTL que explicara un elevado porcentaje de explicación de la varianza genética, aunque si fueron detectados QTL estables en todos los ambientes estudiados, a pesar de que, en muchos de los casos, el alelo *denso* produjo las mayores diferencias en cuanto a estos parámetros, enmascarando la detección de otros QTL en la población de estudio.

Estos componentes del rendimiento se determinan secuencialmente a lo largo del desarrollo de la planta, bien durante el período previo a la antesis (número de espigas y número de granos por espiga) o entre la antesis y la madurez (tamaño de los granos). El hecho de que los componentes de rendimiento se determinen secuencialmente a lo largo del desarrollo, proporciona en los cereales la capacidad de compensar efectos adversos logrando equilibrar la cosecha bajo una gran diversidad de ambientes y circunstancias. Aunque ésta es una de las razones que explican la elección de los cereales como cultivos desde tiempo muy antiguo, también condiciona la aparición de mecanismos de compensación de forma que un componente del rendimiento tiende a estar negativamente correlacionado con los que se desarrollan posteriormente. (García del Moral y Ramos, 1989). Esto queda reflejado en la tabla 19 donde observamos las correlaciones entre los distintos parámetros.

La estabilidad del tamaño de grano se debe a que tiene una fuerte componente genética, ya que el número de células que pasarán a formar el grano está determinado genéticamente, mientras que el llenado final del grano, más relacionado con el peso específico, depende de la disponibilidad de fotosintatos. Esta estabilidad es atribuida a la movilización de asimilados desde las reservas de carbohidratos almacenadas en el tallo y otros órganos vegetativos, las cuales pueden compensar la disminución en la capacidad de fotosíntesis durante el llenado de grano, fenómeno nada infrecuente en áreas secas. (García del Moral y Ramos, 1989).

De manera que, al observar el análisis de varianza para los parámetros estudiados que tienen que ver con el llenado de grano: peso de mil semillas y peso específico, nos encontramos con que el peso de mil semillas es el parámetro para el cual los genotipos tienen un mayor porcentaje de explicación de la varianza de todos los estudiados, un 66,91% (tabla 21), mientras que para el peso específico este porcentaje fue mucho menor, siendo mucho mayor para número de granos por espiga o longitud de la espiga. A pesar de ello hemos observado que el control genético es muy similar en el sentido de que los principales QTL que controlan estos dos caracteres son los mismos como vemos en el gráfico comparativo de los QTL detectados para ambos (figura 16 y tabla 22).

El peso de mil semillas es el carácter que presenta la mayor heredabilidad, la mayor en este estudio (tabla 22), de los que habitualmente se consideran como componentes principales del rendimiento: número de espigas/granos por metro cuadrado, número de granos por espiga y peso de mil semillas.

Han sido detectados dos QTL para el tamaño de grano, que, aunque no eran los mayores determinantes de estos caracteres, aparecían en todos o prácticamente todos los ambientes donde estos parámetros pudieron ser analizados.

El primero de ellos, está situado en el grupo de ligamiento 1H, siendo detectado tanto para peso específico (SW\_1) y peso de mil semillas (TKW\_1), como para granos por metro cuadrado (Gm\_1) (marcadores más próximos: bPb-6970 y bPb-5290). En este caso los alelos de Barbarrosa confieren un tamaño mayor de grano, pero son los alelos de Nevada los que confieren un mayor número de granos por metro cuadrado. Esto es sorprendente cuando Barbarrosa es una de las variedades que ha sido comercializada en España con grano más pequeño, quizá heredado del parental Ager. Además, para rendimiento se detectó también un QTL en 1H, Y\_1, el cual, aunque no fue detectado en todos los ambientes del estudio, al observar el gráfico comparativo entre QTL de rendimiento con los parámetros que estamos tratando (figura 16), vemos en el gráfico superior que, para rendimiento, la forma del gráfico posee un segundo pico de manera que este solapa con TKW\_1 y SW\_1, siendo los alelos de Barbarrosa también en este caso los que son favorables para el rendimiento. Esto podría ser debido a la baja saturación del mapa genético utilizado, el cual nos lleva a intervalos de confianza muy amplios o escasamente definidos traduciéndose en este tipo de problemas, pero a pesar de todo, como hemos visto, en la mayoría de los casos se ha podido solventar, detectándose QTL para rendimiento y sus parámetros potencialmente robustos. Volviendo a centrarnos en Y\_1, en los ambientes donde este no fue significativo, las condiciones de sequía terminal fueron muy fuertes, especialmente en 2006 y 2009\_spring. Por tanto, este QTL cuyos alelos procedentes de Barbarrosa incrementan el rendimiento fue significativo especialmente bajo condiciones favorables, a pesar que los QTL para peso de mil semillas y peso específico se detectaran QTL significativos en 1H en todos los ambientes.

Otro componente respecto a estos QTL detectados en 1H que tenemos que tener en cuenta, es que al ser utilizados como covariables genéticas bajo los modelos AMMI según el alelo que portan de los marcadores más significativos para estos (bPb-6970 y bPb-5290), observamos que respecto IPCAO, la media respecto a los modelos, tanto para peso de mil semillas como para número de granos por metro cuadrado, nos encontramos una tendencia general en la que las líneas portadoras de los alelos de

Barbarrosa para estos marcadores tienden a situarse por encima de la media poblacional del modelo para peso de mil semillas (gráfico inferior izquierdo 27) y por debajo de este respecto al número de granos por metro cuadrado (gráfico inferior izquierdo 27). Este hecho valida la importancia de estos QTL a nivel de los distintos componentes que definen el rendimiento, aunque este efecto no se detectó para rendimiento ya que este posee una mayor complejidad. Por tanto, basándonos en este QTL se podrían diseñar variedades en función de lo que se pretenda mejorar. De manera que si lo que se pretende mejorar es el número de granos por metro cuadrado optaríamos por los alelos procedentes de Nevada. Mientras que si lo que se pretende incrementar es el peso de mil semilla o peso específico, parámetros relacionados con la calidad del grano, deberíamos optar por los alelos de Barbarrosa, los cuales a su vez bajo las condiciones de estudio incrementaron el rendimiento bajo las condiciones especialmente más favorables.

Hemos de añadir que QTL en esta misma región han sido descritos por otros autores para diversos parámetros del rendimiento. Tales como los QTL en 1H encontrados por Li et al (2005) y por von Korff et al (2006) para incremento de biomasa y rendimiento en grano. Estos QTL fueron encontrados en las inmediaciones del marcador HvALAAT, el cual en el mapa NxByB de la población del presente estudio está situado en la posición 69,2cM del grupo 1H, abarcando este los intervalos de confianza de los QTL para rendimiento, peso de mil semillas y granos por metro cuadrado, aunque no para peso específico.

Para peso específico además este QTL, SW\_1, se vio implicado en distintas interacciones con otros QTL, uno en la región de *denso*, SW\_4, y con SW\_2 en la región de *PPD-H2*, en el ambiente donde mejores condiciones se dieron para el llenado de grano, 2008, potenciándose los efectos de estos QTL. En cambio, los QTL en 1H del resto de parámetros donde fue significativo, no se vieron implicados en interacciones con otros QTL con grandes efectos, aunque si se detectó una interacción para granos por metro cuadrado entre Gm\_1 y Gm\_2, abarcando este segundo la región donde se encuentra *denso*, en uno de los ambientes (tabla 22 y figura 12).

En cuanto al segundo QTL detectado para el llenado de grano, este se sitúa en el grupo de ligamiento 5H, siendo el marcador más próximo bPb-2080. En esta ocasión, para peso específico (SW\_6) no fue significativo en 2008, ambiente que, como ya hemos mencionado, más favorable para el llenado de grano. En esta ocasión, al contrario que los QTL detectados en 1H, los alelos de Nevada fueron los que incrementaron tanto peso de mil semillas como peso específico. Sin embargo, al igual que en el caso anterior este fue significativo para el número de granos por metro cuadrado (Gm\_5) siendo los alelos de Barbarrosa los que aumentan este parámetro en dos de los ambientes donde resultó significativo y los de Nevada los que aumentan este carácter bajo siembra primaveral, existiendo un fuerte componente GxE en función de la fecha de siembra.

En una región próxima ha sido descrito el otro gen de resistencia a frío, *Fr-H2* (Francia et al, 2007; Knox et al, 2010; Pasquariello et al, 2014). Por tanto, no es de extrañar que este QTL corresponda a este gen, de manera que se podría llegar a hacer una selección genómica de esta población con resistencia a frío ligada a este gen en vez de a *Fr-H1* el cual está altamente ligado a *VRN-H1* (Akar et al,

2009), de manera que, como es de esperar, las líneas con necesidad de vernalizar portan los alelos de resistencia a frío de *Fr-H1*.

Para rendimiento no fue detectado este QTL, pero si observamos el gráfico comparativo entre estos parámetros y rendimiento respecto a  $-\log_{10}(p)$  (figura 16 superior), observamos que en 5H el QTL correspondiente a Y\_7, situado en la región de *VRN-H1*, abarca hasta su umbral de detección la región donde se encuentran TKW\_6, SW\_6 y Gm\_5, encontrándonos con un doble pico en Y\_7 el cual coincide con los QTL nombrados anteriormente. Además, en una región próxima a esta Pillen et al (2003 y 2004) describió un QTL para peso de mil semillas, mientras que von Korff et al (2006) encontraron QTL para peso de mil semillas y peso específico en esta misma región.

Finalmente, el número de granos por espiga y longitud de la espiga quedan determinados por los QTL detectados en el grupo 2H1 en la región del gen *Eam6* en todos los ambientes, de manera que la mayor o menor precocidad una vez inducida la floración determina la formación de más o menos espiguillas, y por tanto del número de granos, demostrando que este gen actúa una vez inducida la floración, ya que si nos fijamos en parámetro granos por metro cuadrado, observamos que en esta ocasión ningún QTL fue significativo en la región. Destaca que en este caso el hecho de que *denso* tuvo menor importancia en comparación con los QTL en la región de *Eam6*, LS\_2 y GS\_2, en el sentido que estos últimos además de ser detectados en todos los ambientes en los que estos caracteres fueron cuantificados, tuvieron mayor grado de significación que GS\_3 y LS\_3, en la región de *denso*.

Estos parámetros tienen también un alto porcentaje de la varianza en lo que respecta al factor genotípico (tabla 21), pero, no obstante, observamos una escasa correlación entre el número de granos por espiga y el rendimiento (tabla 19). Sin embargo, estas correlaciones son negativas respecto a la longitud de la espiga, encontrándonos que el control genético de este y el número de granos por espiga es muy similar, ya que en esta población el carácter de espiga compacta o laxa no está segregando. Por este motivo, prácticamente los QTL detectados para ambos caracteres son los mismos, incluso los detectados en el grupo 4H, sólo detectados para estos. Pero las interacciones QTLxQTL nada tuvieron que ver entre un carácter y otro (tabla 23).

#### 4.1.1 Genotipos más adaptados a los ambientes estudiados en la población NxBxB según los resultados obtenidos

Ante esta enorme complejidad de la interacción genotipo por ambiente y la gran influencia de los distintos ambientes estudiados en los distintos componentes del genotipo, se ha tratado de encontrar cuales son las líneas que portando los alelos más beneficiosos para el rendimiento de los principales QTL encontrados en la población de estudio, como son los encontrados para llenado de grano en 1H y 5H, así como los alelos de Barbarrosa para *Eam6*, el cual incrementa también estos parámetros y *PPD-H1* de sensibilidad a fotoperiodo largo, encontrándonos con dos líneas que destacan como han sido la línea 66 y la línea 149.

La línea 66, es una línea que en cuanto a sus hábitos de vernalización presenta los alelos primaverales de *VRN-H1* procedentes de Nevada, por lo que se expresa constitutivamente, pero presenta los alelos de Barbarrosa para *VRN-H2*, presentando a este activo, lo que la confiere un genotipo facultativo. Mientras que en lo que respecta a su sensibilidad a fotoperiodo presenta sensibilidad a fotoperiodo corto, portando los alelos de Barbarrosa de *PPD-H2*, y claro está, a fotoperiodo largo, debido al criterio de su selección. Esta línea ocupó los primeros puestos en lo que rendimiento se refiere en tres de los seis ambientes estudiados, caracterizados por su alto déficit hídrico al final del ciclo y además fue la única que cumplía los requisitos de esta selección entre las diez mejores líneas bajo el modelo AMMI de rendimiento, lo que responde a una alta estabilidad de rendimiento en los distintos ambientes debido a que bajo este modelo se ha tratado de explicar la interacción de estas líneas con los distintos ambientes.

Teniendo en cuenta estos requisitos de selección, la línea 66 fue la única que tuvo esta estabilidad. Aunque en este sentido, debemos destacar que el papel del QTL detectado en 5H para peso específico y peso de mil semillas pudo ser menos relevante, puesto que si eliminamos este como criterio de selección nos encontramos con ocho de las diez líneas, por lo que estos QTL que afecta a parámetros de llenado de grano podría estar mucho más influenciado por el ambiente que los otros incluidos en esta selección. Esto no ocurre con los QTL en 1H para peso específico y peso de mil semillas, siendo este una importante covariable genética en el modelo AMMI para peso de mil semillas, uno de los componentes del rendimiento con mayor porcentaje de la varianza genético.

Por otro lado, la línea 149 la cual posee unos hábitos de vernalización iguales a la línea 66, pero presenta el gen de sensibilidad a fotoperiodo corto activo, portando los alelos de Nevada para *PPD-H2*, nos encontramos con que esta línea, a pesar de no encontrarse entre el 5% de las líneas con más altos rendimientos bajo el modelo AMMI, es una de las líneas con más altos rendimientos en dos de los ambientes con mayor estrés hídrico como fueron los ambientes 2006 y 2009\_Spring. Además, esta línea resultó una de las líneas precoces con mayores ratios entre elongación del tallo bajo día largo y encañado bajo fotoperiodo corto ( $SE_{VL}/J_{VC}$ ). Sin embargo, el resto de las líneas seleccionadas bajo el criterio propuesto por Slafer et al (2005) no tuvieron los mejores resultados en cuanto a rendimiento se refiere. Por tanto, de manera general, bajo el fondo genético de esta población y las condiciones climáticas de la meseta castellano leonesa, el hecho de incrementar la fase de elongación del tallo sin variar el tiempo de espigado no supone un incremento en el rendimiento. Esto podría deberse a que Slafer et al (2005) propuso este modelo bajo unas condiciones donde los inviernos eran menos fríos, como es el este de España, cuando se ha visto que dentro del ambiente típicamente mediterráneo donde se encuentra España, existen dos sub-ambientes diferenciándose precisamente esta zona del de la meseta norte en donde se ha realizado el presente estudio (Lasa et al, 2001).

Según los resultados obtenidos, se puede observar también la gran influencia que tuvo *PPD-H2* en la población respecto al rendimiento. De manera que, sin tener en cuenta los QTL SW\_6 y TKW\_6, observamos que muchas de las líneas con el resto de caracteres seleccionados y hábitos de vernalización facultativos o primaverales poseen unos comportamientos similares respecto a los ejes AMMI con valores positivos para IPCA1 al igual que el ambiente 2008, donde se obtuvieron mayores rendimientos, no observándose esta tendencia entre las líneas con *PPD-H2* inactivo.

Por tanto, *PPD-H2*, bajo el fondo genético analizado, tuvo una mayor relevancia en cuanto a la estabilidad del rendimiento que los QTL detectados en 5H, SW\_6 y TKW\_6, donde se localiza el gen de resistencia a frío *Fr-H2* (Francia et al, 2007; Pasquariello et al, 2014; Knox et al, 2010), a pesar de que sólo se detectaran QTL para altura y peso específico en la región de *PPD-H2* y tan sólo para dos de los ambientes. De la misma manera observamos que las líneas con *PPD-H2* activo que portan los alelos de Nevada en los QTL SW\_6 y TKW\_6 poseen una tendencia a obtener mayores rendimientos bajo el modelo AMMI (gráfico 40). Por este motivo, podría ser interesante el hecho de conferir a las líneas con *PPD-H2* activo resistencia al frío mediada por *Fr-H2* en vez de por *Fr-H1*, altamente ligado a *VRN-H1* (Akar et al, 2009), ya que ha sido descrito que este podría penalizar la tolerancia a las bajas temperaturas en los genotipos facultativos (Cuesta-Marcos et al, 2015; Rizza et al, 2016), habiéndose descrito una relevante importancia de *PPD-H2* en la adaptación a las condiciones Mediterráneas (Casao et al, 2011b).

Precisamente para peso específico, único parámetro de rendimiento para el que *PPD-H2* fue significativo, resultó significativa la correlación (y además positiva) con el ratio entre el tiempo de elongación del tallo principal y el de encañado ( $SE/J(VL)$ ) con tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo, condiciones más similares a la siembra primaveral en los ambientes que nos ocupan. Aunque bajo el modelo combinado de condiciones de fotoperiodo, esta correlación fue significativa para más parámetros. Este parámetro, ratio  $SE/J$ , con tan alta heredabilidad como se explicó en el estudio de las fases de pre-espigado de esta misma población, está influenciando el rendimiento junto con el tiempo espigado, en el sentido de que este nos da idea del ajuste entre fases en las que se va definiendo el rendimiento y sus parámetros.

#### 4.2 La influencia del tiempo de espigado en el rendimiento: El papel de *PPD-H2*, *denso* y otros genes de floración

Es indiscutible que el tiempo de espigado influye enormemente en el rendimiento, especialmente bajo condiciones mediterráneas con un déficit hídrico extremo al finalizar el ciclo del cultivo (Cuesta-Marcos et al, 2008a). Pero no todos los genes de floración afectan de la misma manera al rendimiento, ya que cada uno de ellos se expresa en un momento del desarrollo, afectando de distinta manera a los distintos componentes del rendimiento, pudiendo afectar o no al rendimiento final, todo ello teniendo siempre en cuenta que las condiciones ambientales repercuten enormemente en estos genes. Por tanto, algunos de estos genes de floración afectan al desarrollo de la espiga, otros al llenado de grano y su madurez y otros afectarán al número de espigas o granos por metro cuadrado.

Distintos QTL resultaron significativos para la fecha de espigado en los ambientes estudiados, todos ellos directamente relacionados con genes de floración, tanto de sensibilidad a fotoperiodo *PPD-H1* (Turner et al, 2005), QTL F\_2, y *PPD-H2* (Boyd et al. 2003), QTL F\_1, el gen de vernalización *VRN-H1* (Sasani et al. 2009), F\_5, como los genes de precocidad per sé, *Eam6*, tan importante en las latitudes que nos ocupan (Comadrán et al, 2012), QTL F\_3, y el gen *Hv20ox2* (Jia et al, 2009), debido a la

presencia del alelo *denso* en la población (Nevada x Barbarrosa) x Barbarrosa, QTL F\_4. Se detectó también un QTL de menor relevancia en el grupo de ligamiento 6H para floración solamente en el ambiente 2006, el cual fue uno de los ambientes con mayor déficit hídrico a lo largo del ciclo.

Incluso un QTL detectado para alcanzar estado de hoja bandera y espigado en la población Nx BxB bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo, (F\_4 y FL\_4, en tabla 16), fue detectado para altura de la planta (H\_3) en cuatro de los ambientes, en donde los alelos de Barbarrosa incrementan la talla de planta. Pero también fue significativo para rendimiento (Y\_4,  $-\log_{10}(p)$  máximo desplazado 2 centimorgan respecto a los demás QTL detectados en esta región), incrementando los alelos de Nevada este parámetro en igual medida para los cinco ambientes donde fue detectado (en 2008 este no fue significativo), al igual que ocurría con el tiempo para alcanzar el estado de hoja bandera donde la interacción de este QTL (FL\_4) con el ambiente no era significativa. Estos QTL se encuentran en una región próxima a los genes de floración *HvGI* y *HvFT2* (Faure et al, 2007).

#### 4.2.1 *denso*

A pesar de no tratarse directamente de un gen responsable de la inducción de la floración, mutaciones en el gen *Hvovx20*, como la mutación de la que proviene el alelo de semienanismo *denso* (Jia et al, 2009), gen implicado en el metabolismo de las giberelinas, provoca grandes cambios no sólo en la talla de la planta, sino que lleva consigo grandes cambios pleiotrópicos que afectan tanto a la fecha de espigado como al rendimiento y sus componentes (Saville et al, 2012; Franckowiak y Lundqvist 2012; Chandler y Harding 2013).

Este alelo provoca grandes diferencias en la población en todos los ambientes estudiados tanto en fecha de espigado, provocando un retraso de la floración, como en el rendimiento y en la mayoría de los parámetros estudiados, siendo el principal QTL detectado para la talla de las plantas, pero también para rendimiento y peso de mil semillas, además de haber sido significativo para la mayoría de los parámetros del rendimiento. Además, este se vio involucrado en múltiples interacciones QTLxQTL para todos los caracteres estudiados, tanto con QTL en regiones de genes de floración, como QTL detectados sólo para rendimiento, lo que manifiesta una fuerte influencia de este en la población de estudio. Sin embargo, bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo, como vimos en el capítulo tercero de esta tesis, sus efectos no fueron significativos, ni para tiempo de espigado, ni para el tiempo de las fases previas a este. Por tanto, los efectos de *denso* están claramente influenciados por el ambiente, siendo menos evidentes al forzar las condiciones ambientales.

Los efectos de *denso* fueron notables especialmente en rendimiento (Y\_5), donde solamente en uno de los ambientes no fue significativo (2009\_winter), donde los mayores efectos correspondieron a Y\_2, QTL próximo a *PPD-H1*. Sin embargo, en este mismo ambiente *denso* fue significativo para otros parámetros del rendimiento como granos por espiga o los parámetros relacionados con el llenado de grano, peso específico y peso de mil semillas.

La fuerte influencia del alelo *denso* se hace notar en muchos de estos parámetros bajo los modelos de los efectos aditivos principales e interacciones multiplicativas (AMMI), de manera que incluso para espigado los efectos de este alelo fueron más fuertes que incluso sus hábitos primaverales o invernales. Esto queda reflejado en este modelo (gráficos 27) ya que en función de *denso* se observa una tendencia frente a IPCA0 (medias del modelo) a un retraso de la floración de las líneas portadoras de este alelo mayor, que si observamos la distinción entre líneas primaverales e invernales.

Algo similar ocurre si observamos la tendencia de las líneas portadoras de *denso* a obtener rendimientos inferiores bajo el modelo AMMI para rendimiento (ver gráficos AMMI 28 y efectos aditivos de Y\_5 en tabla 22), e incluso para peso de mil semillas, pero en este caso la covariable *denso* obtuvo valores de IPCA1 negativas y positivas para las líneas sin *denso* (gráficos 31 superiores), ya que frente a IPCA0 los efectos de TKW\_1 en 1H fueron los más notables bajo el modelo AMMI para este parámetro (gráficos 31 inferiores). Pero donde los efectos de este fueron más notables fue para altura donde bajo el modelo AMMI quedan totalmente divididas las líneas en función de si portan el alelo *denso* o no (gráficos 31).

Por tanto, existe una tendencia a que los efectos de *denso* fueran negativos respecto al llenado de grano (figura 16): como observamos en los efectos aditivos para peso de mil semillas y peso específico, donde las líneas sin este alelo obtuvieron mayores valores para estos parámetros. Mientras que para los parámetros de granos por espiga y longitud de espiga *denso* tiende a tener una repercusión positiva (figura 17, tabla 22 QTL GS\_3 y LS\_3).

Pero en el caso de granos por espiga se observa una fuerte interacción de este QTL, GS\_3, con los distintos ambientes (figura 17). Esto es claramente apreciable al observar los efectos aditivos de este QTL, ya que en los ambientes 2009\_winter (donde no fue significativo *denso* para rendimiento) y en 2011\_Z, los alelos de Nevada, parental portador del alelo *denso*, incrementan este parámetro (al igual que en LS\_3 para longitud de espiga, en los dos ambientes donde este fue significativo, 2011\_P y 2011\_Z), mientras que para 2008 y 2009\_spring los alelos de Barbarrosa para este QTL, sin alelo *denso*, son los que incrementaron el número de granos por espiga.

Esta fuerte interacción con el ambiente del alelo *denso* frente a parámetros del rendimiento, queda también de manifiesto al observar el número de granos por metro cuadrado, de manera que para este parámetro el  $-\log_{10}(p)$  máximo no coincidió con el marcador intragénico para detectar el alelo *denso*, Gm\_2 incluye en su intervalo de confianza a este (tabla 22, figura 12). Respecto este parámetro observamos que bajo siembra primaveral los efectos de *denso* repercutieron negativamente en este parámetro, siendo los alelos de Barbarrosa los que incrementan el número de granos por metro cuadrado, mientras que para los otros dos ambientes donde fue detectado Gm\_2, 2009\_winter y 2006, los alelos de Nevada, portador de *denso*, fueron los que lo incrementaron.

Por tanto, *denso* repercute negativamente en el llenado de grano en estos ambientes típicamente mediterráneos, que tiene una fuerte relación con el retraso en la fecha de espigado que este produce. Pero para parámetros relacionados con la espiga y número de granos por metro cuadrado, y por tanto espigas por metro cuadrado, los efectos de este están fuertemente influenciados

por el ambiente, llegando a ser beneficioso para los ambientes 2009\_winter y 2011\_Z, sin olvidar los beneficios que este ocasiona en la reducción del encamado de las plantas al producir semienanismo en las líneas que lo portan.

Esta fuerte interacción con el ambiente por parte de *denso*, unido a los fuertes efectos en espigado y pre-espigado de otros genes para los que segrega la población relacionados con vernalización y fotoperiodo, han hecho que los efectos de este no fueran significativos para ninguna de las fases estudiadas en esta tesis bajo condiciones controladas de fotoperiodo y vernalización, a pesar de la gran repercusión que tuvo este en los ensayos realizados en campo con esta población tanto en espigado y altura de planta como en rendimiento y sus componentes.

#### 4.2.2 *VRN-H1* y *VRN-H2*

En cuanto *VRN-H1*, gen responsable de la respuesta de vernalización, quien confiere a las líneas portadoras de los alelos de Barbarrosa la necesidad de vernalizar para poder llegar a espigar (Yan et al, 2003; Sasani et al, 2009), fue esencialmente significativo en el ambiente bajo siembra primaveral, 2009\_spring (QTL F\_5), donde este gen causó las mayores diferencias, a pesar de que bajo este ambiente sí se dieron condiciones adecuadas para cubrir las necesidades de vernalización (gráfico 19). Ningún QTL fue detectado en las inmediaciones de *VRN-H2*, ni para floración ni para rendimiento y sus parámetros.

Siguiendo con *VRN-H1*, este no fue significativo para floración en ambos ambientes de 2011, causando leves diferencias en el resto de los ambientes estudiados (ver gráfico 13), ya que en todos ellos se dieron las condiciones adecuadas para finalizar la vernalización por parte de las líneas con genotipo invernal, igualándose los efectos de este gen entre las líneas invernales y las que expresan constitutivamente *VRN-H1* portadoras del alelo de Nevada para este. En el ensayo de siembra primaveral, a pesar de haberse sometido las plantas a vernalización, se apreciaron también los efectos de *VRN-H1* ya que en este caso al ser el ciclo más corto, la inducción de la floración se vio retrasada en las líneas que necesitan acumulo de frio para que se expresara *VRN-H1* así activando *VRN-H3*, frente a las líneas que expresaban constitutivamente *VRN-H1*, esto es así puesto que las líneas invernales todas llegaron a florecer en este ensayo, y los retrasos de estas, no llegó a una media de día y medio, ligeramente inferior el retraso al sufrido de media por las líneas insensibles a fotoperiodo largo por la presencia del alelo *ppd-H1*.

En los ambientes donde *VRN-H1* fue significativo para floración, incluyendo el ambiente bajo siembra primaveral, no se detectó directamente la interacción de *PPD-H1* con los genes de vernalización, con *VRN-H2*, represor de *VRN-H1* (Mulkin y von Korff, 2016), actuando *PPD-H1*, como represor de la floración mediante la inducción de *VRN-H2* antes de finalizar la vernalización (tabla 23). Sin embargo, en el ensayo bajo siembra primaveral estos efectos podrían intuirse, al igual que ocurría en el ensayo de invernadero bajo tratamiento de vernalización y fotoperiodo largo (VL). En esta ocasión tampoco se llegaron a ajustar la duración de las distintas fases entre las líneas que necesitaban

vernalizar y las que expresaban constitutivamente *VRN-H1*, a pesar de haberse satisfecho las necesidades de vernalización, teniendo como resultado que *VRN-H1* fuera significativo tanto con tratamiento de vernalización como sin él bajo fotoperiodo largo, pudiendo achacar en este caso las pequeñas diferencias a la represión de *VRN-H2* por parte de *PPD-H1*, expresándose *VRN-H1* antes de finalizar la vernalización, y, por tanto, causando diferencias entre las líneas con el alelo invernal de *VRN-H1* en función del alelo de *PPD-H1* que porten.

Además, como se vio en el capítulo tercero, *VRN-H1* es significativo en todas las fases de desarrollo hasta espigado, de manera que este gen posee importancia en esta población como hemos visto en el estudio de las fases de desarrollo de la planta hasta espigado a lo largo de todo el desarrollo de la espiga, por lo que no es de extrañar que este haya sido también significativo en el rendimiento, ya que este es el resultado del desarrollo tanto de las espigas como de los granos de estas (García del Moral y Ramos, 1989). A pesar de ello no ha sido significativo en el resto de parámetros estudiados, posiblemente debido a las escasas diferencias que este ha causado en la población debido a que los requerimientos de vernalización se vieron satisfechos incluso bajo siembra primaveral. A pesar de ello, un QTL en una posición cercana en el grupo 5H se detectó para distintos componentes del rendimiento, aunque por los efectos que causan estos, podemos decir que se trata de QTL diferentes, aunque si vemos la gráfica superior de la figura 14, vemos que estos podrían haberse solapado para rendimiento, no habiendo podido discriminar ambos para este parámetro.

Respecto a este QTL de rendimiento en *VRN-H1*, *Y\_5*, se ha observado que, mientras los alelos invernales de Barbarrosa son los que alargan el tiempo de espigado por ese retraso en la floración de las líneas invernales respecto a las primaverales, pero son los de Nevada los que incrementan el rendimiento. Sin embargo, esto no ocurre en todos los ambientes, ya que en 2011\_Z, fueron los de Barbarrosa los que incrementaron el rendimiento, no habiendo este sido significativo para la fecha de espigado en este ambiente, de manera que nos encontramos una fuerte interacción con los distintos ambientes por parte de este gen de vernalización respecto al rendimiento. Esta fuerte interacción de los efectos de *VRN-H1* con los distintos ambientes, estuvo también muy presente en la fase de elongación del tallo principal en el estudio de las fases de pre-espigado, fase en la que se definen muchos de los componentes del rendimiento (Fischer, 2007; Miralles y Slafer, 2007), de manera que bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo largo esta fase se ve incrementada por los alelos de Barbarrosa del QTL, *SE\_5* en la región de *VRN-H1*, mientras que bajo fotoperiodo corto, independientemente de si se ha realizado tratamiento de vernalización, son los de Nevada los que alargan esta fase.

Esta influencia de la región de *VRN-H1* en el rendimiento, en ausencia de control de la fecha de floración, podría estar mediada por la resistencia a frío. Por este motivo, se precisan estudios mayores con poblaciones que recombinen estos genes para ver los efectos diferenciales de *Fr-H1* y *Fr-H2* bajo condiciones mediterráneas.

## 4.2.3 PPD-H1

El gen de sensibilidad a fotoperiodo largo *PPD-H1*, acelera la floración bajo condiciones de día largo y mutaciones como la que porta Nevada causan insensibilidad a fotoperiodo largo (Turner et al, 2005). El QTL F\_2 (situado en esta región) fue significativo en tres de los ambientes estudiados, como se ha explicado anteriormente. El primero de ellos bajo siembra primaveral, 2009\_spring, ambiente el cual estuvo sometido a fotoperiodos largos durante todo el ciclo, pero este también fue significativo respecto a la fecha de espigado para los dos ambientes donde *VRN-H1* no lo fue, 2011\_P y 2011\_Z. Estos, al proceder de la misma campaña, aunque en localidades diferentes, estuvieron expuestos a la misma duración de fotoperiodos y, a pesar de experimentar cambios en él, puesto que en ambos la siembra fue otoñal, los efectos de este fueron superiores a los efectos de *VRN-H1*, ya que hasta que este no estuvo saturado, los efectos de *PPD-H1* no causaron diferencias en el tiempo de espigado. En estos dos ambientes, el desarrollo vegetativo pudo verse frenado debido a la abundancia de las lluvias invernales unido a una baja temperatura invernal, favoreciéndose que líneas invernales, completaran sus necesidades de vernalizar, y se igualaran en cuanto al desarrollo. Así las mayores diferencias fueron debidas a la sensibilidad a fotoperiodo largo siendo los alelos de insensibilidad a fotoperiodo largo los que alargaron el tiempo de espigado, al igual que ocurre en el ambiente bajo siembra primaveral.

Precisamente estos dos ensayos, 2011\_P y 2011\_Z se comportan de manera diferente al resto de ambientes con siembra otoñal en el modelo AMMI de espigado (gráfico 27), observando que frente IPCA1 ambos adquieren valores positivos al igual que 2009\_spring con siembra primaveral, siendo sólo en estos tres ambientes donde *PPD-H1* resultó significativo para floración. Por tanto, este gen pudo ser el responsable de la disposición de los distintos ambientes frente IPCA1 en el modelo AMMI de espigado.

En el caso del ambiente 2011\_P, las diferencias causadas por *PPD-H1* además se vieron potenciadas por las múltiples interacciones que tuvo este con otros genes que afectaron a la fecha de espigado, como fueron las interacciones con *Hvox20*, alelo *denso* (F\_2 x F\_4) y con *Eam6* (F\_2 x F\_3), resultados mostrados en la tabla 23, mientras que en 2011\_Z fue *PPD-H2* quien interaccionó con *Eam6* (F\_1 x F\_3) potenciando los efectos de ambos.

*PPD-H1* resultó también significativo para rendimiento Y\_2. En esta ocasión son los alelos de Barbarrosa los que incrementaron el rendimiento en grano, de manera que una mayor precocidad incrementa también en esta ocasión el rendimiento en 2006 y 2009\_Winter, pero también en 2009\_spring, no resultando significativo para rendimiento precisamente en los ambientes con siembra otoñal donde lo fue para floración, 2011\_P y 2011\_Z. Sin embargo, para el QTL de rendimiento el  $-\log_{10}(p)$  máximo se encuentra desplazado al marcador tipo DArT bPb-4821, situado a 0,9cM del marcador intragénico SNP22 de *PPD-H1*, pero abarcando su intervalo de confianza la región de este gen.

Algo similar ocurre con los parámetros de los componentes de rendimiento donde este fue significativo, ya que en todos ellos el  $-\log_{10}(p)$  se encuentra desplazado a este mismo marcador. Estos fueron el número de granos por espiga (GS\_1) y la longitud de la misma (LS\_1), siendo significativo en

todos los ambientes del estudio a excepción de los dos de 2009, incluido el ensayo con siembra primaveral. Estos dos parámetros quedan definidos durante la fase de elongación del tallo (Fischer, 2007; Miralles y Slafer, 2007). Un mayor tiempo para el desarrollo de esta fase nos lleva a valores superiores de estos parámetros, teniendo el gran inconveniente bajo las condiciones que nos ocupan, con una grave sequía terminal, que si esto conlleva un retraso en el tiempo total de espigado el incremento de estos parámetros de espiga desembocan en un pésimo llenado de grano, por las condiciones adversas para ello (Cuesta-Marcos et al, 2008a; Comadrán et al, 2011). Esto queda reflejado en la tabla de correlaciones entre rendimiento y estos parámetros (tabla 19) de manera que, aunque existió una baja correlación entre número de granos por espiga y rendimiento, si existió una correlación negativa entre longitud de espiga y rendimiento, estando los dos parámetros relacionados con la espiga positivamente relacionados (tabla 20). Por lo que para los QTL detectados en *PPD-H1*, *GS\_1* y *LS\_1* fueron los alelos de Nevada los que incrementaron estos parámetros, al contrario que para *Y\_2*, donde fueron los de Barbarrosa los que incrementaron el rendimiento. Destacando el hecho de que estos QTL tuvieran una baja o nula interacción con el ambiente, de manera que los efectos de estos fueron estables en todos los ambientes estudiados.

#### 4.2.4 *PPD-H2*

El QTL para floración, *F\_1*, en la región de *PPD-H2*, cuyo marcador más significativo es el marcador intragénico para *HvFT3*, gen candidato para *PPD-H2* (Kikuchi et al, 2009), fue significativo en todos los ensayos. Por tanto, sus efectos para promover la floración bajo condiciones de día corto (Laurie et al, 1999) fueron apreciables en todos los ambientes estudiados, al igual que encontraron varios autores en otros estudios bajo siembra otoñal (Cuesta-Marcos et al, 2008a; Borràs-Gelonch et al, 2012), mostrando una notable importancia de éste para la adaptación a las condiciones Mediterráneas (Casao et al, 2011b). Aunque se ha descrito también que *PPD-H2* activo podría penalizar la tolerancia a las bajas temperaturas en los genotipos facultativos (Cuesta-Marcos et al, 2015; Rizza et al, 2016). En este caso no se han detectado interacciones entre los QTL en las regiones de *PPD-H2* y los genes de resistencia a frío *VRN-H1/Fr-H1* y *Fr-H2* (QTL *SW\_6* y *TKW\_6*). Aunque ambos se encuentran implicados en interacciones con QTL en la región de *Eam6*, para floración en lo que respecta a *Fr-H1* y para peso de mil semillas en el caso de *Fr-H2* (ver tabla 23). Por tanto, en esta población se podría seguir indagando en las implicaciones e interacciones de genotipos facultativos con *PPD-H2* activo frente al gen de resistencia a frío *Fr-H2*, con el fin de buscar genotipos adaptados a estas condiciones sin la penalización de la escasa tolerancia a frío.

*PPD-H2* ha sido detectado también para tiempo de espigado en el ambiente con fecha de siembra primaveral, 2009\_spring, en donde las plantas no estuvieron sometidas a fotoperiodos cortos, pero a pesar de ello, este QTL causó diferencias entre las líneas de la población NxBxB. Por tanto, en este caso los efectos de *PPD-H2* han de deberse a los mecanismos de regulación, ya que tal y como describieron Casao et al (2011a), *VRN-H2*, el cual se expresa bajo fotoperiodos largos, estaría actuando como represor de *PPD-H2* bajo estas condiciones. Por tanto, la segregación en la población tanto de los

alelos de *PPD-H2* como de la delección de *VRN-H2*, y por tanto de la función de este como represor, está haciendo visibles los efectos del primero sin necesidad de fotoperiodo corto, es decir bajo siembra primaveral, con el mismo efecto que en todos los demás ambientes (QTLxE resulto no significativa para este QTL). Además, precisamente bajo siembra primaveral, fue donde más repercusión tuvo en los parámetros del rendimiento, pudiendo ser debido al tremendo estrés al que estuvieron sometidas las plantas en este ambiente, aprovechando al máximo cualquier recurso del que dispusieran. De manera que bajo estas condiciones dos QTL fueron detectados en *HvFT3*, uno de ellos para altura de la planta, *H\_1* y otro para peso específico, *SW\_2*, destacando el hecho de que este último también fue significativo bajo las condiciones más favorables y menos representativas de las condiciones mediterráneas como fue el ambiente 2008.

En todos los casos, la mutación para este gen de la que es portadora Barbarrosa, que confiere insensibilidad a fotoperiodos cortos (Laurie et al, 1995; Kikuchi et al, 2009), desfavorece estos parámetros del rendimiento, de manera que son los alelos de Nevada los que aumentan tanto altura como peso específico en estos ambientes, continuando con la tendencia de que un retraso en el espigado no favorece a estos parámetros que repercuten positivamente en el rendimiento. Destaca también que para peso específico sus efectos se vieron potenciados en beneficio del rendimiento por las interacciones que este QTL, *SW\_1*, se vio implicado con otros QTL (tabla 23), con *SW\_2* en 1H en el caso del ambiente 2008, uno de los QTL más estables para este carácter no relacionado con la floración y con *denso* (*SW\_4*) en el ambiente con siembra primaveral.

Hemos de tener en cuenta también que *PPD-H2* no fue directamente significativo en el ensayo bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo en lo que respecta a la fase de elongación del tallo principal, pero sí para el cociente entre la duración de esta fase y la duración de la fase hasta encañado de las plantas (ratio SE/J), así como para la duración de esta última por si sola en la población de estudio y en el tiempo total hasta espigado. Por tanto, el poseer la mutación que alarga los tiempos hasta encañado bajo fotoperiodo corto repercute en el tiempo total de espigado retrasándole, mientras que la sensibilidad a fotoperiodo corto, alelos procedentes de Nevada, provoca un incremento del ratio SE/J, siendo estos alelos los que han repercutido positivamente en los componentes del rendimiento donde este gen fue significativo y también una mayor precocidad en el espigado.

Así que el ajuste entre ambas fases, tiempo de encañado y elongación del tallo, provocado por *PPD-H2* junto a la precocidad en espigado que este provoca han sido en esta ocasión los principales factores que han beneficiado a componentes del rendimiento bajo las condiciones más favorables para el llenado de grano (ambiente 2008) y siembra primaveral, incrementando el peso específico. En este sentido, sorprende el hecho de que haya repercutido en este parámetro de calidad del grano, ya este se define en las últimas fases del desarrollo de las plantas, no afectando a otros parámetros definidos previamente, como granos por espiga o granos por metro cuadrado, cuando *PPD-H2* es más significativo en las fases iniciales del desarrollo, tal y como vimos en el estudio de las fases de pre-espigado de la población que nos ocupa. Precisamente con peso específico es con el parámetro del rendimiento con el que el mencionado ratio bajo condiciones de vernalización y fotoperiodo corto, condiciones más similares a siembra primaveral en estas latitudes, con el único con quien este guarda correlaciones positivas (tabla 31).

En este estudio 36 líneas portan el represor *VRN-H2* inactivo de las 98 líneas que portan *PPD-H2* activo, habiéndose encontrado que la mayoría de las líneas que portaban *PPD-H2* activo con genotipos potencialmente de alto rendimiento, e incluso con mayores rendimientos en los distintos ambientes y bajo el modelo AMMI, portaban los alelos de Barbarrosa para este represor, por tanto activo bajo condiciones de día largo, condiciones bajo las que se define el peso específico bajo condiciones mediterráneas. En vista de estos resultados, otros mecanismos podrían estar interactuando con *PPD-H2* activando a éste para que bajo dichas condiciones, con *VRN-H2* reprimiendo *PPD-H2*, esté ayudando a incrementar el peso específico, y por tanto, contribuyendo a la calidad del grano repercutiendo en un correcto llenado de este.

Por tanto, la relevancia de *PPD-H2* en este tipo de ambientes podría ir más allá de la adaptación acelerando la floración para evitar la sequía terminal, ya que podría estar contribuyendo a un parámetro de rendimiento que afecta a la calidad de grano. Por este motivo, estos resultados contribuyen a la explicación de por qué autores como Jones et al (2008) o Casao et al (2011b) encontraron una alta frecuencia de alelos de *PPD-H2* activos en ambientes mediterráneos. Sin embargo, se debería indagar más en los mecanismos de cómo éste repercute en el rendimiento y sus parámetros, ya que según estos resultados este gen podría estar repercutiendo en un parámetro definido después del encañado de las plantas, lo que se encuentra en concordancia con los resultados de Casao et al (2011a), así como las interacciones de éste con los genes de resistencia a frío mencionadas anteriormente.

#### 4.2.5 *Eam6*

*Eam6*, cuyo gen candidato es *HvCEN* (Comadrán et al, 2012), ha sido descrito como uno de los principales determinantes del rendimiento y espigado bajo condiciones mediterráneas (Cuesta-Marcos et al, 2008a; Comadrán et al, 2012). Esto es debido al adelanto en fecha de espigado que provoca este gen de precocidad *per sé*, pudiendo salvar la sequía terminal a la que se ve sometido el cultivo al finalizar el ciclo, en beneficio de un correcto llenado de grano (Comadrán et al, 2012).

Este gen se encuentra segregando en esta población de manera que Barbarrosa, línea invernada, es portadora del alelo que provoca esta precocidad, aunque una amplia región del genoma cercana a este gen se vio implicada en QTL de distintos parámetros del rendimiento. En este sentido, tanto para espigado como para los parámetros de longitud de espiga estos QTL se encuentran en las inmediaciones de los marcadores bPb-3677 y bPb-5449, al igual que los QTL detectados en la región de *Eam6* para el estudio de las fases de pre-espigado. Mientras que, tanto para rendimiento, como para los parámetros de llenado de grano, peso específico y peso de mil semillas, el marcador más significativo se desplazó hasta el SSR Bmac132, marcador propuesto por Cuesta-Marcos et al (2008a), como marcador diagnóstico para este gen de precocidad *per sé*, *Eam6*, aunque en todos los casos el intervalo de confianza incluía a los marcadores significativos para los demás parámetros incluido tiempo para espigado.

El QTL localizado en la región de *Eam6*, F\_3, para fecha de espigado se caracteriza por haber sido detectado en todos los ambientes del estudio, de manera que se reafirma la importancia y relevancia que tiene este en el espigado de las plantas, habiendo sido encontrados QTL significativos en todas las fases de pre-espigado estudiadas en el ensayo de invernadero realizado con esta población, a excepción de la fase desde nascencia a encañado. Además, éste se vio involucrado en múltiples interacciones, con QTL en la región de los genes de sensibilidad a fotoperiodo y también con *VRN-H1*, al igual que ocurría en el estudio bajo condiciones controladas de esta misma población. En este estudio nos encontramos con diferencias de espigado de entre medio día y día y medio (ver tabla de efectos aditivos de este, tabla 22). Estas interacciones *Eam6* x *VRN-H1* tuvieron especial repercusión en uno de los ambientes más desfavorables, 2006, donde, esta interacción acelera la floración. Este patrón de interacción entre *Eam6* y *VRN-H1* fue también significativo en todas las fases de pre-espigado bajo condiciones controladas de fotoperiodo corto y tratamiento de vernalización (capítulo tercero de esta tesis), condiciones que en este ambiente 2006 nos encontramos al inicio del ciclo, indicándonos que el encañado de las plantas en esta ocasión tuvo lugar antes de que las condiciones de fotoperiodo cambiaran, de manera que esta interacción para tiempo total de espigado tendría lugar en las fases iniciales de la elongación del tallo antes de que se produjera el llenado de grano. Mientras que interacciones de F\_3 con QTL en las regiones de *PPD-H1* y *PPD-H2* fueron significativas en los ambientes donde *VRN-H1* no resultó significativo para tiempo de espigado, al igual que ocurrió en los distintos ambientes controlados para el estudio de las fases de pre-espigado con esta misma población. Así, en 2011\_Z esta interacción significativa fue con *PPD-H2*, por tanto en fases antes de encañado cuando el fotoperiodo era decreciente, mientras que en 2011\_P resultó significativa la interacción con el QTL en *PPD-H1*, detectado en condiciones de fotoperiodo largo y tratamiento de vernalización en todas las fases de pre-espigado una vez encañadas las plantas, por tanto, en esta ocasión la aceleración de la fecha de espigado pudo estar potenciada a lo largo de toda la fase de elongación del tallo hasta madurez de la espiga.

Por tanto, la relevancia de *Eam6* durante la elongación del tallo fue crucial, siendo esta fase donde se produce el crecimiento de la espiga, definiéndose el número de granos que compondrán finalmente a esta (Kirby, 1988; Miralles et al, 2000; González et al, 2003b) ya que existe una elevada correlación entre esta fase y el número de espiguillas fértiles en anthesis (González et al, 2003a).

En este sentido, *Eam6* fue significativo también para la altura de la planta, H\_2, especialmente en el ambiente donde mayor disposición de agua se encontraron las plantas, 2008, aunque este también fue significativo en otro de los ambientes, 2011\_P. La talla de la planta se vio incrementada en las plantas que bajo estas condiciones no poseían el alelo de precocidad intrínseca (alelos de Nevada), experimentando un crecimiento vegetativo mayor al disponer de más tiempo para ello, al igual que ocurrió con los parámetros de espiga.

En esta región de *Eam6* se localizan los QTL más significativos para los parámetros relacionados con la espiga, tanto granos por espiga (GS\_2) como para longitud de la misma (LS\_2). Para estos parámetros además fue una importante covariable genética, de manera que para estos componentes con una alta heredabilidad en comparación con otros estudiados (tabla 22), y con un alto componente genético en el análisis de la varianza (ver tabla 21), nos encontramos que en los modelos para estos

parámetros de los efectos aditivos principales e interacciones multiplicativas las líneas de la población se ven divididas en dos subgrupos en función de la media de los modelos (IPCA0), quedando patente la gran repercusión que tuvo este gen en el desarrollo de la espiga y, por tanto, durante la elongación del tallo, cuando el crecimiento de tallo y de espiga se encuentran en competencia por los asimilados (Kirby, 1988).

Por el contrario, el llenado de grano, con mayor repercusión para el rendimiento, se vieron beneficiados por el alelo de Barbarrosa de precocidad per sé, tal y como observamos en los efectos aditivos de Y\_3, para rendimiento, y SW\_3 y TKW\_2 para peso específico y peso de mil semillas respectivamente (figuras 12 y 16 y tabla 22). Además, la repercusión de estos QTL en los parámetros de llenado de grano fue por igual, independientemente del ambiente que se tratara, resultando no significativa la interacción de estos QTL con el ambiente (QTLxE), a pesar de que en el ambiente 2008 no existiera ese déficit hídrico al final del ciclo que se dio en el resto de ambientes, con graves repercusiones en el llenado de grano en las líneas más tardías, constatándose que los efectos de este gen de precocidad per sé *Eam6* son independientes de las condiciones ambientales (Sameri et al, 2011; Comadrán et al, 2011).

Además, para estos parámetros del rendimiento destaca la interacción que tuvieron los QTL en esta región de *Eam6* con el alelo *denso*, el cual como se ha detallado anteriormente afecta no sólo a la talla sino a distintos parámetros del rendimiento e, incluso, produce un notable retraso en la fecha de espigado, siendo posiblemente por este motivo por lo que según el ambiente resultara significativa la interacción de este con *Eam6* en los parámetros de llenado de grano y rendimiento.

Por tanto, en esta población un buen llenado de grano fue el principal responsable de que las líneas alcanzaran buenos rendimientos y a su vez, una mayor precocidad favoreció positivamente a este llenado, resultando favorable en este sentido la presencia de *Eam6*.

## *CONCLUSIONES FINALES*

# Conclusiones

---

1. A pesar de las limitaciones de la población de estudio, los resultados obtenidos guardan relación con los resultados obtenidos en otros estudios respecto a las fases de pre-espigado, encontrando altas correlaciones en este trabajo entre el número de hojas desarrolladas en cada fase y el tiempo térmico en el que esta se desarrolla.
2. Los principales QTL detectados para espigado en condiciones controladas y en ensayos de campo, coincidieron con los principales genes de vernalización, *VRN-H1* y *VRN-H2*, y fotoperiodo, *PPD-H1* y *PPD-H2*, los cuales segregan en la población de estudio. Así como *Eam6*, el cual provoca un adelanto de la fecha de espigado y una mayor precocidad a partir del encañado de la planta. Además, otro QTL en 3H se detectó tanto para alcanzar el estado de hoja bandera como para el tiempo total de espigado. Siendo *VRN-H2* significativo sólo bajo fotoperiodo largo y no en los ensayos de campo. Así mismo, *PPD-H1* fue significativo bajo fotoperiodo largo y los ensayos de campo donde *VRN-H1* no resultó significativo, así como el ensayo realizado con siembra primaveral. Mientras que *PPD-H2* fue significativo en todos los ensayos de campo y bajo condiciones controladas con fotoperiodo corto.
3. Existe un distinto control genético entre las fases de pre-espigado y espigado en la que se encuentran implicados los principales genes de floración que segregan en la población, existiendo una secuencia temporal de activación de los mismos. De manera que los efectos de *Eam6* no fueron detectados en la fase desde nascencia hasta encañado, aunque a partir del encañado este fue significativo en todas las demás fases, detectándose interacciones importantes con este gen en todas ellas, por lo que este está potenciando estas fases acelerándolas, con grandes efectos sobre otros genes de floración. Por su parte, *PPD-H2* fue significativo en todas las fases a excepción de la fase de elongación del tallo bajo fotoperiodo corto. Aunque para el ratio entre esta fase y la fase desde nascencia hasta encañado *PPD-H2* fue uno de los principales QTL detectados, lo que indica que éste juega un papel crucial en el ajuste entre ambas fases.
4. Una alta heredabilidad fue detectada para el ratio entre las fases de elongación del tallo y la elongación del tallo principal, *SE/J*, incluso superior a cada una de las fases por separado. Se ha encontrado también un mayor peso del factor genotípico que de la interacción GxE que en estas fases de pre-espigado por separado, a pesar que las condiciones de los ambientes propuestos eran totalmente opuestas. Habiéndose encontrado una cierta relación de este frente a peso específico y una influencia de *PPD-H2* en él, bajo condiciones de día corto especialmente.
5. El rendimiento está altamente influenciado por el ambiente. Los resultados obtenidos con esta población dejan claramente de manifiesto esto, de manera que la mayor contribución en la varianza fue por parte de los propios ambientes, con peso mucho menor para tanto el factor

genotípico como la interacción de este por el ambiente (QTLxE). En este sentido, los parámetros estudiados con mayor componente genético fueron el peso de mil semillas y los parámetros relacionados con la espiga, tanto granos por espiga como la longitud de esta, guardando estos una alta correlación entre ellos. Además, la interacción entre los distintos QTL detectados estuvo también fuertemente influenciada por el ambiente, siendo significativas distintas interacciones QTLxQTL para rendimiento y sus parámetros en función del ambiente estudiado.

6. Bajo condiciones controladas de vernalización y fotoperiodo, el alelo *denso* no llegó a ser significativo para ninguno de los caracteres de pre-espigado estudiados en la población, ni siquiera para el tiempo de espigado, a pesar de que ha sido descrito que este causa grandes diferencias en fecha de espigado, como si ocurrió en los ensayos de campo con la misma población.
7. El alelo *denso* tuvo una fuerte repercusión en lo que respecta al rendimiento y talla de las plantas de las líneas de la población NxBxB, viéndose también involucrado en la gran mayoría de interacciones QTLxQTL. Este tuvo además una fuerte interacción con el ambiente. Además, en este caso sí provocó grandes diferencias en la fecha de espigado en los ensayos de campo, retrasando el alelo *denso* notablemente la fecha de espigado. En estos ambientes tuvo una repercusión claramente negativa, probablemente debida al retraso de espigado que este provoca, y, por consiguiente, mayor exposición a la sequía terminal que sufrieron las líneas en este estudio. De manera que bajo las condiciones de este estudio *denso* provoca menores rendimientos, peso de mil semillas y peso específico, pero incrementa el número de granos por espiga.
8. Dos QTL estables han sido detectados en la población NxBxB para llenado de grano no relacionados con la fecha de espigado. Uno de ellos en el grupo de ligamiento 1H, cuyos alelos procedentes de Barbarrosa incrementan estos parámetros, pero los de Nevada incrementaban el número de granos por metro cuadrado. El otro se sitúa en el grupo 5H, en la región donde se ha descrito que se encuentra el gen de resistencia a frío *Fr-H2*, siendo en este caso los alelos de Nevada los que incrementan tanto peso de mil semillas como peso específico, por tanto, resistencia a frío, al ser los que incrementan estos parámetros. QTL en estas regiones han sido descritos por otros autores en regiones similares para distintos componentes del rendimiento, especialmente para peso de mil semillas, parámetro con más fuerte componente genético.
9. La influencia de genes relacionados con la floración en el rendimiento ha sido muy alta, destacando la influencia de *VRN-H1* en rendimiento, a pesar de que sus efectos en floración en los ensayos de campo fueran escasos. Por tanto, la influencia de *VRN-H1* en rendimiento podría ser a consecuencia de otros factores, como su cercanía al gen de resistencia a frío *Fr-H1* más que las diferencias en fecha de espigado.
10. La presencia de *Eam6* en la población tuvo una gran relevancia tanto en floración, como en rendimiento y sus parámetros, siendo Barbarrosa quien porta el alelo de precocidad intrínseca. Esto reafirma la importancia de este gen bajo condiciones Mediterráneas para incrementar el

rendimiento, salvando la sequía terminal del ciclo, en beneficio de un correcto llenado de grano. Viéndose que, en general, bajo las condiciones de este estudio, los alelos que incrementan los parámetros de llenado de grano tienen una repercusión positiva en el rendimiento, mientras que un mayor número de granos por espiga y longitud de esta repercuten negativamente. En este sentido se comportan de manera similar a *Eam6*, tanto *denso* como *PPD-H1*.

11. Se ha encontrado bajo las condiciones de este estudio un beneficio con respecto a *PPD-H2*, para el cual el gen activo ha sido beneficioso tanto para peso específico, por tanto, un correcto llenado de grano, como para el desarrollo vegetativo, en cuanto a una mayor altura de las plantas, cuando la sequía terminal del ciclo no fue extrema (2008) y bajo siembra primaveral cuando las plantas estuvieron expuestas solamente a fotoperiodos largos. A pesar de que este gen se ha considerado de sensibilidad a fotoperiodo corto, por lo que su función podría ir más allá de las primeras fases del ciclo del cultivo, repercutiendo en el llenado/calidad de grano.



## *BIBLIOGRAFÍA*

# Bibliografía

---

- Akar T, Francia E, Tondelli A, Rizza F, Stanca AM, Peccioni P. 2009. Marker-assisted characterization of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed* 128:381–386.
- Andrés F, Coupland G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*. 13: 627–639.
- Appleyard M, Kirby EJM, Fellowes G. 1982. Relationships between the duration of phases in the pre-anthesis life cycle of spring barley. *Aust. J. Agric. Res.* 33: 917–925.
- Aspinall D. 1961. The control of tillering in the barley plant. *Aust. J. Biol. Sci.* 14:917-925.
- Barley world. <http://barleyworld.org/oregonwolfe.php>
- Blattner FR. 2018. Taxonomy of the Genus *Hordeum* and Barley (*Hordeum vulgare*). En: Stein N, Muehlbauer G. (eds) *The Barley Genome. Compendium of Plant Genomes*.
- Börner A, Korzun V, Malyshev S, Ivandic V, Graner A. 1999. Molecular mapping of two dwarfing genes differing in their GA response on chromosome 2H of barley. *Theor. Appl. Genet.* 99:670–675.
- Börner A, Worland A.J, Plaschke J, Schumann E, Law C.N. 1993. Pleiotropic effects of genes for reduced height (*Rht*) and day-length insensitivity (*Ppd*) on yield and its components for wheat grown in middle Europe. *Plant. Breed.* 111:204–216. Borràs G, Romagosa I, van Eeuwijk F, Slafer G. 2009. Genetic variability in the duration of pre-heading phases and relationships with leaf appearance and tillering dynamics in a barley population. *Field Crops Research.* 113, 95-104.
- Borràs-Gelonch G, Slafer GA, Casas A, van Eeuwijk F, Romagosa I. 2010. Genetic control of pre-heading phases and other traits related to development in a double haploid barley population (*Hordeum vulgare* L.). *Field Crops Research* 119, 36-47.
- Borràs-Gelonch G, Denti M, Thomas WTB, Romagosa I. 2012. Genetic control of pre-heading phases in the Steptoe x Morex barley population under different conditions of photoperiod and temperature. *Euphytica* 183, 303-321.

- Boyd WJR. 1996. Developmental variation, adaptation and yield determination in spring barley. In: A. Skinlard, G. Scoles, and B. Rossnagel (eds), Proceedings of the V International Oat Congress and VII Barley Genetics Symposium. 276—283. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- Boyd WJR, Li CD, Grime CR, Cakir M, Potipibool S, Kaveeta L, Men S, Kamali MRJ, Barr AR, Moody DB, Lance RCM, Logue SJ, Raman H, Rea BJ. 2003. Conventional and molecular genetic analysis of factors contributing to variation in the timing of heading among spring barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes grown over a mild winter growing season. Australian Journal of Agricultural Research. 54:1277-1301.
- Briggs DF. 1978. Barley. Chapman Hall, London, 612 p.
- Campoli C, Shtaya M, Davis SJ, von Korff M. 2012. Expression conservation within the circadian clock of a monocot: natural variation at barley Ppd-H1 affects circadian expression of flowering time genes, but not clock orthologs. BMC Plant Biology. 12: 97.
- Campoli C, von Korff M. 2014. Genetic Control of Reproductive Development in Temperate Cereals. In: Fornara F, ed. Advances in Botanical Research, Amsterdam: Elsevier. 72: 131-158.
- Casao MC, Igartua E, Karsai I, Lasa JM, Gracia MP, Casas AM. 2011a. Expression analysis of vernalization and day-length response genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) indicates that *VRNH2* is a repressor of *PPDH2* (*HvFT3*) under long days. Journal of Experimental Botany. 62: 1939–1949.
- Casao MC, Karsai I, Igartua E, Gracia MP, Veisz O, Casas AM. 2011b. Adaptation of barley to mild winters: A role for *PPDH2*. BMC Plant Biology. 11: 164.
- Casao MC, Igartua E, Karsai I, Bhat PR, Noelia Cuadrado N, Gracia MP, Lasa JM, Casas AM. 2011c. Introgression of an intermediate *VRNH1* allele in barley (*Hordeum vulgare* L.) leads to reduced vernalization requirement without affecting freezing tolerance. Mol Breeding. 28: 475.
- Casas AM, Igartua E, Vallés MP, Molina-Cano JL. 1998. Genetic diversity of barley cultivars grown in Spain, estimated by RFLP, similarity and coancestry coefficients. Plant Breeding. 117: 429-435.
- Casas AM, Yahiaoui S, Ciudad FJ, Molina-Cano JL, Karsai I, Meszaros K, Lasa JM, Gracia MP, Hayes PM, Igartua E, Szúcs P. 2008. Vrn-H1 and Vrn-H2 allelic diversity in barley may explain specific adaptation to the Mediterranean environments. In: Cereal science and

technology for feeding ten billion people: Genomics era and beyond. Eds: J.L. Molina Cano, P. Christou, A. Graner, K. Hammer, N. Jouve, B. Keller, J.M. Lasa, W. Powell, C. Royo, P. Shewry, A.M. Stanca. Zaragoza, CIHEAM/IRTA. Options Méditerranéennes, Serie A, No. 81, pp.105-109.

- Casas AM, Djemel A, Ciudad FJ, Yahiaoui S, Ponce LJ, Contreras-Moreira B, Gracia MP, Lasa JM, Igartua E. 2011. *HvFT1 (VrnH3)* drives latitudinal adaptation in Spanish barleys. *Theor Appl Genet.* 112: 1293-1304.
- Chandler PM, Harding CA. 2013. ‘Overgrowth’ mutants in barley and wheat: new alleles and phenotypes of the ‘Green Revolution’ DELLA gene. *J. Exp. Bot.* 64:1603–1613.
- Cistué, L., Cuesta-Marcos A., Chao S, Chutimanitsakun Y, Corey A, Echávarri B, Filichkina T, Garcia-Mariño N, Romagosa I, Hayes PM. 2011. Comparative mapping of the Oregon Wolfe Barley using doubled haploid lines derived from female and male gametes. *Theor. Appl Genet.* 122:1399-1410.
- Cockram J, Thiel T, Steuernagel B, Stein N, Taudien S, Bailey PC, O’Sullivan DM. 2012. Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the Poaceae. *PLoS ONE.* 7: e45307.
- Comadran J, Kilian B, Russell J, Ramsay L, Stein N, Ganai M, Shaw P, Bayer M, Thomas W, Marshall D, Hedley P, Tondelli A, Pecchioni N, Francia E, Korzun V, Walther A, Waugh R. 2012. Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat Genet.* 44(12):1388-92.
- Comadran J, Russell JR, Booth A, Pswarayi A, Ceccarelli S, Grando S, Stanca AM, Pecchioni N, Akar T, Al-Yassin A, Benbelkacem A, Ouabbou H, Bort J, van Eeuwijk FA, Thomas WTB, Romagosa I. 2011. Mixed model association scans of multi-environmental trial data reveal major loci controlling yield and yield related traits in *Hordeum vulgare* in Mediterranean environments. *Theor. Appl. Genet.* 122:1363–1373.
- Cubero JI, Flores F. 2003. Métodos estadísticos para el estudio de la estabilidad varietal en los ensayos agrícolas. 2a Edición. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. 197 pp.
- Cubero JI. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2003. Ed Mundi-Prensa. 565 pp.
- Cuesta-Marcos A, Igartua E, Ciudad F.J, Codesal P, Russell J.R, Molina-Cano J.L, Moralejo M, Szűcs P, Gracia MP, Lasa JM, Casas AM. 2008a. Heading date QTL in a springxwinter barley cross evaluated in Mediterranean environments. *Molecular Breeding.* 21:455–471.

- Cuesta-Marcos A, Casas AM, Yahiaoui S, Gracia MP, Lasa J.M. y Igartua E. 2008b. Joint analysis for heading date QTL in small interconnected barley populations. *Molecular Breeding*. 21:383-399.
- Cuesta-Marcos A, Casas AM, Hayes PM, Gracia MP, Lasa JM, Ciudad F, Codesal P, Molina-Cano JL, Igartua E. 2009. Yield QTL affected by heading date in Mediterranean grown barley. *Plant Breeding*. 128: 46–53.
- Cuesta-Marcos A, Muñoz-Amatrián M, Filichkin T, Karsai I, Trevaskis B, Yasuda S, Hayes P, Sato K. 2015. The relationships between development and low temperature tolerance in barley near isogenic lines differing for flowering behavior. *Plant and Cell Physiology*. 56: 2312–2324.
- Dale JE, Wilson RG. 1979. The effects of photoperiod and mineral nutrient supply on growth and primordial production at the stem apex of barley seedling. *Ann. Bot.* 44:537-546.
- Digel B, Pankin A, von Korff M. 2015. Global transcriptome profiling of developing leaf and shoot apices reveals distinct genetic and environmental control of floral transition and inflorescence development in barley. *The Plant Cell*. 27: 2318–2334.
- Doležel J, Binarová P, Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol. Plant*. 31:113–120.
- Druka A, Franckowiak J, Lundqvist U, Bonar N, Alexander J, Houston K, Radovic S, Shahinnia F, Vendramin V, Morgante M, Stein N, Waugh R. 2011. Genetic dissection of barley morphology and development. *Plant Physiol*. 155:617–627.
- Dunford RP, Griffiths S, Christodoulou V, Laurie DA. 2005. Characterisation of a barley (*Hordeum vulgare* L.) homologue of the Arabidopsis flowering time regulator GIGANTEA. 110(5):925-931.
- Ellis RH, Roberts EH, Summerfield RJ, Cooper JP. 1988. Environmental control of flowering in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Rate of development as a function of temperature and photoperiod and its modification by low-temperature vernalization. *Ann. Bot.* 62: 145-158.
- EMBL-Bank. <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
- Eurostat. [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural\\_production\\_-\\_crops](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_production_-_crops)

- Fageria, N. K., Baligar, V. C., & Jones, C. A. 2011. Growth and mineral nutrition of field crops (3rd ed.). Boca Raton: CRC.
- FAOSTAT. 2016. Database Collections. <http://faostat.fao.org/>
- Faure S, Higgins J, Turner A, y Laurie DA. 2007. The FLOWERING LOCUS T-Like Gene Family in Barley (*Hordeum vulgare*). Genetics. 176(1): 599–609.
- Fischer RA. 2008. The importance of grain or kernel number in wheat: a reply to Sinclair and Jamieson. Field Crops Res. 105: 15–21.
- Fischer RA. 2007. Understanding the physiological basis of yield potential in wheat. J. Agric. Sci. 145: 99–113.
- Foster AE, Thompson AP. 1987. Effects of a semidwarf gene from Jotun on agronomic and quality traits of barley. p. 979–982. In S. Yasuda and T. Kanishi (ed.) Barley Genet. V., Proc. Int. Barley Genet. Symp., 5th Okayama, Japan. 6–11 Oct. 1986. Sanyo - Press Co., Okayama, Japan.
- Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. Plant Physiol. 127: 1676-1681.
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Tóth B, Hayes PM, Skinner JS, Pecchioni N. 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a "Nure" (winter) x "tremois" (spring) barley map. Theor. Appl. Genet. 108: 670-680.
- Francia E, Barabaschi D, Tondelli A, Laidò G, Rizza F, Stanca AM, Busconi M, Fogher C, Stockinger EJ, Pecchioni N. 2007. Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus *Fr-H2* in barley. Theor Appl Genet. 115:1083–1091.
- Francia E, Tondelli A, Rizza F, et al. 2011. Determinants of barley grain yield in a wide range of Mediterranean environments. Field Crops Research. 120: 169–178.
- Franckowiak JD, Lundqvist U. 1997. BGS6. Barley Genetics Newsletter, No. 26. Department of Agronomy, Colorado State University, Fort Collins, Colo. 49–50.

- Franckowiak JD, Lundqvist U. 2012. Descriptions of barley genetic stocks for 2012. *Barley Genet. Newsl.* 42:36–173.
- Fu D, Szücs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM, Dubcovsky J. 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Genet. Genomics.* 273(1): 54-65.
- García del Moral LF, Ramos JM. 1989. Fisiología de la producción de grano. En: *La cebada: Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales.* Molina Cano JL. 1989. 137-178.
- García del Moral LF, Miralles DJ, Slafer G. 2002. Initiation and appearance of vegetative and reproductive structures throughout barley development. En: Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I. (Eds.), *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality.* Food Product Press, New York. 2002pp. 243–267.
- Gauch HG, Zobel RW. 1996. AMMI analysis of yield trials. En: Kang M.S. y Gauch H.G. (eds) *Genotype-by-environment Interaction.* CRC Press. 1996. pp. 85-122.
- Gauch HG. 1988. Model selection and validation for yield trials with interaction. *Biometrics.* 44: 705-715.
- Gauch HG. 1992. *Statistical analysis of regional yield trials: AMMI analysis of factorial designs.* Elsevier, Netherlands, Amsterdam. 278.
- Gollob HF. 1968. A statistical model that combines features of factor analysis and analysis of variance techniques. *Psychometrika.* 33:73-115.
- Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2002. Vernalization and photoperiod responses in wheat pre-flowering reproductive phases. *Field Crops Res.* 74: 183–195.
- Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2003a. Floret development and spike growth as affected by photoperiod during stem elongation in wheat. *Field Crops Res.* 81: 29–38.
- Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2003b. Grain and floret number in response to photoperiod during stem elongation in fully and slightly vernalized wheats. *Field Crops Res.* 81:17–27.

- GrainGenes. The Steptoe × Morex Barley Mapping Population. <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SxM/>
- Greenup AG, Sasani S, Oliver SN, Talbot MJ, Dennis ES, Hemming MN, Trevaskis B. 2010. *ODDSOC2* is a MADS box floral repressor that is down-regulated by vernalization in temperate cereals. *Plant Physiology*. 153: 1062–1073.
- Griffiths S, Dunford R.P, Coupland G. y Laurie D.A. 2003. The Evolution of CONSTANS-Like Gene Families in Barley, Rice, and Arabidopsis. *Plant Physiol*. 131: 1855-1867.
- Halse N.J, Weir R.N. 1970. Effect of vernalization, photoperiod and temperature on phenological development and spikelet number of Australian wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 21:383-393.
- HarvEST. Barley. <http://harvest.ucr.edu>
- Haun JR. 1973. Visual Quantification of Wheat Development. *Agron. J.* 65:116-119.
- Hayama R, Sarid Krebs L, Richter R, Fernández V, Jang S, Coupland G. 2017. PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length. *The EMBO Journal*. 36: 904–918.
- Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B. 2008. Low-temperature and daylength cues are integrated to regulate FLOWERING LOCUS T in barley. *Plant Physiol*. 147(1):355-66.
- Hemming MN, Fieg S, James Peacock W, Dennis ES, Trevaskis B. 2009. Regions associated with repression of the barley (*Hordeum vulgare*) VERNALIZATION1 gene are not required for cold induction. *Molecular Genetics and Genomics*. 282: 107–117.
- Hemming MN, Walford SA, Fieg S, Dennis ES, Trevaskis B. 2012. Identification of high-temperature-responsive genes in cereals. *Plant Physiology*. 158: 1439–1450.
- Igartua E, Gracia MP, Lasa JM, Medina B, Molina-Cano JL, Montoya JL, Romagosa I. 1998. The Spanish barley core collection. *Genet Resour Crop Evol* 45: 475–481.
- Igartua E, Gracia MP, Lasa JM, Yahiaoui S, Casao MC, Molina-Cano JL, Moralejo M, Montoya JL, Ciudad FJ, Kopahnke D, Ordon F, Karsai I, Szücs P, Casas AM. 2010. Barley adaptation to Mediterranean conditions: lessons learned from the Spanish landraces. En: Ceccarelli, S. and

Grando, S. (eds) 2010. Proceedings of the 10th International Barley. Genetics Symposium, 5-10 April 2008, Alexandria, Egypt. ICARDA, PO Box 5466, Aleppo, Syria, p 205-214.

- Jansen J, De Jong AG, Van Ooijen JW. 2001. Constructing dense genetic linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1113-1122.
- Jansen RC, Stam P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics.* 136: 1447-1455.
- Jansen RC. 1994. Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics.* 138: 871-881.
- Jansen RC. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics.* 135: 205-211.
- Jansen RC, Van Ooijen JW, Stam P, Lister C, Dean C. 1995. Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 91: 33-37.
- Jones H, Leigh FJ, Mackay I, Bower MA, Smith LMJ, Charles MP, Jones G, Jones MK, Brown TA, Powell W. 2008. Population-based resequencing reveals that the flowering time adaptation of cultivated barley originated East of the Fertile Crescent. *Mol Biol Evol.* 25: 2211-2219.
- Jia Q, Zhang J, Westcott S, Zhang XQ, Bellgard M, Lance R y Li C. 2009. *GA-20 oxidase* as a candidate for the semidwarf gene *sdw1/denso* in barley. *Funct Integr Genomics.* 9(2): 255-62.
- Karsai I, Meszaros K, Szucs P, Hayes PM, Lang L, Bedo Z. 2006. The influence of photoperiod on the *Vrn-H2* locus (4H) which is a major determinant of plant development and reproductive fitness traits in a facultative x winter barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Plant Breeding.* 125: 468-472.
- Karsai I, Szucs P, Koszegi B, Hayes PM, Casas AM, Bedo Z, Veisz O. 2008. Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: A genetical phenomics approach. *Journal of Experimental Botany.* 59: 2707-2715.
- Karsai I, Szucs P, Mészáros K, Filichkina T, Hayes PM, Skinner JS, Láng L, Bedo Z. 2005. The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative x winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theoretical and Applied Genetics.* 110: 1458-1466.

- Karsai I, Mészáros K, Láng L, Hayes PM, Bedö Z. 2001. Multivariate analysis of traits determining adaptation in cultivated barley. *Plant Breed.* 120: 217-222.
- Kernich GC, Halloran GM, Flood RG. 1995. Variation in development patterns of wild barley (*Hordeum spontaneum* L.) and cultivated barley (*H. vulgare* L.). *Euphytica.* 82: 105–115.
- Kernich GC, Halloran GM, Flood RG. 1997. Variation in duration of pre-anthesis phases of development in barley (*Hordeum vulgare*). *Aust. J. Agric. Res.* 48: 59–66.
- Kikuchi R, Kawahigashi H, Ando T, Tonooka T, Handa H. 2009. Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering. *Plant Physiology.* 149: 1341–1353.
- Kikuchi R, Kawahigashi H, Oshima M, Ando T, Handa H. 2012. The differential expression of HvCO9, a member of the *CONSTANS-like* gene family, contributes to the control of flowering under short-day conditions in barley. *Journal of Experimental Botany.* 63: 773–784.
- Kirby EJM, Appleyard M, Simpson NA. 1994. Co-ordination of stem elongation and Zadoks growth stages with leaf emergence in wheat and barley. *J Agri Sci* 122:21–29.
- Kirby EJM, Appleyard M. 1981. Cereal development guide. Publicado por la Unidad de Cereales del National Agricultural Center. Stoneleigh, Kenilworth, Warwickshire, England.
- Kirby EJM. 1988. Analysis of leaf, stem and ear growth in wheat from terminal spikelet initiation to anthesis. *Field Crops Res.* 18; 127–140.
- Klepper B, Rickman RW, Peterson CM. 1982. Quantitative characterization of vegetative development in small cereal grains. *Agron. J.* 74: 789-792.
- Knox AK, Dhillon T, Cheng H, Tondelli A, Pecchioni N, Stockinger EJ. 2010. CBF gene copy number variation at *Frost Resistance-2* is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. *Theor Appl Genet.* 121: 21–35.
- Komatsuda T, Nakamura I, Takaiwa F, Oka S. 1998. Development of STS markers closely linked to the *vrs1* locus in barley, *Hordeum vulgare*. *Genome.* 41: 680–685.

- Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Yano M. 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:1424–1429.
- Koppolu R, Anwar N, Sakuma S, Tagiri A, Lundqvist U, Pourkheirandish M, Rutten T, Seiler C, Himmelbach A, Ariyadasa R, Youssef HM, Stein N, Sreenivasulu N, Komatsuda T, Schnurbusch T. 2013. Six-rowed spike4 (*Vrs4*) controls spikelet determinacy and row-type in barley. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:13198–13203.
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172–175.
- Lasa JM, Igartua E, Ciudad FJ, Codesal P, García EV, Gracia MP, Medina B, Romagosa I, Molinacano JL, Montoya JL. 2001. Morphological and agronomical diversity patterns in the Spanish barley core collection. *Hereditas.* 135: 217-225.
- Laurie DA, Pratchett N, Snape JW, Bezant JH. 1995. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome.* 38(3): 575-85.
- Liu ZW, Biyashev RM, Saghai Maroof MA. 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93: 869-876.
- Loss SP, Siddique KHM. 1994. Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. *Advances in Agronomy.* 52: 229-275.
- Lundqvist U, Franckowiak JD, Konishi T. 1997. New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genet. Newsl.* 26:22–516.
- Lundqvist U, Lundqvist A. 1988. Induced intermedium mutants in barley: origin, morphology and inheritance. *Hereditas.* 108:13–26.
- Lynch M, Walsh B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Mahfoozi S, Limin AE, Fowler DB. 2001. Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. *Crop Sci.* 41: 1006-1011.
- Malosetti M, Voltas J, Romagosa I, Ullrich SE, van Eeuwijk FA. 2004. Mixed models including environmental variables for studying QTL by environment interaction. *Euphytica.* 137: 139- 145.
- Mandel J. 1971. A new analysis of variance model for non additive data. *Technometrics.* 13: 1-18.
- Mansour E, Casas AM, Gracia MP, Molina-Cano JL, Moralejo M, Cattivelli L, Thomas WTB, Igartua E. 2014. Quantitative trait loci for agronomic traits in an elite barley population for Mediterranean conditions. *Molecular Breeding.* 33: 249–265.
- Marcel TC, Varshney RK, Barbieri M, Jafary H, de Kock MJD, Graner A, Niks, RE. 2007. A High-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theor. Appl. Genet.* 114: 487–500.
- Mascher M, Schuenemann VJ, Davidovich U, Marom N, Himmelbach A, Hübner S, Korol A, David M, Reiter E, Riehl S, Schreiber M, Vohr SH, Green RE, Dawson IK, Russell J, Kilian B, Muehlbauer GJ, Waugh R, Fahima T, Krause J, Weiss E, Stein N. 2016. Genomic analysis of 6,000-year-old cultivated grain illuminates the domestication history of barley. *Nat Genet.* 48:1089-1093.
- Miralles DJ, Richards RA, Slafer GA. 2000. Duration of the stem elongation period influences the number of fertile florets in wheat and barley. *Aust. J. Plant Phys.* 27: 931–940.
- Miralles DJ, Slafer GA. 2007. Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *J. Agric. Sci.* 145: 139–149.
- Miralles DJ, Richards RA. 2000. Responses of leaf and tiller emergence and primordium initiation in wheat and barley to interchanged photoperiod. *Ann. Bot.* 85: 655–663.
- Molina-Cano JL, Igartua E, Casas AM, Moralejo M. 2002. New views on the origin of cultivated barley. En: *Barley Science. Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality.* Ed. Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I. Haworth Press, New York, 15-29.

- Moralejo M, Swanston JS, Muñoz P, Prada D, Elía M, Russell JR, Ramsay L, Cistué L, Codesal P, Casas AM, Romagosa I, Powell W, Molina-Cano JL. 2004. Use of new EST markers to elucidate the genetic differences in grain protein content between European and North American two-rowed malting barleys. *Theor. Appl. Genet.* 110(1): 116-25.
- Mulki MA, Von Korff M. 2016. CONSTANS controls oral repression by up-regulating VERNALIZATION2 (VRN-H2) in barley. *Plant. Physiol.* 170:325–337.
- Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, Yano M, Ogihara Y. 2003. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *Plant Journal.* 36: 82–93.
- Nevo E, Chen G. 2010. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment.* 33: 670–685.
- Newton AC, Flavell AJ, George TS, Leat Ph, Mullholland B, Ramsay L, Revoredo-Giha C, Russell J, Steffenson BJ, Swanston JT, Thomas WB, Waugh R, White, Ph, Bingham IJ. 2011. Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Sec.* 3:141–178.
- Nishikawa T, Komatsuda T, von Bothmer R, Kadowaki K. 2001. Molecular phylogeny in the genus *Hordeum* using three sequences of chloroplast DNA. En: *Proceedings of the 4th International Triticeae Symposium.* 2001. Consejería de Agricultura y Pesca. Córdoba. España. pp. 91-93.
- Oliver SN, Finnegan EJ, Dennis ES, Peacock WJ, Trevaskis B. 2009. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(20):8386-91.
- Oregon Wolfe Barley (OWB) <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/maps/OWB/>
- Pasquariello M, Barabaschi D, Himmelbach A, Steuernagel B, Ariyadasa R, Stein N, Gandolfi F, Tenedini E, Bernardis I, Tagliafico E, Pecchioni N, Francia E. 2014. The barley Frost resistance-H2 locus. *Funct. Integr. Genomics.* 14:85–100.

- Payne RW, Murray DA, Harding SA Baird DB, Soutar DM. 2009. GenStat for Windows (12th Edition) Introduction. VSN International, Hemel Hempstead.
- Peltonen-Sainio P, Kangas A, Salo Y, Jauhiainen L. 2007. Grain number dominates grain weight in temperate cereal yield determination: evidence based on 30 years of multi-location trials. *Field Crops Res.* 100:179–188.
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F. 1999. ‘Green Revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 400:256–261.
- Pérez de la Vega M, Fratini R, Muehlbauer FJ. 2011. Lentil. En: Pérez de la Vega M, Torres AM, Cubero JI, Kole C (eds) *Genomics and Breeding of Cool Season Grain Legumes.* Science Publishers. 448 pp.
- Ponce-Molina LJ, Casas AM, Gracia MP, Silvar C, Mansour E, Thomas WBT, Schweizer G, Herz M, Igartua E. 2012. Quantitative trait loci and candidate loci for heading date in a large population of a wide barley cross. *Crop Science.* 52: 2469–2480.
- Ramsay L, Comadran J, Druka A, Marshall D.F, Thomas W.T, Macaulay M, MacKenzie K, Simpson C, Fuller J, Bonar N, Hayes P.M, Lundqvist U, Franckowiak JD, Close TJ, Muehlbauer GJ, Waugh R. 2011. *INTERMEDIUM-C*, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene *TEOSINTE BRANCHED 1*. *Nat. Genet.* 43:169–172.
- Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards K.J, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmioli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W. y Waugh R. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics.* 156(4):1997-2005.
- Rizza F, Pagani D, Gut M, Prášil IT, C. Lago C, Tondelli A, Orrù L, Mazzucotelli E, Francia, Badeck FW, Crosatti C, Terzi V, Cattivelli L, Stanca AM. 2011. Diversity in the response to low temperature in representative barley genotypes cultivated in Europe. *Crop Sci.* 51:2759–2779.
- Rizza F, Karsai I, Morcia C, Badeck F-W, Terzi V, Pagani D, Kiss T, Stanca AM. 2016. Association between the allele compositions of major plant developmental genes and frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of different origin. *Molecular Breeding.* 36: 156.

- Roberts EH, Summerfield RJ, Cooper JP, Ellis RH. 1988. Environmental control of flowering in barley (*Hordeum vulgare* L.). I. Photoperiod limits to long-day responses, photoperiod-insensitive phases and effects of low temperature and short-day vernalization. *Ann. Bot.* 62: 127-144.
- Romagosa I, Voltás J, Malosetti M, van Eeuwijk FA. 2008. Interacción genotipo por ambiente. En: Ávila Gómez CM, Atienza Peñas SG, Moreno Yangüela MT, Cubero Salmerón JI (eds) La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. Junta de Andalucía, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera Consejería de Agricultura y Pesca, Andalucía, Spain. 2008. pp. 107-135.
- Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Booth A, Svensson JT, 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. *Mol. Genet. Genomics.* 274(5): 515-27.
- Ruelens P, de Maagd R a, Proost S, Theißen G, Geuten K, Kaufmann K. 2013. *FLOWERING LOCUS C* in monocots and the tandem origin of angiosperm-specific MADS-box genes. *Nature Communications.* 4: 2280.
- Sameri M, Pourkheirandish M, Chen G, Tonooka T, Komatsuda T. 2011. Detection of photoperiod responsive and non-responsive flowering time QTL in barley. *Breeding Science.* 61:183–188.
- Sasani S, Hemming MN, Oliver SN, Greenup A, Tavakkol-Afshari R, Mahfoozi S, Poustini K, Sharifi HR, Dennis ES, Peacock WJ, Trevaskis B. 2009. The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *J. Exp. Bot.* 60(7): 2169-78.
- Saville RJ, Gosman N, Burt C.J, Makepeace J, Steed A, Corbitt M, Chandler E, Brown JK, Boulton MI, Nicholson P. 2012. The ‘Green Revolution’ dwarfing genes play a role in disease resistance in *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 63:1271–1283.
- Schulte D, Close TJ, Graner A, Langridge P, Matsumoto T, Muehlbauer G, Sato K, Schulman AH, Waugh R, Wise RP, Stein N. 2009. The international barley sequencing consortium at the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant. Physiol.* 149: 142-147.
- Sears RG, Kronstad WE, Metzger RJ. 1981. Inheritance of Dwarf and Semidwarf Plant Height in Barley. *Crop. Sci.* 21: 828-833.

- Sharma N, Ruelens P, Dhauw M, Maggen T, Dochy N, Torfs S, Kaufmann K, Rohde A, Geuten K. 2017. A Flowering time locus C homolog is a vernalization- regulated repressor in *Brachypodium* and is cold-regulated in wheat. *Plant Physiology*. 173: 1301–1315.
- Skinner J S, Szücs P, von Zitzewitz J, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, thomashow MF, Stockinger EJ, Chen THH, Hayes PM. 2006. Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in *Arabidopsis*. *Theor. Appl. Genet.* 6112: 832-842.
- Slafer GA, Abeledo LG, Miralles DJ, Gonzalez FG, Whitechurch EM. 2001. Photoperiod sensitivity during stem elongation as an avenue to raise potential yield in wheat. *Euphytica*. 119: 191–197.
- Slafer GA, Araus JL, Royo C, García del Moral LF. 2005. Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments. *Annals of Applied Biology*. 46: 61-70.
- Slafer GA, Calderini DF, Miralles DJ. 1996. Yield components in wheat: opportunities for further increasing yield potential. En: Reynolds MP, Rajaram S, McNab A. (Eds.), *Increasing Yield Potential in Wheat: Breaking the Barriers*. CYMMIT, Mexico, DF. 101–133.
- Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I. 2002. *Barley Science. Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality*. Ed. Haworth Press. Capítulo 3.
- Slafer GA, Rawson HM. 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 393-426.
- Slafer GA. 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142: 117–128.
- Song YH, Shim JS, Kinmonth-Schultz HA, Imaizumi T. 2015. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annual Review of Plant Biology*. 66: 441–464.
- Sorrells ME, LaRota M, Bermudez-Kandianis CE, Greene R.A, Kantety R, Munkvold JD, Miftahudin, Mahmoud A, Ma X, Gustafson PJ, Qi LL, Echalié B, Gill BS, Matthews DE, Lazo GR, Chao S, Anderson OD, Edwards H, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvorak J, Zhang D, Nguyen HT, Peng J, Lapitan NL, Gonzalez-Hernandez JL, Anderson JA, Hossain K, Kalavacharla V,

Kianian SF, Choi DW, Close TJ, Dilbirligi M, Gill KS, Steber C, Walker-Simmons MK, McGuire PE, Qualset CO. 2003. Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Research*. 13: 1818–1827.

- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal*. 3: 739-744.
- Stoesser G, Baker W, van den Broek A, Camon E, Garcia-Pastor M, Kanz C, Kulikova T, Leinonen R, Lin Q, Lombard V, Lopez R, Redaschi N, Store P, Tuli M.A, Tzouvara K, Vaughan R. 2002. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic. Acids. Res.* 30: 21–26.
- Szücs P, Blake VC, Bhat PR, Close TJ, Cuesta-Marcos A, Muehlbauer GJ, Ramsay LV, Waugh R, Hayes PM. 2009. An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *The Plant Genome*. 2: 134–140.
- Szücs P, Karsai I, von Zitzewitz J, Mészáros K, Cooper LL, Gu YQ, Chen TH, Hayes PM, Skinner JS. 2006. Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. *Theor. Appl. Genet.* 112(7): 1277-85.
- Szücs P, Skinner JS, Karsai I, Cuesta-Marcos A, Haggard KG, Corey AE, Chen TH, Hayes PM. 2007. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol. Genet. Genomics*. 277(3): 249-61.
- Tao F, Rötter RP, Palosuo T, et al. 2017. Designing future barley ideotypes using a crop model ensemble. *European Journal of Agronomy*. 82: 144–162.
- Tester M, Langridge P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*. 327: 818-822.
- The International Wheat Genome Sequencing C. 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 345:1251788.
- Thompson WJ, Mathews S. 1981. The effect of daylength and sowing on ear development in barley cultivars. *Barley Genetics IV. Proceedings of the 4th International Barley Genetics Symposium*. pp 518-526. Edinburgh, UK.

- Tondelli A, Francia E, Visioni A, et al. 2014. QTLs for barley yield adaptation to Mediterranean environments in the 'Nure' × 'Tremois' biparental population. *Euphytica*. 197: 73–86.
- Trevaskis B, Bagnall DJ, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES. 2003. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(22): 13099-104.
- Trevaskis B, Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES. 2006. *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiology*. 140: 1397–1405.
- Trevaskis B. 2010. The central role of the *VERNALIZATION1* gene in the vernalization response of cereals. *Functional Plant Biology*. 37: 479–487.
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA. 2005. The Pseudo-Response Regulator *Ppd-H1* Provides Adaptation to Photoperiod in Barley. *Science*. 310(5750): 1031-1034.
- Turner AS, Faure S, Zhang Y, Laurie DA. 2013. The effect of day-neutral mutations in barley and wheat on the interaction between photoperiod and vernalization. *Theoretical and Applied Genetics*. 126: 2267–2277.
- Van Eeuwijk FA, Malosetti M, Yin X, Struik PC, Stam P. 2005. Statistical models for genotype by environment data: from conventional ANOVA models to eco-physiological QTL models. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56: 1-12.
- Van Ooijen JW, 2006. JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V, Wageningen, Netherlands.
- Van Ooijen JW. 2009. MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V, Wageningen, Netherlands.
- Varshney RK, Grosse I, Hähnel U, Siefken R, Prasad M, Stein N, Langridge P, Altschmied L. y Graner A. 2006. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non-uniform distribution of genes in the barley genome. *Theor. Appl. Genet.* 113(2):239-50.
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE y Graner A. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor. Appl. Genet.* 114(6): 1091-103.

- Voltas J, van Eeuwijk FA, Sombrero A, Lafarga A, Igartua E, Romagosa I. 1999a. Integrating statistical and ecophysiological analysis of genotype by environment interaction for grain filling of barley in Mediterranean areas I. Individual grain weight. *Field Crops Research*. 62: 63-74.
- Voltas J, van Eeuwijk FA, Araus JL, Romagosa I. 1999b. Integrating statistical and ecophysiological analysis of genotype by environment interaction for grain filling of barley in Mediterranean areas II. Grain growth. *Field Crops Research*. 62: 75-84.
- Voltas J, van Eeuwijk F, Igartua E, García del Moral L, Molina-Cano JL, and Romagosa I. 2002. Genotype by environment interaction and adaptation in barley breeding: basic concepts and methods of analysis. En: Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, and Romagosa I (eds), *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. 2002. 205—241. Food Product Press, New York.
- von Zitzewitz J, Szücs P, Dubcovsky J, Yan L, Francia E, Pecchioni N, Casas AM, Chen TH, Hayes PM, Skinner JS. 2005. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant. Mol Biol*. 59(3): 449-67.
- Wenzl P, Li H, Carling J, Zhou M, Raman H, Paul E, Hearnden P, Maier C, Xia L, Caig V, Ovesná J, Cakir M, Poulsen D, Wang J, Raman R, Smith K.P, Muehlbauer G.J, Chalmers K.J, Kleinhofs A, Huttner E. y Kilian A. 2006. A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics*. 7:206.
- Whitechurch EM, Slafer GA, Miralles DJ. 2007. Variability in the duration of stem elongation in wheat and barley genotypes. *J Agron Crop Sci*. 193:138–145.
- Yahiaoui S, Igartua E, Moralejo M, Ramsay L, Molina-Cano JL, Ciudad FJ, Lasa JM, Gracia MP, Casas AM. 2008. Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barley. *Theor Appl Genet*. 116: 271–282.
- Yan GP, Chen XM. 2006. Molecular mapping of a recessive gene for resistance to stripe rust in barley. *Theor. Appl. Genet*. 113(3): 529-37.
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J. 2004. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*. 303(5664): 1640-1644.

- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 6263-6268.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research. 14: 415–421.
- Zobel RW, Wright MJ, Gauch HG. 1988. Statistical analysis of a yield trial. Agronomy Journal. 80: 388-393.

# *ANEXOS*

# ANEXO I

Interacciones calculadas usando modelos mixtos para los QTL detectados para las fases de pre-espigado en cada uno de los ambientes. Se han utilizado como elementos fijados los QTL significativos para cada carácter en cada uno de los ensayos por separado y a continuación se han añadido al modelo la/las interacciones QTLxQTL por separado. En la tabla 17 del capítulo tercero aparece un resumen de las interacciones significativas.

Caracter	Ambiente		L				S				VL				VS			
	Marcador e Interacciones	GL	Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
			Efectos adit.	error standard														
<b>Espigado</b>  (°C)	Constante		1201	19,7	1215	19,9	1782	4,6	1781	4,5	757,5	8,13	760,2	8,14	1564	0,3	1564	0,3
	HvFT3x 1H		-	-	-	-	-37,88	4,73	-35,48	4,774	-	-	-	-	-1,279	0,3425	-1,295	0,3305
	SNP22 2H1		125,6	44,43	135,7	43,63	25,86	9,74	19,46	9,977	148,8	17,73	138,5	17,64	-	-	-	-
	bPb_3677 2H1		-	-	-	-	20,82	5,919	19,84	5,857	40,8	10,923	34,83	10,742	1,424	0,424	1,431	0,4091
	Bmag0006 3H		-65,26	20,479	-71,42	20,156	-24,14	4,776	-23,61	4,719	-18,7	8,525	-19,84	8,295	-	-	-	-
	ZCCTHa 4H		-194,5	22,89	-180,7	22,89	-	-	-	-	-60,37	9,872	-55,26	9,828	-	-	-	-
	VRN_H1 5H		-210,1	21,65	-201	21,42	-	-	-	-	-67,63	8,996	-64,36	8,81	-0,8205	0,35353	-0,8368	0,3411
	SNP22.bPb_3677		-	-	-	-	-	-	26,78	11,166	-	-	65,21	19,071	-	-	-	-
	bPb_3677.VRN_H1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,596	0,4264
ZCCTHa.VRN_H1		-	-	73,34	24,759	-	-	-	-	-	-	22,77	10,331	-	-	-	-	
<b>Fase de Encañado</b>  (°C)	Constante		634	18,69	648,7	18,9	1081	8	-	-	246,5	4,5	251,9	4,52	539,3	8,17	542,1	8,11
	HvFT3x 1H		-	-	-	-	-60,79	8,184	-	-	3,945	46,874	4,004	45,018	-29,77	8,407	-28,66	8,287
	SNP22 2H1		-	-	-	-	-	-	-	-	46,57	9,81	63,14	10,526	-76,65	8,637	-75,37	8,517
	ZCCTHa 4H		-169,8	21,5	-155,4	21,55	-	-	-	-	-29,26	5,272	-28,67	5,231	-	-	22,84	8,776
	VRN_H1 5H		-222,3	20,19	-214,7	19,91	-29,96	8,408	-	-	-48,03	4,959	-46,07	4,81	-76,65	8,637	-75,37	8,517
	ZCCTHa.VRN_H1		-	-	70,94	23,296	-	-	-	-	-	-	17,33	5,559	-	-	-	-
HvFT3x.VRN_H1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,84	8,776	
<b>Fase de Elongación del Tallo Principal</b>  (°C)	Constante		518,5	2,67	-	-	633,7	4,71	-	-	445,1	4,11	444,2	3,89	867,2	6,54	868,4	6,36
	bPb_4832 1H		-	-	-	-	25,69	5,119	-	-	-	-	-	-	-13,61	7,065	-12,61	6,865
	SNP22 2H1		21,82	5,67	-	-	20,9	10,176	-	-	87,66	8,895	81,78	8,498	-	-	-	-
	bPb_5449 2H1		19,81	3,629	-	-	29,47	5,994	-	-	27,97	5,558	26,87	5,258	51,11	8,274	52,73	8,046
	ZCCTHa 4H		-14,77	3,217	-	-	-	-	-	-	-23,32	5,102	-24,21	4,826	-	-	-	-
	VRN_H1 5H		-	-	-	-	17,2	5,112	-	-	-13,84	4,53	-14,19	4,282	21,68	6,973	22,06	6,77
	SNP22.bPb_5449		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,72	9,256	-	-	-	-
bPb_5449.VRN_H1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,26	8,489	

Caracter	Ambiente		L				S				VL				VS			
	Marcador e Interacciones	GL	Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
			Efectos adit.	error standard														
Estado de Hoja Bandera (°C)	Constante		1140	19,7	1157	19,9	1712	4,3	1712	4,2	691,6	8,06	695	7,97	1433	7,4	1433	7,2
	HvFT3x	1H	-	-	-	-	-33,93	4,482	-31,17	4,514	-	-	-	-	-25,15	7,653	-23,78	7,369
	SNP22	2H1	116,5	42,7	129	41,73	23,65	9,346	19,34	9,31	142	17,5	135,5	16,87	-	-	-	-
	bPb_5449	2H1	-	-	-	-	23,62	5,531	22,57	5,445	38,49	10,937	33,62	10,512	43,82	9,397	43,53	9,086
	Bmag0006	3H	-65,67	20,585	-72,34	20,135	-21,11	4,539	-20,68	4,46	-21,44	8,438	-22,1	8,069	-	-	-	-
	ZCCTHa	4H	-194,5	22,86	-179,8	22,69	-	-	-	-	-57,64	10,006	-53,55	9,832	-	-	-	-
	VRN_H1	5H	-	-	-199,6	21,46	-9,047	46,988	-8,965	46,145	-63,29	8,908	-60,69	8,6	-19	7,884	-17,5	7,592
	SNP22.bPb_5449		-	-	-	-	-	-	28,58	10,387	-	-	76,27	18,415	-	-	-	-
	ZCCTHa.VRN_H1		-	-	81,23	24,571	-	-	-	-	-	-	23,23	10,2	-	-	-	-
	HvFT3x.bPb_5449		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,66	9,247
bPb_5449.VRN_H1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36,34	9,722	
Nº Hojas Basales	Constante		5,03	0,1484	5,169	0,1485	7,291	0,061	-	-	2,986	0,0139	2,991	0,0142	4,684	0,0401	4,697	0,0399
	HvFT3x	1H	-	-	-	-	-0,5077	0,06281	-	-	-	-	-	-	-0,1503	0,04129	-0,145	0,04078
	bPb_2230	2H1	-	-	-	-	-0,2602	0,11986	-	-	0,05655	0,027772	0,02654	0,032971	-	-	-	-
	ZCCTHa	4H	-1,305	0,1707	-1,17	0,1693	-	-	-	-	-0,08125	0,016274	-0,07094	0,016121	-	-	-	-
	VRN_H1	5H	-1,72	0,1603	-1,648	0,1564	-0,1876	0,06665	-	-	-0,1785	0,01536	-0,1729	0,01508	-0,376	0,04242	-0,37	0,04191
	bPb_2230.ZCCTHa		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0632	0,030184	-	-	-	-
	ZCCTHa.VRN_H1		-	-	0,6666	0,18306	-	-	-	-	-	-	0,0587	0,017707	-	-	-	-
HvFT3x.VRN_H1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1067	0,04318	
Nº Hojas del Tallo Principal	Constante		4,822	0,0318	-	-	5,735	0,0208	-	-	3,901	0,014	3,9	0,0137	5,772	0,078	-	-
	bPb_9656	1H	-	-	-	-	-0,08049	0,023538	-	-	-	-	-	-	-0,2227	0,088	-	-
	SNP22	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1639	0,03032	0,152	0,03006	-	-	-	-
	bPb_5449	2H1	0,215	0,04284	-	-	0,1598	0,02691	-	-	0,06456	0,018772	0,06242	0,01844	0,5132	0,10093	-	-
	ZCCTHa	4H	-0,2736	0,03878	-	-	-	-	-	-	-0,08094	0,017172	-0,0827	0,016866	-	-	-	-
	VRN_H1	5H	-0,178	0,03442	-	-	0,08974	0,021921	-	-	-0,03173	0,015337	-0,03258	0,015056	-	-	-	-
SNP22.bPb_5449		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09188	0,032778	-	-	-	-	
Filocrono (°C/Nº hojas)	Constante		123,3	0,72	-	-	137,5	0,51	137,6	0,5	109,4	0,87	-	-	152,7	1,72	-	-
	HvFT3x	1H	-	-	-	-	2,981	0,5206	2,972	0,515	-	-	-	-	6,415	17,748	-	-
	SNP22	2H1	4,586	15,818	-	-	3,087	10,691	4,165	11,617	13,6	1,879	-	-	-	-	-	-
	VRN_H1	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,772	0,9399	-	-	6,94	18,386	-	-
	HvFT3x.SNP22		-	-	-	-	-	-	-2,451	1,094	-	-	-	-	-	-	-	-

## ANEXO II

Interacciones calculadas usando modelos mixtos para los QTL detectados de rendimiento y sus parámetros en cada uno de los ambientes. Se han utilizado como elementos fijados los QTL significativos para cada carácter en cada uno de los ensayos por separado y a continuación se han añadido al modelo la/las interacciones QTLxQTL por separado. En la tabla 23 del capítulo cuarto aparece un resumen de las interacciones significativas.

Carácter	Nombre QTL	Ambiente		2006				2008				2009_spring			
		Marcador e Interacciones	GL	Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
				Efectos adit.	error standard										
Espigado (días)	F_1	Constante	1H	156,3	0,25	156,3	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_2	HvFT3	1H	-0,7435	0,25741	-0,7214	0,25513	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_3	SNP22	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_4	bPb_3677	2H1	1,8	0,3174	1,809	0,3143	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_5	denso	3H	2,401	0,2747	2,401	0,2721	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_6	VRN_H1	5H	-0,7445	0,27778	-0,7491	0,2751	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_1xF_3	bPb_9702	6H	0,5181	0,29241	0,5611	0,29028	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_2xF_3	HvFT3.bPb_3677		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_2xF_4	SNP22.bPb_3677		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_3xF_5	SNP22.denso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	bPb_3677.VRN_H1		-	-	-0,6876	0,32419	-	-	-	-	-	-	-	-	
Altura (cm)	H_1	Constante	1H	76,98	0,68	76,51	0,684	87,94	0,513	88,04	0,514	-	-	-	-
	H_2	HvFT3	1H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H_3	bPb_5449	2H1	-	-	-	-	4,309	0,6573	4,547	0,6679	-	-	-	-
	H_4	Bmag0006	3H	-0,3163	0,72063	-0,4992	0,70808	-1,674	0,5465	-1,606	0,5448	-	-	-	-
	H_2xH_4	denso	3H	-12,11	0,738	-12,35	0,727	-8,869	0,5594	-8,809	0,5574	-	-	-	-
	H_3xH_4	bPb_5449.denso		-	-	-	-	-	-	1,288	0,7398	-	-	-	-
	Bmag0006.denso		-	-	2,173	0,7288	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rendimiento (g/m <sup>2</sup> )	Y_1	Constante	1H	-	-	-	-	1006	4,3	1006	4,2	283,3	2,23	282,2	2,31
	Y_2	bPb_0910	1H	-	-	-	-	-24,19	4,81	-23,42	4,769	-	-	-	-
	Y_3	bPb_4821	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-14,38	4,887	-24,69	6,281
	Y_4	Bmac132	2H1	-	-	-	-	-29,89	5,182	-30,04	5,125	-	-	-	-
	Y_5	bPb_2394	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	7,886	24,601	-	-
	Y_6	denso	3H	-	-	-	-	-31,28	4,579	-31,43	4,529	-13,67	2,498	-12,79	2,506
	Y_7	bPb_9998	4H	-	-	-	-	11,26	4,566	11,04	4,517	-10,28	2,476	-9,462	24,874
	Y_8	VRN_H1	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	7,502	24,178	7,733	24,499
	Y_2xY_4	bPb_2348	7H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_3xY_5	bPb_4821.bPb_2394		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-17,95	7,826
Y_3xY_8	Bmac132.denso		-	-	-	-	-	-	11,9	5,291	-	-	-	-	
Y_5xY_4	Bmac132.bPb_2348		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	denso.bPb_2394		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Carácter	Nombre QTL	Ambiente		2009_Winter			2011_P			2011_Z					
		Marco e Interacciones	GL	Modelo sin Interacciones Efectos adit.	Interacciones error standard	Modelo con Interacciones Efectos adit.	Interacciones error standard	Modelo sin Interacciones Efectos adit.	Interacciones error standard	Modelo sin Interacciones Efectos adit.	Interacciones error standard	Modelo con Interacciones Efectos adit.	Interacciones error standard		
Espigado (días)	F_1	Constante		-	-	-	-	152,8	0,21	152,8	0,2	157,2	0,14	157,2	0,14
	F_2	HvFT3	1H	-	-	-	-	-0,6724	0,2179	-0,6247	0,21761	-0,5315	0,14779	-0,5437	0,1461
	F_3	SNP22	2H1	-	-	-	-	1,119	0,4405	1,506	0,501	-	-	-	-
	F_4	bPb_3677	2H1	-	-	-	-	1,566	0,267	1,56	0,26	0,6903	0,18169	0,6439	0,18059
	F_5	denso	3H	-	-	-	-	1,63	0,2243	1,767	0,2211	1,404	0,1526	1,39	0,1508
	F_6	VRN_H1	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_1xF_3	bPb_9702	6H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F_2xF_3	HvFT3x.bPb_3677		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4208	0,18012
	F_2xF_4	SNP22.bPb_3677		-	-	-	-	-	-	1,485	0,513	-	-	-	-
F_3xF_5	SNP22.denso		-	-	-	-	-	-	1,855	0,6563	-	-	-	-	
	bPb_3677.VRN_H1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Altura (cm)	H_1	Constante		-	-	-	-	64,54	0,542	64,07	0,538	72,66	0,514	72,33	0,519
	H_2	HvFT3	1H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H_3	bPb_5449	2H1	-	-	-	-	2,432	0,6947	2,527	0,6707	-	-	-	-
	H_4	Bmag0006	3H	-	-	-	-	-1,697	0,5775	-1,878	0,5593	-1,372	0,545	-1,503	0,5375
	H_2xH_4	denso	3H	-	-	-	-	-6,641	0,5912	-6,878	0,5739	-7,468	0,5583	-7,638	0,552
	H_3xH_4	bPb_5449.denso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bmag0006.denso		-	-	-	-	-	-	2,178	0,5738	-	-	1,523	0,5533	
Rendimiento (g/m2)	Y_1	Constante		-	-	-	-	454,9	2,53	453,6	2,54	-	-	-	-
	Y_2	bPb_0910	1H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_3	bPb_4821	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_4	Bmac132	2H1	-	-	-	-	-7,081	30,335	-6,965	29,927	-	-	-	-
	Y_5	bPb_2394	3H	-	-	-	-	6,678	27,536	-	-	-	-	-	-
	Y_6	denso	3H	-	-	-	-	-26,27	2,757	-25,55	2,695	-	-	-	-
	Y_7	bPb_9998	4H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_8	VRN_H1	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_2xY_4	bPb_2348	7H1	-	-	-	-	-11,33	2,82	-12,17	2,775	-	-	-	-
	Y_3xY_5	bPb_4821.bPb_2394		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_3xY_8	Bmac132.denso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y_5xY_4	Bmac132.bPb_2348		-	-	-	-	-	-	-6,474	31,812	-	-	-	-
		denso.bPb_2394		-	-	-	-	-	-	9,025	27,915	-	-	-	-

Caracter	Nombre QTL	Ambiente		2006				2008				2009_spring			
		Marcador e		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
		Interacciones	GL	Efectos adit.	error standard										
Peso Especifico (g/l)	SW_1	Constante	1H	477,6	1,59	477,6	1,57	676,3	0,65	675,8	0,66	664,2	0,56	664,5	0,57
	SW_2	bPb_5290	1H	-3,304	19,232	-3,114	19,047	-1,957	0,8139	-2,72	0,8354	-3,99	0,704	-4,084	0,6984
	SW_3	HvFT3	1H	-	-	-	-	2,108	0,714	2,07	0,6989	3,555	0,6291	3,71	0,6264
	SW_4	Bmac132	2H1	-3,923	1,932	-3,993	19,117	-2,126	0,794	-1,819	0,7923	-4,106	0,6859	-4,117	0,6798
	SW_5	denso	3H	-7,836	17,042	-7,93	16,866	-3,349	0,7017	-3,523	0,6863	-1,281	0,6118	-1,052	0,6138
	SW_6	bPb_6145	4H	2,761	19,011	2,926	18,824	-	-	-	-	2,37	0,6868	2,459	0,6853
	SW_1xSW_2	bPb_2080	5H	5,204	18,834	5,166	18,635	-	-	-	-	3,06	0,6673	2,929	0,6742
	SW_1xSW_4	bPb_5290.HvFT3x	-	-	-	-	-	-	1,806	0,8222	-	-	-	-	
	SW_2xSW_4	bPb_5290.denso	-	-	-	-	-	-	-1,837	0,8423	-	-	-	-	
	SW_3xSW_4	HvFT3x.denso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,151	0,6506	
SW_4xSW_5	Bmac132.denso	-	-	4,342	19,728	-	-	-	-	-	-	-	-		
		denso.bPb_6145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,8068	0,68383	
Peso de Mil Semillas (g)	TKW_1	Constante	1H	23,83	0,153	23,82	0,151	-	-	-	-	32,14	0,134	32,16	0,131
	TKW_2	bPb_6970	1H	-0,9822	0,1871	-0,9837	0,18355	-	-	-	-	-1,684	0,1628	-1,712	0,1595
	TKW_3	Bmac132	2H1	-0,9504	0,18635	-0,9489	0,18348	-	-	-	-	-0,5552	0,16205	-0,5155	0,15897
	TKW_4	bPb_5012	3H	0,08389	0,181358	-	-	-	-	-	-	0,5412	0,15103	0,5059	0,14812
	TKW_5	denso	3H	-1,587	0,1732	-1,585	0,1668	-	-	-	-	-	-	-	-
	TKW_6	bPb_9998	4H	0,8493	0,16966	0,8648	0,16395	-	-	-	-	-	-	-	-
	TKW_1xTKW_3	bPb_2080	5H	1,073	0,1726	1,064	0,1694	-	-	-	-	0,3651	0,15044	0,3812	0,14718
	TKW_2xTKW_4	bPb_6970.bPb_5012	-	-	0,4812	0,19987	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TKW_2xTKW_6	Bmac132.denso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Bmac132.bPb_2080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5434	0,17816	
Nº Granos por metro cuadrado	Gm_1	Constante		16985	78,1	17012	77,7	31555	108,3	31290	108,1	-	-	-	-
	Gm_2	bPb_5290	1H	641,2	95,88	665,4	95	405	132,26	433,8	132,38	-	-	-	-
	Gm_3	bPb_8506	3H	278,8	86,89	309,7	86,54	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gm_4	bPb_8580	5H	367,9	116,01	431,6	117,17	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gm_5	bPb_4911	5H	-355,8	113,5	-379,6	112,28	-675,9	157,58	-738,2	160,3	-	-	-	-
	Gm_1xGm_2	bPb_5229	5H	-201,6	88,24	-175,7	87,59	-233,9	119,96	-234,3	119,21	-	-	-	-
	Gm_2xGm_5	bPb_5290.bPb_8506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gm_4xGm_5	bPb_8506.bPb_5229	-	-	-222,4	89,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			bPb_4911.bPb_5229	-	-	-	-	-	-	297,2	163,56	-	-	-	-

Caracter	Nombre QTL	Ambiente		2009_Winter				2011_P				2011_Z			
		Marcador e		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
		Interacciones	GL	Efectos adit.	error standard										
Peso Especifico (g)	SW_1	Constante		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_2	bPb_5290	1H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_3	HvFT3	1H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_4	Bmac132	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_5	denso	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_6	bPb_6145	4H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_1xSW_2	bPb_2080	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_1xSW_4	bPb_5290.HvFT3x		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_2xSW_4	bPb_5290.denso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SW_3xSW_4	HvFT3x.denso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SW_4xSW_5	Bmac132.denso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		denso.bPb_6145		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Peso de Mil Semillas (g/l)	TKW_1	Constante		27,33	0,146	27,33	0,145	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_2	bPb_6970	1H	-1,336	0,1774	-1,323	0,1762	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_3	Bmac132	2H1	-0,4591	0,1761	-0,4613	0,17471	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_4	bPb_5012	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_5	denso	3H	-0,6454	0,16154	-0,6469	0,16027	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_6	bPb_9998	4H	0,5605	0,15877	0,5438	0,15774	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_1xTKW_3	bPb_2080	5H	0,9049	0,16406	0,9059	0,16276	-	-	-	-	-	-	-	
	TKW_2xTKW_4	bPb_6970.bPb_5012		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TKW_2xTKW_6	Bmac132.denso		-	-	0,356	0,18118	-	-	Bmac132.denso	-	-	-	-		
		Bmac132.bPb_2080		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Nº Granos por metro cuadrado	Gm_1	Constante		17404	92,4	17375	92,4	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_2	bPb_5290	1H	398,2	111,01	344,3	110,53	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_3	bPb_8506	3H	86,78	98,079	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_4	bPb_8580	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_5	bPb_4911	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_1xGm_2	bPb_5229	5H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_2xGm_5	bPb_5290.bPb_8506		-	-	-261,2	123,01	-	-	-	-	-	-	-	
	Gm_4xGm_5	bPb_8506.bPb_5229		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		bPb_4911.bPb_5229		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

		Ambiente		2006				2008				2009_spring			
Caracter	Nombre QTL	Marcador e		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
		Interacciones	GL	Efectos adit.	error standard										
Nº de Granos por Espiga		Constante		61,1	0,52	61,11	0,517	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_1	bPb_4821	2H1	4,569	11,231	4,789	11,221	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_2	bPb_5449	2H1	4,385	0,6686	4,361	0,6644	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_3	denso	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_4	bPb_9504	4H	2,442	0,5564	2,503	0,5537	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_2xGS_4	bPb_5449.bPb_9504		-	-	1,31	0,7112	-	-	-	-	-	-	-	-
Longitud de la Espiga (mm)		Constante		73,04	0,517	73,08	0,516	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_1	bPb_4821	2H1	6,306	11,433	6,549	11,483	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_2	bPb_5449	2H1	4,416	0,6689	4,594	0,6751	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_3	denso	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_4	bPb_3829	4H	1,819	0,546	1,856	0,5441	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_5	bPb_2058	6H	-1,97	0,6245	-1,911	0,6229	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_3xLS_4	denso.bPb_3829		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS_4xLS_5	bPb_3829.bPb_2058		-	-	-1,016	0,6323	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ambiente		2009_Winter				2011_P				2011_Z			
Caracter	Nombre QTL	Marcador e		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones		Modelo sin Interacciones		Modelo con Interacciones	
		Interacciones	GL	Efectos adit.	error standard										
Nº de Granos por Espiga		Constante		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_1	bPb_4821	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_2	bPb_5449	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_3	denso	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_4	bPb_9504	4H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GS_2xGS_4	bPb_5449.bPb_9504		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Longitud de la Espiga (mm)		Constante		-	-	-	-	-	-	-	-	77,9	0,273	78,1	0,276
	LS_1	bPb_4821	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	3,12	0,6055	3,203	0,5931
	LS_2	bPb_5449	2H1	-	-	-	-	-	-	-	-	3,05	0,3528	3,037	0,3452
	LS_3	denso	3H	-	-	-	-	-	-	-	-	1,232	0,3003	1,375	0,2977
	LS_4	bPb_3829	4H	-	-	-	-	-	-	-	-	1,353	0,2966	1,326	0,2903
	LS_5	bPb_2058	6H	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,8795	0,33114	-0,909	0,32415
	LS_3xLS_4	denso.bPb_3829		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,905	0,30205
	LS_4xLS_5	bPb_3829.bPb_2058		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## ANEXO III

---

Principales genes segregantes en la población para los cuales se utilizaron marcadores intragénicos. En esta tabla se muestran el porcentaje de líneas de la población NxBxB que portan el alelo de Barbarrosa y el porcentaje de líneas que muestran el alelo de Nevada para cada uno de ellos.

Gen	GL	% de líneas con el alelo de Barbarrosa	% de líneas con el alelo de Nevada
<i>PPD-H2</i>	1H	46,49	53,51
<i>PPD-H1</i>	2H1	93,51	5,95
<i>denso</i>	3H	63,24	34,59
<i>VRN-H2</i>	4H	69,19	30,81
<i>VRN-H1</i>	5H	56,76	37,84

A continuación se muestra la segregación de los marcadores más próximos a los QTL detectados más relevantes de rendimiento y sus parámetros.

Marcador	GL	% de líneas con el alelo de Barbarrosa	% de líneas con el alelo de Nevada
<b>bPb_5290</b>	1H	71,19	28,81
<b>bPb_6970</b>	1H	71,02	28,98
<b>bPb_4821</b>	2H1	93,95	6,04
<b>bPb_5449</b>	2H1	78,8	21,2
<b>bPb_3677</b>	2H1	78,26	21,74
<b>Bmac132</b>	2H1	76,63	22,83
<b>Bmag6</b>	3H	62,16	37,84
<b>bPb_2080</b>	5H	69,23	30,77