



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMIA

**MAPEO DE QTLs ASOCIADOS A CARACTERES DE CALIDAD INDUSTRIAL
CON DEFICIT HIDRICO EN CEBADA CERVECERA**

Ing. Agr. M. Sci. Antonio Alberto Aguinaga

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre el 19 de agosto de 2008 y el 20 de septiembre de 2017, bajo la dirección de la Doctora María Mónica Poverene y el Doctor Max Baumer (†) del Instituto Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, (Instituto de Ciencias de Cultivos y Mejoramiento de Plantas del Estado de Bavaria, Alemania).

Antonio Alberto Aguinaga



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 02/12/2019. , mereciendo la calificación de 10 (Diez, Sobresaliente).

II

An Dr. Max Baumer

Beispiel für Altruismus und Wertschätzung des Anderen

Al Dr. Max Baumer

Ejemplo de Altruismo y Valoración del Prójimo

III

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos viejos, con quienes me hubiese gustado tanto compartir este momento.

A Laura, parte de mi alma, y a Maite y Martín, nuestros hijos, por el placer de estar juntos.

A mis hermanos, Jorge y Marta, por estar siempre.

Al Doctor Max Baumer, del Instituto Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft de Alemania, investigador incansable de la calidad industrial y creador de este proyecto, a quien también me hubiese gustado mostrarle cómo terminó su idea.

A mi Directora de Tesis, Dra. Mónica Poverene, por haber sido mi guía permanente en el desarrollo de esta tesis y por su enorme ayuda para poder concretar este trabajo.

A los Dres. Markus Herz, Günther Schweizer y Gert Daniel del Instituto Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft de Alemania, por su trabajo y guía en la obtención de las líneas doble haploides, los análisis de marcadores y la interpretación de los mismos.

Al Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, por brindarme el ámbito académico para la realización de la tesis.

A Cervecería y Maltería Quilmes S.A., por motivarme a investigar y mejorar la calidad por sobre todas las cosas.

A mis compañeros de los Criaderos Quilmes y Maltería Pampa, por la pasión y la responsabilidad para que las cosas salgan bien.

A mi inolvidable Instituto de Genética “Ewald A. Favret”, por mostrarme el camino.

Finalmente, a la especie *Hordeum vulgare L.* (Cebada Cervecera), por ser el motivo de mi pasión en el camino de la investigación desde el año 1988.

RESUMEN

Las zonas de producción de cebada (*Hordeum vulgare* L.) de Argentina se caracterizan por la variabilidad climática entre sitios y años, causando variaciones de rendimiento por hectárea y en la calidad industrial de los lotes cosechados. El déficit de lluvias durante el ciclo del cultivo causa el mayor impacto en ambos factores. Los programas de mejoramiento de cebada deben considerar y minimizar los efectos de una alta interacción genotipo x ambiente, para que las variedades liberadas tengan menor variación de calidad al ser utilizadas como materia prima de los procesos industriales.

La evaluación de calidad mediante micromalteos y análisis de malta es costosa y consume mucho tiempo. La detección de *loci* de caracteres de herencia cuantitativa (QTL) relacionados con calidad en condiciones de sequía podría ser una herramienta de selección para esos ambientes. Otros caracteres como temperatura de canopeo y respuesta al fotoperíodo, también fueron evaluados.

Para el mapeo de QTL se utilizó una población de 150 líneas doble haploides, derivadas del cruzamiento entre la línea argentina Mut 6519 y la variedad europea Aspen, ensayada en el período 2007-2011 en cuatro localidades con suelos y regímenes de temperatura y precipitaciones diferentes. Se analizaron rendimiento, contenido de proteína, tamaño de granos, y los principales caracteres de calidad. Se determinó la respuesta fotoperiódica de las líneas mediante ensayos en cinco fechas de siembra, y la temperatura de canopeo en ambientes con y sin déficit de lluvias. Además, se realizaron dos ensayos en la localidad de Fort Collins (Estado de Colorado, EEUU) con y sin riego.

Se analizaron 333 marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y 27 marcadores de secuencias simples repetitivas o microsátélites (SSR), utilizándose para el mapeo 231 marcadores. Se detectaron 25 QTL en ambientes sin estrés, 8 en estrés moderado, 6 en estrés intenso, y 7 en ambientes con estrés severo, con porcentajes de explicación de la varianza fenotípica (PEV) entre 6,8% y 19,9%. Aún con valores LOD altamente significativos, los PEV de cada uno de los caracteres a través de todos los ambientes fueron bajos (máximo 3,6%).

Los QTL que aportaron mayor explicación a los caracteres de calidad se localizaron en los ambientes Tres Arroyos 2007 y 2011 para proteína (11,4% y 10,6%), Puán 2011 (2 QTL) y La Dulce 2010 para humedad de salida de remojo (19,9%, 17,6% y 14,4%), Puán 2010 (2 QTL) y Tres Arroyos 2011 para dureza de malta (13,5%, 11,3% y 13,4%), todos ellos ambientes sin déficit. Los QTL detectados en ambientes con estreses moderados y severos aportaron poca explicación a los caracteres.

Las correlaciones entre las herramientas simples utilizadas con todos los caracteres medidos, si bien estadísticamente significativas en algunos casos, fueron bajas como para ser utilizadas con fines de selección. Las distribuciones de frecuencia de cada carácter indicaron herencia transgresiva en casi todos los ambientes, permitiendo seleccionar los genotipos con mejores resultados que el parental de mayor valor para cada carácter.

Los métodos que combinan los rankings de caracteres en ambientes contrastantes, y el análisis de estabilidad de los resultados de una cantidad grande de ambientes con y sin limitaciones, serían las herramientas más efectivas para seleccionar genotipos con mejores aptitudes productivas.

ABSTRACT

Barley (*Hordeum vulgare* L.) crop areas in Argentina display climatic variability between sites and years, causing variations in yield and in industrial quality of the harvested lots. Rainfall deficit during the crop cycle causes the greatest impact on both factors. Barley breeding programs have to consider and minimize the effects of a high genotype x environment interaction, so that the released varieties have less variation in quality when used as raw material for industrial processes.

Malting quality evaluation by micromalting and malt analysis is expensive and time-consuming. Detection of quantitative traits loci (QTL) related to industrial quality in drought conditions could be a selection tool in those environments. Other characters such as canopy temperature and photoperiod response were also evaluated.

For QTL mapping, a population of 150 double haploid lines was used, derived from the crossing between the Argentine line Mut 6519 and the European variety Aspen, tested during the period 2007-2011 in four locations with different soils and temperature and rainfall regimes. Yield, barley protein, grain size, and the main industrial quality characters were analyzed. Photoperiodic response of the lines was evaluated by trials in five sowing dates, and the same was canopy temperature in environments with and without rainfall deficit. In addition, two trials were conducted in Fort Collins (State of Colorado, USA) with and without irrigation.

Three hundred and thirty three amplified fragment length polymorphism markers (AFLP) and 27 simple sequence repetitive or microsatellite markers (SSR) were analyzed, using 231 markers for the mapping. Twenty five QTL were detected in stress-free environments, 8 in moderate stress, 6 in intense stress, and 7 in environments with severe stress, with percentage of explained phenotypic variation (PEV) between 6.8% and 19.9%. Even with highly significant LOD values, the PEV of each character across all the environments was low (maximum 3.6%).

QTL that provided the highest explanation for quality traits were located in Tres Arroyos 2007 and 2011 for protein (11.4% and 10.6%), Puán 2011 (2 QTL) and La Dulce 2010 for steeping out (19.9%, 17.6% and 14.4%), Puán 2010 (2 QTL) and Tres Arroyos 2011 for malt hardness (13.5%, 11.3% and 13.4%), all environments without water deficit. The QTL detected in environments with moderate and severe stress contributed little explanation to the characters.

The correlations between simple tools used with all the measured characters, although statistically significant in some cases, were too low to be used for selection purposes. Observations of the frequency distributions of each character indicated transgressive inheritance in almost all environments, allowing selecting the genotypes with better results than the parent of greater value for each trait.

The methods that combine the character ranking in contrasting environments, and the stability analysis of the results in a high amount of environments with and without limitations, would be the most effective tool to select genotypes with best productive aptitudes.

VI

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación mundial	1
1.2. Zonas de producción en Argentina.....	2
1.3. Modificación del Endosperma de Cebada.....	6
1.4. Resistencia a la sequía	7
1.5. Métodos directos e indirectos de selección por tolerancia a sequía	8
1.5.1. Temperatura de Canopeo	9
1.5.2. Índice de Resistencia a la Sequía (IRS)	10
1.6. QTLs relacionados con calidad industrial	10
1.7. QTLs relacionados con tolerancia a sequía	12
1.8. Determinantes fisiológicos y genéticos de la tolerancia a sequía	13
1.9. Guía para el futuro.....	15
1.10. Propósito de esta tesis.....	15
1.11. Hipótesis y Objetivos específicos.....	17
1.11.1. Hipótesis 1	17
1.11.2. Hipótesis 2	17
1.11.3. Hipótesis 3	18
1.11.4. Hipótesis 4	18
2. MATERIALES Y METODOS	19
2.1. Material genético	19
2.1.1. Caracterización fisiológica de la línea Mut 6519	19
2.2. Protocolo de obtención de plantas doble haploides: cultivo de anteras	22
2.2.1. Cultivo de plantas donantes de anteras	22
2.2.2. Selección de espigas y estado de desarrollo de microsporas:	23
2.2.3. Cultivo de anteras	24
2.2.4. Cultivo de callos en medio de regeneración	24
2.2.5. Obtención de plantas doble haploides	25
2.3. Ensayos de Campo	27
2.3.1 Diseño experimental y Análisis Estadístico.....	28
2.3.2. Manejo de los ensayos	30
2.3.3. Determinación de la respuesta fotoperiódica.....	31
2.4. Ensayo realizado con y sin riego	32

2.5. Temperatura de canopeo.....	32
2.6. Determinaciones realizadas con los granos cosechados.....	33
2.6.1 Proteína Total y Humedad (según Analytica – EBC, 1998).....	33
2.6.2 Clasificación (según Analytica – EBC, 1998).....	33
2.6.3 Micromalteos	34
2.6.4. Análisis de Parámetros de Malta.....	35
2.7. Marcadores Moleculares.....	47
2.7.1. Extracción de ADN.....	47
2.7.2 Análisis de microsatélites (SSR).....	50
2.7.3 Análisis de marcadores AFLP.....	53
2.8. Mapeo de marcadores.....	57
2.9 Mapeo de QTL	61
3. RESULTADOS DE ENSAYOS DE CAMPO	66
3.1 Hipótesis 1	66
3.2. Variabilidad climática.....	66
3.3. Rendimiento	68
3.3.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)	73
3.3.2. Comparación de análisis entre Modelos Mixtos y Modelos Espaciales.....	74
3.3.3. Ensayos de rendimiento con y sin irrigación.....	76
3.4. Tamaño de los granos	80
3.4.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)	85
3.4.2. Comparación de análisis entre Modelos Mixtos y Modelos Espaciales.....	86
3.4.3 Ensayos con y sin irrigación.....	87
3.5 Temperatura de canopeo (TC).....	90
3.6. Respuesta al fotoperíodo	97
3.7. Otros métodos de selección por resistencia a sequía y estabilidad	103
3.8. Discusión	119
3.9 Conclusiones.....	125
4. RESULTADOS DE CALIDAD INDUSTRIAL	129
4.1 Hipótesis 2	129
4.2 Proteína de Cebada	129
4.3 Humedad a la Salida de Remojo.....	138
4.4 Dureza de malta	141
4.5 Extracto.....	147
4.6 Viscosidad del mosto.....	151
4.7 β -glucanos	155

4.8 Aminoácidos libres (FAN, por su sigla en inglés, Free Amino Nitrogen).....	162
4.9 Índice de Hartong (Vz 45°C).....	166
4.10 Atenuación Límite Aparente	168
4.11 Discusión	172
4.12 Conclusiones	175
5. MAPA DE LIGAMIENTO Y ANALISIS DE QTL	177
5.1 Hipótesis 3.....	177
5.2 Hipótesis 4.....	177
5.3 Construcción de un mapa de ligamiento de cebada	177
5.4 Análisis de QTL	188
5.4.1 Rendimiento agronómico.....	189
5.4.2 Tamaño de los granos (Calibre sobre zaranda de 2,5 mm).....	190
5.4.3. Proteína Total de Cebada (%).....	190
5.4.4. Temperatura de Canopeo (TC)	191
5.4.5 Respuesta al fotoperíodo.....	192
5.4.6. Humedad de Fin de Remojo	192
5.4.7. Extracto.....	193
5.4.8. Dureza de Malta.....	194
5.4.9. Viscosidad de Mosto.....	194
5.4.10. Aminoácidos libres.....	195
5.4.11. β -Glucanos en mosto	196
5.4.12. Atenuación límite aparente	196
5.4.13. Índice de Hartong (Vz 45 °C).....	197
5.4.14. QTL en posiciones similares	197
5.5 Discusión	206
5.5.1 Distorsión de segregación.....	206
5.5.2 Mapeo de marcadores	207
5.5.3 QTL para los caracteres agronómicos estudiados.....	209
5.5. 4 Discusión sobre QTL para los caracteres de calidad estudiados.	212
5.6. Conclusiones	218
6. CONSIDERACIONES FINALES.....	219
7. ANEXOS.....	221
1. Origen de la Línea Mutante 6519	221
Tabla 7.1. Resumen de Precipitaciones (mm), Rendimientos (Kg/Ha), Calibre (% retenido sobre zaranda de 2,5 mm), Proteína de Cebada (% sobre sustancia seca), y determinaciones analíticas de calidad de malta.....	222

Tabla 7.2. Correlaciones entre ambientes (sitios y años) para rendimiento.	223
Tabla 7.3 Correlaciones entre ambientes (sitios y años) para calibre.	224
8. REFERENCIAS	225

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Evolución de la producción argentina de cebada, período 1990-2016
- Figura 1.2:** Capacidad de malteo de las mayores cervecerías del mundo
- Figura 1.3:** Capacidad de malteo de las mayores malterías independientes del mundo
- Figura 1.4:** Ubicación geográfica de las plantas productoras de malta argentinas
- Figura 1.5:** Distribución de lluvias en la Provincia de Buenos Aires
- Figura 1.6:** Precipitaciones totales anuales de Tres Arroyos (mm), serie 1971 a 2016
- Figura 1.7:** Precipitaciones del mes de octubre de Tres Arroyos, serie 1971 a 2016
- Figura 1.8:** Precipitaciones del mes de noviembre de Tres Arroyos, serie 1971 a 2016
- Figura 1.9:** Evolución de rendimientos promedios comerciales en Argentina, período 1970 – 2015.
- Figura 1.10:** Enfoque holístico que integra genómica, fisiología y mejoramiento genético para desarrollar variedades con mayor tolerancia a la sequía
- Figura 2.1:** Caracterización fisiológica de la línea Mut 6519.
- Figura 2.2.1:** Etapas del cultivo de anteras.
- Figura 2.3.1:** Ubicación de los sitios experimentales en la Provincia de Buenos Aires
- Figura 2.4.1:** A y B) Imágenes del ensayo con estrés y sin estrés. C) Equipo de riego de avance frontal
- Figura 2.5.1:** Termómetro infrarrojo
- Figura 2.6.2.1:** Espectrofotómetro de infrarrojo cercano y calibradora.
- Figura 2.6.3.1:** Etapas del micromalteo.
- Figura 2.6.4.1.1:** Farinógrafo Brabender
- Figura 2.6.4.2.1:** Instrumentos utilizados en el análisis de malta.
- Figura 2.7.1.1:** Extracción de ADN.
- Figura 2.7.1.3.1:** Gel de agarosa con estándares de peso molecular utilizado para controlar el peso molecular del ADN extraído.
- Figura 2.7.3.1:** Gel de poliacrilamida con estándares de peso molecular de fracciones de ADN
- Figura 2.7.3.2:** Geles de poliacrilamida.
- Figura 3.2.1:** Precipitaciones registradas en cada sitio experimental durante los años 2008 a 2011, y promedio histórico de una serie de 30 años
- Figura 3.2.2:** Temperaturas medias registradas en cada sitio experimental durante los años 2008 a 2011, y promedio histórico de una serie de 30 años
- Figura 3.3.1.** Rendimientos promedios de Mut 6519 y Aspen en función del rendimiento promedio de cada ambiente experimental.
- Figura 3.3.2:** Distribución de frecuencia de los rendimientos en cada sitio experimental.
- Figura 3.3.1.1:** Gráfico H-plot de ambientes en el plano de CP 1 y 2. CP 1
- Figura 3.3.2.1:** Relación entre rendimientos ajustados por Modelos lineales generales mixtos (MLGM) y Fila por Columna (FxC).
- Figura 3.3.3.1:** Potencial agua medido en el ensayo irrigado en dos profundidades.
- Figura 3.3.3.2:** Potencial agua medido en el ensayo no irrigado en dos profundidades.
- Figura 3.3.3.3:** Temperatura del suelo (°C), sector no irrigado.
- Figura 3.3.3.4:** Temperatura del suelo (°C), sector irrigado.
- Figura 3.3.3.5:** Distribución de frecuencias de rendimiento de líneas en ensayos con riego y sin riego adicional.
- Figura 3.3.3.6:** Regresión entre rendimientos en ensayo irrigado y no irrigado.

Figura 3.3.3.7: H-plot incluyendo los datos del ensayo “Irrigado-No Irrigado” con los ambientes de Argentina.

Figura 3.4.1: Relación entre los calibres promedio de las líneas parentales y los calibres promedio en cada sitio experimental.

Figura 3.4.2: Distribución de frecuencias de los calibres en cada sitio experimental.

Figura 3.4.1.1: Gráfico biplot para tamaño de los granos.

Figura 3.4.2.1: Relación entre calibres ajustados por MLGM y FxC

Figura 3.4.3.1: Distribución de frecuencias de calibre de líneas en ensayo irrigado y no irrigado.

Figura 3.4.3.2: Regresión entre calibres en ensayo irrigado y no irrigado

Figura 3.4.3.3: H-plot incluyendo los datos del ensayo “Irrigado-No Irrigado” al análisis de componentes principales

Figura 3.5.1: Mediciones de temperatura de canopeo tomadas en dos momentos del período de llenado de los granos, Puán 2008

Figura 3.5.2 Combinación de rankings entre las temperaturas tomadas en el estado Z73 y en el estado Z83 del cultivar Aspen.

Figura 3.5.3: Temperatura de canopeo registradas en los estados fenológicos Z73 y Z83 del cv. Aspen, en Puán 2008.

Figura 3.5.4: Relación entre TC y Calibre, estado Z 83 en Puán 2008.

Figura 3.5.4: TC tomadas en dos ambientes sin déficit de agua en el estado Z 83 del cv. Aspen.

Figura 3.5.5: Relación entre temperatura de canopeo y rendimiento en Cabildo 2009

Figura 3.5.6: Relación entre temperatura de canopeo tomada en estado Z83 en Puán 2008 y rendimiento basado en los promedios del 4to. Cuartil.

Figura 3.5.7: Relaciones entre Depresión de Temperatura obtenida en el ensayo La Dulce 2007, y rendimientos en los ensayos Cabildo 2008, Puan 2008 y La Dulce 2008.

Figura 3.5.8: Relación entre valores de depresión por temperatura con calibre, Puan 2008, al estado fenológico Z83 del cv. Aspen.

Figura 3.5.9: Relaciones entre Depresión por Temperatura de Canopeo –promedio de todos los datos- con Rendimientos promedio y Calibres promedio.

Figura 3.6.1: Respuesta al fotoperíodo en la línea Mut 6519 y el cv. Aspen, en siete fechas de siembra.

Figura 3.6.2: Distribución de frecuencias de la respuesta a fotoperíodo correspondiente a la población completa del cruzamiento Mut 6519 x Aspen, medida en siete fechas de siembra.

Figura 3.6.3: Relación entre pendiente de respuesta fotoperiódica y tamaño de grano, obtenida en dos ensayos realizados en Tres Arroyos 2008.

Figura 3.6.4: Relación entre longitud de ciclo tomado en el ensayo Tres Arroyos 2009 1ª época de siembra, y la pendiente de respuesta a fotoperíodo.

Figura 3.6.5: Relación entre ciclo a floración y rendimiento en La Dulce 2008.

Figura 3.6.6: Relación entre ciclo a floración y promedio de rendimiento de todos los ensayos.

Figura 3.6.7: Relación entre longitud de ciclo y promedios de rendimiento de todos los ensayos, obtenidos para cada nota.

Figura 3.6.8: Relación entre longitud de ciclo y promedios de calibres de los granos de todos los ensayos, obtenidos para cada nota.

Figura 3.6.9: Variabilidad de calibres para los ciclos 5, 6 y 7, en los ensayos La Dulce 2008 y Tres Arroyos 1 época 2009.

Figura 3.7.1: Regresiones entre los rendimientos en ensayos con y sin riego con el Índice de Resistencia a Sequía.

Figura 3.7.2: Regresión entre las diferencias de rendimiento entre los ensayos con y sin riego con el Índice de Resistencia a Sequía.

Figura 3.7.3: Ranking de rendimientos de todos los genotipos ensayados en los ambientes Puán 2010 y La Dulce 2008.

Figura 3.7.4: Ranking de rendimientos y del Índice de Resistencia a Sequía (DRI) de todos los genotipos ensayados en secano e irrigación.

Figura 3.7.5: Ranking de rendimientos de todos los genotipos ensayados en los ambientes Puán 2010 y La Dulce 2008.

Figura 3.7.6: Tamaño de granos (%), promedio del primer cuartil vs. promedio del cuarto cuartil.

Figura 3.7.7: Relación entre los calibres promedio en cada ambiente y el calibre de cada genotipo

Figura 3.7.8: Método no paramétrico del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” como estimador de la estabilidad de los genotipos a través de los ambientes

Figura 3.7.9: Método de estabilidad basado en los logaritmos decimales de los promedios y

Figura 3.7.10: Relación entre los rankings de Log10 de los promedios de rendimiento con las varianzas.

Figura 3.7.11: Relación entre los rankings de Log10 de los promedios de calibre con las varianzas.

Figura 4.2.1: Distribución de frecuencias de Proteína de Cebada en los ensayos Puán 2009 y Puán 2011.

Figura 4.2.2: Precipitaciones mensuales y temperaturas medias registradas en Puán 2009, Puán 2011 y promedio histórico.

Figura 4.2.3: Distribución de frecuencias de Proteína de Cebada en los ensayos La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2009 1ª época de siembra.

Figura 4.2.4: Relación entre Rendimiento y Proteína de los granos en el ambiente La Dulce 2008

Figura 4.2.5. Relaciones entre promedios de Rendimiento (Kg/Ha) y Proteína de Cebada (% s/s) obtenidos del primer y cuarto cuartil para rendimiento.

Figura 4.2.6: Gráfico H-plot de Proteína de Cebada, componentes 1 y 2.

Figura 4.2.7: Relación entre los promedios de rendimiento de cada sitio experimental y el valor promedio de proteína en los mismos sitios.

Figura 4.2.8: Relación entre los promedios de calibre de cada sitio experimental y el valor promedio de proteína en los mismos sitios.

Figura 4.3.1: Gráfico H-plot de Humedad a la Salida de Remojo, componentes 1 y 2.

Figura 4.3.2: Relación entre variables en ambientes contrastantes (Tres Arroyos 2011 y Puan 2008)

Figura 4.4.1: Distribuciones de frecuencia de Dureza de Malta de todos los sitios experimentales analizados.

Figura 4.4.2: Relaciones entre variables en los ambientes Puán 2011 y Cabildo 2010

Figura 4.4.3: Relaciones entre Proteína de Cebada y Dureza de Malta en los ambientes Puán 2011 y Cabildo 2010.

Figura 4.4.4: Gráfico H-plot de Dureza de Malta, componentes 1 y 2.

Figura 4.4.5: Regresiones entre los sitios Puán 2008 y Tres Arroyos 2008, y entre Cabildo 2008 y Tres Arroyos 2007.

Figura 4.5.1: Extracto (%) de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de extracto de cada sitio experimental.

Figura 4.5.2: Gráfico H-plot de Extracto, componentes 1 y 2.

Figura 4.5.3: Distribución de frecuencias de extracto en los sitios Puán 2008 y 2011.

Figura 4.5.4: Precipitaciones de Puán, años 2008 y 2011, comparado con el promedio histórico.

XIII

Figura 4.5.5: Temperaturas medias de Puán, años 2008 y 2011, comparado con el promedio histórico.

Figura 4.6.1: Distribución de frecuencia de la población en los ambientes que generaron mayor nivel de viscosidad de mosto: La Dulce 2010, La Dulce 2008, Cabildo 2008.

Figura 4.6.2: Precipitaciones mensuales y temperaturas medias mensuales de los sitios La Dulce 2008 y 2010 y Cabildo 2008.

Figura 4.6.3: Distribución de frecuencia de la población en los ambientes que generaron menor nivel de viscosidad de mosto: La Dulce 2011 y Tres Arroyos 2011.

Figura 4.6.4: Precipitaciones mensuales y temperaturas medias mensuales de los sitios La Dulce 2011 y Tres Arroyos 2011

Figura 4.6.5: Gráfico H-plot de Viscosidad, componentes 1 y 2.

Figura 4.7.1: β -glucanos de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de cada sitio experimental.

Figura 4.7.2: Distribuciones de frecuencia de β -glucanos de todos los ambientes analizados.

Figura 4.7.3: Relación entre dureza de malta y β -glucanos, en los sitios La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011.

Figura 4.7.4: Relación entre β -glucanos y Dureza de Malta para las líneas Mut 6519 y Aspen, a través de todos los ambientes

Figura 4.7.5: Regresión entre promedios de β -glucanos y Dureza de Malta, para todos los ambientes analizados.

Figura 4.8.1: Aminoácidos libres de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de cada sitio experimental.

Figura 4.8.2: Distribución de frecuencias para Aminoácidos Libres en los ambientes Tres Arroyos 2008 y 2011.

Figura 4.8.3: Precipitaciones y Temperaturas Medias Mensuales de los ensayos Tres Arroyos 2008 y 2011.

Figura 4.8.4: Relación entre lluvias de noviembre y los niveles de aminoácidos libres en cada una de las localidades.

Figura 4.9.1: Relaciones entre Vz 45°C y Atenuación Límite Aparente, en La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011

Figura 4.9.2: Relaciones entre Vz 45°C y Aminoácidos Libres, en La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011

Figura 4.9.3: Valores de Vz 45 °C de las líneas Mut 6519 y Aspen, en relación al promedio de cada ambiente.

Figura 4.10.1: Atenuación Límite Aparente de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de cada ambiente.

Figura 4.10.2: Distribuciones de frecuencia de Atenuación Límite Aparente en los ambientes Tres Arroyos 2007, 2008, 2010 y 2011.

Figura 4.10.3: Relación entre Proteína de Cebada y Atenuación, valores promedio de ambientes

Figura 4.10.4: Relación entre Proteína de Cebada y Atenuación, Variedad Aspen y Línea Mut 6519.

Figura 5.3.1: Conformación de los grupos de ligamiento asociados a los cromosomas de cebada. Mapa de ligamiento derivado de una población de mapeo de doble haploides originada del cruzamiento Mut 6519 x Aspen.

Figura 5.4.1: Mapa de ligamiento de cebada derivado del cruzamiento Mut 6519 x Aspen, mostrando la ubicación más probable de QTL relacionados con rendimiento y calidad.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.1:** Resumen de QTL de calidad industrial mapeados en nueve poblaciones.
- Tabla 2.1.1:** Resumen de las características del cv. Aspen y de la línea Mutante 6519
- Tabla 2.2.1:** Condiciones de crecimiento de plantas donantes de anteras
- Tabla 2.2.4.1:** Componentes de los medios de inducción de callos y regeneración de plantas
- Tabla 2.3.1:** Características de los suelos en las localidades experimentales
- Tabla 2.3.2:** Balance de Nitrógeno aplicado en cada sitio experimental, en función del potencial de rendimiento estimado y del porcentaje de proteína.
- Tabla 2.7.2.1:** Ubicación de los microsatélites mapeados en cromosomas y brazos.
- Tabla 3.2.1:** Precipitaciones mensuales y temperaturas medias mensuales del sitio Tres Arroyos en 2007
- Tabla 3.2.2:** Detalle de los ensayos y variables registradas.
- Tabla 3.3.1:** Promedios de rendimiento, prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y significación de ANOVA en cada ambiente.
- Tabla 3.3.2:** Significación de los factores del ANOVA por localidad para el carácter rendimiento.
- Tabla 3.3.3:** Análisis por cuartiles de los rendimientos promedio de cada ambiente experimental.
- Tabla 3.3.4:** Coeficientes de correlación de Pearson entre promedios de cuartiles de rendimiento y probabilidad asociada
- Tabla 3.3.5:** Información de modelos espaciales para el ambiente La Dulce 2008
- Tabla 3.3.6:** Coeficientes de correlación y probabilidades entre los ensayos de Argentina con los ensayos irrigado y no irrigado de Fort Collins, EEUU.
- Tabla 3.4.1:** Promedios de calibre en cada ambiente, normalidad y significancia del ANOVA.
- Tabla 3.4.2:** Significado de los factores del ANOVA por localidad para el carácter calibre.
- Tabla 3.4.3:** Análisis por cuartiles de los calibres promedio de cada ambiente.
- Tabla 3.4.4:** Coeficientes de correlaciones de Pearson y probabilidades asociadas entre ambientes dentro del 4to. Cuartil
- Tabla 3.4.5:** Información de modelos espaciales para el ambiente Puán 2010
- Tabla 3.4.6:** Coeficientes de correlación y probabilidades entre los ensayos de Argentina con los ensayos irrigado y no irrigado de Fort Collins, EEUU.
- Tabla 3.5.1:** Genotipos ordenados por temperatura de canopeo tomadas en el estado Z73 del cultivar Aspen.
- Tabla 3.5.2:** Genotipos ordenados por menor temperatura de canopeo tomadas en el estado Z83 del cultivar Aspen.
- Tabla 3.5.3:** Genotipos ordenados por menor diferencias de temperatura de canopeo tomadas en los estados Z73 y Z83 del cultivar Aspen.
- Tabla 3.5.4:** Lista de genotipos que mantuvieron la Temperatura de Canopeo más bajas en las dos mediciones realizadas en Puán 2008.
- Tabla 3.5.5:** Ranking de rendimientos y calibres de los genotipos que mantuvieron menor temperatura de canopeo en Puán 2008.
- Tabla 3.5.6:** Resultados de rendimiento promedio (kg/ha) tomando tres TC como ejemplo.
- Tabla 3.7.1:** Genotipos con mayor Índice Relativo de Sequía.
- Tabla 3.7.2:** Genotipos con menor Índice Relativo de Sequía.
- Tabla 3.7.3:** Ranking de genotipos en sitios irrigado y no irrigado.
- Tabla 3.7.4:** Combinaciones de máximos rendimientos en ensayos con y sin riego adicional

Tabla 3.7.5: Combinaciones de máximos rendimientos e Índice de Resistencia a Sequía (DRI) en ensayos con y sin riego adicional.

Tabla 3.7.6: Valores de \log_{10} de promedios y varianzas de calibre de las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y de los DH 79 y 122.

Tabla 3.7.7: Valores de pendiente de la regresión y el coeficiente R^2 entre el índice ambiental y los valores de calibre de las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y de los DH 79 y 122.

Tabla 3.7.8: Valores de \log_{10} de promedios y varianzas de calibre de las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y de los DH 79 y 122.

Tabla 3.7.9: Resultado de la selección de rendimientos basadas en el método de logaritmos.

Tabla 3.7.10: Resultado de la selección de calibres basada en el método de logaritmos.

Tabla 3.7.11: Resultado de la selección de calibres basada en el método de logaritmos, posterior a la selección por rendimiento.

Tabla 4.2.1: Promedios, máximos y mínimos de proteína de la población de doble haploides y sus parentales en cada sitio experimental o ambiente

Tabla 4.2.2: Promedios de Proteína en Granos, ordenados y clasificados de acuerdo a los cuartiles de Tamaño de los granos.

Tabla 4.2.3: Resultados de Rendimiento, Calibre y Proteína de Cebada, Puán, años 2009 y 2011. Promedios de DH, Aspen y Mut 6519

Tabla 4.2.4: Resultados de Rendimiento, Calibre y Proteína de Cebada, Tres Arroyos-1 2009 y La Dulce 2010. Promedios de DH, Aspen y Mut 6519

Tabla 4.3.1: Promedios, máximos y mínimos de Humedad a la Salida de Remojo en la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

Tabla 4.3.2: Relación entre Humedad a la Salida de Remojo (y) y promedios de Proteína (x_1), Calibre (x_2) de los genotipos Aspen y Mut 6519, en todos los ambientes

Tabla 4.4.1: Promedios, máximos y mínimos de Dureza de Malta (Nm) de la población de DH y sus parentales en cada ambiente.

Tabla 4.4.2: Valores de Dureza de Malta en el ensayo Tres Arroyos 2008.

Tabla 4.5.1: Promedios, máximos y mínimos de Extracto en la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

Tabla 4.5.2: Coeficientes de correlación entre sitios. Variable: Extracto.

Tabla 4.6.1: Promedios, máximos y mínimos de Viscosidad de Mosto de la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

Tabla 4.6.2: Coeficientes de correlación entre sitios. Variable: Viscosidad.

Tabla 4.7.1: Promedios, máximos y mínimos de β -glucanos en la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

Tabla 4.7.2: Temperaturas medias mensuales de noviembre en las localidades ensayadas.

Tabla 4.7.3: Coeficientes de correlación (r) y de determinación (R^2) de las variables Dureza de Malta (Newtonmetros) y β -glucanos (ppm).

Tabla 4.7.4: Regresiones múltiples entre Dureza de Malta (y), Proteína de Cebada (x_1) y β -glucanos (x_2), para los sitios Cabildo 2008, La Dulce 2010 y Puán 2011.

Tabla 4.7.5: Regresiones múltiples entre Dureza de Malta (y), Proteína de Cebada (x_1) y β -glucanos (x_2), para los genotipos Mut 6519, Aspen, y promedio de todas las líneas de cada ensayo.

Tabla 4.8.1: Promedios, máximos y mínimos de Aminoácidos Libres (ppm) de la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

Tabla 4.8.2: Regresiones múltiples entre Aminoácidos Libres (y), Proteína de Cebada (x_1) y Dureza de Malta (x_2), para los genotipos Mut 6519, Aspen, y promedio de todas las líneas de cada ambiente.

Tabla 4.8.3: Proteína de Cebada de los ensayos Tres Arroyos 2008 y 2011 de las líneas Mut 6519, Aspen y el promedio de la población.

Tabla 4.9.1: Promedios, máximos y mínimos de Índice de Hartong (%) de la población de DH y sus parentales en cada ambiente.

Tabla 4.10.1: Promedios, máximos y mínimos de Atenuación Límite Aparente (%) de la población de DH y sus parentales en cada ambiente.

Tabla 4.11.1: Distribución de precipitaciones en Puán, años 2008 a 2011.

Tabla 4.11.2: Resultados de Rendimiento, Calibre y Proteína de Cebada, en Puán, años 2008 a 2011.

Tabla 5.3.1: Medidas de diversidad genética de marcadores de la población de DH y de sus líneas parentales

Tabla 5.3.2: Grupos de ligamiento, cantidad de marcadores, longitud de cada grupo y densidad de marcadores del mapa construido

Tabla 5.3.3: Constitución de cromosomas de cebada de acuerdo a la presencia de marcadores microsatélites en los grupos de ligamiento.

Tabla 5.4.1: Ambientes de evaluación de las variables introducidas en el análisis de QTL

Tabla 5.4.1.1: QTL relacionados con rendimiento

Tabla 5.4.2.1: QTL relacionados con Tamaño de los Granos.

Tabla 5.4.3.1: QTL relacionados con Proteína de Cebada.

Tabla 5.4.4.1: QTL relacionados con Temperatura de Canopeo

Tabla 5.4.5.1: QTL relacionados con Respuesta al Fotoperíodo.

Tabla 5.4.6.1: QTL relacionados con Humedad de Fin de Remojo.

Tabla 5.4.7.1: QTL relacionados con Extracto.

Tabla 5.4.8.1: QTL relacionados con Dureza de Malta.

Tabla 5.4.9.1: QTL relacionados con Viscosidad de Mosto.

Tabla 5.4.10.1: QTL relacionados con Aminoácidos Libres en mosto.

Tabla 5.4.11.1: QTL relacionados con β -Glucanos en mosto.

Tabla 5.4.12.1: QTL relacionados con Atenuación Límite Aparente en mosto.

Tabla 5.4.13.1: QTL relacionados con Índice de Hartong.

Tabla 5.4.14.1: QTL más significativos en posiciones cercanas o coincidentes.

Tabla 5.4.14.2 (a y b): Ambientes en que fueron detectados QTL para cada carácter, indicando el tipo de ambientes

Tabla 5.5.2.1: Comparación de intervalos entre marcadores en el mapa consenso y esta tesis

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación mundial

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) pertenece a la familia Gramíneas y es uno de los cultivos de producción de grano más importante. En el año 2016, la producción mundial de cebada fue de 141,3 millones de toneladas (mt), siendo así el sexto cultivo en importancia – después del maíz, arroz, trigo, papa y soja-, y el cuarto cereal más cultivado (FAOSTAT, 2018). Europa es el continente de mayor producción total (88,5mt), mientras que Sudamérica se encuentra entre los de menor producción (4,75mt).

Desde 1990 a la actualidad la producción global ha descendido, principalmente por la disminución en Europa, mientras que en el resto de los continentes la producción se mantuvo estable o se incrementó, como es el caso de Sudamérica.

Del total producido de cebada, una parte se destina a la elaboración de malta y otra a la alimentación humana y/o animal. Considerando las estadísticas del comercio mundial de cebada del período 2014/15, de un total de 21,7 mt, 17,6 mt (81,1%) se comercializaron como cebada forrajera y 4,1 mt (18,9%) como cervecera. En el período anterior, 18,5 mt de cebada forrajera y 4,3 mt de cervecera, representan exactamente los mismos porcentajes sobre el total (81,1 y 18,9% respectivamente sobre 22,8 mt) (e-malt.com. 2016).

En la actualidad, Argentina es el noveno país en producción cebada (3,31 mt), precedido por la Unión Europea (59,8 mt), Rusia (19,5 mt), Ucrania (9,4 mt), Australia (7,6 mt), Canadá (7,12 mt), Turquía (4,0 mt) y Estados Unidos (3,85 mt). La figura 1.1 muestra la evolución de la producción de cebada argentina, desde el año 1990 hasta el 2016 (última estadística oficial disponible)

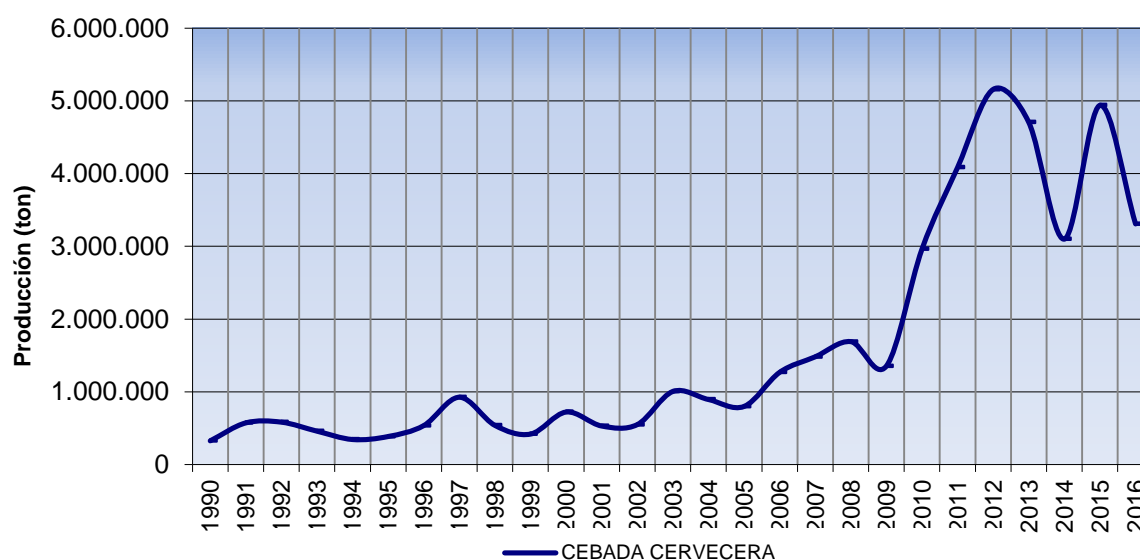


Figura 1.1: Evolución de la producción argentina de cebada, período 1990-2016. Fuente: FAOSTAT, 2018.

Del total producido en Argentina en 2016, 1,4 mt se destinaron a la producción local de malta, y casi 2 mt fueron exportadas.

La capacidad de malteo instalada a nivel mundial es de 27,1 mt. En el año 2013, la producción mundial de malta fue de 21,5 mt. Para elaborar dicha cantidad de malta se requiere aproximadamente un 20% más de cebada (por pérdidas de proceso), totalizando así 25,8 mt. Eso significa que, sobre 145 mt de producción mundial en el año 2013, el 18,42% del total se destinó a la producción de malta, porcentaje muy cercano al dado por el comercio internacional para cebada cervecera.

Las empresas cerveceras más importantes tienen una producción propia de malta de 6,13 mt. El resto es producido por compañías malteras que son proveedoras de las anteriores y también de otras cervecerías que no elaboran su malta.

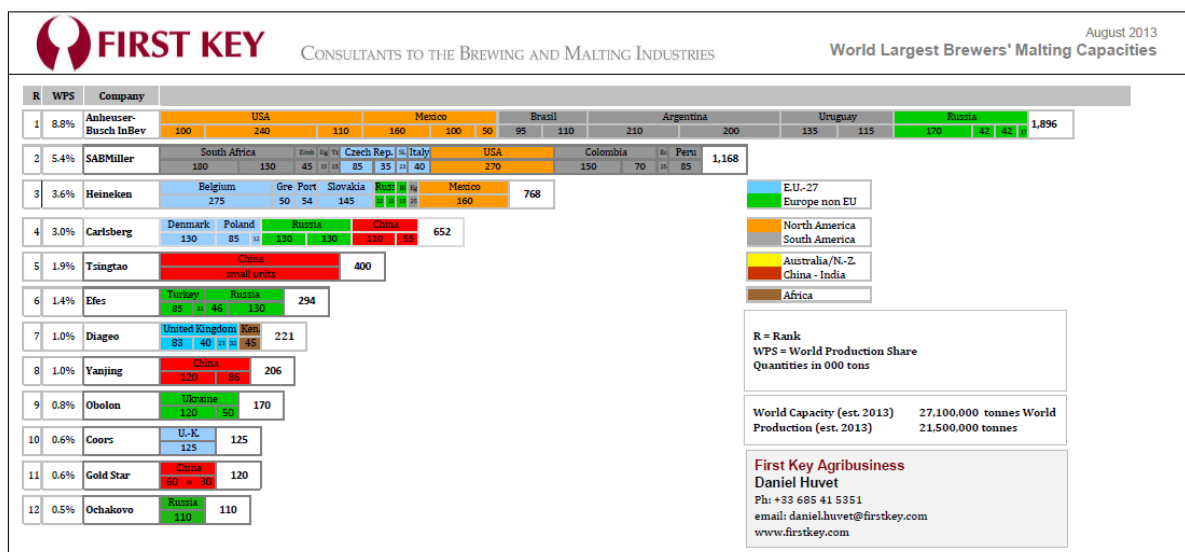


Figura 1.2: Capacidad de malteo de las mayores cervecerías del mundo

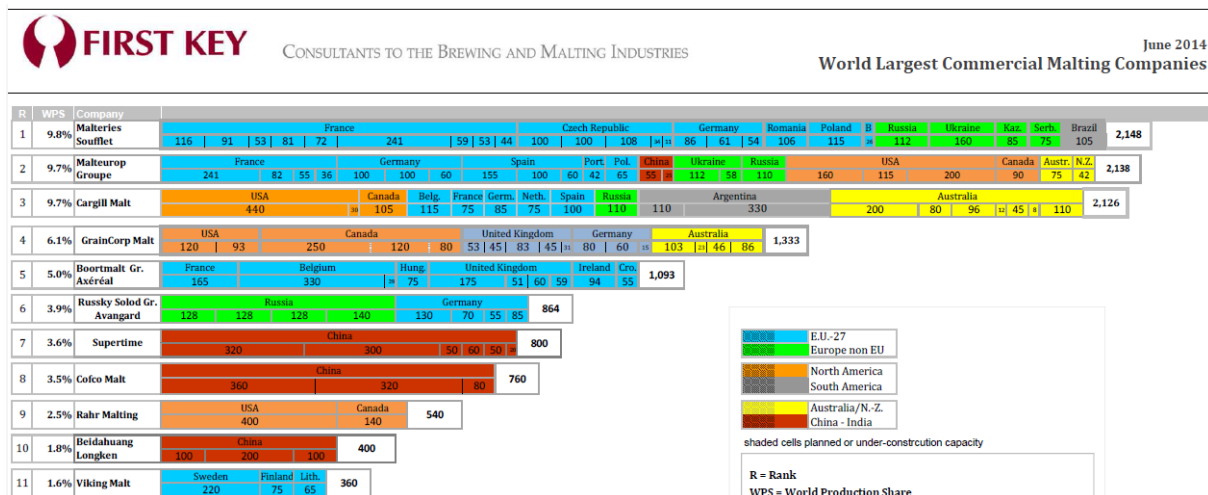


Figura 1.3: Capacidad de malteo de las mayores malterías independientes del mundo

1.2. Zonas de producción en Argentina

En nuestro país, las principales zonas de producción de cebada se encuentran en las Provincias de Buenos Aires (Centro-Norte, Sudeste, Sudoeste, Oeste), Santa Fe (Sur), Entre Ríos

(Sur), Córdoba (Sur) y La Pampa (Este). Debido al costo logístico de transporte y almacenamiento de la cebada para su procesamiento como malta, la ubicación geográfica de las malterías está relacionada con dichas regiones. Las cervecerías, en cambio, se encuentran dentro de las áreas de mayor consumo.

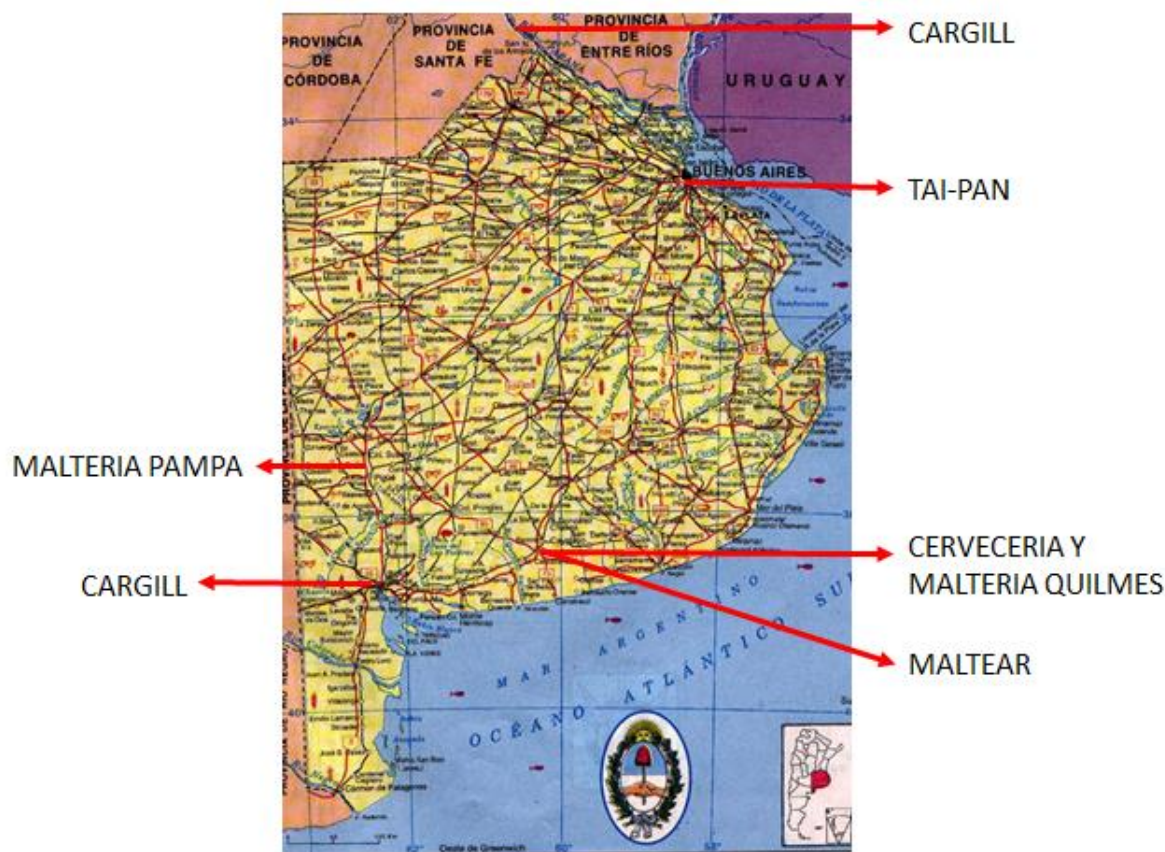


Figura 1.4: Ubicación geográfica de las plantas productoras de malta argentinas.

Algunas de las zonas mencionadas manifiestan una variabilidad climática temporal destacada, con años secos en el período de cultivo de cereales de invierno, resultando en menores rendimientos agronómicos y tamaño de los granos, y otras veces con buena disponibilidad hídrica, permitiendo la expresión de mayores rendimientos y mejor calidad comercial.

Particularmente para estos ambientes, se requiere variedades de cebada con estabilidad de calibre (tamaño de granos, medido por el porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm), para que las condiciones de sequía o de altas temperaturas durante el período de llenado de los granos no afecten la especificación de calidad comercial.

En la Provincia de Buenos Aires, las precipitaciones totales anuales disminuyen de este a oeste Aires (Figura 1.5). Una dificultad que se presenta en Argentina para la selección por tolerancia a sequía, es la variación temporal registrada aún en sitios que se encuentran al oeste de la isohieta de 600mm. En el área de producción no existen regiones en las que todos los años se presenten condiciones de sequía. Esto significa, años con déficit y otros con exceso en la misma zona. Por el contrario, en sitios con un mayor promedio de precipitaciones anuales, algunos años presentan condiciones de sequía en momentos relevantes del cultivo, disminuyendo el potencial de rendimiento y/o afectando el tamaño de los granos.



Figura 1.5: Distribución de lluvias en la Provincia de Buenos Aires.

Como ejemplo de las variaciones comentadas, la figura 1.6 muestra las precipitaciones anuales en Tres Arroyos, desde el año 1971 al 2016.

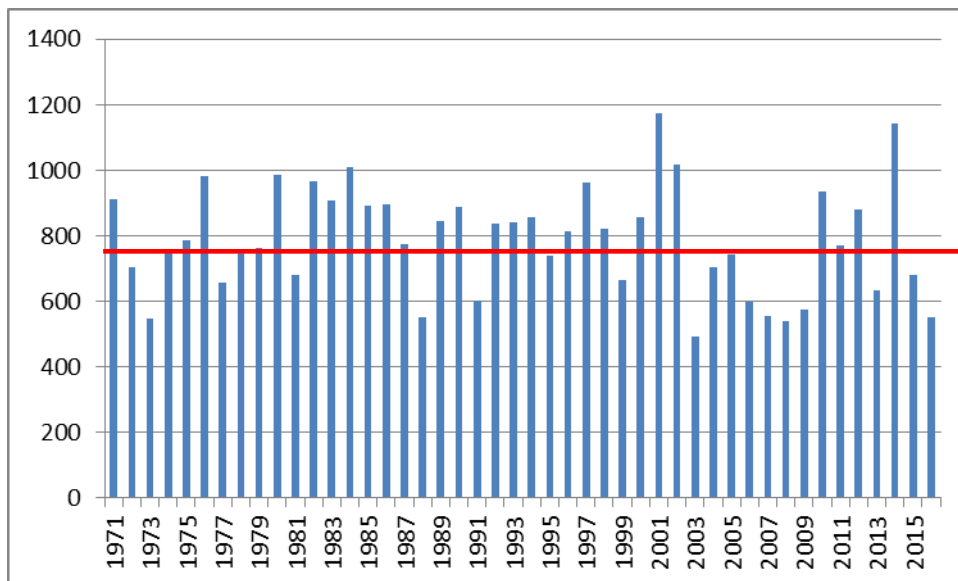


Figura 1.6: Precipitaciones totales anuales de Tres Arroyos (mm), serie 1971 a 2016. Promedio histórico: 788mm (línea roja).

El promedio del cuartil superior de la serie de 45 años es 999,8 mm, mientras que el promedio del cuartil inferior es 583,2mm.

En esa misma serie de años durante los meses de octubre y noviembre (meses más relevantes por la ocurrencia del período crítico del cultivo y del llenado de los granos), la variabilidad de las precipitaciones es aún más acentuada (Figuras 1.7 y 1.8).

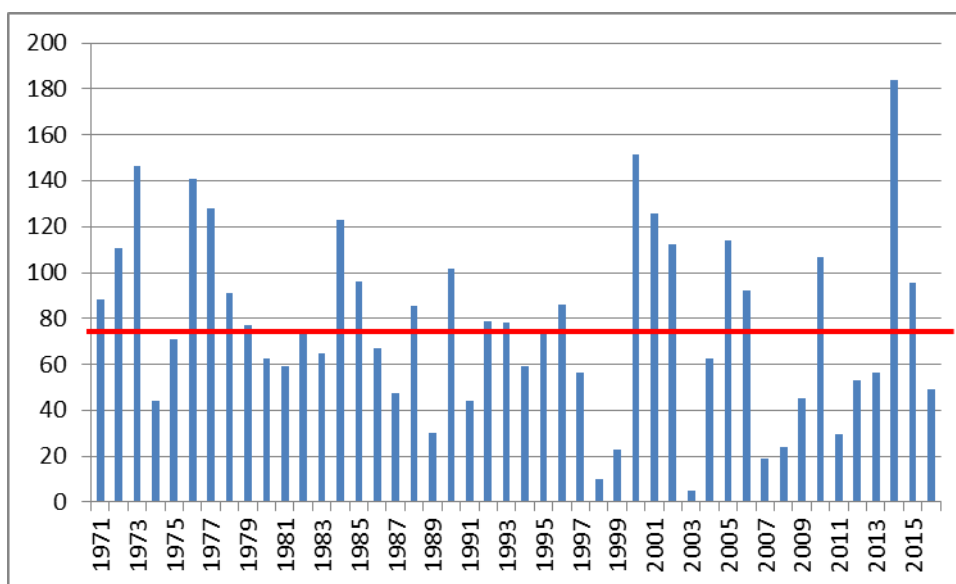


Figura 1.7: Precipitaciones del mes de octubre de Tres Arroyos, serie 1971 a 2016. Promedio histórico: 77,4mm (línea roja) Promedio cuartil superior: 131,2mm, promedio cuartil inferior: 29,3mm.

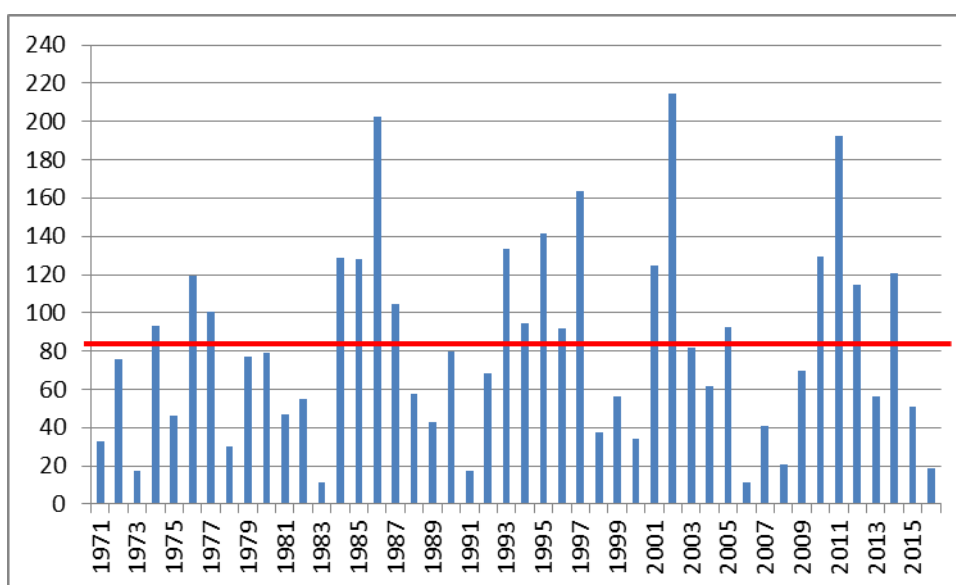


Figura 1.8: Precipitaciones del mes de noviembre de Tres Arroyos, serie 1971 a 2016. Promedio histórico: 84,1mm (línea roja). Promedio cuartil superior: 152,7mm, promedio cuartil inferior: 26,9mm.

El impacto de estas variaciones en el mejoramiento genético se manifiesta, por un lado, en la dificultad de seleccionar en forma continua por tolerancia a sequía, y por el otro, en la necesidad de liberar al mercado cultivares con potencial de rendimiento suficientemente alto para su expresión en los años con buena disponibilidad hídrica, y lo suficientemente estables en tamaño de granos y calidad industrial, para los años con déficit de agua.

1.3. Modificación del Endosperma de Cebada

Se denomina así al fenómeno de disolución enzimática de paredes celulares y matriz proteica. La transformación de cebada a malta está definida por la modificación del endosperma, que posibilita la exposición de los gránulos de almidón a la acción de enzimas amilolíticas.

Al iniciarse el proceso de germinación, las giberelinas sintetizadas en el embrión durante el llenado del grano, se movilizan hacia la capa de aleurona donde se activan la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas hacia el endosperma central (Fincher y Stone, 1993). Estas enzimas (denominadas en forma general glucanasas, proteasas y amilasas) movilizan las reservas del endosperma, disolviendo secuencialmente las paredes celulares, la matriz proteica y el almidón. Idealmente, la estructura del endosperma de los granos de malta (formada por paredes celulares y matriz proteica) se disuelve durante el transcurso de la germinación controlada. La germinación se interrumpe con el secado, antes de que la descomposición del almidón -que provee azúcares simples al embrión- alcance un grado de intensidad tal que ocasione pérdidas de sustrato para la cervecera. La amilólisis enzimática se realiza durante el cocimiento en la cervecera, transformando el almidón proveniente de la malta en carbohidratos fermentables (Bamforth y Barclay, 1993).

La tasa de síntesis de enzimas en la aleurona y la velocidad y eficiencia de la secreción enzimática dentro del endosperma son fundamentales para la calidad maltera. Una rápida y extensa degradación de los polisacáridos de las paredes celulares, beta-glucanos y arabinoxilanos, debe ocurrir a través de todo el endosperma (Palmer et al., 1985). Sería deseable entonces, que las enzimas hidrolíticas correspondientes sean secretadas rápidamente en el endosperma, teniendo mayor tiempo para completar la degradación de las paredes celulares. De la misma manera para las proteasas que solubilizan las hordeínas y degradan la matriz proteica en la cual los gránulos de almidón están embebidos. En este caso, debería asegurarse que la degradación proteica no sea excesiva, si no otros factores de la calidad podrían afectarse (Mac Gregor, 1996).

El tipo de endosperma, sea vítreo o harinoso, también tiene influencia en la modificación durante el malteado. El endosperma tipo harinoso tiene características deseables para la cebada cervecera, debido a que su condición facilita la absorción de agua y su distribución durante el remojo, y la modificación del endosperma durante la germinación (Palmer, 1989). Los granos vítreos tienden a tener niveles de proteína y beta-glucanos más altos, y gránulos de almidón de tamaño más pequeño que los endospermas harinosos (Mac Gregor, 1996).

Si bien la genética juega un rol en la determinación de la estructura del endosperma, las condiciones ambientales durante el crecimiento son muy importantes. Condiciones de crecimiento frescas tienden a producir endospermas harinosos, con niveles de proteínas más bajos, mientras que condiciones secas y cálidas tienden a producir cebadas con menor contenido de almidón, y en consecuencia, granos con mayores niveles de proteína y más vítreos. (Mac Gregor, 1996).

El contenido total de proteína del grano, es una de las características usada actualmente para predecir la calidad maltera potencial de un lote que proviene del campo. Es un parámetro sensible a las fluctuaciones de las condiciones ambientales (suelo, clima y manejo) y muestra una correlación negativa con otras determinaciones que definen la calidad. Mientras esta correlación provee una guía útil para predecir la calidad potencial, no siempre explica la variación que se observa entre años (Howard et al., 1996). Las características estructurales del grano como la densidad del endosperma, la partición entre proteína y almidón, el espesor de las paredes celulares, y el contenido de cáscaras, pueden afectar la absorción de agua y su distribución y así, la homogeneidad (MacLeod, 2000). La calidad maltera es un carácter complejo, dependiente de la interacción de características individuales expresadas durante el desarrollo del grano y durante el proceso industrial. Del primero resultan las diferencias en la estructura del endosperma y su composición (por ejemplo, cantidad de β -glucanos y hordeínas), mientras que del proceso de malteo derivan principalmente la producción de enzimas hidrolíticas y sus efectos sobre las células del endosperma y sus componentes de reserva (Lazzeri y Shewry, 1993; MacLeod, 2000).

1.4. Resistencia a la sequía

La sequía es el estrés abiótico más devastador que afecta la productividad de los cultivos, causada por lluvias insuficientes y/o por patrones de precipitación alterados o erráticos (Toker et al., 2007). La gravedad de la misma depende de la época de ocurrencia, duración e intensidad (Serraj et al., 2005). El impacto de la sequía en las producciones agrícolas se evidenció desde principios del siglo XVII, causado por los efectos de la intervención humana en la deforestación (Held et al., 2005). El incremento de las emisiones que causan el efecto invernadero se ha traducido en precipitaciones alteradas, aumento de superficies áridas, desertificación y finalmente, reducción de la productividad. Suele ir acompañada de temperaturas relativamente altas, que incrementan la evapotranspiración y afectan la cinética de la fotosíntesis, intensificando así sus efectos y reduciendo los rendimientos. Se prevé que la ocurrencia de sequía en muchas regiones productoras de alimentos aumentarán significativamente en respuesta al cambio climático (Collins et al. 2008; Reynolds y Ortiz 2010).

Una condición estresante es aquella que reduce la tasa de algún proceso fisiológico por debajo de la tasa máxima que la especie mantendría en condiciones favorables. Jacob Levitt (1972) tomó el concepto de “stress” de la física. El término alude a “*cualquier fuerza que actúa sobre un cuerpo y provoca una tensión o deformación del mismo*”, y lo adaptó a la biología como “*un factor externo que actúa sobre un organismo provocando modificaciones –respecto de su funcionamiento normal- de naturaleza físico y/o química*”. La fuerza generadora del estrés biológico está constituida por todas aquellas alteraciones que ocurren en el medio ambiente y que pueden influir en el desarrollo normal de la planta; esto corresponde a la función metabólica que ha sido modificada o alterada. (Goldberg et al., 2011).

En la literatura se encuentran muchas definiciones sobre resistencia a la sequía, expresadas de diferentes formas como resistencia, homeostasis, tolerancia, escape, adaptación, supervivencia, productividad en relación al uso de agua, protección contra o defensa frente al estrés hídrico. Pareciera que los recién llegados a esta disciplina de investigación, a menudo crean nuevas definiciones sin tener en cuenta las anteriores. Por ese motivo, Blum (2014) propone volver al concepto de resistencia a la sequía establecido por Levitt en 1972, quien establece que cuando el agua en el entorno de la planta llega a ser deficiente, la transpiración no puede satisfacer plenamente la demanda atmosférica, y así el déficit evoluciona. Este déficit

genera una tensión en la planta que causa daños e impulsa una red de respuestas que son proporcionales a su intensidad. La planta puede hacer frente a esta situación, evitando o tolerando la tensión. La resistencia a la sequía involucra dos componentes. Uno es el que "evita la deshidratación", siendo ésta la capacidad de reducir el déficit de agua de las plantas. El otro es el que "tolera la deshidratación" que es la capacidad para mantener las funciones de las plantas bajo déficit hídrico (Blum, 2014).

La tolerancia a la sequía es un carácter cuantitativo complejo controlado por varios genes de efecto menor y es a menudo confundido por diferencias fenológicas en las plantas (Bernabé et al., 2008; Fleury et al., 2010). Para abordar la complejidad de las respuestas de las plantas a la sequía, es vital comprender la base fisiológica y genética de esta respuesta. La falta de comprensión de los mecanismos moleculares en la estabilidad de rendimiento ha obstaculizado tanto los métodos tradicionales como el uso de la genética moderna en el mejoramiento de la tolerancia a la sequía de las plantas (Passioura 2010; Sinclair 2011). Los recientes avances en la fisiología de cultivos, el fenotipado sistemático y la genómica han dado lugar a conocimientos adicionales sobre tolerancia a la sequía, proporcionando nuevas herramientas para el mejoramiento (Tuberosa y Salvi, 2006). Mientras que la fisiología vegetal mejora nuestra comprensión acerca de la compleja red de caracteres relacionados con la tolerancia a la sequía, mejorando así la eficiencia de selección, los enfoques de la biología molecular y la genómica identifican genes candidatos y QTLs asociados con estos caracteres.

Para un adecuado abastecimiento de la industria cervecera, la tolerancia a la sequía tiene implicancias en el rendimiento (por el volumen de cebada que necesita como materia prima en las malterías), en el tamaño y porcentaje de N de los granos (por su calidad comercial), y en la calidad industrial. Existen antecedentes que muestran una influencia negativa en la calidad cuando el llenado de los granos se realiza en condiciones de déficit hídrico, debido a una mayor dificultad de modificar el endosperma durante el proceso de malteo (Aguinaga, 2004) y en la temperatura de gelatinización del almidón acumulado (Palmer, 1989, Mac Gregor, 1996).

1.5. Métodos directos e indirectos de selección por tolerancia a sequía

El estado hídrico de las plantas es una característica importante que impacta directamente en la fotosíntesis y en la tasa de crecimiento. Los mecanismos que regulan el uso del agua por la planta forman un área importante de investigación en fisiología del estrés y el mejoramiento (Aharon et al., 2014).

Sin entrar en el detalle particular de cada método, por escapar al objetivo de esta tesis, los métodos utilizados para medir el estado hídrico de las plantas son:

- Dispositivo electrónico para medir el uso de agua en tiempo real
- Cámara de presión para medir el potencial agua de las hojas
- Contenido relativo de agua
- Ajuste osmótico
- Conductancia estomática
- Imagen térmica
- Uso de polietilenglicol para variar el estado hídrico de las plantas
- Llenado de grano en condiciones de estrés hídrico por uso de reservas del tallo
- Determinación de carbohidratos solubles en tallo
- Refugio contra lluvia

NDVI (Normalized difference vegetation index)
Temperatura de canopeo (Blum et. al., 1982)
Índice de resistencia a sequía (IRS)

En esta tesis se utilizaron las dos últimas metodologías, con el fin de probar herramientas simples de selección por resistencia/tolerancia a una menor disponibilidad hídrica.

1.5.1. Temperatura de Canopeo

Uno de los roles importantes que cumple la transpiración (T) es el enfriamiento de las hojas. Así, la temperatura de canopeo (TC) y su reducción relativa a la temperatura del aire (TA) es una capacidad que tiene la planta de enfriar las hojas en un ambiente demandante. Las relaciones entre TC, TA y T no son simples, involucran condiciones atmosféricas (déficit de presión de vapor, TA y velocidad del viento), suelo (principalmente humedad) y planta (tamaño y arquitectura del canopeo, y ajustes de las hojas al déficit hídrico). En mejoramiento y selección por resistencia a sequía, el interés es encontrar genotipos que mantengan el nivel de transpiración, el intercambio gaseoso y una menor TC, cuando se comparan genotipos en las mismas condiciones de campo.

TC relativamente menores en cultivos estresados por sequía indican una mejor capacidad de tomar agua del suelo y mantener un mejor estado hídrico relativo, debido a caracteres constitutivos y adaptativos (Blum, 2009). Esta capacidad, expresada como menor TC, fue correlacionada con el rendimiento final bajo estrés (Reynolds, 2009). En las décadas de 1970/80 se publicaron trabajos que correlacionaban positivamente el rendimiento potencial de trigo con la conductividad estomática (ejemplo, Fisher et al., 1981). En los '90, las correlaciones positivas encontradas entre el rendimiento de trigo irrigado y la discriminación isotópica de C_{13} fueron evidencias indirectas de la correlación entre rendimiento y conductividad estomática. Adicionalmente, ambas variables estuvieron asociadas con una mayor actividad fotosintética (Condon et al., 1990). No obstante, la medición de actividad fotosintética y la discriminación isotópica resultan métodos poco prácticos y caros para aplicar en programas de mejoramiento, debido al número de progenies que se manejan en las etapas de selección y evaluación.

En cambio, la termometría infrarroja utilizada sobre el canopeo es un método suficientemente rápido como para ser usado en programas de selección. Existen resultados empíricos que han demostrado que la diferencia entre la temperatura de las hojas y la temperatura del aire se relaciona linealmente con la conductividad estomática (Pinter et al, 1990). Debido a que esta diferencia es negativa (generalmente la temperatura del canopeo es inferior a la temperatura del aire), Amani et al. (1996), utilizaron la “depresión de temperatura de canopeo” (DT) como el valor positivo de la diferencia entre TC y TA, estableciendo que de los factores publicados por otros investigadores (déficit de presión de vapor, temperatura del aire, radiación neta, resistencia aerodinámica del canopeo y velocidad del viento), el factor más dominante (además de la conductividad estomática), en cultivos bien irrigados, fue el déficit de presión de vapor (DPV), que se relaciona lineal y positivamente con la DT, y ésta con el rendimiento de trigo irrigado en ambientes de alta demanda atmosférica (clima seco y cálido) (Reynolds et al., 1994, Amani et al., 1996).

El uso de termómetros infrarrojos manuales, además del tiempo que requiere para medir cada parcela individualmente, tiene la desventaja de la ocurrencia de cambio de condiciones climáticas cuando el número total de parcelas a medir es alto. La depresión por temperatura salva

en parte el inconveniente del cambio de temperatura, pero no así la velocidad del viento, o la aparición repentina de nubosidad, que obliga a detener la medición en forma inmediata. Deery et al (2016) publicaron una metodología utilizando termografía aérea, mediante la cual se reduce la variación temporal del clima, cuando se realizan fenotipados de grandes experimentos con termómetros infrarrojos de mano. El método incluye un software desarrollado para el procesamiento de datos (píxeles) que relaciona las imágenes con la TC en forma muy rápida.

Sobre una población de RILs de trigo del cruzamiento Seri/Babax, Pinto y Reynolds (2015) encontraron que un mismo QTL estuvo asociado con menores temperaturas de canopeo para condiciones de sequía y de alta temperatura. Los genotipos “más frescos” tuvieron un sistema radicular más profundo, extrayendo 35% más de agua del perfil del suelo. Para las condiciones de mayor temperatura, ese grupo de genotipos concentró más raíces cerca de la superficie. Este uso de la TC profundiza el conocimiento de bases fisiológicas que podrían explicar un diferencial de rendimiento en condiciones estresantes.

1.5.2. Índice de Resistencia a la Sequía (IRS)

El rendimiento bajo estrés es un criterio de selección importante para ambientes limitados en agua. Sin embargo, debido al efecto del potencial de rendimiento en el rendimiento bajo estrés, este último no es una estimación sólida de la resistencia a sequía en términos de rendimiento. La proporción de reducción por estrés en rendimiento o biomasa (rendimiento bajo estrés como porcentaje del rendimiento sin estrés) se usa a menudo como un estimador de resistencia en términos de producción, en adición al rendimiento absoluto bajo estrés. La determinación de esta proporción requiere ensayos bajo condiciones de estrés por un lado y completa irrigación por otro.

El IRS desarrollado por Fisher y Maurer en 1978 es una mejora sobre la simple expresión de rendimiento bajo condiciones de estrés y no estrés. Aquí, el IRS muestra la proporción de la reducción de rendimiento debido al estrés en un genotipo comparado con la reducción promedio sobre todos los genotipos ensayados. Originalmente ellos propusieron un índice de susceptibilidad a sequía.

El cálculo se realiza con la expresión: $(Y_s/Y_n)/(M_s/M_n)$, donde Y_s y Y_n son los rendimientos del genotipo (o biomasa) bajo condiciones de estrés y no estrés, M_s y M_n son los rendimientos promedios (o biomasa) de todos los genotipos del ensayo en condiciones de estrés y no estrés.

Algunos mejoradores expresan que este índice no es una representación verdadera de la resistencia a la sequía en términos de rendimiento, ya que está sesgado por el potencial de rendimiento (rendimiento en condiciones de no estrés), es decir, los genotipos de mayor potencial de rendimiento tienden a expresar un índice más bajo (Blum, 1995).

1.6. QTLs relacionados con calidad industrial

Los caracteres que definen la calidad maltera (por ejemplo, contenido de extracto, actividad de α y β -amilasa, poder diastásico, contenido de β -glucanos, actividad de β -glucanasa, proteína de los granos, calibre, dormancia, entre otros) tienen herencia cuantitativa e influencia ambiental. Las tecnologías moleculares abrieron las puertas para una mejor comprensión de estos

caracteres, ya que los análisis de QTL identifican regiones cromosómicas, marcadores ligados, efectos génicos, interacciones QTL*ambiente y QTL*QTL. La tabla 1.1 muestra una revisión de QTLs mapeados y publicados de estudios realizados en EEUU, Europa, Australia y Asia (Zale et al., 2000).

Tabla 1.1: Resumen de los QTLs de calidad industrial mapeados en nueve poblaciones. AA: α -amilasa; BA/F: β -amilasa Un/gr harina; BA/P: β -amilasa Un/mgr de proteína; BBG: β -glucanos de cebada; Dor: dormición de cebada; DP: poder diastásico; EV: viscosidad de extracto; F/C: diferencia de molienda fina-gruesa; FMBGase: β -glucanasa en malta terminada; GMBGase: β -glucanasa en malta verde; GP: proteína en granos; KP: calibre de cebada; MBG: β -glucanos de malta; MBGase: β -glucanasa de malta; ME: extracto de malta; SMP: proteína soluble de malta; S/T: relación proteína soluble/proteína total; TMP: proteína total de malta; WC: transparencia de mosto.

Población de Mapeo	Cromosoma						
	1	2	3	4	5	6	7
Blenheim/E224-3		GP	DP, GP, KP		DP, GP, KP	KP	ME, DP
Calicuchima-sib/Bowman	AA, DP	AA, GP, ME		DP, AA		ME	AA
Chebec/Harrington		GP	Dor	DP, AA, BA/F			Dor
Clipper/Sahara		BA/F	FMB-Gase	BA/F	AA		
Dicktoo/Morex	AA, DP, F/C, GP	ME		GP, AA, DP, F/C	GP	GP	AA, DP, F/C, GP, ME
Galleon/Haruna Nijo		DP, GP, BA/F	BA/F	BA/F		DP, AA	BA/F
Harrington/TR 306	GP	BA/P	BA/P, BA/F, F/C, EV, MBG	Dor, KP, GP	DP, ME, GP, BA/F, BA/P, F/C	F/C, EV, AA, DP	ME, KP, GP, AA, DP, F/C, SMP, BBG, EV
Stephoe/Morex	ME, MBG, FMBGase, MBGase, Dor, AA, DP, BA/P	BBG, ME, DP, AA, GP, KP	KP, GP, MBG, TMP, AA, DP, WC, SMP	MBG, BA/P, BA/F, DP, AA, ME, GP, Dor, FM/GM, BGase	DP, ME, AA, KP, BA/F, MBG, FM/GMBGase	ME, BA/P, BA/F, AA, DP, GP	AA, DP, GP, FM/GMBGase, Dor, KP
Harrington/Morex	GP, DP, KP, BA/F, BA/P	ME, GP, BA/P, DP, KP, S/T		GP	KP	BA/P	GP, KP, AA, S/T

Ciento sesenta y ocho QTLs relacionados con 19 caracteres de calidad maltera fueron mapeados en nueve poblaciones. Las regiones genómicas donde se encontraron estos QTLs están distribuidas a lo largo de cada uno de los siete cromosomas de cebada, especialmente concentrados en los cromosomas 1, 2, 4, 5 y 7. Mientras que existe una buena conservación de ellos en algunos sectores cromosómicos entre las diferentes poblaciones, hay otros que son únicos. Es notable también que se mapearon muchos QTLs superpuestos, es decir, de caracteres relacionados. Por ejemplo, los QTLs de extracto de malta son casi siempre coincidentes con caracteres tales como actividad de enzimas hidrolíticas, siendo probable que la causa de ello sea la existencia de efectos pleiotrópicos. Dado que los determinantes de la calidad maltera están distribuidos en todo el genoma de cebada, se debe tener precaución en la elección de los QTLs

para seleccionar en los programas de mejoramiento. La magnitud del efecto, por supuesto, es un criterio que puede ser aplicado. En algunos casos, las regiones ampliamente conservadas pueden ser los objetivos de selección para mantener la calidad, pero la selección por regiones únicas puede conducir a nuevas mejoras.

El mapeo de QTLs en cebada ha recibido atención mundial. El proyecto North American Barley Genome Mapping se ha enfocado en las poblaciones de Steptoe/Morex, Harrington/TR306, Harrington/Morex, entre otras. En Europa, se ha estudiado la población Blenheim/E224/3, y en Australia, las poblaciones Chebec/Harrington, Clipper/Sahara and Galleon/Haruna Nijo.

1.7. QTLs relacionados con tolerancia a sequía

La mayor parte de los datos disponibles de trabajos con marcadores moleculares referidos a tolerancia a sequía están basados en mapeo por segregación y análisis de QTLs. Se están haciendo esfuerzos para comprender las bases genéticas de los caracteres fisiológicos que confieren ventajas en ambientes de sequía, aunque se le prestó menor atención a entender la estabilidad de rendimiento en ambientes secos y húmedos (Sylvänen, 2005). La tolerancia a sequía es un carácter cuantitativo típico, no obstante, hay genes simples que pueden cumplir un rol muy importante en la adaptación al déficit, como los que controlan el tiempo a floración o el tipo de espiga (Forster et al., 2004).

La aplicación del análisis de QTL ha provisto de buenas oportunidades para identificar regiones cromosómicas que controlan las variaciones de cambios fisiológicos, morfológicos y de desarrollo, observadas durante el crecimiento de las plantas en condiciones de sequía. Se ha prestado particular atención a:

- Variación genética de ajuste osmótico (Teulat et al., 1998; Robin et al., 2003)
- Bases genéticas de caracteres fisiológicos, ejemplo, “stay green” (Sanchez et al., 2002; Jiang et al., 2004; Verma et al., 2004)
- Habilidad de las raíces para explorar suelo profundo (Johnson et al., 2000; Nguyen et al., 2004)
- Limitación de uso de agua reduciendo área foliar y período de crecimiento (Anyia and Herzog, 2004)
- Discriminación isotópica (Martin et al., 1989; Juenger et al., 2005; Saranga et al., 2004)
- Limitación de la pérdida de agua no estomática desde las hojas, por ejemplo, a través de la cutícula (Lafitte and Courtois, 2002)
- Respuesta de la velocidad de alargamiento foliar en función de la humedad del suelo y la demanda de evaporación (Reymond et al., 2003).

Los análisis comparativos de resultados de QTLs muestran que las regiones cromosómicas que determinan variación en caracteres agronómicos y fisiológicos relacionados con sequía cubren una gran proporción del genoma total. Existen colecciones de QTLs relacionados con sequía de muchas especies cultivadas en bases de datos abiertas como GRAMENE (www.gramene.org/) o GRAINGE (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/>). La asociación entre la variación de caracteres cuantitativos relacionados con sequía y los efectos de esos caracteres en rendimiento en ambientes favorables y con déficit, es la principal meta de investigaciones presentes y futuras. Buscando la coincidencia entre loci de caracteres específicos y loci para rendimiento bajo estrés y en ambientes libres de estrés, es posible ensayar más

precisamente si un carácter específico tiene significancia en mejorar la tolerancia y el potencial de rendimiento. Por ejemplo, en arroz, los QTLs para rendimiento en estrés fueron coincidentes con QTLs para caracteres de raíz y ajuste osmótico (Babu et al., 2003). Varios loci mayores para rendimiento bajo diferentes regímenes ambientales fueron mapeados junto con QTLs para senescencia tardía de la hoja bandera en trigo (Verma et al., 2004).

La estrategia de genes candidatos promete acercar los enfoques de genética cuantitativa y molecular para estudiar caracteres complejos y ha sido aplicado, por ejemplo, para encontrar genes potencialmente involucrados en tolerancia a la sequía para cebada y arroz (Zheng et al., 2003; Nguyen et al., 2004; Diab et al., 2004; Tondelli et al., 2006).

1.8. Determinantes fisiológicos y genéticos de la tolerancia a sequía

La sequía es el estrés ambiental más importante en agricultura, y por esa razón, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la productividad bajo condiciones limitantes de agua. Mientras que la selección natural de las especies favoreció los mecanismos de adaptación y sobrevivencia, el mejoramiento ha dirigido la selección hacia el incremento del rendimiento de las especies. Con muchos años de mejora se lograron incrementos en ambientes secos, y además, los trabajos de investigación han provisto ganancias significativas en la comprensión de las respuestas fisiológicas y moleculares de las plantas bajo déficits de agua. No obstante, todavía hay una gran brecha de rendimiento entre condiciones óptimas y con estrés. Minimizar esta brecha e incrementar la estabilidad de rendimiento son las vías de importancia estratégica para garantizar alimentos en el futuro.

La evolución de los cultivos desde su domesticación se ha conducido mediante la selección de caracteres deseables a nivel fenotípico. De todas maneras, la selección directa por rendimiento bajo condiciones de estrés por sequía ha sido obstaculizada por la baja heredabilidad, control poligénico, epistasia, interacciones genotipo*ambiente y QTL*ambiente significativas (Piepho, 2000). La complejidad de los mecanismos de tolerancia a sequía explica el lento progreso en mejora de rendimiento en ambientes secos. Afortunadamente, en los últimos años la fisiología y la genómica están trayendo nuevas ideas en la tolerancia a sequía, aportando quizás otras herramientas para el mejoramiento (Tuberosa y Salvi, 2006).

Los incrementos en potencial de rendimiento logrados por el mejoramiento están bien documentados para la mayoría de los cultivos (Grausgruber et al., 2002). Frecuentemente, la ganancia genética ha sido estudiada comparando en el mismo ensayo el rendimiento de los cultivares liberados en diferentes épocas. Para la mayoría de los cultivos se encontró una relación lineal entre el rendimiento y el año de liberación, y así, la pendiente de la recta da una estimación de la mejora (Abeledo et al., 2002). La comparación de los cultivares hizo posible la identificación de los caracteres morfo-fisiológicos asociados con el aumento de rendimiento. Por ejemplo, los trabajos realizados con genotipos de trigo y cebada mostraron que el incremento en rendimiento de granos estuvo correlacionado directamente con un incremento en el índice de cosecha, desde 30% hasta 55% (Slafer et al., 1994), mientras que la acumulación total de biomasa permaneció casi invariable a lo largo de los años, debido a una reducción en altura de planta, proceso asociado con la introgresión en el germoplasma elite de unos pocos genes que afectaron la altura de las plantas, principalmente *Rht* en trigo (Slafer et al., 1994) y *swd* en cebada (Lundqvist et al., 1997; Franckowiak et al., 2005). En general, se ha registrado una ganancia genética de 10 a 50 kg/ha por año para cereales y legumbres, incluyendo aquellas caracterizadas por vastas regiones secas. En Argentina, las estadísticas de rendimiento de cebada

muestran una ganancia genética promedio de 60 kg/ha/ año, desde el año 1970 hasta el 2015 (Figura 1.9)

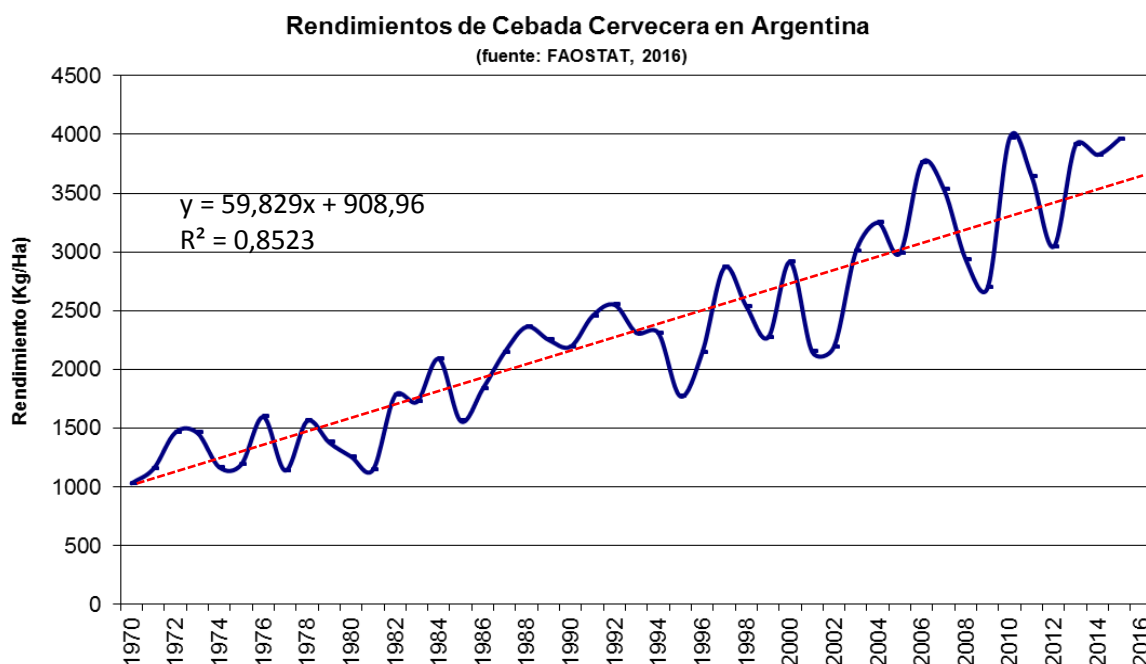


Figura 1.9: Evolución de rendimientos promedios comerciales en Argentina, período 1970 – 2015. Datos extraídos del sitio web de FAO, 2016.

La información obtenida de la ganancia genética comparando cultivares de diferente año de liberación no es absoluta debido a la influencia ambiental (fundamentalmente, disponibilidad de agua) sobre el comportamiento de las variedades. Cuando los valores de rendimiento de trigo y cebada fueron estimados en ambientes con diferente disponibilidad de agua, el progreso de rendimiento atribuido a la mejora genética fue, en términos absolutos, más altos en los ambientes caracterizados por un bajo nivel de estrés (Slafer et al., 1994). Sin embargo, cuando los incrementos de rendimiento fueron expresados en porcentaje, no se registraron diferencias en ambientes con diferentes grados de estrés. Esto sugiere que algunos de los caracteres seleccionados para mejorar el rendimiento conducen también a aumentos de rendimiento en ambientes secos (Araus et al., 2002).

Una cantidad de estudios fisiológicos han identificado algunos caracteres por los cuales su presencia o expresión está asociada con la adaptabilidad a sequía. Entre ellos, caracteres como plantas pequeñas, área foliar reducida, precocidad y cierre estomático prolongado, conducen a una evapotranspiración total reducida, pero también a un menor potencial de rendimiento (Fischer and Wood, 1979). Dependiendo de las condiciones de estrés (momento e intensidad) de los ambientes objetivo, algunos caracteres adaptativos pueden ser considerados para la mejora de rendimiento bajo sequía si ellos permiten a las plantas enfrentar un evento de estrés que tiende a ocurrir cada año en la misma etapa de crecimiento. Por ejemplo, un buen nivel de precocidad es una estrategia de mejoramiento efectiva para mejorar la estabilidad de rendimiento en ambientes mediterráneos cuando la cebada es expuesta a sequías terminales. En estas condiciones, acortando la duración del cultivo, una estrategia de escape típica, puede ser útil en sincronizar el ciclo de cultivo con las condiciones ambientales más favorables. Es sabido, sin embargo, que una precocidad extrema conduce a penalidad de rendimiento, con precocidad no correlacionada con

rendimiento en ambientes mediterráneos. Una floración tardía, seguida por un período de llenado de grano corto, puede estar asociada con un rendimiento más alto cuando la sequía se produce en una etapa temprana del ciclo, durante la fase vegetativa (van Ginkel et al., 1998).

1.9. Guía para el futuro

El esquema de la figura 1.10 fue publicado por Mir et al. (2012), como un enfoque holístico que integra genómica, fisiología y mejoramiento genético para desarrollar variedades con mayor tolerancia a la sequía, a partir de la necesidad de un trabajo multidisciplinario para enfrentar las consecuencias del cambio climático. La ocurrencia de sequías en todo el mundo se ha tornado endémica debido a este cambio. Esto trae serias preocupaciones y coloca una gran responsabilidad en los científicos para desarrollar variedades adecuadas para la sequía. Optimizar la estabilidad de rendimiento de los cultivos principales y de los cultivos localmente importantes es esencial. Mantener la seguridad de cosecha en este escenario requiere enfoques sistemáticos que incluye el desarrollo y uso de germoplasma resistente a la sequía (Reynolds and Ortiz, 2010). Se cree que los avances recientes en fisiología, genómica y futuras estrategias de mejoramiento, conducirán la naturaleza multigénica de los estreses abióticos, incluyendo la sequía.

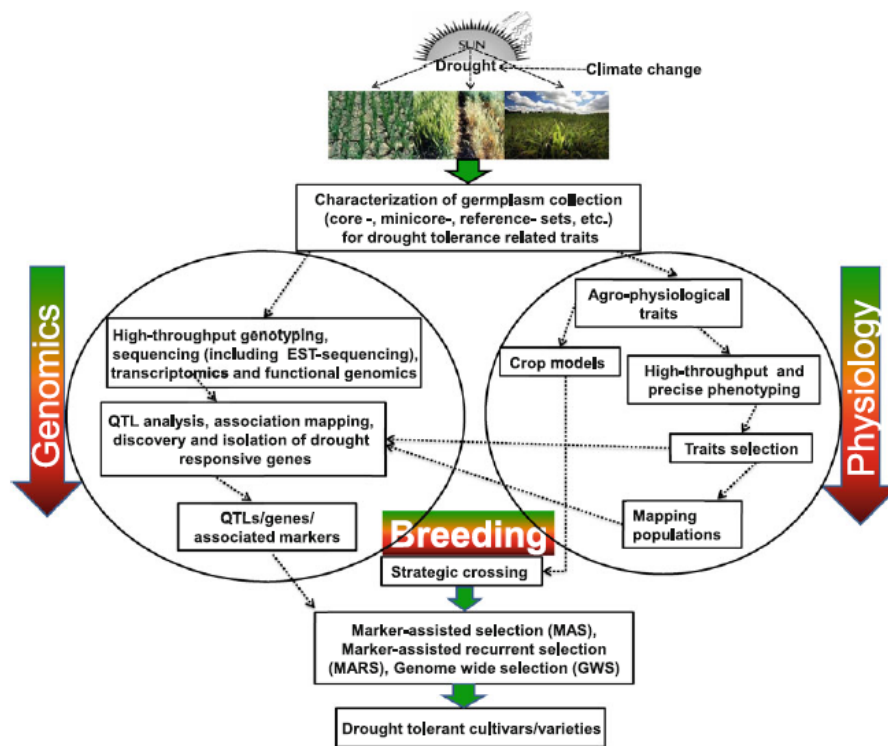


Figura 1.10: Enfoque holístico que integra genómica, fisiología y mejoramiento genético para desarrollar variedades con mayor tolerancia a la sequía (Mir et al., 2012)

1.10. Propósito de esta tesis

En los años previos a la idea original de esta tesis, se observó la complejidad que causaba la variabilidad climática para seleccionar genotipos que respondiesen favorablemente a situaciones de sequía. Esto significa que las líneas que manifestaban buena calidad en ambientes sin restricciones de agua, mostraban mala calidad cuando las condiciones climáticas durante el cultivo eran estresantes.

Se puede afirmar que, en definitiva, esto también ocurre con el rendimiento. Pero en el caso de la calidad industrial, el desafío es encontrar líneas que, aún sabiendo que no podrán manifestar el potencial de calidad desarrollado en ambientes sin restricciones, al menos poder manifestar una calidad aceptable, por ejemplo, cumpliendo con las especificaciones mínimas de calidad de malta.

Los micromalteos y las determinaciones de calidad de malta son costosas y requieren de tiempos mayores a los análisis realizados para definir la calidad en otras especies. Una capacidad limitada de micromaltear y analizar las muestras de malta, habitualmente obliga a hacerlo solamente para líneas más avanzadas, por ejemplo, con dos o más de dos años de ensayos. Idealmente, el *screening* por calidad debería comenzar en etapas de desarrollo anteriores, por ejemplo, en las progenies F₅ ó F₆ de poblaciones segregantes, o con pocos gramos en caso de provenir de producción de doble haploides, pero la selección en estas etapas requeriría una cantidad elevada de micromalteos, muchas veces difícil de realizar.

Al momento de definir la posibilidad de mapear QTLs para realizar selección asistida, en el programa de mejoramiento de Cervecería y Maltería Quilmes estaba comenzando a utilizarse:

- 1) Para calidad: el método de dureza de malta con Farinógrafo Brabender para seleccionar las mejores líneas por capacidad citolítica, utilizando solamente 12 gramos de muestra.
- 2) Para rendimiento y calibre: métodos de estabilidad

Posteriormente, fueron pensados como posibilidad de herramientas simples de selección en etapas muy tempranas:

- 3) La temperatura de canopeo, para detectar líneas que mantuvieran el canopeo con menor temperatura, principalmente durante la etapa de llenado de los granos, con la idea de detectar líneas con mayor acumulación de almidón en los granos, componente principal del extracto, además del posible beneficio para rendimiento y tamaño de los granos;
- 4) la respuesta a fotoperíodo, por haber sospechado relaciones negativas entre dicha respuesta y calidad en 3 tipos de germoplasma (argentino, europeo y norteamericano).

Estas ideas, lejos de pretender ser estudiadas a un nivel de profundidad necesario para la búsqueda de respuestas fisiológicas (escapando al objetivo de la tesis), buscaban la manera de hacer más rápido y eficiente el proceso de selección.

En el año 1999, el Dr. Max Baumer, mejorador del Instituto Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft de Alemania, quién era asesor externo del programa de Investigación de Cervecería y Maltería Quilmes, observó que la línea Mut 6519 manifestaba características de tolerancia a la sequía en un ensayo comparativo de rendimiento en el Criadero de la Asociación de Cooperativas Argentinas de la localidad de Cabildo. Teniendo como objetivo el logro de una calidad aceptable en condiciones limitantes de agua, el Dr. Baumer pensó en la posibilidad de generar una población de doble haploides a partir del cruzamiento entre la línea Mut 6519, de aparente tolerancia a la sequía y calidad industrial media a baja (como se verá en la explicación correspondiente en el capítulo de Materiales y Métodos), con la variedad Aspen, de muy buena calidad industrial. A partir de esta población, el objetivo era realizar el mapeo de QTLs de caracteres de calidad, con el fin de detectar QTLs que se expresen en ambientes con limitaciones de agua.

Debido a que en los ensayos realizados se registraron datos agronómicos, (además de los relacionados con calidad de las muestras micromalteadas, motivo principal del trabajo), se incluyeron también las sgtes determinaciones:

- Rendimiento,
- Calibre, como componente de calidad comercial,
- Proteína, como componente de calidad comercial e industrial,
- Temperatura de canopeo,
- Respuesta a fotoperíodo,

En definitiva, el mapeo de QTLs asociados a las determinaciones de calidad industrial, así como otras herramientas de fenotipado, fueron evaluados como una solución a la eficiencia de selección en los ambientes con menor disponibilidad de agua, para lo cual, se plantearon las hipótesis y objetivos detallados en el punto 1.11.

1.11. Hipótesis y Objetivos específicos

1.11.1. Hipótesis 1

La variabilidad climática observada entre sitios y años en la zona de producción de cebada de Argentina genera diferencias de rendimiento y calibre en un mismo genotipo. Tales variaciones causan una mayor complejidad en la selección de líneas y poblaciones segregantes en los programas de mejoramiento.

Objetivo 1.1: Explorar la variabilidad climática espacial y anual en cuatro localidades del Sudeste y Sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, donde se realiza alrededor del 65% del cultivo.

Objetivo 1.2: Evaluar el rendimiento y tamaño de los granos en los ambientes experimentales y relacionarlo con la variabilidad climática.

Objetivo 1.3: Evaluar el efecto del riego suplementario sobre el rendimiento y tamaño de los granos y relacionar los resultados con los obtenidos en sitios de diferente disponibilidad de agua.

Objetivo 1.4: Presentar diferentes métodos de estabilidad de rendimiento y tamaño de granos.

Objetivo 1.5: Evaluar la temperatura de canopeo y la respuesta a fotoperíodo como herramientas simples de selección para rendimiento y tamaño de los granos.

1.11.2. Hipótesis 2

Las variaciones ambientales generan diferencias de calidad industrial, afectando el porcentaje de proteína de los granos de cebada, y otros parámetros de calidad de la malta obtenida.

Objetivo 2.1: Evaluar los resultados de calidad industrial en diversas situaciones ambientales.

Objetivo 2.2: Analizar el contenido de proteína de los granos y los posibles factores que lo afectan.

Objetivo 2.3: Evaluar parámetros de calidad aparentemente relacionados, con el fin de buscar correlaciones que permitan disminuir el número de determinaciones analíticas para seleccionar eficientemente.

1.11.3. Hipótesis 3

Es posible construir un mapa de ligamiento de marcadores AFLP y SSR a partir de una población de mapeo de doble haploides proveniente del cruzamiento entre las líneas Mut 6519 y Aspen.

Objetivo 3.1: Obtener una población de mapeo a partir del cruzamiento de la línea Mut 6519 con la variedad Aspen,

Objetivo 3.2: Analizar marcadores AFLP y SSR en dicha población de mapeo

Objetivo 3.3: Establecer las relaciones de ligamiento entre los marcadores moleculares utilizados (AFLP y SSR), posibilitando la construcción de un mapa genético de cebada.

1.11.4. Hipótesis 4

Es posible identificar regiones genómicas relacionados con rendimiento, tamaño de los granos, respuesta a fotoperíodo, temperatura de canopeo y todas las determinaciones analíticas que caracterizan la calidad industrial de cebada.

Objetivo 4.1: Localizar QTLs para todos los caracteres agronómicos y de calidad estudiados, utilizando un software de mapeo.

Objetivo 4.2: Verificar si las regiones genómicas identificadas con calidad en ambientes de adecuada disponibilidad hídrica son diferentes a las regiones que lo hacen en ambientes con deficiencia, con el fin de utilizar esta metodología para selección asistida en ambientes contrastantes.

Objetivo 4.3: Determinar si para caracteres de calidad relacionados (por ejemplo, extracto con proteína) aparecen QTL en posiciones coincidentes o cercanas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Material genético

Para la realización de esta tesis se obtuvieron líneas doble haploides (DH) procedentes del cruzamiento entre la línea mutante Mut 6519 y la variedad europea Aspen.

La línea Mutante 6519 se originó a partir de un tratamiento mutagénico con azida sódica 2×10^{-4} M sobre semillas de la variedad Quilmes Painé, realizado por el Ing. Agr. Alberto R. Prina del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (Convenio INTA - Cervecería y Maltería Quilmes, 1992). En la generación M6 se tuvo el primer registro de resistencia a sequía de esta línea y al año siguiente, con intensa sequía en la localidad de Cabildo (Provincia de Buenos Aires), la línea Mut 6519 participó de un ECR en el Criadero de la Asociación de Cooperativas Argentinas, en el que demostró muy buen tamaño de los granos a pesar de dicha condición ambiental (Anexo 1).

2.1.1. Caracterización fisiológica de la línea Mut 6519

En el año 2008, el Profesor Urs Schmidhalter, responsable del Institute of Plant Nutrition, School of Life Sciences, Universidad Técnica de Múnich, Weihenstephan, evaluó variables fisiológicas de la Mut 6519 (asimilación, transpiración, conductividad estomática y eficiencia de uso de agua). La Figura 2.1.1.1 muestra los resultados de dichas variables fisiológicas. Con los valores obtenidos, se consideró a la línea Mut 6519 como tolerante a sequía (Hofmann et al., 2009).

El experimento fue realizado en macetas y colocadas en cámara de exposición en el Helmholtz Center in Neuherberg, Munich. Se ensayaron tres genotipos: Barke, una variedad de cebada de origen alemán (Criadero Breun) con buena calidad maltera, la línea Mut 6519, con antecedentes en el campo de buena tolerancia a sequía, y la línea IPZ 24727 del Instituto LfL de Alemania, con antecedentes de buena tolerancia a la exposición a rayos UV.

Se sembraron un set de 4 plantas x 4 repeticiones con riego continuo y otro set de 4 x 4 plantas irrigado hasta fin de espigazón, y luego sometido a un período de estrés por sequía durante 12 días. El clima simulado en el interior de la cámara fue una imitación del promedio de clima de los años 2004 a 2006 de Múnich, comenzando en abril y finalizando a mediados de agosto.

V105 gas exchange measurements
22.01.-12.02.2008

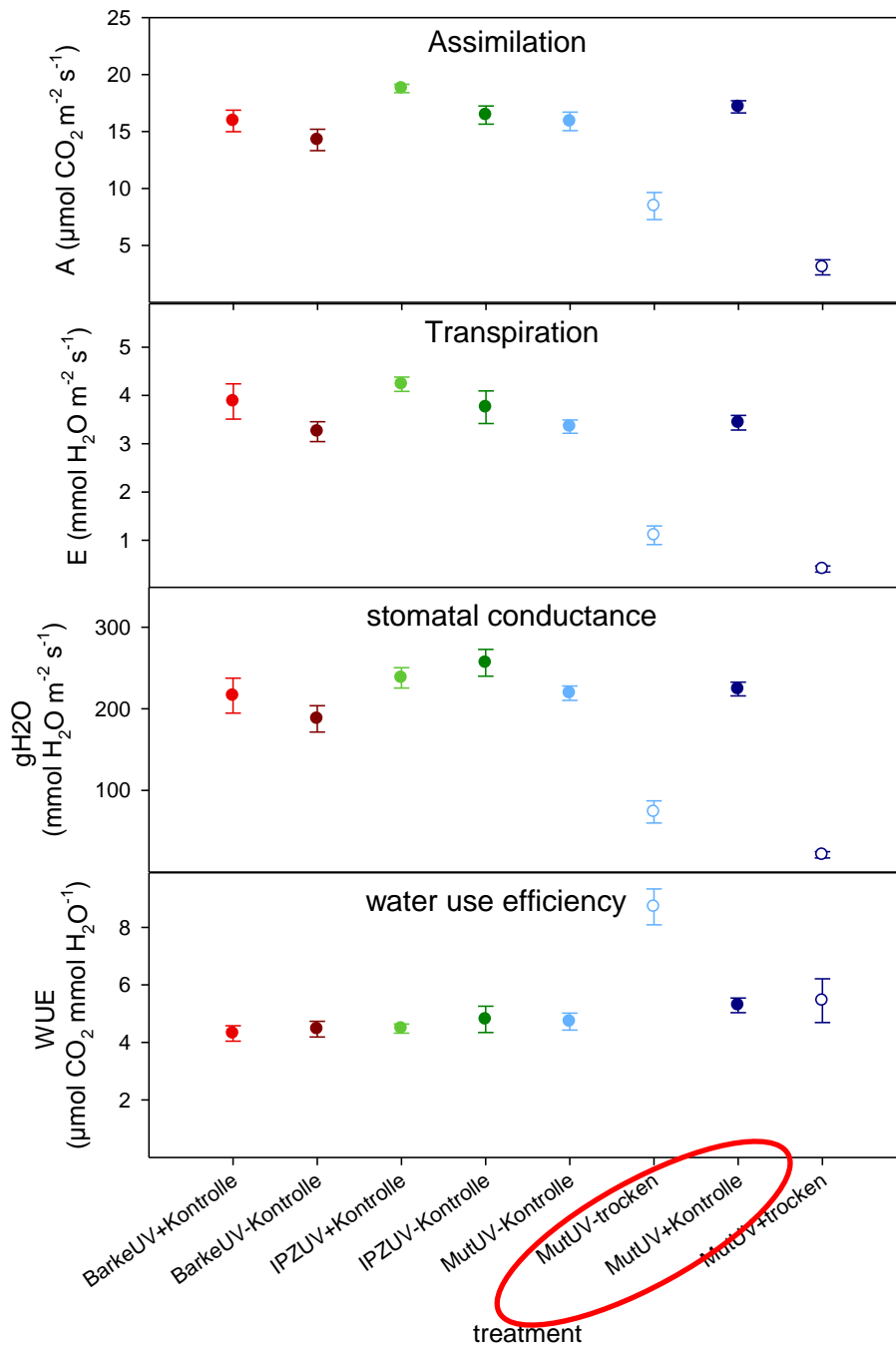


Figura 2.1 Caracterización fisiológica de la línea Mut 6519. Mut UV- Kontrolle = Mut 6519 control sin aplicación de rayos ultravioleta. Mut UV- trocken = Mut 6519 sin aplicación de rayos ultravioleta y crecimiento en sequía, Mut UV + Kontrolle = Mut 6519 control con aplicación de rayos ultravioleta. Mut UV + trocken = Mut 6519 con aplicación de rayos ultravioleta y crecimiento en sequía.

En la Fig. 2.1 Se observa mayor eficiencia de uso de agua, menor conductividad estomática y menor transpiración en el tratamiento Mut UV- sequía, comparado con el control y con otros tratamientos del mismo ensayo. Como aspecto negativo de producción de biomasa se

observa una menor asimilación, comparado con los mismos tratamientos mencionados anteriormente.

2.1.2. Características agronómicas de la línea Mut 6519

En el Anexo 1 se describen la forma de obtención de la línea Mut 6519 y la genealogía hasta línea estable.

En el año 1998, correspondiente a la generación M₆ en el registro de ese año del Criadero Quilmes consta que la parcela 98/M/544 tuvo el primer registro de tolerancia a sequía. “Observación 2/11/98: planta totalmente verde (hasta las hojas inferiores) a pesar de la condición de sequía”.

La línea Mut 6519 tiene alta respuesta a fotoperíodo y ciclo a floración intermedio (valor 4 de una escala de 1=tardío a 9=precoz, se verá en el capítulo correspondiente), muy similar a genotipos desarrollados en la década del 90 por el programa de mejoramiento de Cervecería y Maltería Quilmes.

Con respecto al rendimiento, en el registro de análisis Head to Head del año 2000 que compara la línea Mut 6519 con los testigos de la época, el promedio de 23 ensayos realizados en los años 1998, 1999 y 2000, la línea Mut 6519 dio 4082,79 Kg/Ha versus 3776,06 Kg/Ha de Quilmes Palomar (108,1% de Q. Palomar, valor “t” = -2,94, estadísticamente significativo), y 4140,80 de Quilmes Painé (98,6% de Q. Painé, valor “t” = 0,74, no significativo).

La calidad industrial de Mut 6519 se considera media a baja, debido a que en la época de desarrollo de ésta y otras líneas del programa de CMQ, el período de germinación en Argentina era de 6 días, es decir, las especificaciones industriales podrían cumplirse con una germinación larga. Es la misma situación de Quilmes Painé (variedad sobre la que se realizó el tratamiento mutagénico). En Europa, en la misma época, el tiempo de germinación ya había sido acortado, desarrollándose variedades más rápidas en germinar y cumplir con las especificaciones de malta. Es el caso de Aspen (padre de la población de DHs) y de otras variedades como Scarlett y Barke, inscriptas en Alemania en el año 1994. Se verá en el capítulo correspondiente a calidad industrial, con 4 días de germinación el contenido de β -glucanos de alto peso molecular en el mosto, indicador de la capacidad enzimática para descomponer paredes celulares y sus productos, es significativamente más alto en Mut 6519 que en Aspen.

2.1.3. Características de Aspen

El cv. Aspen es una variedad de cebada cervecera primaveral de origen europeo, obtenida por el Criadero Nickerson y liberada en el año 1999. Se obtuvo a partir del cruzamiento de las variedades Vintage y Chariot. Tiene excelente calidad industrial (Índice de Calidad de Malta = 9), alta resistencia a *Erysiphe graminis*, media a *Drechslera teres* y leve susceptibilidad a *Puccinia hordei* y *Rhynchosporium secalis* (Braugersten Jahrbuch, 1998). La elección de esta variedad como padre se basó en los resultados de rendimiento agronómico en Alemania, y fundamentalmente por la excelente calidad industrial.

Las características que diferencian a ambos padres se resumen en la Tabla 2.1.1.

Tabla 2.1.1: Resumen de las características del cv. Aspen y de la línea Mutante 6519

Parental	ASPEN	MUTANTE 6519
Origen	Europa	Argentina
Potencial de Rendimiento	Alto	Medio
Calibre en ambientes con estrés hídrico	Medio	Alto
Respuesta a fotoperíodo	Media	Alta
Calidad Industrial	Alta	Media a baja

2.2. Protocolo de obtención de plantas doble haploides: cultivo de anteras

Para este propósito, se siguió el protocolo desarrollado en el Instituto LfL Pflanzenbau (Instituto de Producción de Cultivos y Mejoramiento de Plantas del Estado de Bavaria, Alemania) por el Dr. Gert Daniel (2006).

En el año 2005 se realizaron los cruzamientos entre la línea Mut 6519 y la variedad Aspen, con el fin de obtener plantas F₁, cuyas flores fueron el origen de las anteras utilizadas para la obtención de los doble haploides.

Consta de las siguientes etapas:

2.2.1. Cultivo de plantas donantes de anteras

Las plantas donantes son aquéllas de las cuales se extraen las anteras. Las mismas deben crecer en ambientes controlados para asegurar óptimas condiciones, ya que de haber factores que producen estrés durante el crecimiento, éstas podrían afectar profundamente la respuesta androgénica. El vigor de estas plantas es influenciado por varios parámetros, tales como temperatura, intensidad de luz, fotoperíodo, nutrición, disponibilidad de agua. Cuanto más apropiadas y uniformes sean las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, más uniforme es el desarrollo de las microsporas y mayor es la cantidad de plantas verdes obtenidas. Para lograr una buena tasa de macollaje, y con esto un mayor número de espigas y de anteras en estado óptimo para ser sembradas *in vitro*, las condiciones de cultivo en macetas son las descritas en la tabla 2.2.1.

Tabla 2.2.1. Condiciones de crecimiento de plantas donantes de anteras

ETAPA	AMBIENTE	TEMPERATURA (°C)	LUZ (tipo y horas)	TIEMPO (días)
Siembra y germinación	Invernadero	18-24	Natural	10
Vernalización	Cámara	4	Tubos luz blanca, 11	28
Crecimiento vegetativo 1	Cámara	8	Lámparas HQ 400 Osram	28
Crecimiento vegetativo 2	Cámara	14-16	Lámparas HQ 400 Osram	28
Floración	Invernadero	14-16	Natural	28

2.2.1.1. Siembra: Por cada cruzamiento se toman entre 10 a 15 semillas y se colocan en *bins* de macetas pequeñas (diámetro de 4,5 cm), con tierra. Se mantienen 10 días en invernáculo, con temperatura entre 18 a 24 °C, con luz natural y riego moderado, manteniendo solamente la superficie levemente húmeda al tacto.

2.2.1.2. Vernalización: en el caso de cebadas primaverales (como es el caso de Aspen y Mut 6519), este requerimiento no es indispensable, pero se ha comprobado que la aplicación de un período de bajas temperaturas induce una mayor cantidad de macollos y por lo tanto, de espigas y anteras para extraer. El proceso de vernalización se lleva a cabo en una cámara a 4 °C, con luz blanca (tubos fluorescentes)

2.2.1.3. Crecimiento vegetativo 1: las plantas en *bins* se trasplantan a macetas de 14 cm. de diámetro, y se colocan en cámara por un período de 3 a 4 semanas a 8 °C, con nivel medio de riego, controlado diariamente como en la etapa anterior, y lámparas HQ 400 Watts, a razón de 1 lámpara por metro cuadrado.

2.2.1.4. Crecimiento vegetativo 2: en la misma cámara de crecimiento se incrementa la temperatura a 14 – 16°C, bajo la misma iluminación.

2.2.1.5. Floración: es la última etapa antes de cortar las espigas. Se coloca a las plantas en invernáculo, con temperatura de 14 a 16 °C y luz natural.

2.2.2. Selección de espigas y estado de desarrollo de microsporas:

En cebada, el desarrollo de las microsporas dentro de las flores y el de flores dentro de las espigas generalmente están sincronizados, con flores apicales y basales levemente atrasadas. Los macollos que contienen espigas al estado de desarrollo deseado pueden ser preseleccionadas sobre la base de su morfología. Es un factor crítico para la inducción exitosa de androgénesis. Para confirmar el estado inicial de las microsporas, se extraen las anteras de la parte central de la espiga y se aplastan en un portaobjeto con una gota del colorante acetocarmín al 4%. Las microsporas teñidas son examinadas en un microscopio. El estado se determina sobre la base del tamaño y posición del núcleo y la vacuola en la célula. La respuesta androgénica más alta se alcanza cuando las espigas colectadas contienen microsporas al estado llamado uninucleado medio a tardío.

En cebada, la distancia entre la hoja bandera y la penúltima hoja indica el estado de desarrollo de las microsporas apropiado. Para la mayoría de los genotipos, los macollos deberían ser cosechados cuando la distancia entre la hoja bandera y la penúltima hoja es 3 a 6 cm. Para algunos genotipos, la hoja bandera puede estar emergida 0 a 1 cm por encima de la penúltima hoja, y para otros, las puntas de las aristas deberían estar visibles por encima de la hoja bandera (Szarejko, 2003).

En las plantas F1 utilizadas en este trabajo se determinó el estado morfológico que coincidía con el estado mid-uninucleado, que fue 0,5 cm de arista emergida. De todas maneras, antes de cortar las espigas, se abría la vaina de la hoja bandera dejando expuesta la espiga y se extrajo unas pocas anteras para controlar con microscopio el estado de desarrollo de la microspora. Si se observaba un atraso al momento ideal, se marcaba la maceta y se controlaba al día siguiente.

2.2.3. Cultivo de anteras

2.2.3.1. Pretratamiento de frío: las espigas cortadas se identifican y se colocan en cajas de Petri con división en el centro de la caja, de un lado la espiga y del otro lado un trozo de esponja húmeda para conservar la humedad de la espiga, y se llevan a cámara a 4°C en oscuridad, durante 28 días.

2.2.3.2. Siembra de anteras

2.2.3.2.1. Esterilización de las espigas: Se colocan las espigas entre toallas de papel embebidas con hipoclorito de sodio al 2%, durante 1 minuto, trabajando en mesada de flujo laminar. Posteriormente, se realiza el enjuague por arrastre con agua destilada estéril.

2.2.3.2.2. Siembra de anteras propiamente dichas: luego de esterilizadas, se corta el costado de cada flor (espiguilla) y se extraen las 3 anteras con una pinza de punta fina esterilizada con alcohol etílico al 70% y flameada en mechero Bunsen.

Las anteras se siembran en cajas de Petri con medio de inducción (Tabla 2.2.4.1), y se colocan en cámara de crecimiento en oscuridad a 22-24 °C durante 4 semanas.

2.2.4. Cultivo de callos en medio de regeneración

Luego de cuatro semanas, los callos formados durante la etapa de inducción se repican a frascos con medio de regeneración (Tabla 2.2.4.1). Los frascos se colocan en cámara de crecimiento a 22-24 °C, con luz fluorescente, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, durante 35 días.

Tabla 2.2.4.1: Componentes de los medios de inducción de callos y regeneración de plantas

	INDUCCION	REGENERACION
	Concentración final (mgr/litro)	
Macroelementos		
NH ₄ NO ₃	165	165
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Microelementos		
MnSO ₄ *H ₂ O	16,9	16,9
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	0,25
FeNa ₂ -EDTA	40	40

Elementos orgánicos		
Glutamina		750
Mio-inositol	100	100
Tiamina	0,4	0,4
IAA	1,0	---
BAP	1,0	---
Maltosa	63000	---
Azúcar de mesa		20000
Gelrite	3400	3400
pH	5,6	5,6

2.2.5. Obtención de plantas doble haploides

2.2.5.1 Trasplante de frascos a macetas en cámara húmeda

Las plantas regeneradas se trasplantan a *bins* con soporte vermiculita esterilizada y se colocan en contenedores envueltos con plástico fino, en cámara de crecimiento a 22-24 °C con iluminación fluorescente (16 hs-8 hs). El riego en el momento del trasplante se realiza con Solución nutritiva de Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950).

2.2.5.2 Rustificación

Luego de transcurrida una semana del trasplante, se corta parcialmente el plástico con el objeto de iniciar el intercambio gaseoso de las hojas con la atmósfera. A la semana siguiente, el plástico se extrae completamente y las plantas permanecen en esas condiciones de temperatura y luz por una semana más. El riego continúa siendo con Solución de Hoagland.

2.2.5.3 Trasplante a macetas definitivas:

Las plantas obtenidas se trasplantan a macetas conteniendo tierra mezclada con turba a razón de 70:30. Se colocan en invernáculo con luz natural + artificial (de ser necesaria) con un fotoperíodo de 16 horas, y temperatura ambiente regulada para que no exceda los 25 °C ni disminuya los 10 °C (con equipo de aire acondicionado y calefacción por aire). El riego fue por aspersión agregado según necesidad. La apertura y cierre de cortinas laterales, y el control de temperatura (calefacción o aire acondicionado) se realizó con un PLC central que controlaba estas variables (Invernáculo Industrias Nahiel). Una vez cosechadas las plantas en forma individual, se eligieron al azar 150 plantas para multiplicar, que fueron los Doble-Haploides (DH) utilizados para el trabajo de tesis.

La figura 2.2.1 corresponde a fotografías de cada una de las etapas del método.

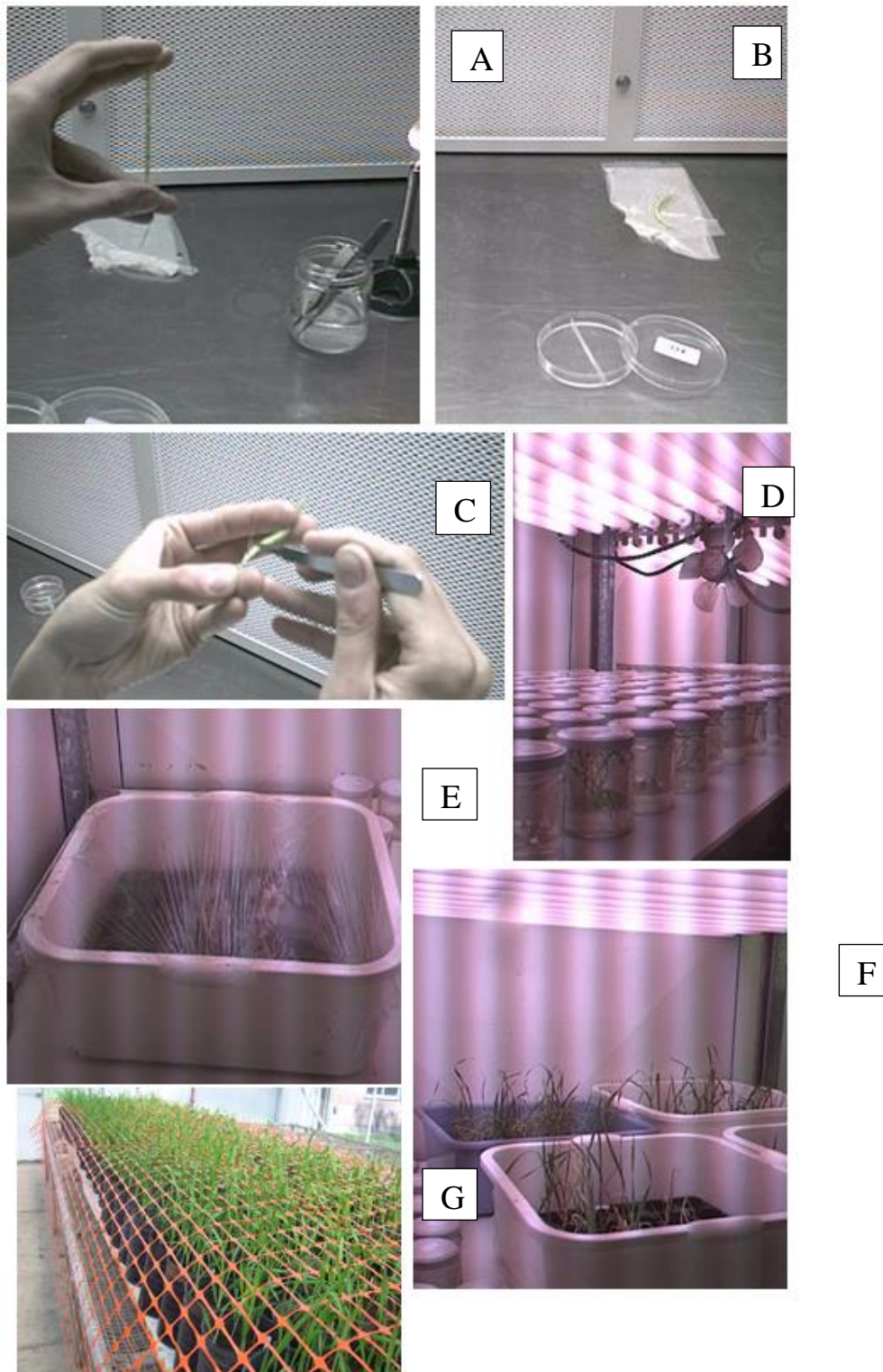


Figura 2.2.1. Etapas del cultivo de anteras. A) y B) Desinfección de espigas, C) Extracción de anteras, D) Regeneración in vitro, E) Plantas regeneradas en cámara húmeda (rustificación), F) Plantas rustificadas en cámara de crecimiento, G) Plantas en macetas definitivas.

2.3. Ensayos de Campo

Se realizaron ensayos en los siguientes años y sitios:

2007	2008	2009	2010	2011
Tres Arroyos	Tres Arroyos 1	Tres Arroyos 1	Tres Arroyos 1	Tres Arroyos
	Tres Arroyos 2	Tres Arroyos 2	Tres Arroyos 2	
	Cabildo	Cabildo	Cabildo	Cabildo
	Puán	Puán	Puán	Puán
	La Dulce	La Dulce	La Dulce	La Dulce

El propósito en la elección de los sitios (Figura 2.3.1) fue contar con un rango de condiciones de temperaturas y precipitaciones que permitiera analizar el comportamiento diferencial de los genotipos obtenidos en la etapa previa.



Figura 2.3.1.: Ubicación de los sitios experimentales en la Provincia de Buenos Aires. 1) La Dulce (Criadero José Buck SA) 38,283S, 59,200O, 75msnm. 2) Tres Arroyos (Criadero Cervecería y Maltería Quilmes) 38,370S, 60,274O, 113msnm. 3) Cabildo (Criadero Asociación de Cooperativas Argentinas) 38,483S, 61,890O, 252msnm. 4) Puán (Criadero Maltería Pampa) 37,540S, 62,767O 260msnm.

El tipo y las características de suelo de cada sitio experimental se detallan en la Tabla 2.3.1.

Tabla 2.3.1. Características de los suelos en las localidades experimentales (Clasificación de acuerdo a USDA Soil Taxonomy V. 2010)

LOCALIDAD	CLASIFICACION TAXONOMICA	TEXTURA	CARACTERISTICAS	DRENAJE
La Dulce	Argiudol Típico	Franco fino	Desarrollado en sedimentos loésicos	Bueno, pendiente de 0,5% a 1%
Tres Arroyos	Argiudol Petrocálcico	Franco-limoso	Costra calcárea “tosca” entre 40 y 100 cm.	Bueno, pendiente de 1% a 3%
Cabildo	Argiustol típico	Franco–arenoso	Susceptibles a erosión eólica	Bueno
Puán	Haplustol típico	Franco fino	Loess sobre tosca	Moderado

2.3.1 Diseño experimental y Análisis Estadístico

Con los 150 DHs más las líneas parentales Aspen y Mut 6519 se realizó un diseño experimental de bloques incompletos con 2 repeticiones. La aleatorización por ambiente se realizó con el software Gendex (<http://designcomputing.net/gendex>), los análisis estadísticos con los softwares Infostat (Modelos Lineales Generales Mixtos, BoxPlots), SAS (Versión 9.3 para Windows), para análisis de modelos espaciales, Minitab 17 (Distribuciones de Frecuencia, Análisis de Regresión y Componentes Principales).

El diseño constó de 8 bloques incompletos de 19 participantes dentro de cada repetición (total: 150 doble haploides + 2 parentales). Para el análisis estadístico con Infostat (potenciado por “R” para el análisis de modelos mixtos) se consideró en cada ambiente a las líneas como efectos fijos y a los bloques incompletos y a las repeticiones como efectos aleatorios.

Si t tratamientos se disponen en b bloques de k unidades cada uno, y estando repetido r veces (los bloques no se agrupan por repeticiones completas), el rendimiento de una parcela que contiene el tratamiento i y pertenece al bloque j será: $y_{ij} = \mu + \tau_i + b_j + \varepsilon_{ij}$, donde μ es la media general, τ_i son los residuos de la media atribuibles al tratamiento, b_j son los residuos de la media atribuible al efecto de los bloques, y ε_{ij} son los residuos aleatorios.

El modelo estadístico para este diseño es el mismo que para el diseño en bloques aleatorizados completos. La diferencia está en la descomposición de la suma de cuadrados totales, quedando $SCT = SCTr^* + SCBI + SCR$, siendo la $SCTr^*$ la suma de cuadrados de tratamientos ajustada.

Para el análisis de este diseño se utilizó la función *lme* de R y el método REML (estimador de máxima verosimilitud restringida) para estimar los componentes de varianza en modelos lineales mixtos (Di Renzo et al, 2009).

Especificación del modelo en R

```

modelo.XXX_RENDIMIENTO_REML<-lme(RENDIMIENTO~1+LINEA
,random=list(REPETICION=pdIdent(~1)
,BLOQUE.INCOMPLETO=pdIdent(~1))
,method="REML"
,control=lmeControl(msMaxIter=200)
,na.action=na.omit
,data=R.data25
,keep.data=FALSE)

```

Para la comparación de medias se utilizó la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher con $\alpha = 0,05$. La DMS se basó en la raíz cuadrada de la varianza promedio.

Para el análisis con modelos espaciales, cada parcela se ubicó espacialmente por los números de fila y columna. Además de tener en cuenta la estructura de correlación entre observaciones provenientes de distintas parcelas (las líneas DH provienen de un solo cruzamiento, lo que las hace altamente emparentadas) es posible modelar heterogeneidad de varianza residual, la cual puede tener una magnitud importante en ensayos con una cantidad grande de tratamientos, aunque éstos estén agrupados de manera de tener un mayor control de la variabilidad de suelo.

Se invoca el comando Proc mixed, definiendo el tipo de modelo con Title: Row by Column, Spherical, Exponential, Power, Anisotropic, Matern.

Ejemplo: Spherical

```

proc mixed data=Trials_&&EX&j convf=1e-6 absolute maxiter=100;
Title "EXPT_&&EX&j Spherical"; (aquí se coloca el nombre de cada modelo)
*by expt;
class row1 col1 ID;
model YIELD = /ddfm=kr solution;
random ID /solution;
random intercept /subject=row1 solution;
random intercept /subject=col1 solution;
repeated / subject=intercept type=sp(sph) (row1 col1);

```

El modelo con el menor valor AIC (Akaike Information Criteria, Akaike, 1974) es el de mejor ajuste. El AIC se deriva de la teoría de la información y está diseñado para elegir el modelo que produce una distribución de probabilidad con la discrepancia más pequeña de la distribución real (Bozdogan, 2000)

Las medias ajustadas se informaron como valores BLUP (mejor predictor lineal insesgado) (Borevitz et al., 2002).

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson “r” para medir el grado de asociación entre caracteres o entre resultados de diferentes ambientes, y el coeficiente de regresión “R” para establecer el grado de explicación de la variable dependiente por parte de la independiente.

Para los análisis de normalidad se utilizó el método de Shapiro-Wilks.

2.3.2. Manejo de los ensayos

2.3.2.1. Nutrición

En presiembra, se extrajeron muestras de suelo a 0-20, 20-40, 40-60 cm. de profundidad, explorando la zona del ensayo en forma de zig-zag, obteniendo 50 submuestras. El instrumento de muestreo fue el barreno tubular, por la uniformidad en la profundidad y el tamaño reducido de las submuestras que se obtienen.

Con el fin de asegurar una provisión suficiente de fósforo y nitrógeno, se fertilizó a la siembra con 120 kg/ha de fosfato diamónico (18-46-0), y con una dosis de nitrógeno calculada en función de la necesidad del nutriente de acuerdo al potencial de rendimiento de cada sitio experimental, y con 10,5% de proteína en los granos, según el siguiente detalle (Tabla 3.2)

Tabla 2.3.2. Balance de Nitrógeno aplicado en cada sitio experimental, en función del potencial de rendimiento estimado y del porcentaje de proteína.

LOCALIDAD	RENDIMIENTO ESTIMADO (kg/ha)	PROTEINA A COSECHAR (kg/ha)	KG N A COSECHAR (kg/ha)	EXTRACCION TOTAL (kg N/ha)	N TOTAL (suelo+fertilizante)
La Dulce	6500	682,5	109,2	165,5	236,4
Tres Arroyos	5000	525	84,0	127,3	181,9
Cabildo	4000	420	67,2	101,8	145,4
Puán	4000	420	67,2	101,8	145,4

A partir de los promedios estimados de rendimiento potencial y porcentaje de proteína de los granos, se calculó la proteína producida (kg/ha). El nitrógeno (N) contenido en los granos (kg/ha) se calculó en base al rendimiento estimado, el 10,5% de proteína objetivo y el factor de conversión de N total a Proteína (6,25). El índice de cosecha de N (ICN) es la relación entre la cantidad de N de los granos y la cantidad de N que queda en el resto de la planta, como residuo de cosecha. En este caso, se utilizó un ICN de 0,66 (Echagüe, 2004). Por lo tanto, la diferencia en cada sitio entre el N aportado por el suelo (N a la siembra + N mineralizable de la materia orgánica o N anaeróbico), se agregó como fertilizante, urea en todos los casos, en el estado Z21 (Zadocks, 1974).

2.3.2.2. Siembra y mantenimiento de los ensayos

La siembra se realizó con máquinas experimentales, en parcelas de 5,5m x 1,4m, a una densidad de 250 plantas/m². Las fechas de siembra se concentraron en la primera semana de julio. Los ensayos se mantuvieron libres de malezas con herbicidas para hoja ancha (Metsulfuron metil 6,7 gr/ha + Picloram 100 cm³/ha.) y con graminicidas (Axial, principio activo: Pinoxaden: Fenilpirazolina + Cloquintocet-mexil) a razón de 800 cm³/ha para el control de Avena fatua y Lolium multiflorum. Las enfermedades fueron tratadas preventivamente con fungicida Amistar Xtra (20 g Azoxistrobina + 8 g Cyproconazole), a razón de 450 cm³/ha., con el propósito de mantener libre de necrosis el área fotosintéticamente activa.

2.3.2.3. Cosecha y post-cosecha

La cosecha se realizó con cosechadoras experimentales en todos los sitios. La misma comenzó cuando las líneas de ciclo más largo estaban en condiciones de ser cosechadas y conservadas sin secado artificial (máximo 13% de humedad). Debido a la diferencia de humedad entre las muestras de ciclos más cortos y largos, se registró el porcentaje de humedad de cada parcela junto con el rendimiento, y se corrigió éste a 12% de humedad, dejando en igualdad de condiciones a todas las muestras.

Además del registro de rendimiento por parcela y porcentaje de humedad, se analizó el calibre de los granos (% sobre zaranda de 2,5 mm) con analizadora de fracciones Pfeuffer Sortimat, y proteína total de cebada por espectroscopía infrarroja cercana con analizador Foss Tecator.

2.3.3. Determinación de la respuesta fotoperiódica

La población de DHs y las líneas parentales fueron sembradas en siete fechas durante el año 2009, registrándose las fechas de emergencia y de floración de cada genotipo. Se graficó la respuesta entre fecha de siembra y tiempo a floración, en días y en grados día ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{día}$), para determinar la pendiente de la regresión como respuesta a fotoperíodo (i.e. sensibilidad al fotoperíodo). Para los análisis realizados posteriormente se utilizaron las pendientes de las regresiones que indican la sensibilidad al fotoperíodo expresada en días/días.

Las líneas DHs y parentales se sembraron con máquina experimental electroneumática de precisión Hege 95, en surcos de 2,25 metros de longitud con caminos de 1, 5 metros. Cada parcela tuvo cuatro surcos, y dentro del surco la distancia entre plantas fue de 5 cm. Se realizó una distribución de los surcos dentro de cada fecha de siembra con software Gendex, completamente aleatorizado, en bloques incompletos, con 2 repeticiones. Los 304 surcos (152 x 2 repeticiones) fueron distribuidos en bloques incompletos de 8 parcelas de frente por 10 parcelas de profundidad. En la primera repetición (5 bloques incompletos) se completó con 2 parcelas (8 surcos) de relleno, ya que $4 \text{ surcos} * 8 \text{ parcelas/bloque} = 32 \text{ surcos por bloque incompleto}$, $32 \text{ surcos} * 5 \text{ bloques incompletos} = 160 \text{ surcos}$. De forma idéntica, para la segunda repetición (bloques incompletos 6 al 10).

La precisión en la siembra con esta máquina está dada por impulsos eléctricos producidos por una rueda telemétrica y transformados en distancia por un PLC. Además, el sistema de zapata junto con un limitador de profundidad muy preciso permite que la profundidad de siembra sea exactamente la misma en todos los surcos y parcelas, condición necesaria para que todas las plantas puedan emerger de manera homogénea.

Tanto la fecha de emergencia como la de floración (se consideró anthesis cuando las aristas emergieron 1cm por arriba de la lígula de la hoja bandera), se consideró cuando el 80% de las plantas se encontraron en esos estados.

Las fechas de siembra de estos ensayos fueron: 5 de mayo, 5 de junio, 7, 14 y 30 de julio, 2 y 7 de agosto.

2.4. Ensayo realizado con y sin riego

En 2013 se realizaron en el campo experimental de la empresa Anheuser Busch-InBev, situado en Fort Collins, Estado de Colorado, EEUU (40,60°N, -105,00°O) dos ensayos colindantes con los mismos participantes (150 DHs, cv. Aspen y Mut 6519), con la diferencia que uno de ellos fue irrigado. El objetivo fue contar con la información en el mismo sitio experimental (suelo, temperaturas, manejo, precipitaciones) con la única diferencia de la provisión de mayor cantidad de agua a uno de los ensayos. La siembra fue el 16/05/2013 sobre suelo franco arcilloso y se cosechó el 26/08/2013.

El control de potencial osmótico y temperatura de suelo se realizó con un sistema de sondas de suelo Decagon, con sensores MPS6, que fueron colocados a 2 profundidades, 7 y 15 pulgadas (17,7 y 37,9 cm, respectivamente), registrando cada dos horas humedad y temperatura de suelo con y sin irrigación, totalizando 1135 registros desde el 23 de mayo hasta el 26 de agosto.

Se aplicó riego con equipo de avance frontal (Figura 4.1.C), complementando las lluvias recibidas durante el ciclo del cultivo.



Figura 2.4.1. A y B) Imágenes del ensayo con estrés y sin estrés. C) Equipo de riego de avance frontal Zimmatic Aims Basic (Lindsay Corporation)

2.5. Temperatura de canopeo

La temperatura de canopeo se midió con un termómetro infrarrojo marca Testo con sensibilidad de 0,1°C (Figura 5.1). El canopeo emite radiación infrarroja de onda larga en función de su temperatura. El termómetro censa dicha radiación y la convierte en una señal eléctrica, la cual se muestra como temperatura en grados centígrados. Los puntos siguientes son los más importantes del protocolo de uso de temperatura de canopeo (TC) en mejoramiento (Blum, 2009).

La correlación entre TC y el estado hídrico de la planta es mayor cuando dicho estado se reduce. Dado que la evaluación por TC en una población es relativa, las condiciones atmosféricas durante la medición deben ser relativamente estables, evitando las condiciones de nubosidad y viento, ya que las nubes pasajeras tienen un efecto inmediato en la temperatura de las hojas.

Las mediciones se realizaron en horas cercanas al mediodía, cuando el déficit de agua podría ser alto por mayor demanda atmosférica. Como el estado hídrico cambia a lo largo del día, las mediciones se hicieron en un período relativamente corto, sin presencia de nubes.

El termómetro tiene un ángulo fijo de visión. La medida del área depende entonces de la distancia entre el termómetro y el objetivo. Deben medirse solamente hojas. Por esto, el *screening* por TC bajo condiciones de sequía puede ser realizado solamente durante el estado de crecimiento vegetativo, después de la cobertura total del suelo.

Se tuvieron en cuenta todos los aspectos puntualizados con anterioridad. La distancia, posición y ángulo del dispositivo se conservaron en todas las parcelas medidas, realizando las lecturas con el sol a espaldas.

Los ambientes en los cuales se registró la TC fueron Tres Arroyos 2007, Puán 2008 (dos mediciones, en los estados Z73 y Z83 del cultivar Aspen), Cabildo 2009 (ensayo finalmente perdido por sequía extrema), y Tres Arroyos 2011 (dos mediciones, en los mismos estadíos mencionados para Puán 2008).



Figura 2.5.1. Termómetro infrarrojo Testo. Se observa el cuerpo del termómetro, la pantalla y la sonda de temperatura para controlar la temperatura del aire.

2.6. Determinaciones realizadas con los granos cosechados

2.6.1 Proteína Total y Humedad (según Analytica – EBC, 1998)

Se analizaron en muestras de 400g de granos de cebada limpia con Espectrofotómetro de Infrarrojo Cercano Foss–Tecator. Los resultados se expresaron en % de proteína en sustancia seca.

2.6.2 Clasificación (según Analytica – EBC, 1998)

Se pesaron 100g de granos de cebada y se colocaron en el interior de una calibradora Sortimat de Pfeuffer GmbH (Figura 2.6.2.1 B), recogiendo y pesando la muestra retenida por cada zaranda (2,8 mm, 2,5 mm, 2,2 mm). Calibre se define como el porcentaje de granos que queda retenido sobre una zaranda de 2,5 mm

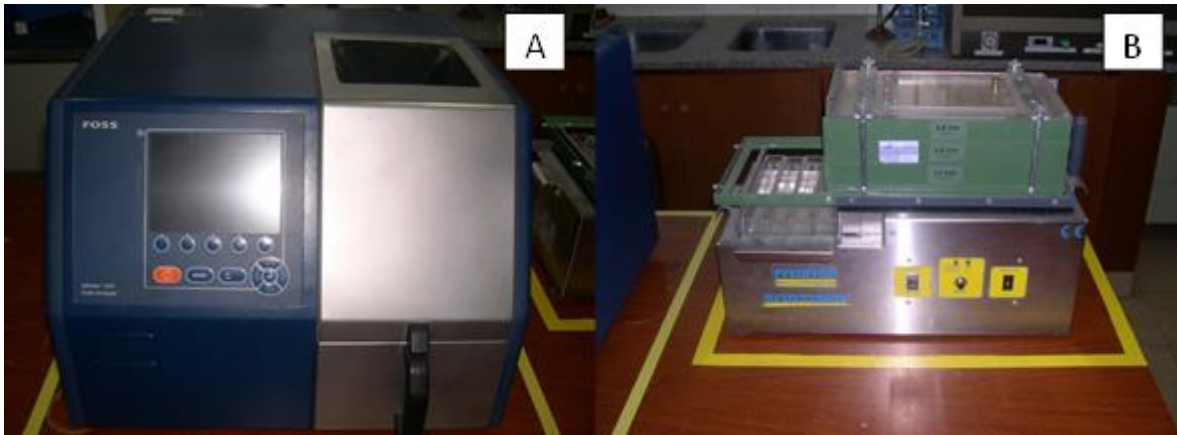


Figura 2.6.2.1. Espectrofotómetro de Infrarrojo Cercano (A) y Calibradora (B)

2.6.3 Micromalteos

Los micromalteos se realizaron con el programa desarrollado por la Cátedra de Tecnología Cervecera I de la Universidad Técnica de Múnich (Weihenstephan, Alemania).

Se colocaron las muestras de cebada sometidas a limpiadora experimental Schmidt, sin impurezas, en la micromaltería, registrando el peso exacto (400g), el contenido de proteína y la humedad de cada muestra. El porcentaje de humedad se utiliza como punto de partida para los controles de humedad posteriores.

El proceso de micromalteo consta de las siguientes etapas

2.6.3.1 Remojo

Etapa	Tiempo (horas)
Inmersión 1	5
Descanso de aire 1	19
Inmersión 2	5
Descanso de aire 2	19

Temperatura del agua:	15 °C
Tiempo de extracción de CO ₂ :	10 minutos
Tiempo de pausa:	60 minutos

Una vez finalizada la etapa de remojo, se registra la humedad de la malta verde a la salida del remojo.

2.6.3.2. Germinación

Durante esta etapa se aplican 2 a 3 riegos hasta que la malta alcanza 45 % de humedad. La temperatura de germinación es 15 °C, y el tiempo total de la etapa es 96 horas.

2.6.3.3. Secado

Se realiza en secadora experimental, la que aplica aire caliente a las muestras según el siguiente esquema:

Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
4	55
1	Ascenso 55 a 60
6	60
1	Ascenso 60 a 65
1	Ascenso 65 a 70
1	Ascenso 70 a 75
1	Ascenso 75 a 80
1	Ascenso 80 a 82
3	82

2.6.3.5. Desbrotado y limpieza de malta

Una vez finalizado el secado, se desbrota y limpia manualmente la malta obtenida.

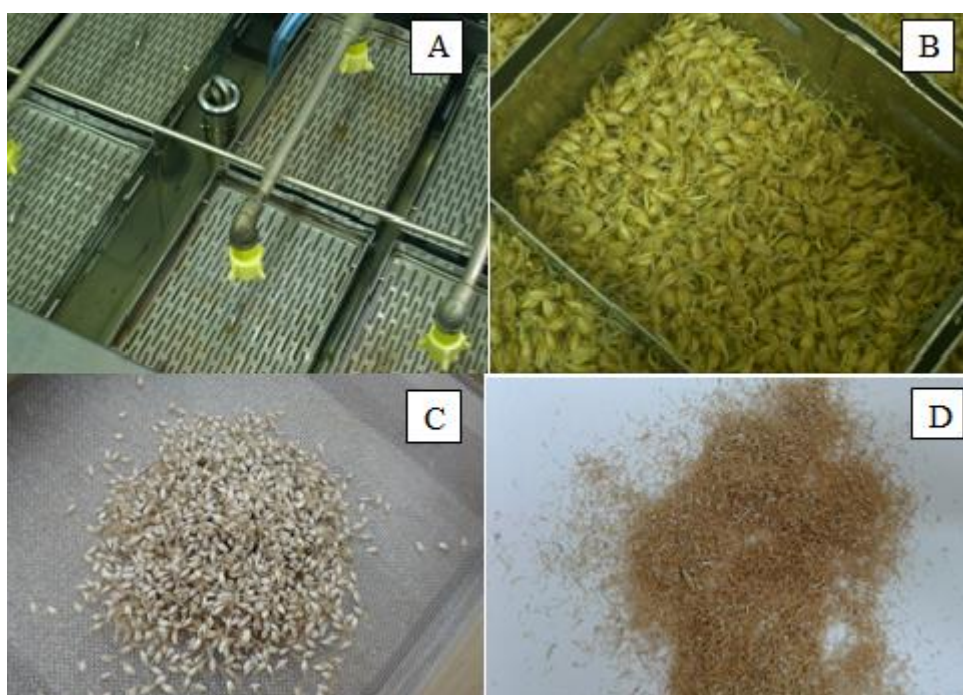


Figura 2.6.3.1. Etapas del micromalteo. A) Remojo de las muestras. B) Germinación. C) Malta antes del desbrotado. D) Restos del desbrotado.

2.6.4. Análisis de Parámetros de Malta

2.6.4.1 Dureza de Malta

Es el primer análisis que se realiza luego de desbrotar la malta. Se define como el momento (fuerza x distancia) necesario para moler una muestra de malta. Este parámetro está íntimamente relacionado con la friabilidad de dicha muestra, y como ésta, es indicativo de la intensidad de modificación del endosperma. Para su determinación, se tomaron 2 muestras de 12

gramos de malta y se molieron con molino ciclónico Ciclotec de Tecator en el punto 7 (molienda gruesa). Se midió el momento necesario para moler finamente las muestras con farinógrafo Brabender (Figura 6.4.1.1.). El promedio (en Newton-metros) de las dos mediciones de cada muestra representa la dureza de malta.



Figura 2.6.4.1.1. Farinógrafo Brabender

2.6.4.2. Obtención y análisis de mosto

Se realizó siguiendo las metodologías publicadas en Analítica, European Brewery Convention (1998), reconocidas mundialmente para todos los análisis de cebada y malta.

A partir de la molienda de malta, realizada con molino de discos DLFU (Buhler Miag) con una separación entre discos de 0,20 mm (Fig.2.6.4.2.1 A), las determinaciones analíticas realizadas fueron Extracto, Tiempo de Filtración, Viscosidad de Mosto, Atenuación Límite Aparente, Aminoácidos Libres y β -glucanos. (Figuras 2.6.4.2.1 B-H)

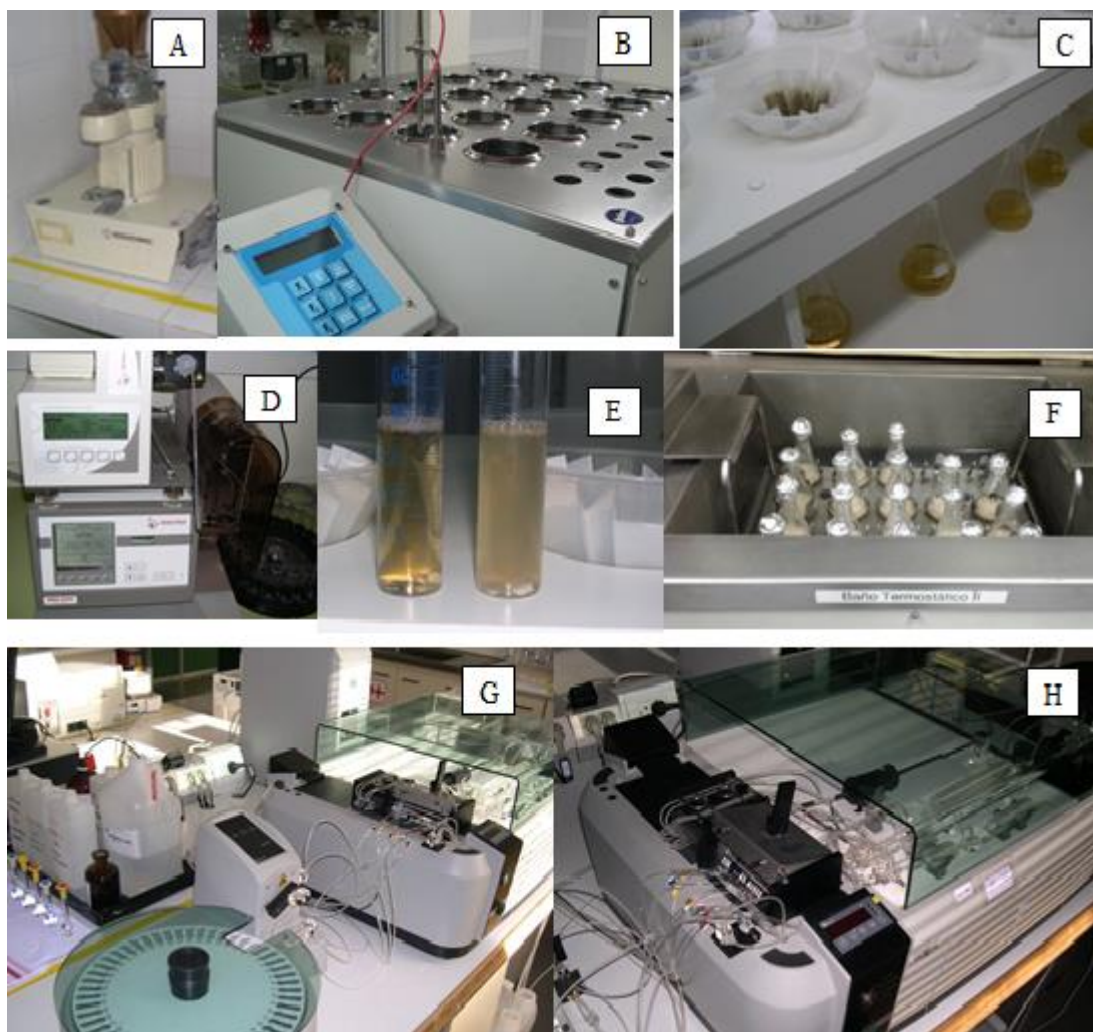


Figura 2.6.4.2.1 Instrumentos utilizados en el análisis de malta. A) Molino de discos, B) Macerador, C) Filtración y obención de mosto, D) Densímetro y viscosímetro, E) Dosificación de Levadura, F, Baño termostático para fermentación, G y H) Analizador de Aminoácidos Libres y β -glucanos con carrusel para muestras.

2.6.4.3. Extracto

Se define como el total de sustancias solubles de malta (en % s/s) obtenidas a partir de una maceración con un programa de tiempos y temperaturas determinado (ver 5.3.4.1. Maceración). El extracto está formado por hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, vitaminas y sales, que han sido solubilizados durante la maceración.

2.6.4.3.1. Objetivo del análisis

Es la determinación del potencial de malta para producir solubles de mosto (denominado mosto Congreso) por un programa estándar de maceración. Este procedimiento es también usado para la determinación del tiempo de sacarificación, velocidad de filtración, pH del mosto, color, viscosidad del mosto, contenido de nitrógeno soluble y contenido de nitrógeno amino libre.

2.6.4.3.2. Principio

El contenido de extracto en maltas es determinado después de macerar y filtrar el contenido de extracto del mosto resultante. El contenido de extracto del mosto surge del peso específico por medio de la tabla oficial de azúcar (tabla Plato) para 20 °C. El término “peso específico” significa la relación del peso de un volumen de líquido a 20 °C con el peso del mismo volumen de agua a la misma temperatura.

2.6.4.3.3. Equipos

Molino de discos DLFU (Buhler-Miag). La separación entre discos de molienda es de 0,20 mm.

Balanza, exactitud de 0,1 g bajo carga de 750 g.

Vasos y agitadores de maceración de acero inoxidable, níquel puro o latón (pero no de cobre). Los vasos de latón deben ser limpiados sólo por lavado con agua.

Baño de maceración, un baño de agua con calor adecuado y control de temperatura. La velocidad de agitación debe ser de entre 80 y 100 r.p.m.

Varilla de vidrio, de 250 mm de largo y 8 mm de diámetro.

Frascos Erlenmeyer, de 500 ml con una marca a 100 ml.

Embudos, de 200 mm de diámetro.

Papeles de filtro plegado, 320 mm de diámetro. Schleider and Schuell N° 597/2, Machery, Nagel & Co. N° 614-1/4, F.C.Binzer N° 12 y 53 o equivalente.

Densímetro digital Anton Paar, con mediciones tomadas con 5 decimales.

Balanza, exactitud de 1mg.

Protocolo

Tomar cantidades de aproximadamente 55 g de malta y moler en el molino de discos DLFU. Transferir cada porción de malta molida a un vaso de maceración y mezclar bien con una cuchara. Tomar porciones para la determinación de humedad y pesar una porción de 50,0 g en el vaso de maceración.

2.6.4.3.3. Operatoria

2.6.4.3.3.1. Maceración

Hacer que el baño de maceración tome la temperatura de 45 °C.

Agregar 50 ml de agua destilada a una temperatura de alrededor de 46 °C, dentro de cada vaso, de manera de formar un empaste, con la ayuda de la paleta de agitación. Agregar 150 ml más de agua, sin dejar de agitar para evitar que se agrume. Asegurarse de que la temperatura en la maceración sea de $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ubicar inmediatamente el vaso en el baño de maceración y poner los agitadores en movimiento. Mantener la temperatura a 45 °C en el macerador por exactamente 30 min.

Elevar la temperatura del macerador en 1 °C por minuto durante 25 min.

Cuando la temperatura alcanza los 70 °C agregar 100 ml más de agua destilada a 70 °C.

Mantener la temperatura de 70 °C por 1 hora. Enfriar el macerador a temperatura ambiente en 10-15 min. Lavar el agitador con una pequeña cantidad de agua destilada, secar el lado de afuera del vaso y ajustar el contenido del vaso a 450,0 g por adición de agua destilada.

2.6.4.3.3.2. Filtración

Agitar el contenido del vaso cuidadosamente con una varilla de vidrio y verter inmediatamente y completamente en un filtro. Asegurarse de que el papel de filtro no sobrepase el borde del embudo. Retornar los primeros 100 ml de filtración al embudo al llegar a 250 ml de filtración. Finalizar la filtración cuando el terrón parezca seco o con filtración lenta después de 2 hs.

2.6.4.3.3.3. Determinación de la densidad y viscosidad del mosto

Se realiza con densímetro y viscosímetro digital Anton Paar.

2.6.4.3.3.4. Expresión de resultados

Con los datos de humedad y densidad de la muestra, se obtienen los valores de: grado Plato, Extracto (sustancia natural -s/n-) y Extracto (sustancia seca -s/s-).

Se determina el contenido de extracto del mosto de acuerdo con la determinación del peso específico de la tabla oficial de azúcar, en gramos de extracto por 100 g de mosto.

Se calcula el contenido de extracto en malta de acuerdo a la fórmula:

$$\text{a) } E_1 = \frac{P * (M + 800)}{100 - P}$$

$$\text{b) } E_2 = \frac{E_1 * 100}{100 - M}$$

E₁: contenido de extracto en la muestra, en por ciento (m/m)

E₂: contenido de extracto en malta seca, en por ciento (m/m)

P: contenido de extracto en mosto, en gramos por 100 g de mosto

M: contenido de humedad de la malta, en por ciento (m/m)

800: la cantidad de agua destilada agregada en el macerador a los 100 g de malta.

Expresar los resultados en % (m/m) con una cifra decimal.

La viscosidad del mosto se expresa en miliPascal*seg

2.6.4.4. Atenuación límite aparente

Se denomina así a la disminución de la densidad del mosto, cuando el mismo es puesto en contacto con levaduras en condiciones de fermentación. Es la medida (en %) de la intensidad de fermentación. Como el sustrato de la fermentación son azúcares fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa) y el producto es CO₂, alcohol y otros volátiles, el mosto fermentado posee menor densidad que el mosto original. La disminución de la densidad se denomina atenuación. Límite significa que la fermentación es total en las condiciones del análisis (exceso de levadura y tiempo de fermentación) y aparente significa que no se extrae el alcohol disuelto (de menor densidad que el agua) al medir la nueva densidad. Este parámetro mide la intensidad de acción de las enzimas amilolíticas, ya que el valor de atenuación será bajo en el caso de no haber azúcares fermentables en el mosto.

2.6.4.4.1. Principio del análisis

Se prepara un mosto filtrado de malta usando el método de maceración detallado en 2.6.4.3.3.

Las enzimas amilolíticas del mosto son inactivadas por calentamiento a alta temperatura.

El mosto enfriado es fermentado con levadura de cerveza.

Se calcula la Atenuación Límite Aparente por diferencia entre valores iniciales y finales de densidades.

Se recomienda el uso de un mosto de control para chequear el estado de la levadura usada.

2.6.4.4.2. Equipos

Agitador orbital

Balanza granataria

Baño con agua hirviendo

Frascos erlenmeyer, de 250 - 300 ml.

Frascos erlenmeyer, de 125 ml.

2.6.4.4.3. Operatoria

Preparar un mosto estándar según el método Congreso. Recoger para su uso el mosto filtrado. Transferir una cantidad suficiente a un erlenmeyer de 250-300 ml con tapa y registrar su peso en balanza granataria.

Sumergir el mosto del erlenmeyer tapado convenientemente durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo. Durante este tiempo el mosto debe exceder los 90 °C.

Enfriar a 20 °C.

Pesar nuevamente el erlenmeyer con el mosto. Si fuera necesario, llevar a peso inicial con el agregado de agua destilada. Homogeneizar y determinar su densidad a 20 °C.

Pesar la cantidad necesaria de levadura para incorporar 7,5 % de la misma al mosto. Agregar la cantidad de mosto necesaria. (Por ejemplo: pesar 3 g de levadura para 40 ml de mosto) Agitar.

Colocar el erlenmeyer en el agitador y mantener a 20 °C durante 24 horas.

Centrifugar el mosto a 3000 r.p.m. y determinar la densidad.

2.6.4.4.3. Cálculo

La atenuación límite aparente de la muestra es:

$$\frac{P - E_s}{P} \cdot 100 \%$$

Donde:

P = extracto antes de la fermentación, en g/100 ml

E_s = extracto aparente después de la fermentación, en g/100 ml

2.6.4.5. Índice de Hartong (Vz 45°C)

Es un parámetro que indica la intensidad potencial de acción de las enzimas proteolíticas desarrolladas durante el proceso de malteo. Se realiza una maceración a 45 °C, que es la temperatura óptima de las enzimas proteolíticas, durante 1 hora (mosto Hartong). Por ese motivo, el extracto generado en tales condiciones (en % s/s) está compuesto fundamentalmente por sustancias nitrogenadas como producto de la disolución de proteínas complejas.

2.6.4.5.1. Objetivo del análisis

Determinación de la relación entre el extracto del mosto obtenido con una maceración a 45 °C y el extracto obtenido con el programa de maceración detallado en 2.6.4.3.3.

2.6.4.5.2. Equipos

Molino para maltas.

Balanza granataria, precisión 0.1 g.

Macerador con curva Hartong (constante a 45°C).

Tarros de acero inoxidable para el macerador.

Agitadores de una sola paleta.

Embudos de 60°, de 150 o 200 mm de diámetro.

Erlenmeyers de 500 ml con graduación en 100 ml.

Papel de filtro detallado en 2.6.4.3.3

Densímetro detallado en 2.6.4.3.3.

Baño termostático a 20 °C controlado con un termómetro cuya incertidumbre de medición sea como máximo de ± 0,1 °C.

Balanza analítica, precisión 1mg.

2.6.4.5.3. Operatoria

Se realiza una extracción a 45 °C.

Pesar 50 g de malta molida fina. Agregar 350 ml. de agua destilada a 46 °C.

Llevar al macerador 1 hora a 200 r.p.m. Al llegar a los 30 minutos, agregar 30 ml de agua destilada (a 45 °C).

Luego de cumplido el tiempo, enfriar a 20 °C rápidamente. Llevar a 450 g de peso total (harina + agua) y filtrar con papel de filtro. Refiltrar una sola vez, al llegar a los 100 ml. Determinar la densidad por picnometría o con densímetro.

2.6.4.5.4. Expresión de resultados

$$\%E \text{ s/n} = \frac{(800 + H) * \%P}{(100 - \%P)}$$

$$\%E \text{ s/sn} = \frac{\%E \text{ s/n}}{(100 - H)}$$

$$Vz = \frac{\%E \text{ s/s} * 100}{\% E \text{ Congreso s/s}}$$

Donde:

%Es/n: por ciento extracto sustancia natural calculado con la densidad del mosto Hartong.

%Es/s: por ciento extracto sustancia seca calculado con la densidad del mosto Hartong.

%E Congreso s/s: por ciento extracto sustancia seca calculado con la densidad del mosto obtenido por maceración con programa 2.6.4.3.3.

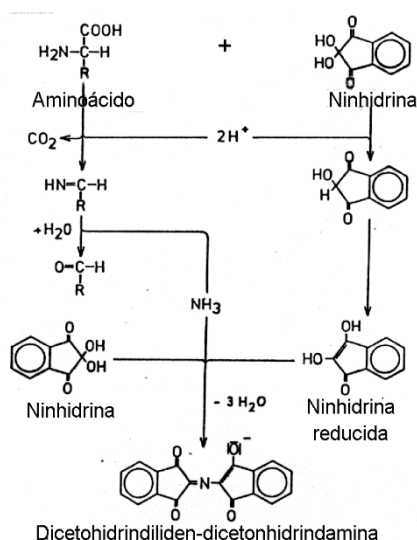
%P: por ciento en peso.

H: contenido de humedad.

2.6.4.6. Aminoácidos libres (FAN, por sus siglas en inglés de Free Amino Nitrogen)

La reacción de la ninhidrina es la reacción de color más conocida de los aminoácidos.

La ninhidrina es un agente oxidante que provoca la descarboxilación oxidativa de los alfa-aminoácidos, produciendo CO_2 , NH_3 y un aldehído con un átomo de carbono menos que el primitivo aminoácido. La ninhidrina reducida reacciona rápidamente con la ninhidrina no reducida y el NH_3 liberado, formando un complejo de color azul. La muestra diluida se calienta con ninhidrina y el color producido se lee por espectrofotometría.



2.6.4.6.1. Objetivo del análisis

La determinación de alfa amino nitrógeno (FAN) en mosto mediante el método de Flujo Segmentado.

2.6.4.6.2. Equipos y materiales

Equipo para Análisis de Flujo Segmentado (SKALAR)

Pipetas automáticas, diferentes volúmenes

Vasos de Precipitado, diferentes volúmenes

Baño de agua a 20 °C

Erlenmeyer 5000 ml

Matraces, diferentes volúmenes

Frascos color topacio o caramelo

Balanza analítica

2.6.4.6.2. Reactivos

Agua destilada + Brij 35: Diluir 6.0 ml de Brij 35 (Fluka 16005) al 30% P/V en agua destilada y degasificada y llevar a 2000 ml en matraz aforado. Este reactivo es estable por una semana y debe conservarse a 4°C.

Solución de Acido L (+) Ascórbico: Pesar 30 mg de Acido Ascórbico (C₆H₈O₆ Sigma-Aldrich A7506) y disolver con 150 ml de agua destilada y degasificada, agregar 0.6 ml de Brij 35 (Fluka 16005) al 30% P/V. Llevar a 200 ml en matraz aforado. Este reactivo debe prepararse diariamente.

Solución de Ninhidrina: Disolver 40 gr Acetato de Sodio (CH₃COONa Merck 106268) en 400 ml de agua destilada y degasificada. Ajustar el pH a 6.7+/- 0.1 con ácido Acético (CH₃COOH Merck 100063). Agregar 10 gr de Ninhidrina (C₉H₆O₄ Merck 106762) y disolver completamente (usar agitador magnético). Una vez disueltos los cristales llevar a 500 ml en matraz aforado. Guardar en Botella color caramelo. Este reactivo es estable por una semana y debe conservarse a 4°C. Chequear el pH diariamente y ajustar si es necesario.

Solución de Iodato de Potasio: Disolver 500 mg de Iodato de Potasio (KIO₃ Merck 105051) en 200 ml agua destilada y degasificada. Llevar a 250 ml en matraz aforado. Este reactivo es estable por una semana y debe conservarse a 4°C.

Solución Estándar de Glicina 1000 ppm: Pesar en balanza analítica 0,5357 g de Glicina (C₂H₅O₂N Merck 104201) y disolver en 80 ml agua destilada y degasificada. Llevar a 100 ml en matraz aforado. Este reactivo es estable por una semana y debe conservarse a 4°C.

Soluciones Estándar de Glicina (para calibración del equipo):

300 ppm: 3 ml de Solución Estándar 1000, llevar a 10 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

240 ppm: 2.4 ml de Solución Estándar 1000, llevar a 10 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

180 ppm: 1.8 ml de Solución Estándar 1000, llevar a 10 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

120 ppm: 1.2 ml de Solución Estándar 1000, llevar a 10 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

60 ppm: 0.6 ml de Solución Estándar 1000, llevar a 10 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

Agua degasificada: Se utiliza para la preparación de todos los reactivos, estándares y limpieza del equipo. Dejar hervir agua desmineralizada por al menos 15 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.

2.6.4.6.3. Procedimiento

2.6.4.6.3.1. Preparación de las muestras

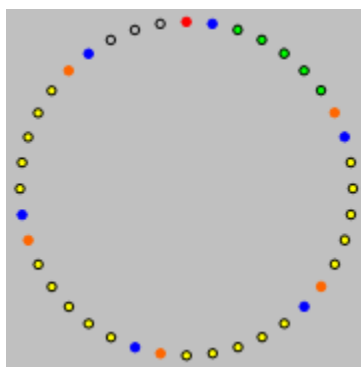
Mosto: preparar el mosto Congreso según la técnica 2.6.4.3.3 (Maceración). Clarificar las muestras de mosto por filtración con papel de filtro.

Preparación del Drift /Tracer: Esta muestra debe contener aproximadamente la mitad de la concentración del estándar más alto de FAN y como este análisis en general se realiza

conjuntamente con el análisis de Betaglucanos, se prepara una muestra con un 50% del estándar más concentrado de FAN (300 ppm) y un 50% del estándar más concentrado de Betaglucanos, se homogeniza bien y se utiliza en todas las posiciones drift/tracer.

2.6.4.6.3.2. Desarrollo

- a) Se enciende el equipo de acuerdo a las indicaciones del manual Skalar.
- b) Colocar las mangueras en los reactivos correspondientes y dejar correr los mismos hasta que la línea de base en el gráfico se estabilice (desaparición del serrucho)
- c) Mientras el equipo estabiliza, cargar el carrusel con las muestras. Primero se carga un Tracer ● (un mosto que contenga al menos 120 ppm de FAN) y la cubeta siguiente con agua degasificada (Wash) ● , luego se cargan los estándares ● (si se determina en conjunto betaglucanos se cargan también los estándares para esta determinación) y por último se cargan las muestras ● a determinar . Entre los estándares y muestras y luego de cinco muestras ● carga un Drift (Idem Tracer) ● y un Wash ● según indica el diagrama. La serie se cierra con un Drift y un Wash



- d) Una vez estable la línea de base dar start en el equipo.
- e) Terminado el análisis se pasan las mangueras a una botella de agua degasificada para la limpieza del equipo.
- d) Una vez estable la línea de base dar start en el equipo.
- e) Terminado el análisis se pasan las mangueras a una botella de agua degasificada para la limpieza del equipo.

2.6.4.6.4. Cálculo

Para abreviar el nombre “alfa amino nitrógeno” se emplea la sigla "FAN".

El programa arroja los valores de FAN expresados en mg/L (ppm). Los valores referentes a malta deben expresarse en mg de FAN por 100 gr en materia seca, la formula a emplear se detalla a continuación:

$$\text{FAN \% (m/m)} = \frac{\text{FAN (mg/l) (extracto (mosto congreso))} \times 100}{(100 - \text{Humedad de la Malta})}$$

De todas maneras, para los objetivos de esta tesis, el valor de FAN se expresó directamente en partes por millón (ppm = mgr/litro)

2.6.4.7. β -glucanos

La determinación de Betaglucanos, componentes de paredes celulares del endosperma de cebada, se basa en la reacción entre estos compuestos y una solución de Calcoflúor, formando un complejo fluorescente Calcoflúor-Betaglucano cuya intensidad se mide por un fluorímetro. Se utiliza el mismo equipo Skalar que el utilizado para la determinación de FAN, por lo tanto, esos dos análisis se realizan simultáneamente.

2.6.4.7.1. Objetivo del análisis

La determinación de β -glucanos en mosto mediante el método de Flujo Segmentado.

2.6.4.7.2. Equipos y materiales

Equipo para Análisis de Flujo Segmentado (SKALAR)

Pipetas automáticas, diferentes volúmenes

Vasos de Precipitado, diferentes volúmenes

Baño de agua a 20 °C

Erlenmeyer 5000 ml

Matraces, diferentes volúmenes

Frascos color topacio o caramelo

Balanza analítica

2.6.4.7.3. Reactivos

Agua destilada + Sacarosa + Tritón X-100:

Diluir 130.0 g de Sacarosa (Merck 107654) en agua destilada, agregar 1 ml de Tritón X-100 al 10% y llevar a 2000 ml en matraz aforado. Este reactivo es estable por una semana.

Solución de Acido Clorhídrico 1M: Diluir 100 ml de Acido Clorhídrico 32% en 800 ml de agua destilada y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Este reactivo es estable por dos semanas.

Solución Tris Buffer (0.1 M, pH 9.0 \pm 0.2): Disolver 24.2 g de Tris (hidroximetil)-aminometano (Merck 108382) en 1600 ml de agua destilada y degasificada. Ajustar el pH a 9.0 \pm 0.2 con la solución de HCl preparada en 4.2. Llevar a 2000 ml con agua destilada en matraz aforado. Filtrar la solución. Esta solución es estable por una semana.

Solución stock de Calcoflúor: Disolver 87.5 mg de Calcoflúor (Fluorescent Brightener 28 Sigma F-3543) en 40 ml de agua destilada y degasificada. Ajustar el pH a 10,6 por adición de Hidróxido de Sodio 1M. Llevar a 50 ml en matraz aforado con agua destilada. Este reactivo es estable por una semana y debe conservarse a 4°C.

Solución de trabajo de Calcoflúor: Diluir 5 ml de la solución stock de Calcoflúor (4.4) con 400 ml de la solución de Tris Buffer (4.3), agregar 50 μ L de Triton X-100 al 10% y llevar a 500 ml en matraz aforado y transferir a un recipiente color caramelo. Este reactivo debe prepararse diariamente.

Solución Estándar de Betaglucanos 400 ppm (aprox): Seleccionar una muestra de malta que contenga aprox. 400 ppm de Betaglucanos. Preparar un mosto VZ 65° (Ver punto 5.7.4.1) y realizar la determinación de betaglucanos mediante el método Enzimático. Conservar el mosto en freezer.

Soluciones Estándar de Betaglucanos (para calibración del equipo):

400 ppm: 100 ml Mosto Estándar (4.6).

240 ppm: 60 ml de Solución Estándar 400, llevar a 100 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

180 ppm: 45 ml de Solución Estándar 400, llevar a 100 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

120 ppm: 30 ml de Solución Estándar 400, llevar a 100 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

60 ppm: 15 ml de Solución Estándar 400, llevar a 100 ml en matraz aforado con agua destilada y degasificada.

Para determinar el valor exacto de los estándares realizar el siguiente cálculo:

$$C_x = (C_s * V_s) / 100$$

C_x: concentración a calcular.

C_s: concentración del Mosto Estándar determinado por método enzimático.

V_s: Volumen de Estándar agregado.

100: Volumen final de dilución.

Fraccionar las soluciones de a 3 ml y congelar en freezer.

Agua degasificada: se utiliza para la preparación de todos los reactivos, estándares y limpieza del equipo. Dejar hervir agua desmineralizada por al menos 15 min. y dejar enfriar a temperatura ambiente.

2.6.4.7.4. Procedimiento

2.6.4.7.4.1. Preparación de las muestras

Mosto: Preparar el mosto congreso según la técnica 5.3.4.1 (Maceración).

Mosto Vz 65°: Pesar 50 g de malta molida fina. Agregar 350 ml de agua destilada a 65 °C. Llevar al macerador 1 hora a 200 r.p.m. Al llegar a los 30 minutos, agregar 30 ml de agua destilada (a 65 °C). Luego de cumplido el tiempo, enfriar a 20°C rápidamente. Llevar a 450 gr. de peso total (harina + agua) y filtrar con papel del tipo usado para mostos congreso. Filtrar hasta sequedad de la torta antes de tomar la muestra.

2.6.4.7.4.2. Para muestras turbias

Las muestras de mostos sumamente turbios deben ser clarificadas antes del análisis mediante alguno de los siguientes métodos:

Filtración: Agregar al mosto tierra de Diatomeas, mezclar bien, dejar reposar durante 5 min y filtrar con filtro banda negra.

Centrifugación: Centrifugar la muestra durante 10 minutos en 3000 a 5000 revoluciones por minuto y tomar el sobrenadante.

2.6.4.7.4.3. Preparación del Drift /Tracer:

Esta muestra debe contener aproximadamente la mitad de la concentración del estándar más alto de betaglucanos y como este análisis en general se realiza conjuntamente con el analisis FAN, se prepara una muestra con un 50% del estándar más concentrado de betaglucanos (400 ppm) y un 50% del estándar más concentrado de FAN, se homogeniza bien y se utiliza en todas las posiciones drift/tracer.

2.6.4.7.4.4. Desarrollo

Idem 2.6.4.6.3.2.

2.6.4.7.4.5. Cálculo

El programa entrega los valores de Betaglucanos expresados en ppm.

2.7. Marcadores Moleculares

El trabajo de laboratorio relacionado con marcadores moleculares se realizó en el Laboratorio de Geneanalysis del Bayerische Landsanstalt für Landwirtschaft, Alemania (Günther F Schweizer - guenther.schweizer@LFL.bayern.de). El mapeo de los marcadores y el análisis de QTL se realizaron en Argentina, con los softwares MultiPoint y MultiQTL (MultiQTL Ltd, Prof. Abraham Korol y colaboradores, Instituto de Evolución, Universidad de Haifa, Israel).

2.7.1. Extracción de ADN

Se tomaron hojas de plantas de una semana en invernáculo y se liofilizaron por dos días en tubos Eppendorf. Se molieron en un dispositivo de molienda por 3-5 min, con una esfera de acero en cada tubo. El material pulverizado se almacenó en freezer a -80°C (Figura 2.7.1.1.)

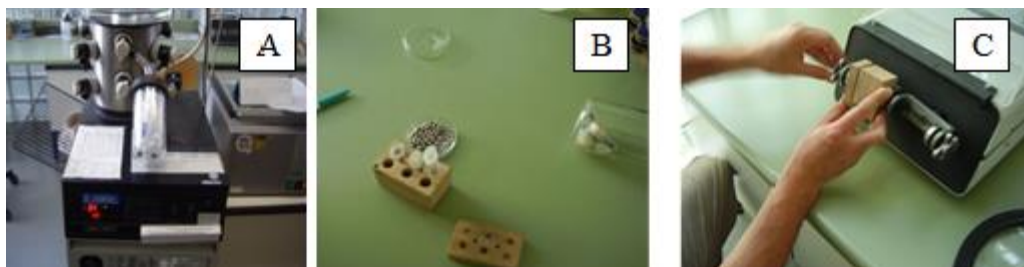


Figura 2.7.1.1 Extracción de ADN: A) Liofilizador. B y C) Detalles de molienda del material vegetal.

El aislamiento de ADN a partir del material de la hoja pulverizado se realizó con buffer de extracción bisulfuro de sodio (NaHS) 3,9 g/l en un baño de agua a 60°C , a razón de 1ml cada 0,05- 0,1g de material liofilizado. Luego de incubar por 20-30 min a 65°C , se purificó el ADN agregando cloroformo: isoamiloalcohol (24:1) para separar las proteínas y ARNasa. El ADN se precipitó con isopropanol. Luego de lavar con acetato de sodio y acetato de amonio disueltos en etanol, el pellet se dejó secar, se resuspendió en buffer TE y se almacenó en concentración de 100ng/ μl de ADN.

La concentración se midió corriendo el ADN sin cortar en gel de agarosa 1%. La cantidad y calidad del ADN fue cuantificado por comparación de intensidad de banda con un estándar de pesos moleculares de ADN, en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Con mayor nivel de detalle, el protocolo de análisis consta de las siguientes etapas:

2.7.1.1 Extracción de ADN.

2.7.1.1.1. Soluciones

2.7.1.1.2. ARNasa: se disuelven 100 mgr de ARNasa en una solución estéril de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y NaCl 15 mM, y se hierve durante 15 minutos en un baño de agua. Luego de enfriado, la solución de ARNasa se controla y almacena a -20 °C.

2.7.1.1.3. Cloroformo: isoamilalcohol (24:1 v/v): 40 ml de isoamilalcohol se agregan a 960 ml de cloroformo. Se almacena la mezcla en botellas oscuras a 4 °C en oscuridad.

2.7.1.1.4. Buffer Tris-EDTA (TE): 1,2114 gr de Tris-HCl 1M pH 8,0 y 0,37224 gr de Na₂ EDTA 0,5M se agregan a 900 ml de agua destilada. El volumen se lleva a 1 litro y se esteriliza en autoclave.

2.7.1.2. Metodología de extracción

Se toman hojas de plantas sembradas en invernáculo, de una semana desde germinación y se colocan en tubos Eppendorf de 2ml con cierre seguro.

Inmediatamente se colocan en liofilizador durante 2 días, a -45°C y 13 milibares de presión

Cuando se va a realizar la molienda, se colocan en los tubos Eppendorf una bolita de acero y el conjunto de 6 tubos se disponen en una caja de madera que se coloca en el dispositivo de molienda. El movimiento brusco de este dispositivo, hacia un lado y hacia otro, permite que las bolitas de acero pulvericen finamente las hojas secas. Tiempo: entre 3 y 5 minutos.

Si la extracción no va a ser inmediata, se colocan los tubos con el material pulverizado en freezer a -80°C.

Para el aislamiento de ADN a partir del material de la hoja pulverizado (0,05-0,1 g) se utiliza 1000 microlitros (µlitros) de buffer de extracción en un baño de agua a 60 °C. El buffer es bisulfuro de sodio (NaHS) a una concentración de 3,9 g/l.

Se vorterea y la suspensión se coloca durante 20-30 min en un baño de agua a 65 ° C, con agitación suave.

Se invierten manualmente 1 ó 2 veces para mejorar la mezcla.

Se extrae del baño y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Se coloca en cada tubo 750 microlitros de una mezcla de cloroformo-isoamiloalcohol (24:1). Mezclar suavemente durante 10 a 15 minutos. El cloroformo tiene la función de separar las proteínas del ADN.

Se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos, quedando 3 fases bien diferenciadas: la parte inferior, que contiene la fase de cloroformo, recoge las proteínas lipófilas (solubles en grasa); en la fase media, estructuras fibrosas fuertes y proteínas desnaturalizadas, y en la fase superior, acuosa, el ADN.

Se pipetea desde arriba la fase más acuosa y se coloca en otro microtubo de 1,5 ml.

Se agrega 1 µlitro de ARNasa dejando actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Luego se incorporan 750 µlitros de isopropanol, mezclando muy suavemente. La función es hacer precipitar el ADN.

Se lleva a heladera a -20 °C durante 30 minutos.

Se centrifuga a 5000 rpm durante 3 minutos, precipitando el ADN. La fase líquida superior se desecha.

Se lava el ADN con 500 µlitros de acetato de sodio 0,2 M disuelto en etanol al 76%. Se deja actuar durante 30 minutos.

Se centrifuga nuevamente a 5000 rpm durante 3 minutos, precipitando el ADN. La fase líquida superior se desecha.

Se realiza otro lavado, pero con acetato de amonio 2M (500 µlitros) disuelto en etanol al 76% durante 5 minutos.

Nueva centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos, precipitando el ADN. La fase líquida se desecha.

Para secar el ADN (extraer el etanol) centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos con centrífuga de vacío.

Disolver el ADN en buffer TE (pH 8, concentración 10% mezcla TE: agua), usando 50 a 200 µlitros, dependiendo de la concentración de ADN final deseada. La concentración para guardar el ADN es 100 nanogramos (ng)/µlitro (µl). La concentración de trabajo es 10 ng/µl en placas de 96 wells.

Con este protocolo se puede hacer la extracción de 60 a 100 muestras por día, con el material seco y molido anteriormente.

2.7.1.3. Metodología de medición de concentración:

Este paso es esencial para controlar que el ADN aislado posee un alto peso molecular.

Para ello, se hace correr el ADN sin cortar en gel de 1% de agarosa. La cantidad y calidad del ADN fue cuantificado por comparación de intensidad de banda con estándar de pesos moleculares de ADN, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

En cada pocillo se colocan 40 µl de la siguiente solución:

DNA	0,5 µl	x 4
10 x Buffer de aplicación	1,0 µl	x 4
H2O	8,5 µl	x 4
Total	10 µl	x 4

(Buffer de aplicación: glicerina 40%, EDTA 0,2 M, 0,3 gr de bromofenol)

Debido a que medir 0,5 µl es muy difícil y puede inducir a error, se multiplica todo por 4. Pero siempre se siembran 10 µl en el gel.

Gel de agarosa: Se prepara 300 ml para cada gel al 0,8%. 2,4 gramos de agarosa + 300 ml de Buffer TBE, + 15 µl de bromuro de etidio.

10 x Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE): 108 gramos de Tris 0,89M, 55 gramos de ácido bórico 0,89M y 8,3 gramos de EDTA 20mM son agregados a 900 ml de agua destilada. El volumen se lleva a 1000 ml.

Stock de bromuro de etidio (10 mgr/ml): 1 gramo de bromuro de etidio se agrega a 100 ml de agua, y se agita vigorosamente en un agitador magnético por varias horas hasta que el colorante está totalmente disuelto. El contenedor se envuelve en papel de aluminio y se conserva a 4 °C.

Estándar de peso molecular: Lambda x Hind III “Marker 1”, concentración: 250 ng/10 µl.

Ungeeignet für PCR - Agarosegele:

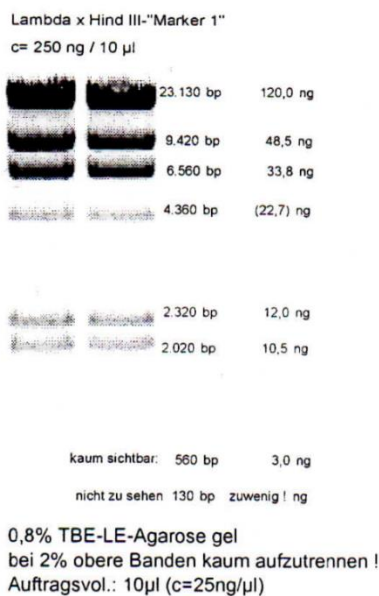


Figura 2.7.1.3.1. Gel de agarosa con estándares de peso molecular utilizado para controlar el peso molecular del ADN extraído.

2.7.2 Análisis de microsatélites (SSR)

Los microsatélites son secuencias de repeticiones en tándem de 1 a 6 pares de bases. Han demostrado ser útiles dadas sus características como alto polimorfismo y amplia distribución en el genoma de todos los organismos. En general son selectivamente neutros y de relativo fácil manejo en el laboratorio (Goldstein y Pollock, 1997).

2.7.2.1. Metodología para análisis de microsatélites (SSR)

2.7.2.1.1. Desarrollo de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Luego de la extracción de ADN y la determinación de su concentración, los tubos Eppendorf de 1,5 ó 2 ml pueden conservarse o preparar la solución de trabajo con una concentración de 10 ng/µl.

Para las placas de 96 pocillos se coloca 200 µl en cada pocillo, para las placas de 384 pocillos se coloca 8 µl.

Se agrega el resto de los componentes de la master-mix, que la integran todos los componentes necesarios para el desarrollo de la PCR (Polymerase Chain Reaction), con el ADN de cada individuo en cada pocillo.

Protocolo para PCR (Concentración de MgCl₂: 1,5 mM)			
	Concentración Solución madre	Concentración de trabajo	Volumen para PCR
10 x PCR	10X	1X	2,0 µl
dNTP	5 mM	0,2 mM	0,8 µl
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,6 µl
Primer F+R	10µM	0,6 µM	1,2 µl
Taq	5 U/µl	0,25 U	0,05 µl
H ₂ O			7,85 µl
ADN	10 ng/µl	75 ng	7,5 µl
		Volumen total	20 µl

Inmediatamente se coloca la placa en el termociclador, debido a que la Taq polimerasa se descompone rápidamente.

Programa de PCR (corta, 60 °C). Nombre del programa: SSR-60			
	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	2 min	
Desnaturalización	95 °C	10 seg	35 x
Fijación	60 °C	30 seg	
Extensión del primer	72 °C	50 seg	
Extensión final	72 °C	15 min	
Conservación	4 °C	∞	

Luego de la extensión final, se colocan las muestras a 4 °C si no van a ser sembradas inmediatamente.

Para sembrar los geles de poliacrilamida (PAA), se agrega a cada well de la placa 20 µl de buffer TBE (Tris-Borato-EDTA, pH 8,0) con el colorante formamida.

2.7.2.1.2. Corrida electroforética

2.7.2.1.2.1. Soluciones

- Solución madre de acrilamida al 40%, con relación Acrilamida: Bisacrilamida 19:1.
- APS al 10%: 0,5 gramos de disulfato peróxido de amonio disuelto en 5 ml de H₂O, dura hasta 2 semanas.
- Solución de urea: 8,8 M de urea; 1,18x TBE.
- Solución de 10x TBE: 0,89 M Tris, 0,89 M Borato, 0,5 M EDTA, pH 8,3.
- Solución colorante formamida

Para preparar 500 ml de la solución colorante, a 490 ml de formamida para biología molecular, agregar 150 mgr de xylencyanol FF, 150 mgr de bromofenol, y 10 ml de EDTA 0,5 M pH 8.

2.7.2.1.2.2. Geles

5% de Acrilamida, Urea 7,5 M, 1x TBE

Para preparar 100 ml (4 geles), 85 ml de solución de Urea, 2,5 ml de agua desmineralizada, 12,5 ml de solución de Acrilamida al 40% (Acric: Bis relación 19:1). Degasificar durante 10 minutos, filtrar con filtro de membrana de 0,2 µm.

Para polimerizar, agregar 260 µl de APS al 10%, 60 µl de TEMED, dejar endurecer durante 1,5 a 2 horas.

2.7.2.1.2.3. Corrida electroforética y revelado

La siembra de los geles se realiza con micropipeta de 8 muestras, de manera que pueden tomarse las muestras directamente de la placa de 24 x 16 wells, ya que son múltiplo de 8.

Buffer de cubas: Tris-Borato-EDTA (pH 8,0)

Potencia: 50 Watts/gel.

Revelado: la tinción se realizó con Bromuro de Etidio (BrEt) en concentración de 5 mgr/800 ml durante 12 minutos. Luego de este tiempo, se introdujo el gel en una cubeta con agua durante 2 minutos para retirar el exceso de BrEt

El BrEt es un compuesto intercalante, es decir, que se introduce entre las bases del ADN debido a su naturaleza hidrófoba. Su utilidad deriva de su fluorescencia, exaltada al estar unido al DNA. Se excita con luz ultravioleta de onda corta, 254 nm, y emite su fluorescencia como luz visible, de color rosado-anaranjado.

La imagen tomada por un transiluminador UV se transfiere a una computadora donde se guarda la imagen para su posterior análisis.

Tabla 2.7.2.1. Ubicación de los microsátélites mapeados en cromosomas y brazos. HS: brazo corto, HL: brazo largo.

CROMOSOMA	BRAZO	SSR	CROMOSOMA	BRAZO	SSR
1	HS	GBM 1042	5	HS	Bmac 96
		Bmac 90			Bmac 163
1	HL	GBM 1007	5	HL	Ebmac 824
		Bmac 213			Bmag 223
2	HS	Bmac 134	6	HS	Bmac 40
		HVM 36			GBM 1008
2	HL	Bmag 138	6	HL	Bmag 496
		Bmag 350			HVM 65
3	HS	Bmac 67	7	HS	HVCMA
		GBM 1031			GBM 1033
					Bmag 120
3	HL	Falcon			
		GBMS 138			
4	HS	Bmac 30			
		Ebmac 775			
		(HVM 3)			
4	HL	HVM LOH-1a			

2.7.3 Análisis de marcadores AFLP

Los marcadores AFLP se basan en polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (Vos et al, 1995). Son marcadores dominantes, que no dependen de los estados alélicos ni de la expresión génica (Mueller y Wolfenbarger, 1999)

La diferencia entre los marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los microsatélites (SSR) reside en que la amplificación por PCR de los SSR es específica, es decir, copias múltiples mediante primers específicos. En el caso de los AFLP, la amplificación es no específica, utilizando dos etapas llamadas de preamplificación y de amplificación, con enzimas de restricción de corte “raro” y corte “frecuente”. Las enzimas de restricción utilizadas fueron PstI y MseI.

2.7.3.1. Metodología para marcadores AFLP

Los protocolos de tratamiento de las muestras, extracción del ADN, realización de los geles y el revelado fueron detallados en el inciso anterior.

2.7.3.1.1. Protocolo de AFLP

2.7.3.1.1.1. Preparación de los adaptadores

6µl	ADMse1 (500 µM)	6µl	ADPst1 (50 µM)
6 µl	ADMse2 (500 µM)	6 µl	ADPst2 (50 µM)
48 µl	H ₂ O	48 µl	H ₂ O
60 µl	∑ 50 µM	60 µl	∑ 5,0 µM

Se calienta la mezcla a 95°C y se deja enfriar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

2.7.3.1.1.2. Restricción y Ligación

Soluciones:

TE_{0,1}: (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0)

BSA 100X (10 mg/ml): diluir con H₂O hasta 10X (1,0 mg/ml)

ATP 100 Mm: diluir con H₂O hasta 10mM

Se describe la metodología utilizando las enzimas de restricción Pst I y Mse I con sus adaptadores correspondientes. En cada well de las placas se colocan las muestras individuales de ADN, a una concentración de 50 ng/µl (lograda con buffer TE 0,1 Tris-HCl+EDTA pH 8,0), con los reactivos detallados.

Reactivo	Volumen en cada pocillo	Concentración en cada pocillo
ADN (50 ng/μl)	5,0 μl	250 ng
Pst I (20.000 U/ml)	0,125 μl	2,5 U
Mse I (10.000 U/ml)	0,1 μl	1 U
Buffer NBE 2	1,25 μl	1 X
ADPst1 (5 μM)	0,5 μl	0,2 μM
ADMse1 (50 μM)	0,5 μl	2,0 μM
ATP (10 mM)	1,25 μl	1,0 mM
BSA 10x (1,0 mg/ml)	1,25 μl	0,1 mg/ml (1X)
Ligae (6000 U/ml)	0,16 μl	1,0 U
H ₂ O	2,36 μl	
Volumen total	12,5 μl	

Se coloca la placa de 96 wells con los componentes en termociclador durante 3 horas a 37 °C. Luego se deja incubar durante toda la noche a 37 °C o a temperatura ambiente. Al día siguiente se agrega 37 μl de agua, llevando cada well a 50 μl.

2.7.3.1.1.3. Preamplificación (PCR 1)

Reactivo	Volumen en cada pocillo	Concentración en cada pocillo
ADN de Restricción-Ligación	5,0 μl	
Primer M02 (10 μM)	0,6 μl	0,3 μM
Primer P03/S00 (10 μM)	0,6 μl	0,3 μM
dNTP (20 mM)	0,8 μl	0,8 mM
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μl	1,5 mM
Buffer PCR (10x)	2 μl	1 x
Taq (5 U/μl)	0,1 μl	0,5 U
H ₂ O	10,3 μl	
Volumen total	Σ 20 μl	

Secuencia de termociclador:

2 minutos a 72 °C

20 ciclos de 30'' a 94 °C, 60'' a 60°C, 2 'a 72 °C. Final a 4 °C.

2.7.3.1.1.4. Amplificación selectiva (PCR 2)

Reactivos	Volumen de inicio		Concentración en cada pocillo
	1 X	110 X	
ADN (productos de preamplif)	3 μl		
Primer S (10 μl)	0,3 μl	33 μl	0,3 μM
Primer M (10 μl)	0,3 μl	33 μl	0,3 μM
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 μl	33 μl	1,5 mM
dNTP (20 mM)	0,4 μl	44 μl	0,8 mM
Buffer PCR (10x)	1 μl	110 μl	1 x
Taq (5 U/μl)	0,05 μl	11 μl	0,25 U
H ₂ O	4,65 μl	511 μl	
	Σ 10 μl		

Secuencia de termociclador:

La amplificación selectiva se realizó por PCR touch-down, cuyo fundamento es la utilización de un programa de termociclado en el que la temperatura se va reduciendo paulatinamente hasta alcanzar la temperatura de annealing de los primers (cebadores) o aún algunos grados menos. La secuencia de temperaturas fue:

- 2 minutos a 94 °C,
- 9 ciclos de 30'' a 94 °C, 30'' 65 °C -1 °C/ciclo, 2' a 72 °C (desnaturalización, annealing y extensión).
- 23 ciclos de 30'' a 94 °C, 30'' a 56 °C/ciclo, 2' a 72 °C. Final a 4 °C.

Lista de combinación de cebadores de AFLP

Secuencias centrales para los conjuntos de cebadores (con nucleótidos selectivos mostrados como N)

PstI 5'-GACTGCGTACATGCAGNNN-3'

MseI 5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'

MseI+1 (A, C, G T –M01, M02, M03, M04-)

MseI+2 (AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, M11, M12, M13, M14, hasta M26

MseI+3 (AAA, AAC, AAG, AAT, ACA, ACC, ACG,M31, M32, M33, M34,...hasta M94

PstI+1 (A, C, G, T – P01, P02, P03, P04-)

PstI+2 (AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT,.....P11, P12, P13, P14,....

PstI+3 (AAA, AAC, AAG, ACA, ACC, ACG,.....P31, P32, P33, P34, hasta P94

2.7.3.1.1.5. Corrida electroforética

Las muestras procedentes de la amplificación se sembraron en gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida: bisacrilamida 29:1, urea 4,6M y TBE 1x). Los geles se corrieron en cubas verticales a 1800 V durante 1 hora.

El tamaño aproximado de las bandas se estimó por comparación con un patrón de peso molecular de entre 100 y 570 pares de bases.

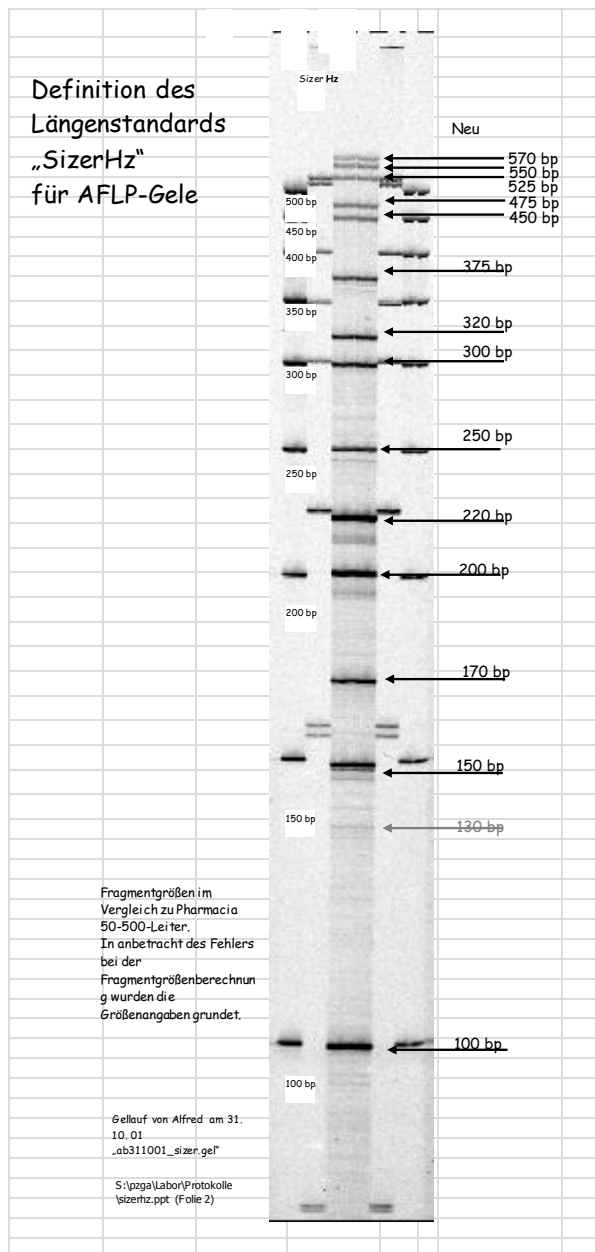


Figura 2.7.3.1. Gel de poliacrilamida con estándares de peso molecular de fracciones de ADN

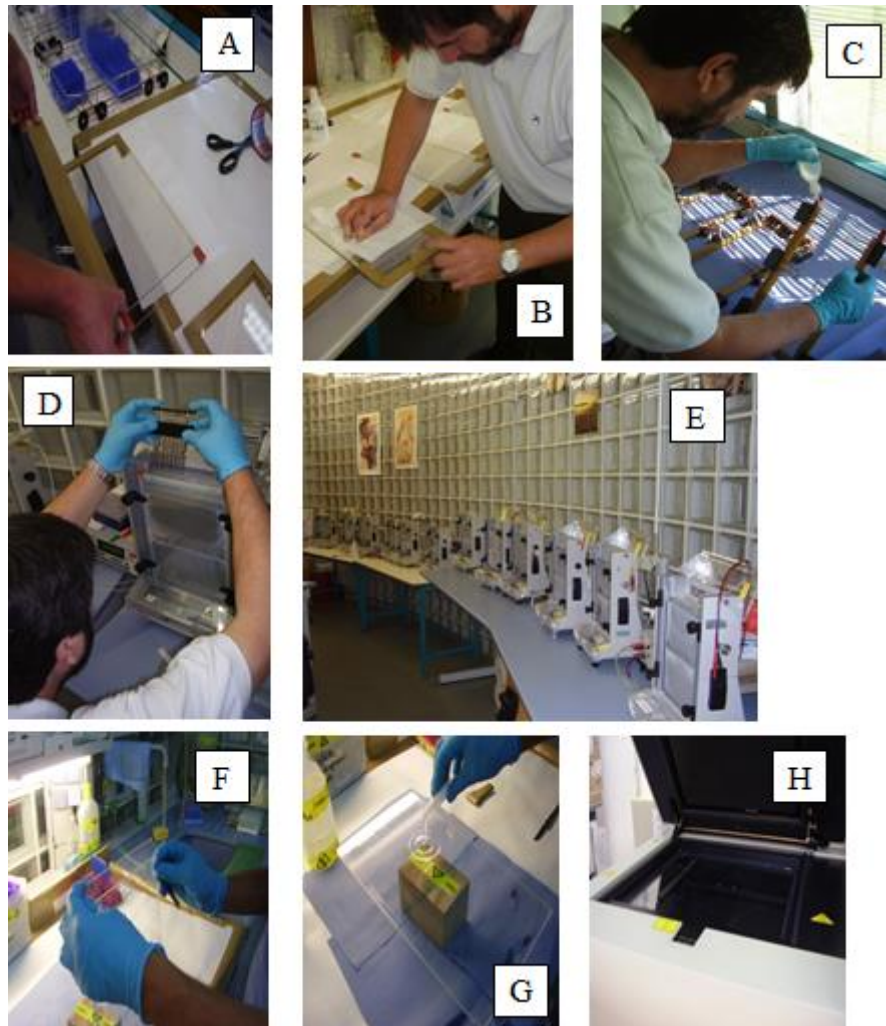


Figura 2.7.3.2. Geles de poliacrilamida. A, B y C) Preparación, D) Siembra de muestras, E) Corrida electroforética, F y G) Preparación para revelado, H) Transiluminador.

2.8. Mapeo de marcadores

Se utilizó el software MultiPoint (MultiQTL Ltd, Dr. Abrahan Korol y colaboradores, Institute of Evolution, Universidad de Haifa, Israel, Versión 1.2)

La secuencia de pasos para el mapeo de marcadores consta de:

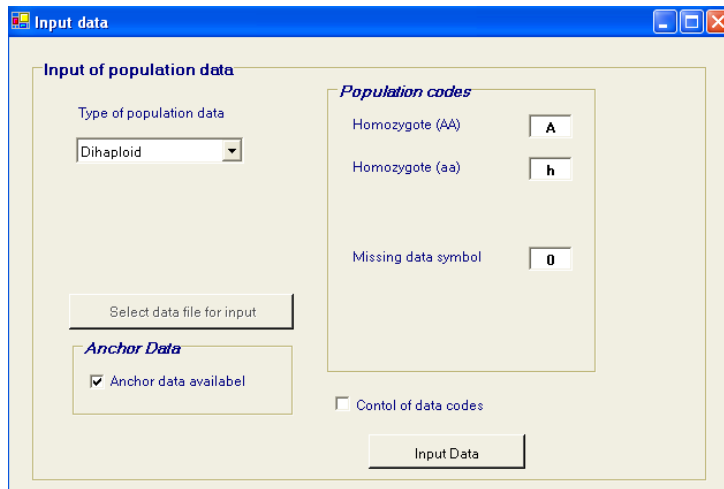
2.8.1. Preparación de la matriz de datos para ser utilizada por el programa. Ejemplo de parte del archivo, indicando el marcador y la constitución genotípica. Por tratarse de doble haploides, la constitución es A: homocigota dominante (AA), h: homocigota recesivo (aa), y 0 para los datos perdidos.

1148-7

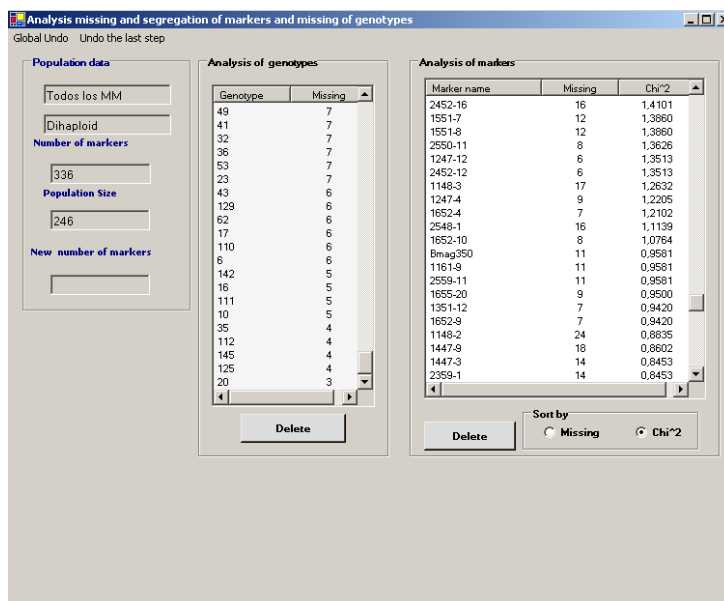
AAhhAAAhAAhAAAhAAhhAAhhAhAhhAAhAhhAAhAAhAAAhAhAhAAAhhhh0AA
 AAAhAAA0AAhAAAhhhAAhAhAh0AAAhAAAhA0AhhhA00AhhAhAhhAhhAAAAhA
 AAAhhAAhhhAhAAAhAhhhhAAAAA

1148-8

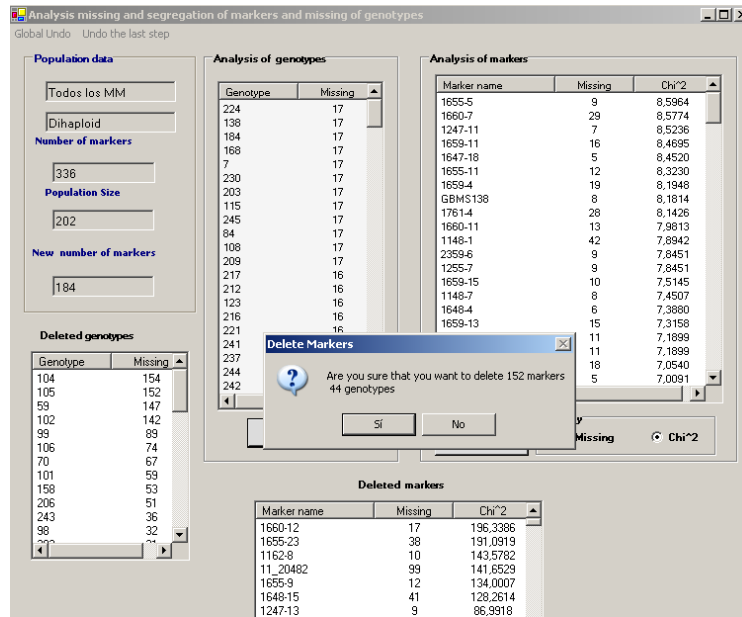
hhhhAhhhhAAAhhhhAhAAhhhAhhhhhhhhhhhhAhhAhhhhhAhhhhhhhhAhhAhA0hhAhAhhhAA
hAhhhhhAhhhhhhhhAhhAAAhAAhhhhAhhhhAAAhAhhhhAAhhhhAhhAAhhhhAhAhAhhAhhh
hAAAhAhhAAhA



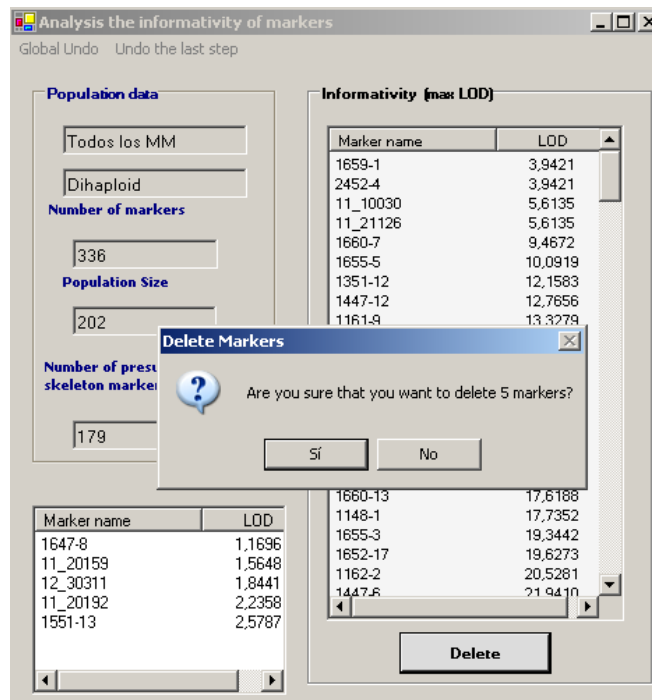
2.8.2. Análisis de segregación de marcadores y eliminación de aquellos marcadores con alta distorsión. El programa da el valor de Chi cuadrado para la comparación Observados – Esperados, de acuerdo a la segregación 1:1 esperada para individuos doble haploides.



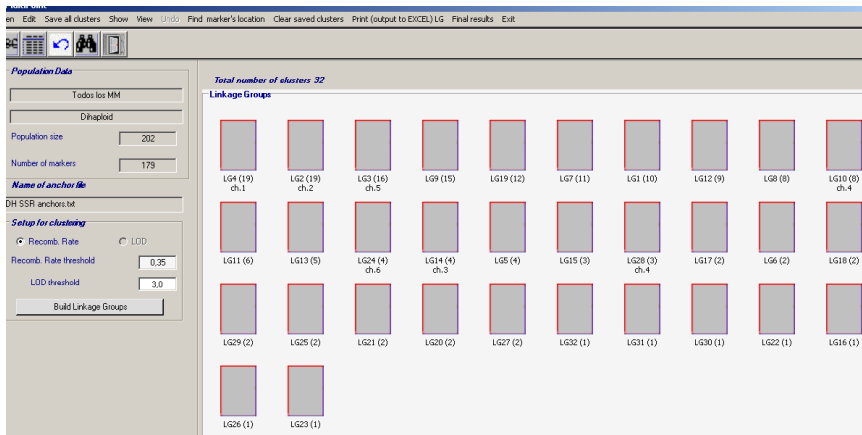
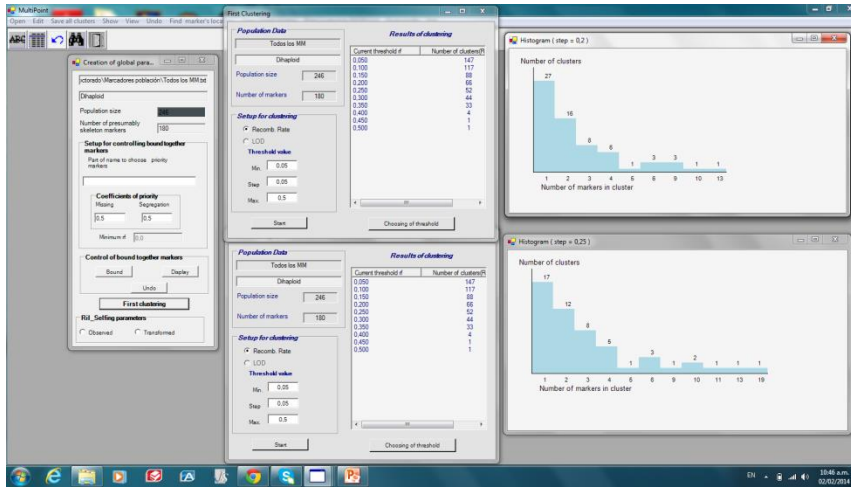
2.8.3 Eliminación de genotipos con marcadores perdidos o de dudosa calidad



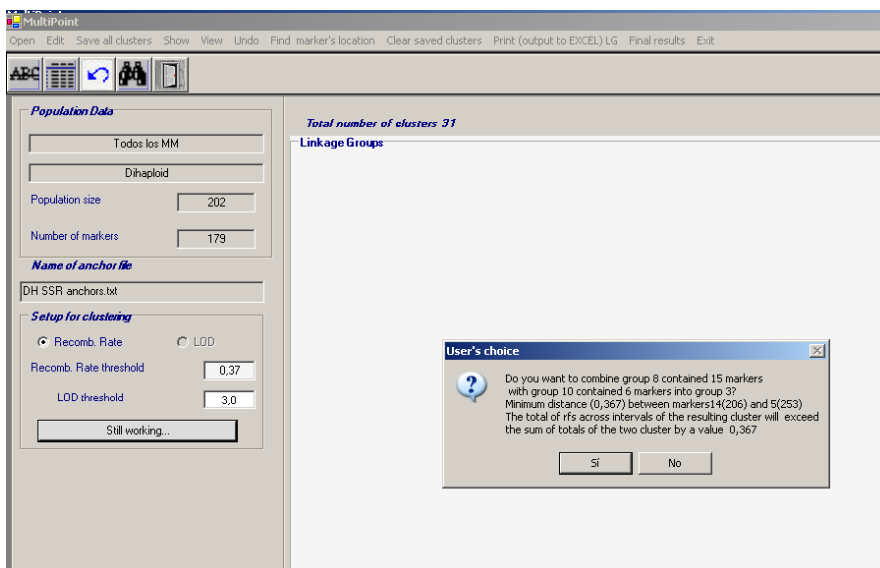
2.8.4. Análisis de información de marcadores (LOD scores) y eliminación de los marcadores menos informativos.

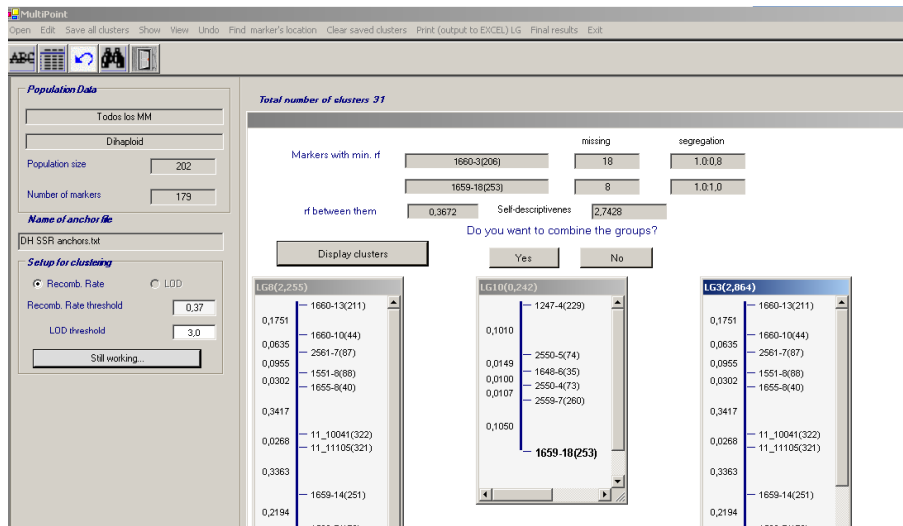


2.8.5. Determinación de la tasa de recombinación para iniciar el proceso de “clustering”, comenzando con $r=0,5$ (tasa de recombinación límite que establece cuando al menos dos marcadores están ligados), disminuyendo la tasa hasta llegar a un número razonable de grupos de ligamiento (GL). Ejemplos de $r=0,2$ y $0,25$ y GL formados con $r=0,35$

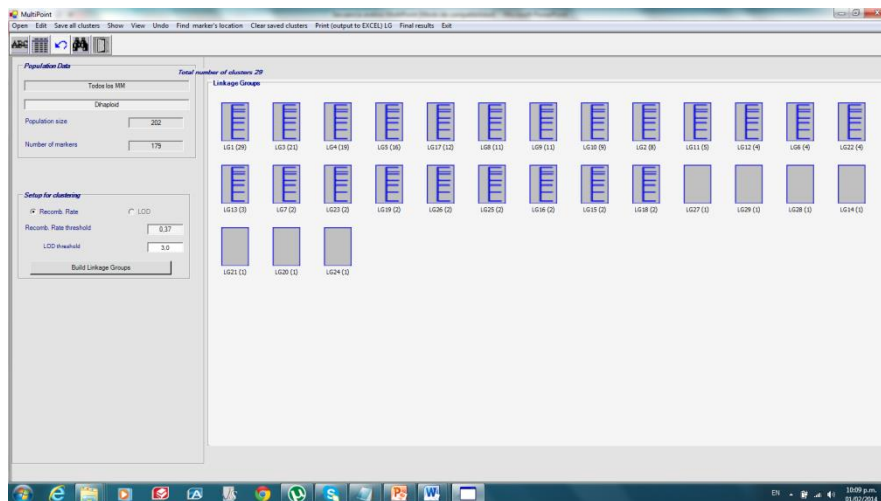


2.8.6. Fusión de grupos de ligamiento para reducir la cantidad total de los mismos, con valores de recombinación mayores pero cercanos al considerado como umbral.





2.8.7. Ordenamiento de los marcadores dentro de cada GL.



2.8.8. Eliminación de GL que quedaron con 1 ó 2 marcadores aislados

2.8.9. Asignación del número de cromosoma de cebada a los GL que contienen microsatélites con posición conocida (ver Tabla 7.2.1).

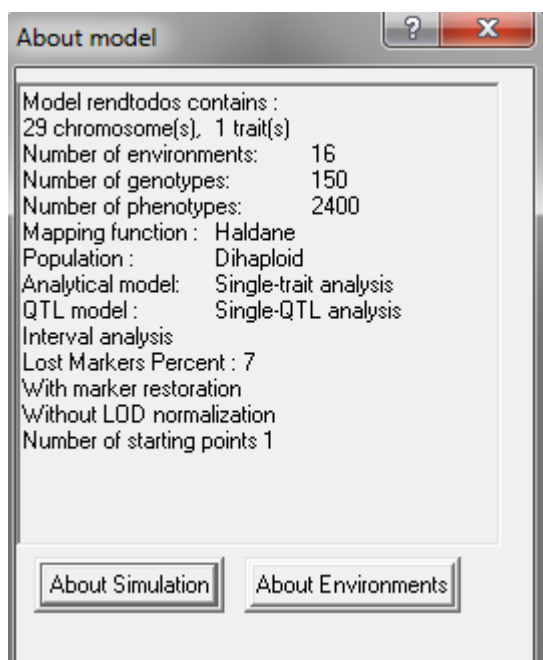
2.9 Mapeo de QTL

Se utilizó el software MultiQtl (MultiQTL Ltd, Institute of Evolution, Haifa University, Israel, Versión 2.5), que es un paquete de programas para el mapeo genético de caracteres cuantitativos, que permite el análisis de caracteres múltiples, ambientes, familias, e intervalos.

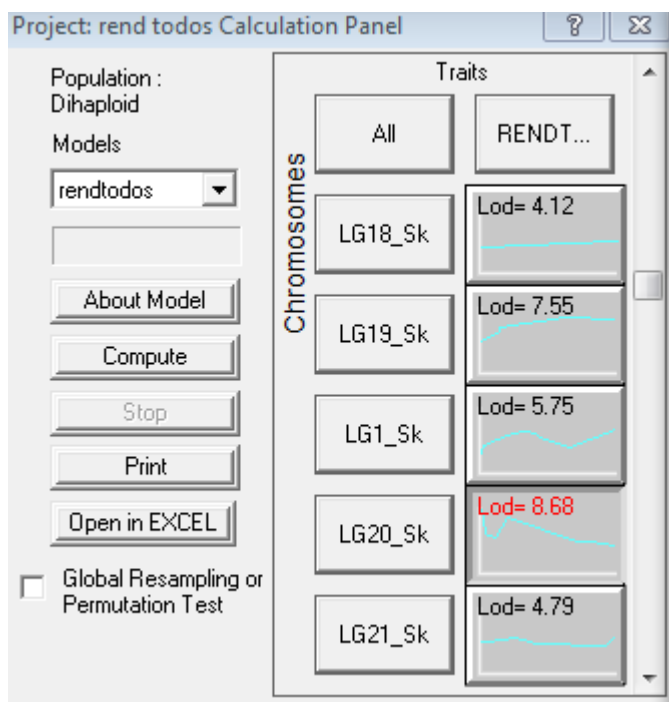
La secuencia de pasos para el mapeo de qtls consta de:

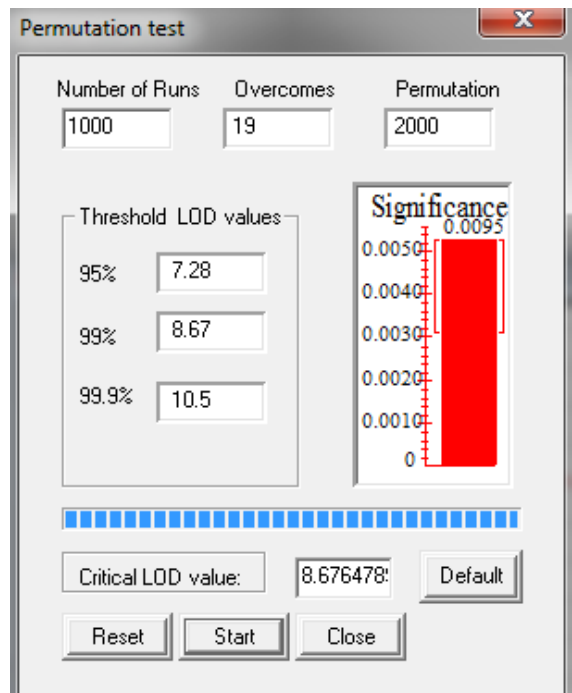
2.9.1. Carga y edición de datos (marcadores y fenotípicos). Los archivos de datos deben ser preparados en formato texto, con las siguientes extensiones: *.chr para GL, *.trt para caracteres individuales, o *.tra, para todos los caracteres en un solo archivo.

2.9.2. En el panel de modelo se elige el si se corre un análisis de carácter simple y QTL simple (o múltiples), la función (Haldane o Kosambi), y el tipo de población.

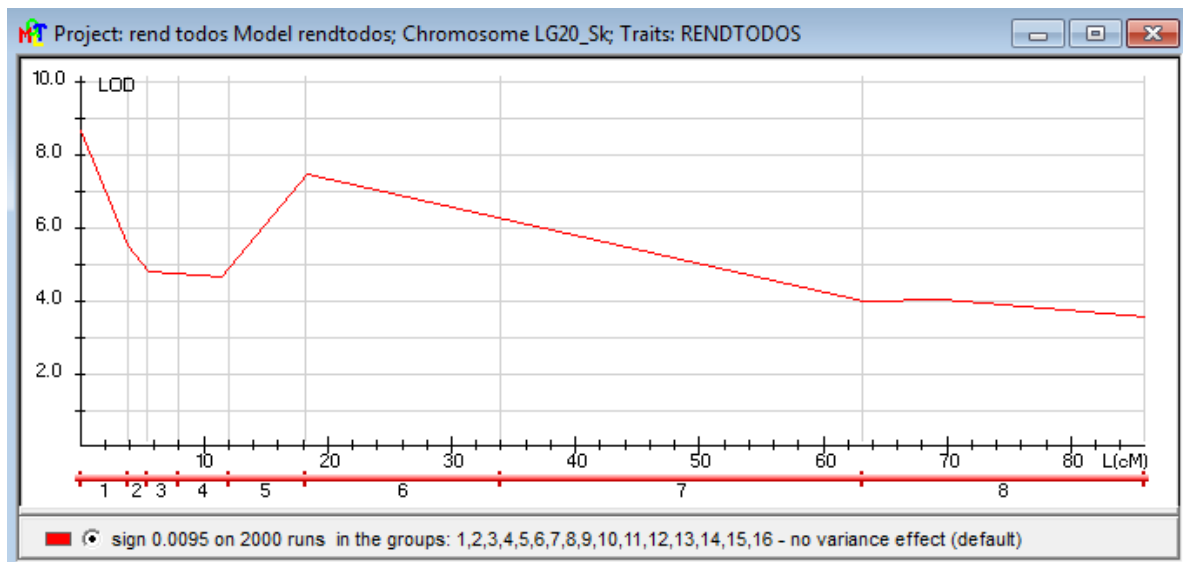
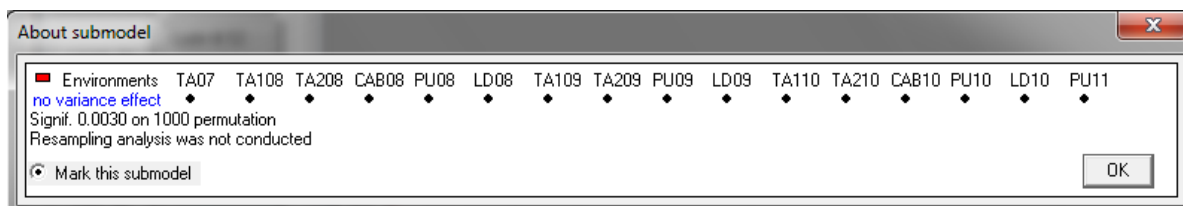


2.9.3. Una vez definido el modelo, se presenta el panel de cálculo donde aparecen todos los QTLs encontrados (ligamiento entre datos fenotípicos y marcadores), con la información del valor LOD y la probabilidad asociada, realizada con 1000 permutaciones (por configuración, pero esto es posible de incrementar)

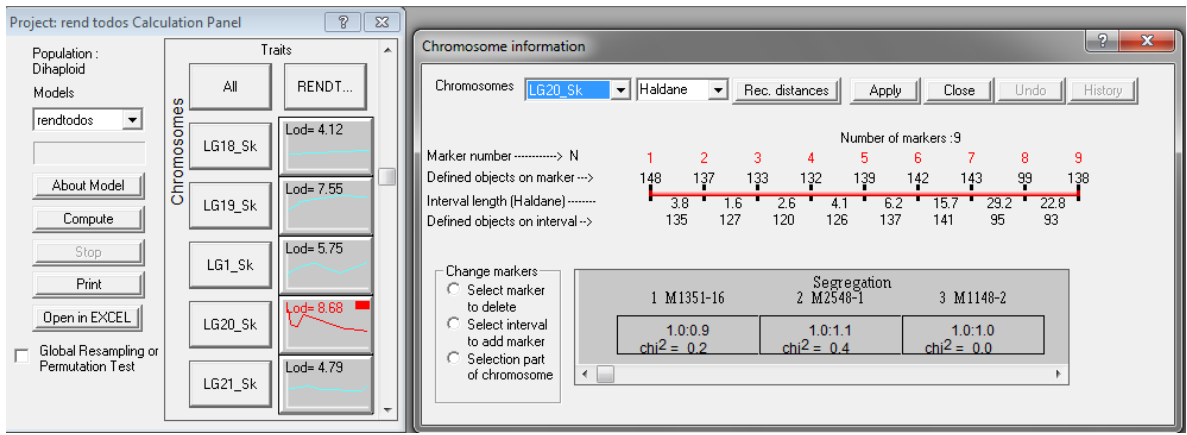




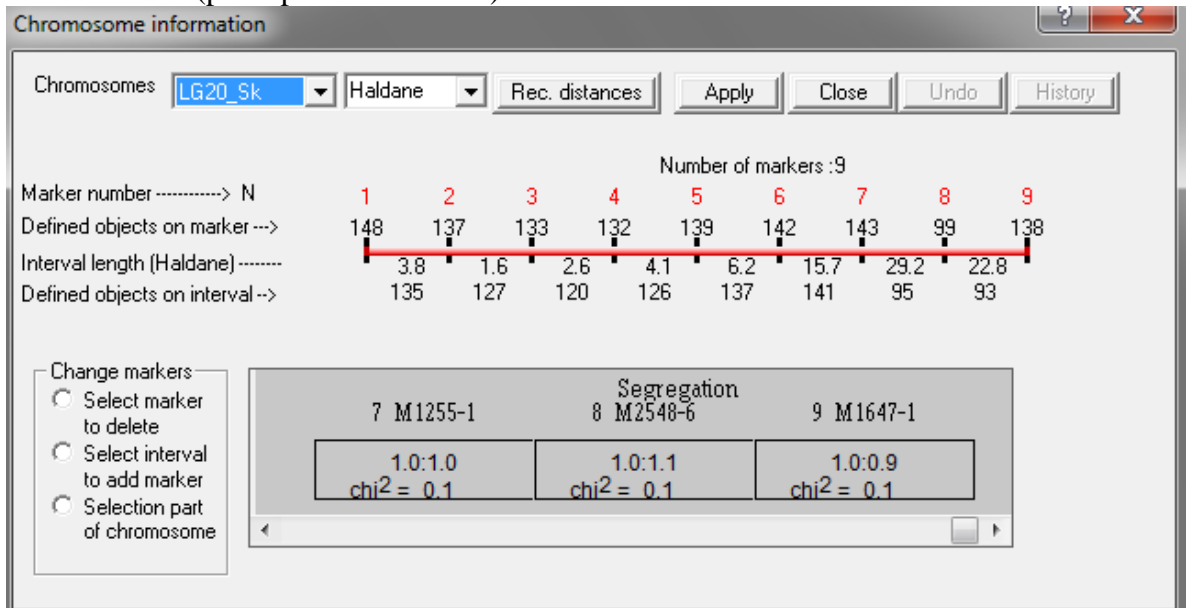
2.9.4. Luego se ingresa al detalle del QTL y de los ambientes analizados, clickeando sobre el cuadro correspondiente que queda marcado en rojo.



2.9.5. Para verificar que los marcadores del intervalo están ligados (esto ya se hizo durante el mapeo de ligamiento, pero en el análisis de QTLs el programa vuelve a hacerlo dentro de cada intervalo), se recorre todo el intervalo y se comprueba que el valor de chi cuadrado se encuentre dentro de la probabilidad de aceptación.

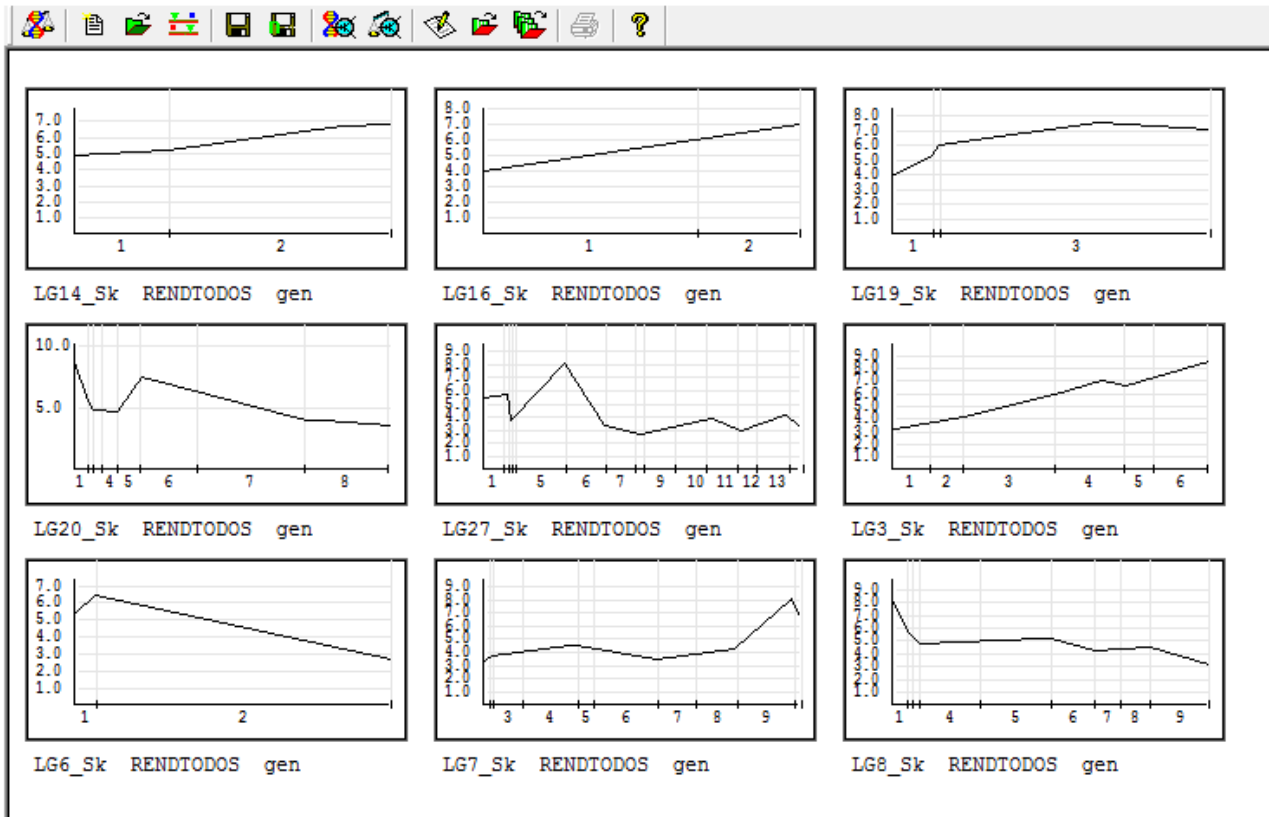


(principio del intervalo)



(fin del intervalo)

2.9.6. Finalmente, el programa muestra la totalidad de los gráficos de cada GL donde se encontró un QTL (umbral de significancia de 0,05) y una planilla con la información del grupo de ligamiento, el carácter, el valor LOD y la probabilidad asociada, la posición en el GL, el porcentaje de explicación de la varianza y el efecto de sustitución del alelo favorable, en la unidad del carácter (en el ejemplo, rendimiento en Kg/Ha). El valor mínimo de LOD para aceptar la presencia de un qtl en esta tesis fue de 2.



GROUP one_trait : rend por sitios ; Significance threshold 0.050

Chrom.	Trait	LOD	P value	Loci position(CM)	PEV	Subst.effect
LG10_Sk	RENDA210	2,25	0,006	29	0,101	-428,93
LG11_Sk	RENDA210	1,08	0,049	0	0,035	252,408
LG13_Sk	RENLD09	1,24	0,029	6,1	0,038	367,513
LG14_Sk	RENPU08	2,2	0,007	23	0,1	-132,752
LG16_Sk	RENPU10	1,6	0,024	40,6	0,052	133,76
LG17_Sk	RENDCAB10	1,43	0,041	7,7	0,058	171,162
LG19_Sk	RENDCAB10	1,74	0,006	25,7	0,072	189,891
LG19_Sk	RENDA208	1,31	0,037	33,1	0,047	162,34
LG19_Sk	RENDA210	1,74	0,014	13,8	0,073	365,24
LG1_Sk	RENLD09	1,82	0,032	112,7	0,055	-437,023
LG20_Sk	RENDCAB10	2,06	0,013	15,5	0,07	-188,318
LG20_Sk	RENDA07	1,95	0,019	0	0,059	-441,912

3. RESULTADOS DE ENSAYOS DE CAMPO

En este capítulo se detallan los resultados obtenidos en la evaluación fenotípica de los materiales, previa enumeración de las hipótesis y objetivos expuestos en la Introducción.

3.1 Hipótesis 1

La variabilidad climática observada entre sitios y años en la zona de producción de cebada de Argentina genera diferencias de rendimiento y calibre en un mismo genotipo. Tales variaciones causan una mayor complejidad en la selección de líneas y poblaciones segregantes en los programas de mejoramiento.

Objetivo 3.1.1: Explorar la variabilidad climática espacial y anual en cuatro localidades del Sudeste y Sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, donde se realiza alrededor del 65% del cultivo.

Objetivo 3.1.2: Evaluar el rendimiento y calibre en los ambientes experimentales y relacionarlo con la variabilidad climática.

Objetivo 3.1.3: Evaluar los resultados de rendimiento y calibre en ambientes con y sin irrigación, y relacionar dichos resultados con los obtenidos en sitios de diferente disponibilidad de agua.

Objetivo 3.1.4: Estudiar diferentes métodos de estabilidad de rendimiento y tamaño de granos.

Objetivo 3.1.5: Evaluar la temperatura de canopeo y la respuesta a fotoperíodo como herramientas simples de selección para rendimiento y tamaño de los granos.

3.2. Variabilidad climática

Las figuras 3.2.1 y 3.2.2 muestran las precipitaciones totales y las temperaturas medias de cada localidad en los años evaluados. La tabla 3.2.1 corresponde a los datos climáticos de Tres Arroyos 2007, único ensayo realizado en ese año.

Tabla 3.2.1 Precipitaciones mensuales y temperaturas medias mensuales del sitio Tres Arroyos en 2007

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC
Precipitaciones Mensuales 2007	36,5	141,5	74,2	52,2	33,3	2,6	2,5	2,7	138,1	19,2	40,6	11,2
Promedio Histórico	78,1	87,2	82,0	77,3	51,8	31,7	40,4	44,0	57,7	75,3	82,9	78,6
Temperatura Media Mensual 2007	21,6	20,2	17,2	14,3	8,5	6,0	5,0	6,2	12,6	14,3	15,2	20,2
Promedio Histórico	21,9	20,7	18,7	14,6	11,1	8,1	7,6	9,2	11,2	13,9	16,6	19,7

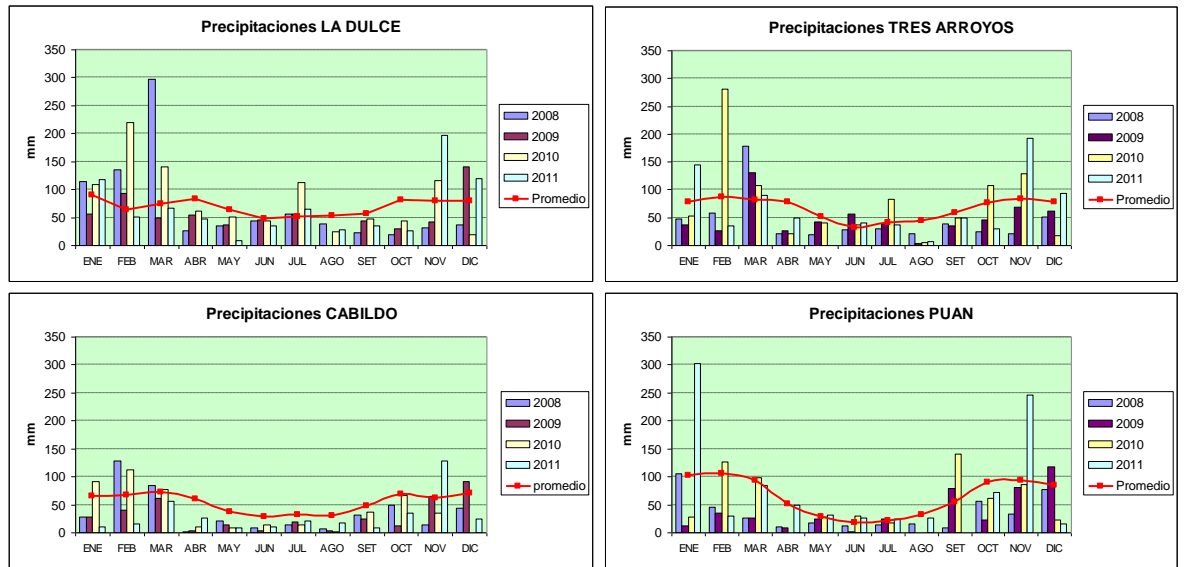


Figura 3.2.1: Precipitaciones registradas en cada sitio experimental durante los años 2008 a 2011, y promedio histórico de una serie de 30 años

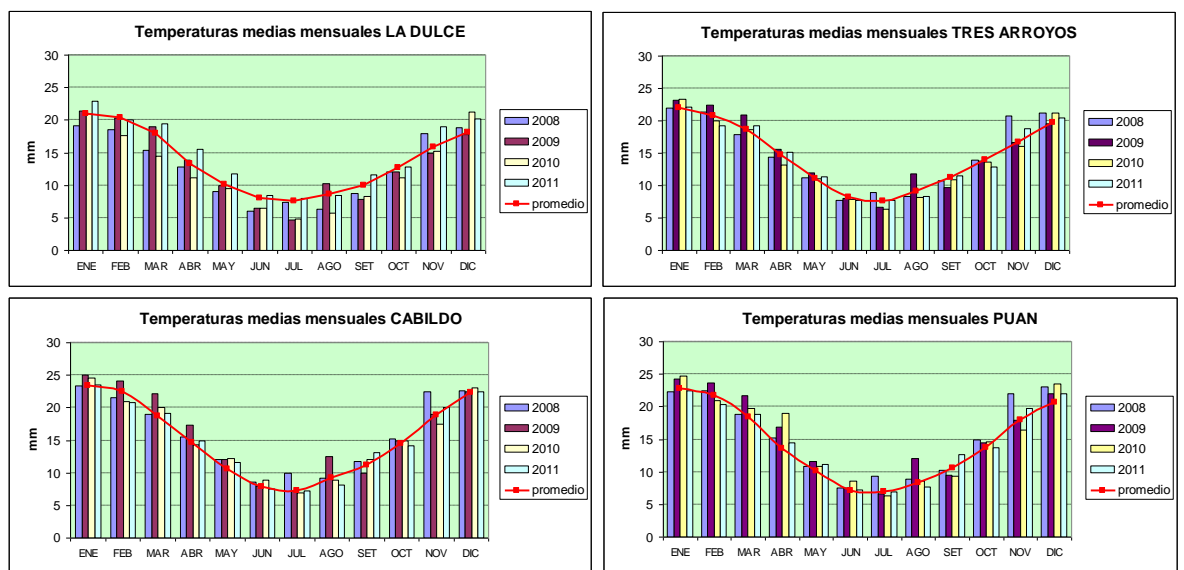


Figura 3.2.2.: Temperaturas medias registradas en cada sitio experimental durante los años 2008 a 2011, y promedio histórico de una serie de 30 años

De los 20 ensayos realizados en el período 2007-2011, no todos pudieron ser analizados para todos los parámetros considerados. Causas como pérdidas por granizo, (Tres Arroyos y La Dulce 2011) hasta condiciones de sequía extrema (Cabildo 2009), impidieron contar con todos los datos. Los micromaltesos de cada sitio se realizaron con muestras compuestas de las dos repeticiones. La tabla 3.2.2 muestra el detalle de sitios, años y análisis realizados. Los números de registro (1 a 5776) corresponden a la planilla de datos utilizada para el análisis de QTLs.

Tabla 3.2.2: Detalle de los ensayos y variables registradas

REGISTRO		AÑO	SITIO	VARIABLES			
1	152	2007	TA rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, visc,			
153	304	2007	TA rep 2	rend, cal, hum remojo, dureza			
305	456	2008	TA1, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu			
457	608	2008	TA1, rep 2	rend, cal, prot			
609	760	2008	TA2, rep 1	rend, cal, prot			
761	912	2008	TA2, rep 2	rend, cal, prot			
913	1064	2008	CABILDO, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
1065	1216	2008	CABILDO, rep 2	rend, cal, prot			
1217	1368	2008	PUAN, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
1369	1520	2008	PUAN, rep 2	rend, cal, prot			
1521	1672	2008	LA DULCE, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu,			
1673	1824	2008	LA DULCE, rep 2	rend, cal, prot			
1825	1976	2009	TA1, rep 1	rend, cal, prot			
1977	2128	2009	TA1, rep 2	rend, cal, prot			
2129	2280	2009	TA2, rep 3	rend, cal, prot			
2281	2432	2009	TA2, rep 3	rend, cal, prot			
2433	2584	2009	PUAN, rep 1	rend, cal, prot			
2585	2736	2009	PUAN, rep 2	rend, cal, prot			
2737	2888	2009	LA DULCE, rep 1	rend, cal, prot			
2889	3040	2009	LA DULCE, rep 2	rend, cal, prot			
3041	3192	2010	TA1, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
3193	3344	2010	TA1, rep 2	rend, cal, prot			
3345	3496	2010	TA2, rep 3	rend, cal, prot			
3497	3648	2010	TA2, rep 3	rend, cal, prot			
3649	3800	2010	CABILDO, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
3801	3952	2010	CABILDO, rep 2	cal, prot			
3953	4104	2010	PUAN, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
4105	4256	2010	PUAN, rep 2	rend, cal, prot			
4257	4408	2010	LA DULCE, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
4409	4560	2010	LA DULCE, rep 2	rend, cal, prot			
4561	4712	2011	PUAN, rep 1	rend, cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
4713	4864	2011	PUAN, rep 2	rend, cal, prot			
4865	5016	2011	TA1, rep 1	cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
5017	5168	2011	TA1, rep 2	cal, prot			
5169	5320	2011	CABILDO, rep 1	cal, prot			
5321	5472	2011	CABILDO, rep 2	cal, prot			
5473	5624	2011	LA DULCE, rep 1	cal, prot, hum remojo, dureza, ext, visc, fan, glu, Vz			
5625	5776	2011	LA DULCE, rep 2	cal, prot			

3.3. Rendimiento

Los rendimientos de las líneas parentales Mut 6519 y Aspen se relacionaron con los rendimientos promedios de cada sitio (Figura 3.3.1). Se observó que en ambientes promedio de hasta 3300 kg/ha no existieron diferencias de rendimiento entre los dos genotipos, mientras que a mejores calidades ambientales, la variedad Aspen expresó un mayor potencial de rendimiento que la línea Mut 6519. La calidad ambiental fue valorada mediante el promedio de todas las líneas evaluadas en cada sitio (Finlay y Wilkinson, 1963).

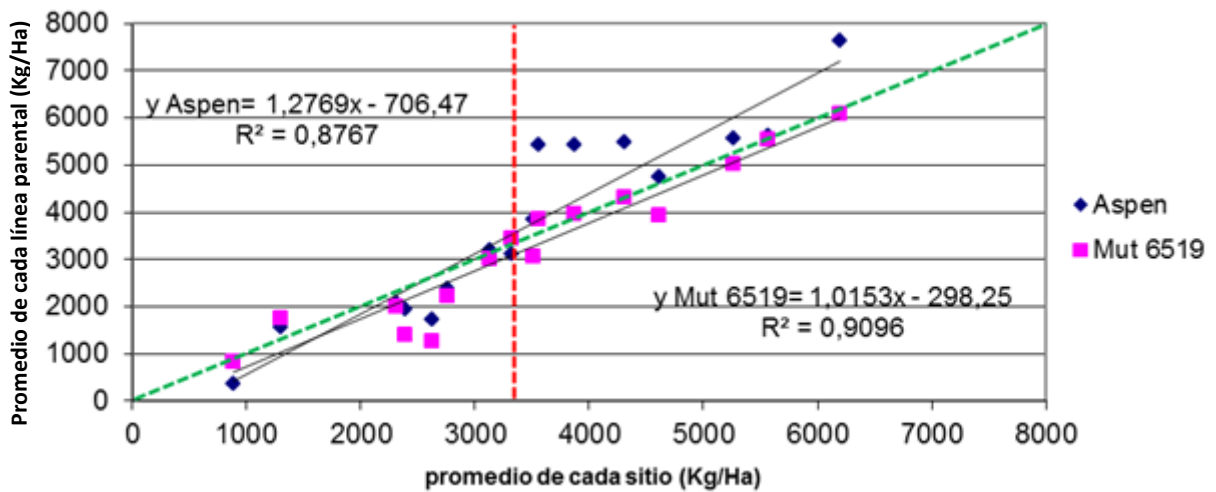
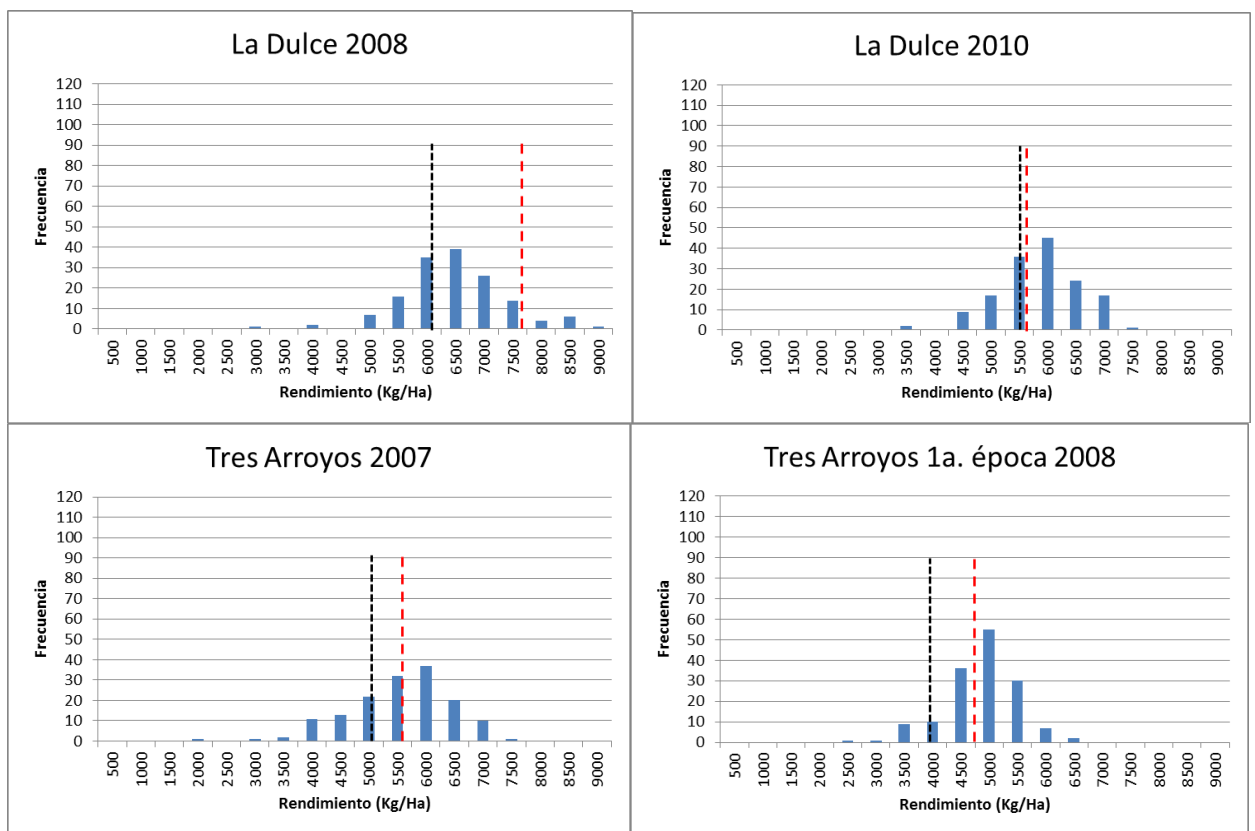
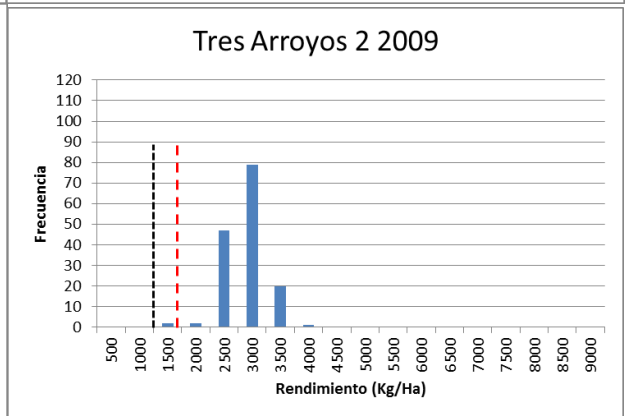
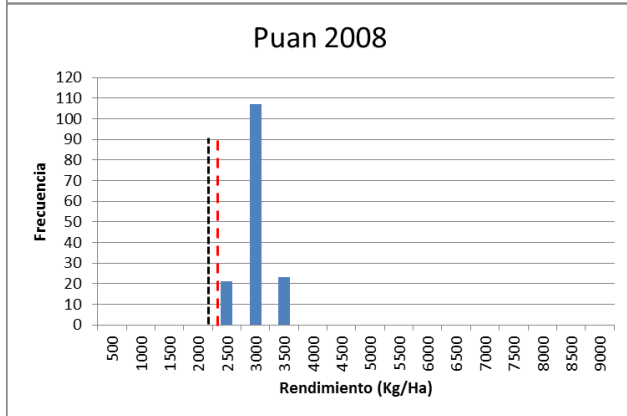
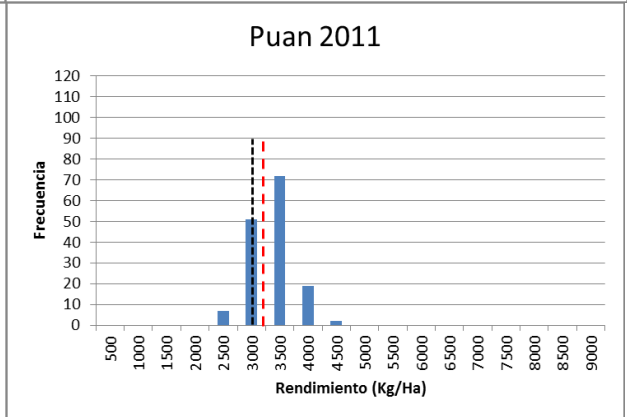
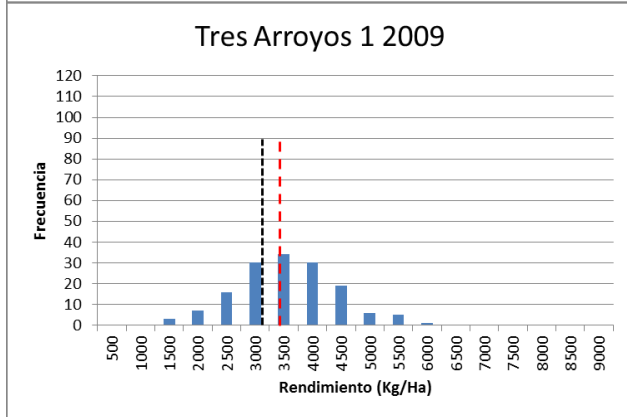
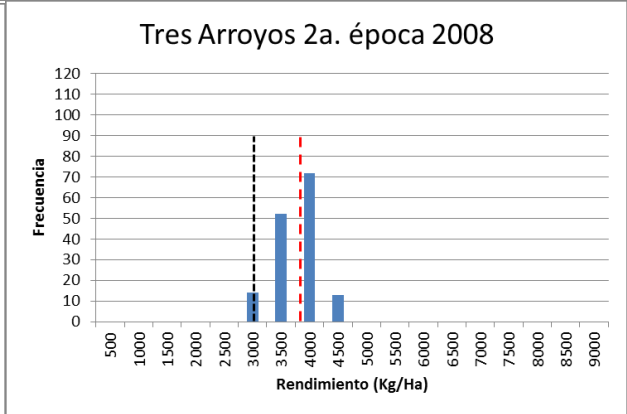
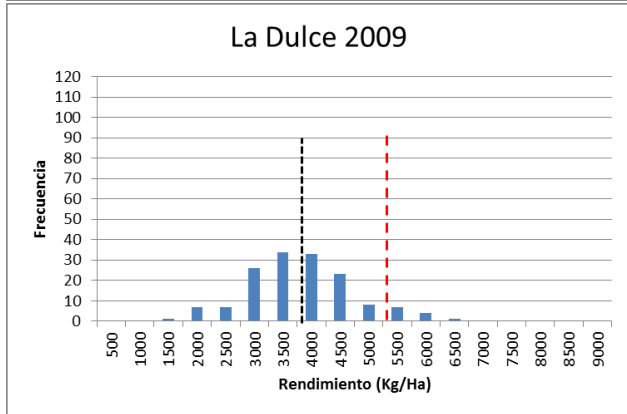
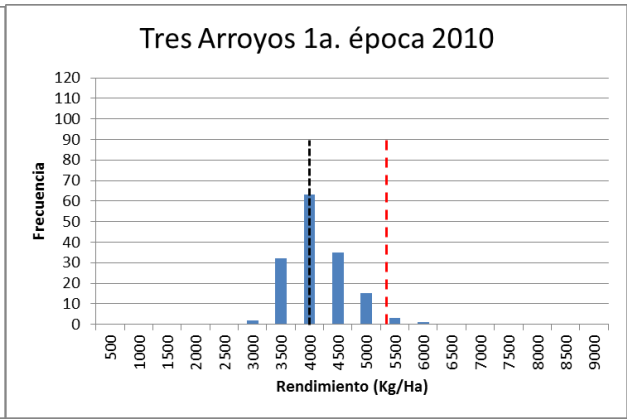
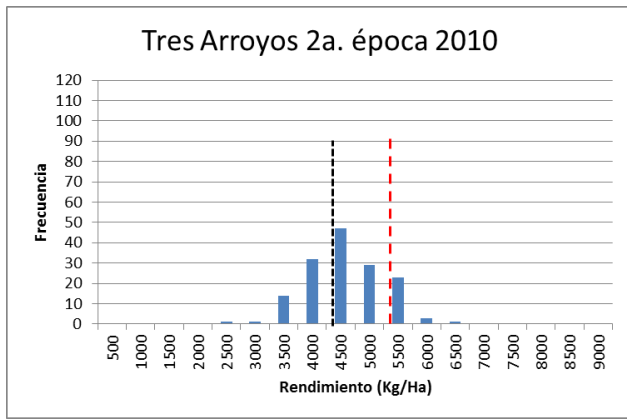


Figura 3.3.1. Rendimientos promedios de Mut 6519 y Aspen en función del rendimiento promedio de cada ambiente experimental. La línea discontinua roja señala 3300 kg/ha., la línea discontinua verde señala la relación 1:1.

Se graficaron los rendimientos promedio de 150 líneas doble haploide más las dos líneas parentales y las distribuciones de frecuencia de cada sitio experimental (Figura 3.3.2). El orden corresponde a los promedios de rendimiento, ordenados de mayor (La Dulce, 2008) a menor (Puán, 2009). Los rendimientos de las líneas parentales se indican mediante líneas discontinuas.





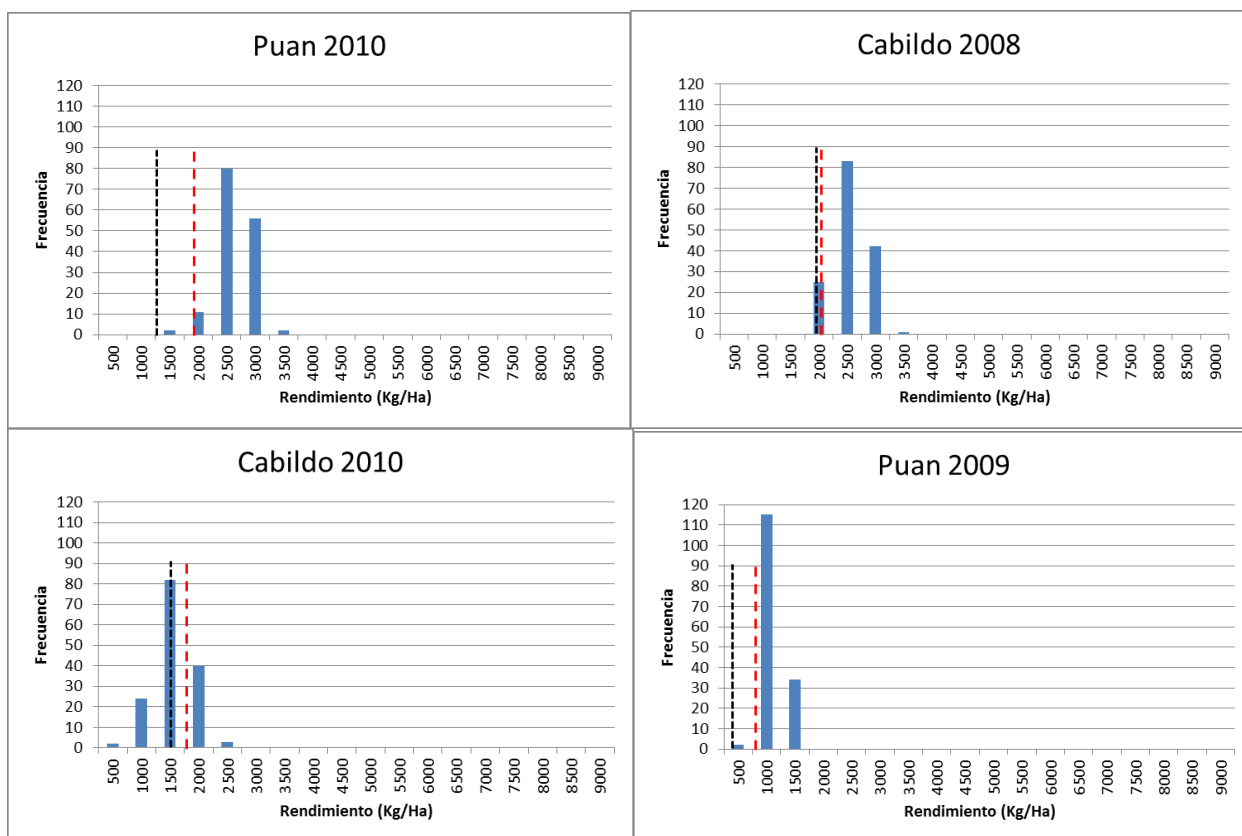


Figura 3.3.2: Distribución de frecuencia de los rendimientos en cada sitio experimental. Línea roja: cultivar Aspen, línea negra: Mut 6519. Cabildo 2010, basado en una repetición.

Los promedios de rendimiento de cada sitio, como así también la significancia del Análisis de Varianza basado en modelos mixtos, se observan en la Tabla 3.3.1. Los factores de variación y su significación se detallan en la Tabla 3.3.2.

Tabla 3.3.1.: Promedios de rendimiento (kg/ha), prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y significación de ANOVA en cada ambiente. Cabildo 2010 basado en una repetición.

Ambiente	Promedio Población DH	p Normalidad	p ANOVA	Mut 6519	Aspen	Media padres
La Dulce 2008	6189,6	0,4471	<0,0001	6077,8	7610,3	6844,1
La Dulce 2010	5568,2	0,0029	0,012	5525,4	5584,4	5554,9
Tres Arroyos 2007	5262,8	0,2992	<0,0001	5020,7	5548,5	5284,6
Tres Arroyos 1 2008	4616,9	0,9516	<0,0001	3933,0	4719,5	4326,2
Tres Arroyos 2, 2010	4301,5	0,2111	<0,0001	4313,0	5446,5	4879,7
Tres Arroyos 1, 2010	3862,8	0,0001	<0,0001	3946,9	5413,9	4680,4
La Dulce 2009	3538,7	0,4050	0,0224	3860,6	5399,6	4630,1
Tres Arroyos 2, 2008	3519,4	0,9516	<0,0001	3052,3	3834,3	3518,3
Tres Arroyos 1, 2009	3321,9	0,0836	<0,0001	3446,8	3091,8	3269,3
Puán 2011	3130,6	0,7926	0,1113	3013,9	3159,4	3086,6
Puán 2008	2765,2	0,0008	0,4853	2228,5	2343	2285,7
Tres Arroyos 2, 2009	2644,0	0,3960	<0,0001	1271,5	1692,5	1482,1
Puán 2010	2402,4	0,0529	0,0089	1399	1927,5	1663,2
Cabildo 2008	2310,5	0,2908	<0,0001	2003,5	2051,0	2027,3
Cabildo 2010	1290,9	0,3514	n/a	1759,9	1547,2	1653,6
Puán 2009	885,2	0,0303	0,0032	836,7	337,2	587,0

Tabla 3.3.2 Significación de los factores del ANOVA por localidad para el carácter rendimiento; gl grados de libertad

Localidad	GI	Genotipo	gl	Año	gl	Interacción GxA
Tres Arroyos	151	3,61***	3	247,9***	453	1,18*
La Dulce	151	1,72***	2	617,1***	302	1,28**
Puán	151	1,26*	3	2049,5***	453	1,10 ns

En general, en los ambientes de mayor potencial de rendimiento, la media de las líneas parentales se ubicó entre la media de la población y los rendimientos más altos (con excepción de Tres Arroyos 1 2008), siendo el cv. Aspen el que mostró mayores rendimientos que la línea Mut 6519. En cambio, en los ambientes de menor potencial, la media de los padres fue casi siempre menor a la media de la población (con excepción de Cabildo 2010). La comparación de los rendimientos promedio indicó herencia transgresiva en casi todos los ambientes, probablemente debido al diferente fondo genético de las líneas parentales (Tondelli et al., 2014). Esto permite suponer que el proceso de selección sobre la población de DHs sería exitoso.

En 2008 el rendimiento fue muy variable, aún en la misma localidad (TA) en dos fechas de siembra. En Cabildo la media de los DH superó a ambos parentales. También fue muy variable en 2009, año en que no fue posible registrar datos en Cabildo. La pérdida de plantas en esta localidad no permitió incluirla en el análisis de rendimiento que figura en la Tabla 3.3.2. En La Dulce el rendimiento fue muy inferior al año anterior y afectó especialmente al parental Aspen, mientras que en 2010 no hubo diferencias entre las medias de la población de DH y sus parentales. En todos los casos la variabilidad de la colección de DH fue grande, pero no mostró mejor performance que sus parentales excepto en los ambientes más pobres, demostrando una cualidad de estabilidad que puede atribuirse a efectos de recombinación, que fue el objetivo inicial del cruzamiento.

Los análisis de varianza realizados por sitio (Tres Arroyos, La Dulce, Puán,) muestran que el factor aleatorio “años” fue el más significativo (por ejemplo, $F = 247,92$, $p < 0,0001$ vs. $F = 3,61$, $p < 0,0001$ para genotipos en Tres Arroyos; $F = 617,17$, $p < 0,0001$ vs. $F = 1,72$, $p < 0,0001$ en La Dulce), y en menor magnitud, la interacción genotipo*año (por ejemplo, $F = 1,18$ $p = 0,03$ en Tres Arroyos, $F = 1,28$ $p = 0,091$ en La Dulce). Estos resultados reflejaron la variación interanual de las condiciones ambientales, afectando de diversas maneras el potencial de rendimiento promedio, aún más que la interacción genotipo*año.

Con el fin de evaluar las relaciones entre ambientes y observar si la selección en uno de ellos podría resultar similar a la selección en otro, se determinaron los coeficientes de correlación entre los rendimientos unitarios de cada sitio experimental, con un rango entre valores máximos de coeficiente $r = 0,582$ (correlación entre los ambientes La Dulce 2008 con Tres Arroyos 2 2010, $p = 0,0000$) y mínimo $r = 0,002$ (correlación entre Cabildo 2008 y Puán 2011, $p = 0,98$) (Tabla 7.1 en Anexo).

Con el mismo propósito de encontrar relaciones entre ambientes experimentales y evaluar la posibilidad de utilizar ambientes tipo cuyos resultados pudieran extrapolarse hacia otros de aparente similitud, se ordenaron los promedios de rendimientos agronómicos de mayor a menor, y luego se dividió la lista por cuartiles, realizando comparaciones entre grupos.

Tabla 3.3.3.: Análisis por cuartiles de los rendimientos promedio de cada ambiente experimental

AMBIENTE	RENDIMIENTO PROMEDIO	IDENTIFICACION
La Dulce 2008	6198	A1
La Dulce 2010	5568	A2
TA 2007	5263	A3
TA 1 2008	4613	A4
TA 2 2010	4309	B1
TA 1 2010	3874	B2
La Dulce 2009	3553	B3
TA 2 2008	3518	B4
TA 1 2009	3321	C1
Puan 2011	3130	C2
Puan 2008	2759	C3
TA 2 2009	2629	C4
Puan 2010	2393	D1
Cabildo 2008	2307	D2
Cabildo 2010	1296	D3
Puan 2009	881	D4

La Tabla 3.3.4 muestra los coeficientes de correlación entre promedios de cuartiles. Se observó, en general, una mayor asociación entre promedios de cuartiles que entre ambientes particulares dentro de un mismo cuartil. Es evidente que dentro de los valores promedio de cada genotipo se esconde la interacción que existe con cada ambiente, pero la utilidad práctica de esta observación radica en que selecciones sucesivas en sitios de alta calidad ambiental, basadas en rendimientos promedios, resultarían más eficientes para detectar líneas con mayor capacidad de enfrentar situaciones de estrés que la propia selección en ambientes de baja calidad.

Tabla 3.3.4: Coeficientes de correlación de Pearson entre promedios de cuartiles de rendimiento (bajo diagonal) y probabilidad asociada (sobre diagonal)

	Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Cuartil 4
Cuartil 1	--	0,0000	0,0000	0,0002
Cuartil 2	0,5708	--	0,0000	0,0213
Cuartil 3	0,5082	0,4390	--	0,0000
Cuartil 4	0,2962	0,1867	0,4894	--

3.3.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Se realizó un ACP basado en la distancia Euclídea por individuos doble haploides con sitios como variable. La primera y segunda componentes explicaron el 78,6% de la variación total. Tomando cada combinación sitio/año como ambientes individuales, el gráfico H-plot de la figura 3.3.1.1 muestra la distribución de los vectores en el plano de las CP 1 y 2.

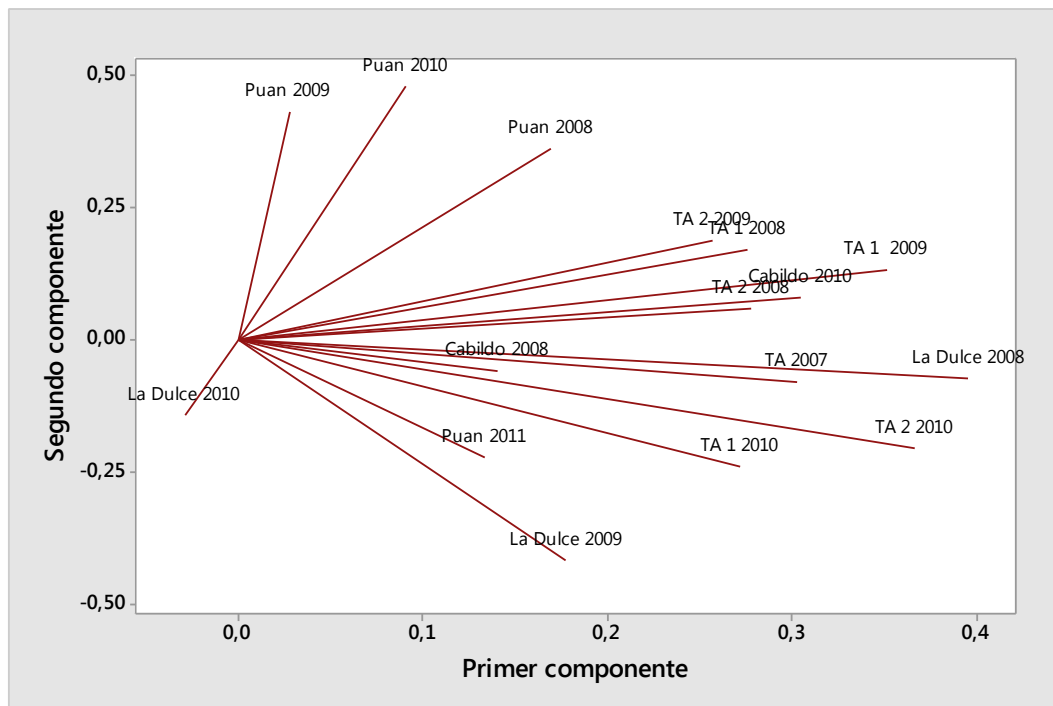


Figura 3.3.1.1: Gráfico H-plot de ambientes en el plano de CP 1 y 2. CP 1: 25,6%, CP 2: 13,8% de explicación de la varianza.

La componente 1 opone La Dulce 2010 al resto de los ambientes. Las variables La Dulce 2008 ($r=0,80$), TA 1 2009 ($r=0,71$), TA 2 2010 ($r=0,74$) y Cabildo 2010 ($r=0,62$) son las más relacionadas con esta componente. La componente 2 representa bien a la variable Puán 2010 ($r=0,71$) y Puán 2009 ($r=0,64$). La CP 3 se relaciona mayoritariamente con el ambiente Cabildo 2008. La Dulce 2010 es la única variable con signo negativo en todos los ejes. Los ambientes La Dulce 2008, TA 1 2009 y Puán 2010 son los que tienen mayor porcentaje de explicación con las CP 1 y 2 (65,3, 54,5 y 54,0% respectivamente).

3.3.2. Comparación de análisis entre Modelos Mixtos y Modelos Espaciales

La ventaja de analizar los datos con modelos mixtos es la posibilidad de modelar las varianzas aún en aquellos casos en que no se cumpla con el supuesto de homocedasticidad, mientras que los modelos espaciales resultan adecuados en aquellos casos en que la variación ambiental intra-ensayo podría resultar alta debido al número de participantes. Con el fin de comparar los resultados, se analizó la relación entre de medias ajustadas por modelos mixtos y espaciales, eligiendo el modelo con Akaike Information Criterion (AIC) y coeficiente de variación más bajos, lo que supone un mejor ajuste de las medias, obteniéndose el mejor BLUP (Best Linear Unbiased Predictor).

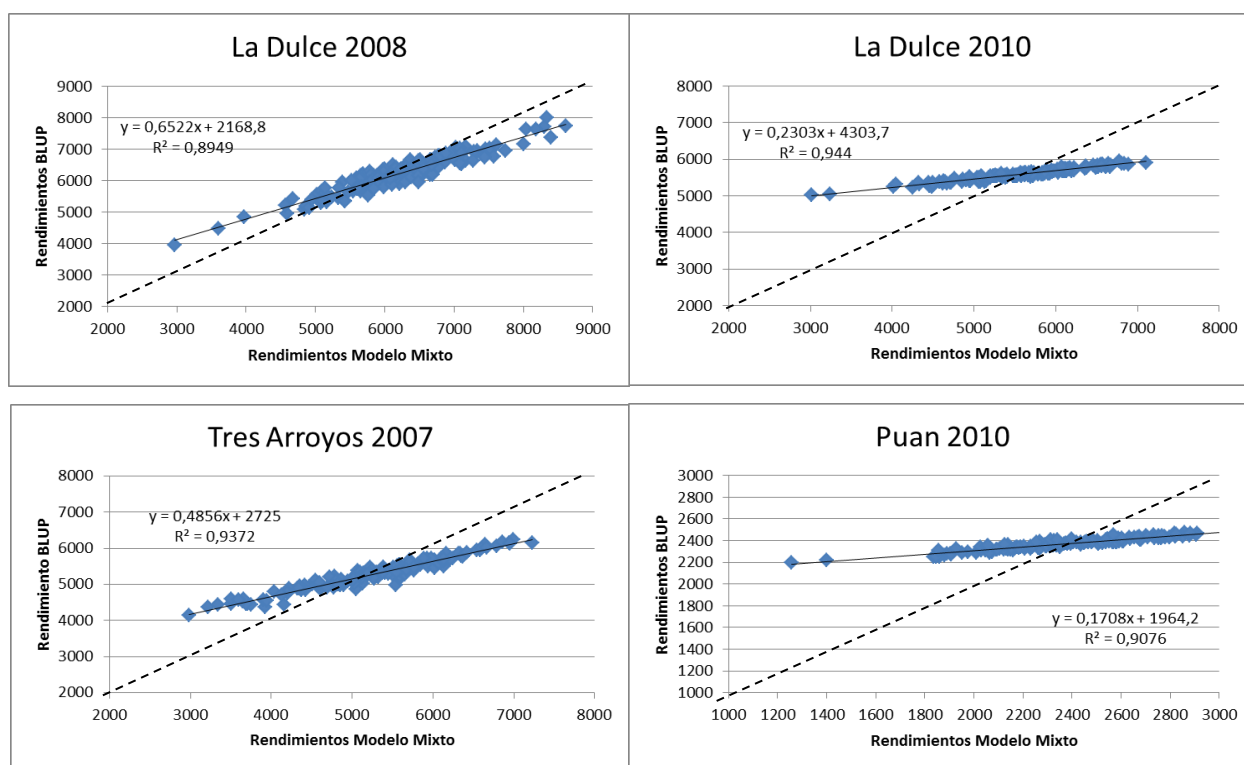
A modo de ejemplo, la Figura 3.3.2.1 relaciona las medias ajustadas por análisis de modelos mixtos (Infostat, potenciado por el software estadístico R), correspondiente al ambiente La Dulce 2008, con los modelos espaciales analizados por el software estadístico SAS (Versión 9.3 para Windows). Se realizaron los análisis con los modelos espaciales “Filas x Columnas (RxC)”, “Esférico”, “Exponencial”, “Power”, “Anisotrópico”, y “Matern”. En la tabla 3.3.5 se encuentra la comparación de los métodos por coeficiente de variación y AIC, incluyendo además el modelo general no espacial de DMS. Se observa la reducción del Coeficiente de Variación en todos los modelos espaciales, comparado con el análisis lineal. En este caso, los modelos RxC y

Exponencial tienen el menor AIC, de manera que se tomó el ajuste de rendimiento realizado por Rx C para verificar la relación con el método de modelos mixtos.

Tabla 3.3.5: Información de modelos espaciales para el ambiente La Dulce 2008

Metodología	Media del Modelo	Desvío Estándar del Modelo	Coefficiente de Variación del Modelo	AIC
Diferen Mín Significativa	6211,414474	892,9109444	14,37532382	
Fila x Column	6211,414474	556,265253	8,955532679	5009,984
Esférico	6211,414474	556,265	8,955528606	5011,984
Exponencial	6211,414474	556,2652544	8,955532701	5009,984
Power	6211,414129	554,3180348	8,924184144	5011,924
Anisotrópico	6211,412316	554,3600139	8,924862587	5011,925
Matern	6211,414474	556,2652544	8,955532701	5011,984

El ranking de genotipos entre ambos métodos es similar, aunque el valor de rendimiento ajustado por el modelo espacial (BLUP) es menor que el rendimiento ajustado por el modelo mixto. La figura 3.3.2.1 presenta algunos ejemplos con rendimientos potenciales diferentes.



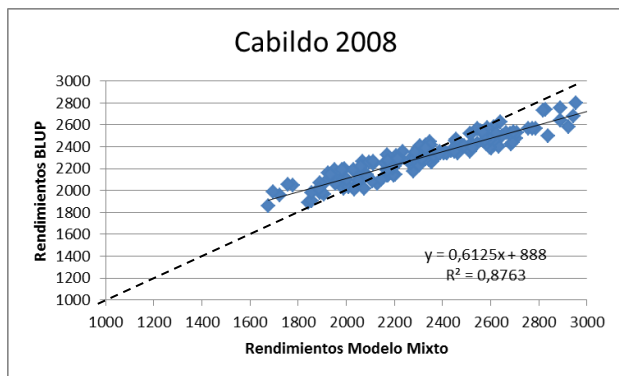


Figura 3.3.2.1 Relación entre rendimientos ajustados por MLGM y RxC. La Dulce 2008, Coeficiente de correlación: 0,946; La Dulce 2010, CC: 0,971; Tres Arroyos 2007, CC: 0,968; Puán 2010, CC: 0,952; Cabildo 2008, CC: 0,936. La línea discontinua señala la relación 1:1.

Con fines de mejoramiento, resultaría más conveniente analizar los datos por modelos lineales mixtos, ya que el rango de rendimientos de las medias corregidas por este método es mayor que con modelos espaciales (ejemplos más notables, La Dulce 2010, rango MGLM 3000-7000 kg/ha, RxC 5000-6000 kg/ha, Puán 2010, rango MGLM 1200-2900 kg/ha, RxC 2200-2500 kg/ha, Figura 3.3.2.1). La línea que indica la relación 1:1 muestra que en el rango de menores rendimientos los BLUPs sobreestiman en rendimiento con respecto al resultado por modelos mixtos, mientras que en el rango de mayores rendimiento se observa lo contrario, es decir, los BLUPs subestiman los valores de rendimiento.

3.3.3. Ensayos de rendimiento con y sin irrigación

Se realizaron dos ensayos de rendimiento y calibre en el mismo sitio experimental, Fort Collins, EEUU. A uno de los ensayos se aplicó riego adicional a las precipitaciones, sirviendo el otro como testigo en secano.

En las Figuras 3.3.3.1 a 3.3.3.4 se observa los potenciales de agua y las temperaturas en el suelo, a dos profundidades (17,7cm y 35,4cm) y en las dos situaciones (riego y secano). Las mediciones se registraron cada dos horas, totalizando 1135 registros en el período 23 de mayo al 26 de agosto de 2013.

Durante el ciclo del cultivo, las precipitaciones caídas totalizaron 124,7mm. Previo a la siembra, el agua acumulada en el perfil por lluvias y nieve fue de 260,8mm.

Cuando los potenciales de agua pasaron de valores negativos a cero Kilo Pascales (KPa), se debió a la ocurrencia de lluvias. Entre los registros 553 y 576 se produjo un aumento positivo de potencial agua debido a precipitaciones entre los días 5 y 7 de julio. A partir de ese momento comenzó a aplicarse riego solamente en el ensayo sin estrés, dejando sin regar el ensayo restante.

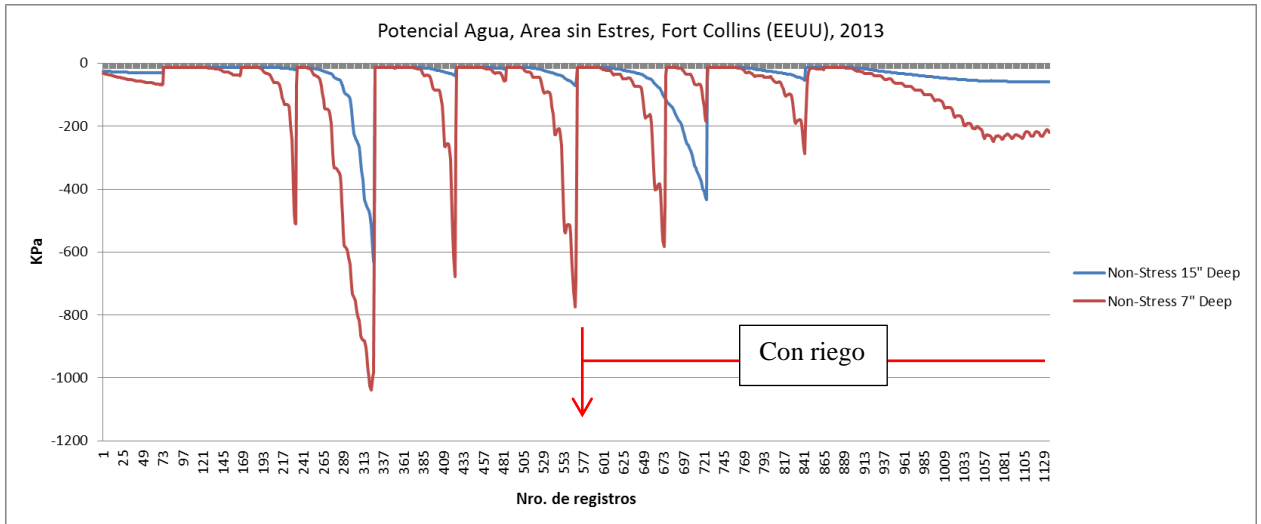


Figura 3.3.3.1: Potencial agua medido en el ensayo irrigado en dos profundidades (17,7cm y 35,4cm.) durante el ciclo del cultivo de cebada, desde el 23/5 al 26/8/2013.

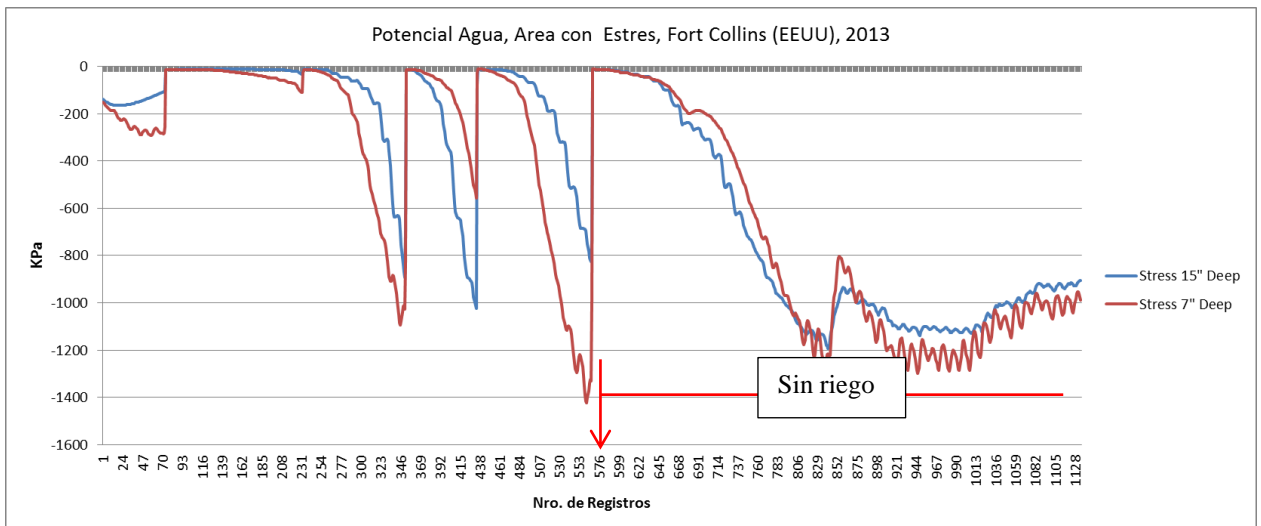


Figura 3.3.3.2: Potencial agua medido en el ensayo no irrigado en dos profundidades (17,7cm y 35,4 cm) durante el ciclo del cultivo de cebada, desde el 23/5 al 26/8/2013.

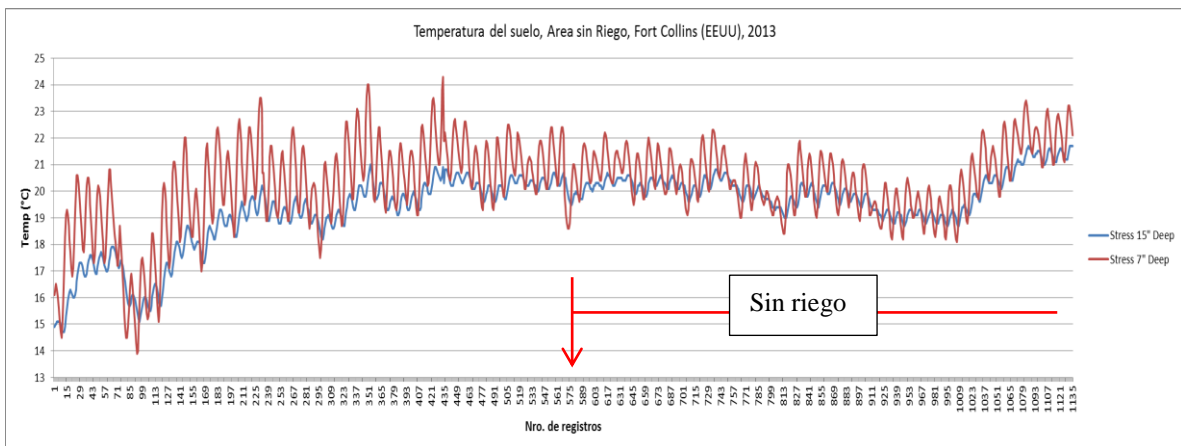


Figura 3.3.3.3. Temperatura del suelo (°C), sector no irrigado, a profundidades de 7'' y 15''

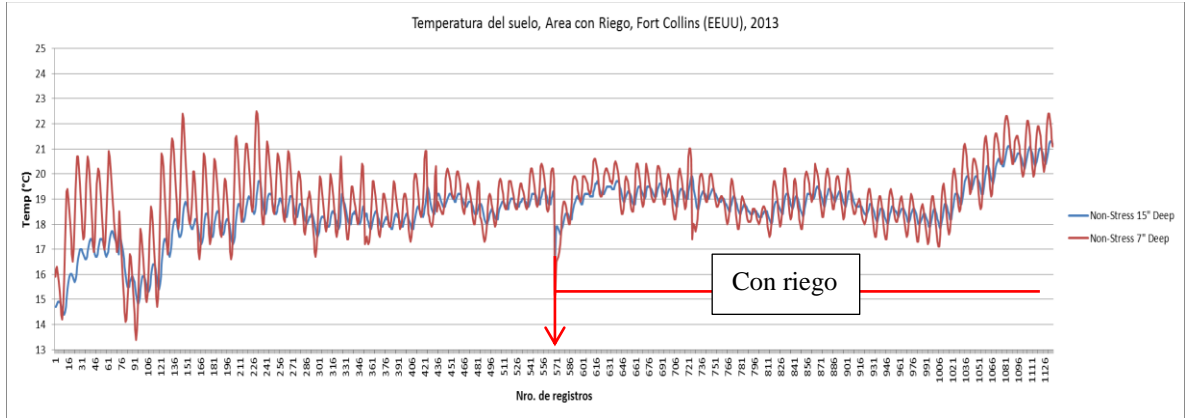


Figura 3.3.3.4. Temperatura del suelo (°C), sector irrigado, a profundidades de 7'' y 15''

Las distribuciones de frecuencia de los rendimientos obtenidos en cada ambiente, se observan en la Figura 3.3.3.5.

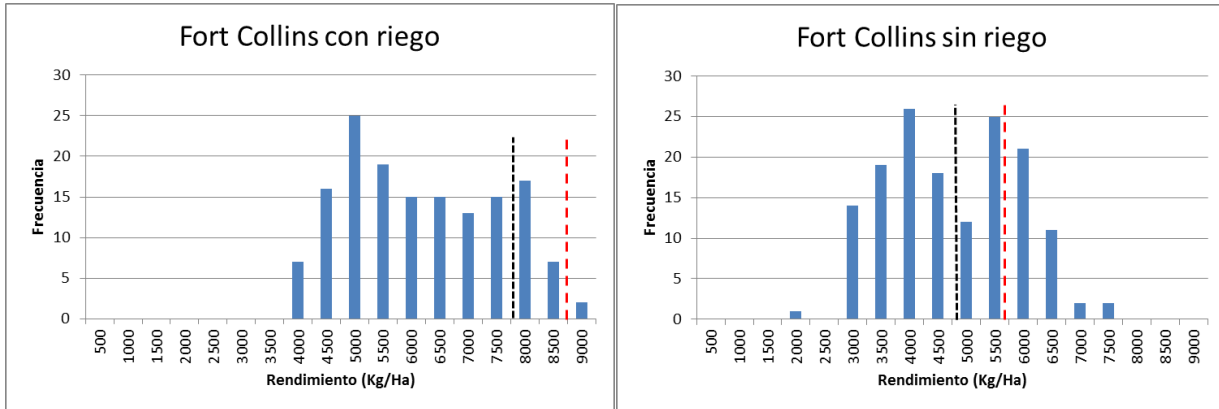


Figura 3.3.3.5: Distribuciones de frecuencias de rendimientos de líneas en ensayos con riego y sin riego adicional. Línea punteada roja: cv. Aspen, línea punteada negra: Mut 6519

Con el fin de verificar si existió relación entre los rendimientos obtenidos en el ensayo irrigado y no irrigado con cada uno de los ensayos realizados en Argentina, se calcularon los coeficientes de correlación y su significación estadística, obteniéndose los resultados detallados en la Tabla 3.3.3.1.

Tabla 3.3.6: Coeficientes de correlación y probabilidades entre los ensayos de Argentina con los ensayos irrigado y no irrigado de Fort Collins, EEUU. Se ordenaron los sitios de mayor a menor rendimiento promedio.

Identificación	Ambiente	IRRIGADO		NO IRRIGADO	
		r	p	r	p
	NO IRRIGADO	0,892	< 0,001		
A1	La Dulce 2008	-0,009	0,915	-0,006	0,939
A2	La Dulce 2010	0,090	0,271	0,106	0,194
A3	TA 2007	0,076	0,357	0,117	0,154
A4	TA 1 2008	-0,124	0,127	-0,063	0,439
B1	TA 2 2010	0,244	0,002	0,224	0,006
B2	TA 1 2010	0,278	0,001	0,253	0,002
B3	La Dulce 2009	-0,080	0,326	-0,044	0,59
B4	TA 2 2008	-0,045	0,579	0,012	0,886
C1	TA 1 2009	0,021	0,794	0,053	0,519
C2	Puan 2011	0,169	0,037	0,275	0,001
C3	Puan 2008	-0,195	0,016	-0,118	0,148
C4	TA 2 2009	0,050	0,538	0,135	0,097
D1	Puan 2010	0,021	0,799	0,055	0,503
D2	Cabildo 2008	-0,191	0,018	-0,165	0,043
D3	Cabildo 2010	0,255	0,002	-0,080	0,325
D4	Puan 2009	-0,149	0,067	0,299	0,000

En el mismo sitio experimental, con la sola diferencia de la aplicación de riego, el coeficiente de correlación fue muy alto (0,892). La regresión entre los rendimientos del ensayo irrigado y no irrigado fue de 0,80 ($F=581,14$, $p<0,0001$, Figura 3.2.3.6).

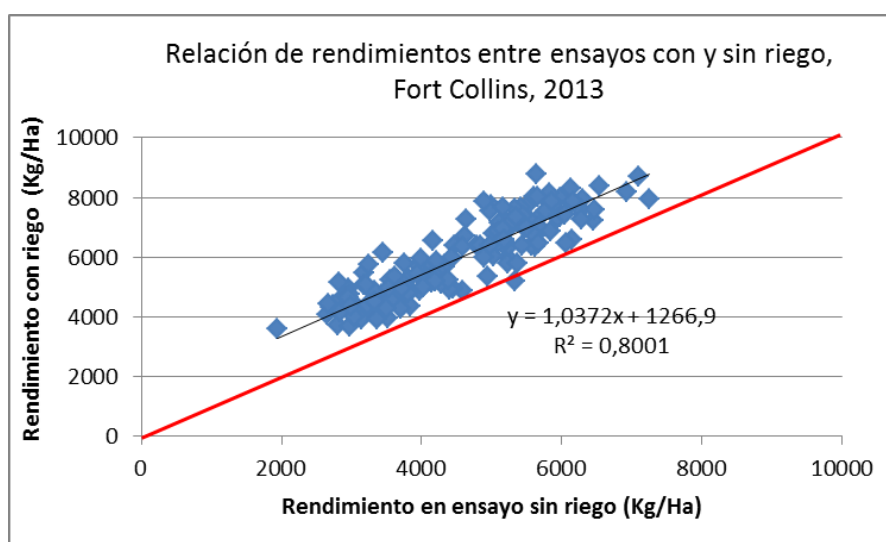


Figura 3.3.3.6: Regresión entre rendimientos en ensayo irrigado y no irrigado. La línea roja indica la relación 1:1.

El DH 3 fue la única línea que tuvo un rendimiento mayor (aunque estadísticamente no significativo) en el ensayo sin riego con respecto al irrigado (5329 vs. 5209 Kg/Ha). El resto de

las líneas quedaron por encima de la línea que indica la relación 1:1 en la Figura 3.3.3.6, es decir, con rendimientos mayores en el ensayo con riego.

Con respecto a la relación con los otros sitios, en general las correlaciones fueron bajas, con un máximo de $r=0,299$ ($p=0,000$) para el ensayo Puán 2009 con FC no irrigado, hasta un mínimo de $r=-0,006$ ($p=0,939$) para el ensayo La Dulce 2008 con FC no irrigado.

Una vez más se observaron las bajas relaciones entre ambientes, aun tomando conjuntos de datos procedentes de situaciones de mayor y menor disponibilidad hídrica. En este caso, los rendimientos del ensayo no irrigado podrían correlacionarse positivamente con los rendimientos obtenidos en ambientes de sequía terminal (Puán y Cabildo 2008, por ejemplo). Sin embargo, dichas correlaciones tuvieron valores $r=-0,118$ y $-0,165$, respectivamente.

En el análisis de componentes principales de rendimiento realizado precedentemente, se agregaron los datos de los ensayos irrigado y no irrigado, observándose el pequeño ángulo que forman los vectores, lo que confirma la alta correlación de resultados entre ellos (Figura 3.3.3.7).

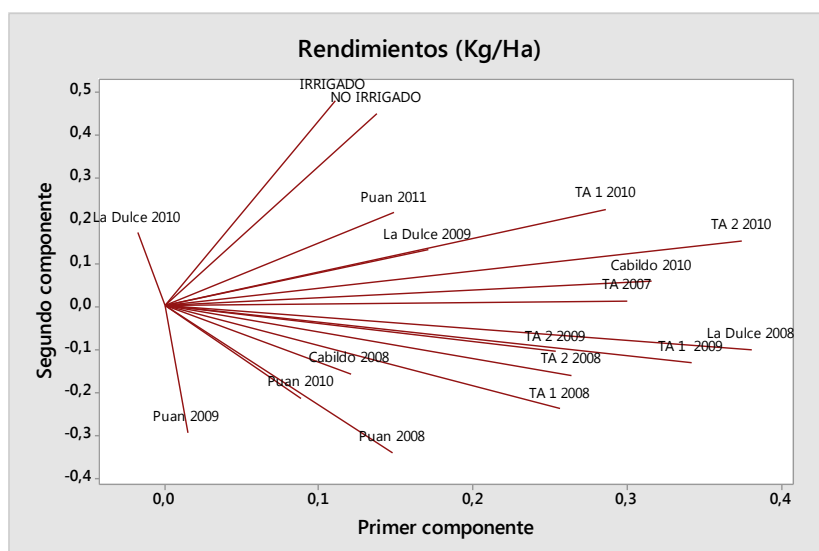


Figura 3.3.3.7.: H-plot incluyendo los datos del ensayo “Irrigado-No Irrigado” con los ambientes de Argentina.

3.4. Tamaño de los granos

Se relacionaron las fracciones de los granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm (tamaño de los granos o “calibre” llamado así industrialmente) de las líneas parentales Mut 6519 y Aspen en función de los calibres promedio de cada sitio (Figura 3.4.1). En ambientes con valores de 80% de calibre promedio o mayores no existieron diferencias importantes entre los dos genotipos (a excepción de Tres Arroyos 2007, ver Tabla 3.4.1), mientras que a menores calidades ambientales en términos de valores de calibre, la línea Mut 6519 expresó un mayor tamaño de grano en comparación con la variedad Aspen.

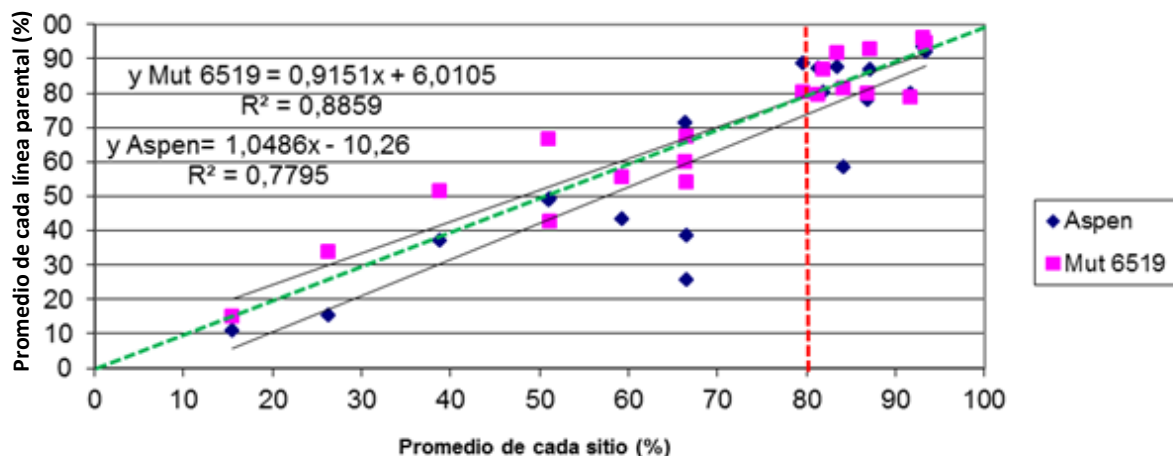
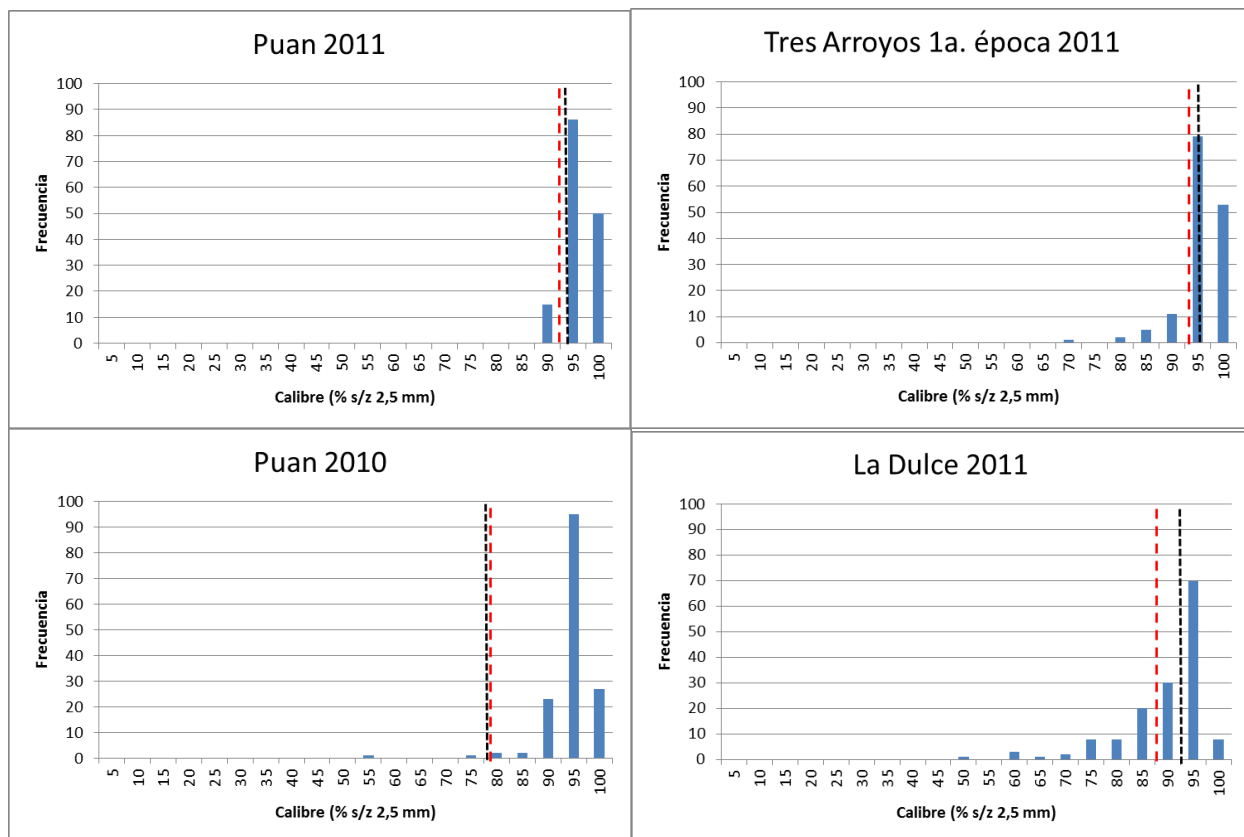
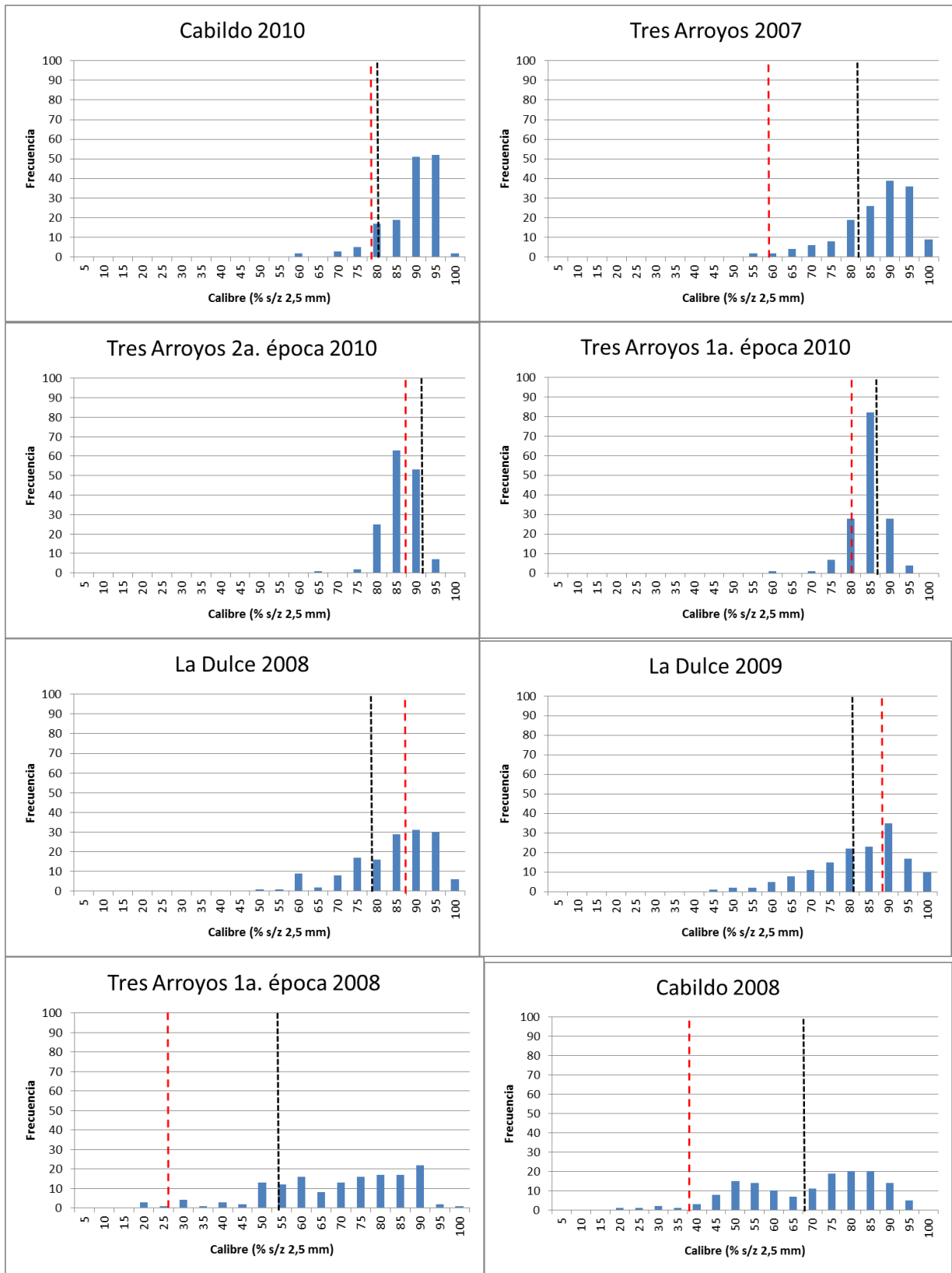


Figura 3.4.1. Relación entre los calibres (porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm) promedio de las líneas parentales y los calibres promedio en cada sitio experimental. La línea discontinua verde indica la relación 1:1. La línea discontinua roja señala el valor de 80%.

Los calibres promedio de las 150 líneas doble haploide y los dos padres, y las distribuciones de frecuencia en cada sitio experimental se observan en la Figura 3.4.2. El orden de los ensayos corresponde a los promedios de calibre, ordenados de mayor (Puán 2011) a menor (Puán 2009).





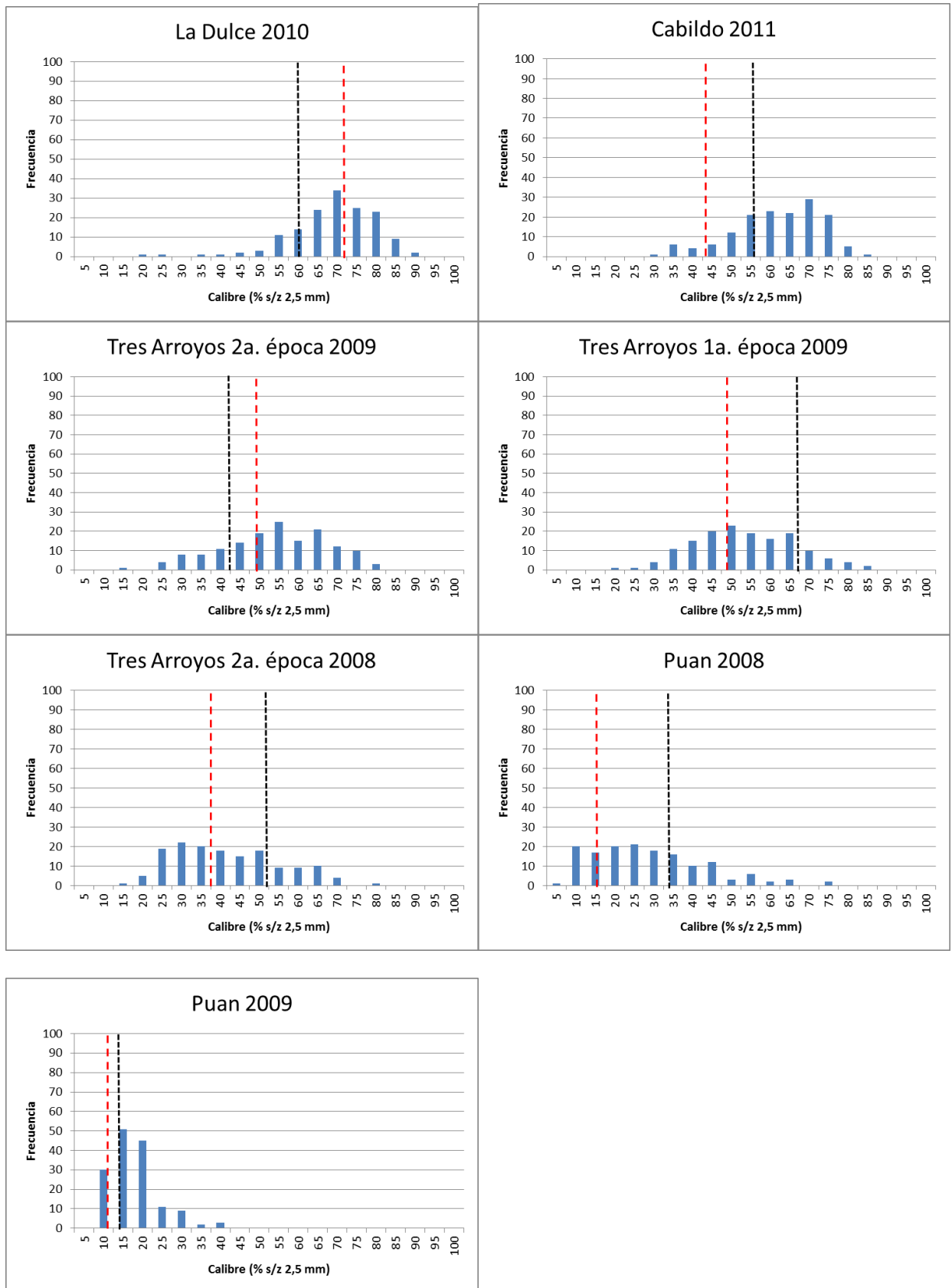


Figura 3.4.2: Distribución de frecuencias de los calibres (porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm) en cada sitio experimental. Línea roja: cv. Aspen, Línea negra: línea Mut 6519.

Los promedios de calibre de cada sitio, normalidad por prueba de Shapiro-Wilks y la significancia del Análisis de Varianza basado en modelos mixtos, se observan en la Tabla 3.4.1.

Tabla 3.4.1: Promedios de calibre (%) en cada ambiente, normalidad y significancia del ANOVA. Cabildo 2010 basado en una repetición.

Sitio	Promedio DH (% s/z 2,5 mm)	p Normalidad	p ANOVA	Mut 6519	Aspen	Media padres
Puán 2011	93,48	<0,0001	0,1069	94,65	92,05	93,35
TA 1 2011	93,09	<0,0001	<0,0001	95,88	93,38	94,63
Puán 2010	91,96	<0,0001	<0,0001	78,74	79,74	79,24
La Dulce 2011	87,09	<0,0001	<0,0001	92,89	86,89	89,89
Cabildo 2010	86,96	<0,0001	n/a	80,00	78,00	79,00
TA 2007	84,35	<0,0001	<0,0001	81,47	58,47	69,97
TA 2 2010	83,41	<0,0001	<0,0001	91,58	87,58	89,58
TA 1 2010	81,94	<0,0001	<0,0001	86,86	80,36	83,61
La Dulce 2008	81,30	<0,0001	0,3245	79,38	87,38	83,38
La Dulce 2009	79,64	<0,0001	<0,0001	80,3	88,8	84,55
TA 1 2008	66,88	<0,0001	<0,0001	54,17	25,67	39,92
Cabildo 2008	66,68	<0,0001	<0,0001	67,38	38,38	52,88
La Dulce 2010	66,44	<0,0001	<0,0001	59,96	71,46	65,71
Cabildo 2011	59,40	<0,0001	<0,0001	55,45	43,45	49,45
TA 2 2009	51,27	0,0500	<0,0001	42,62	49,12	45,87
TA 1 2009	50,93	0,0366	<0,0001	66,52	49,02	57,77
TA 2 2008	38,78	<0,0001	<0,0001	51,56	37,06	44,31
Puán 2008	26,28	<0,0001	<0,0001	33,8	15,3	24,55
Puán 2009	15,46	<0,0001	<0,0001	14,81	10,81	12,81

Tabla 3.4.2 Significado de los factores del ANOVA por localidad para el carácter calibre: gl grados de libertad

Localidad	gl	Genotipo	gl	Año	gl	Interacción GxA
TresArroyos	151	7,75***	5	1394,1***	775	2,06***
La Dulce	151	2,09***	3	29,7***	302	1,26**
Puán	151	6,05***	3	13785,3***	453	3,22 ***

El calibre del grano varió extensamente entre localidades y entre y entre fechas de siembra en la misma localidad (TA). Hubo una influencia apreciable del padre Mut 6519 en la descendencia de DH en 2008, no así en 2009. La población de DH superó a los parentales en el ambiente más pobre (Cabildo) nuevamente demostrando la validez del objetivo del cruzamiento (Figura 3.4.3).

De la misma forma que para rendimiento, se determinaron los coeficientes de correlación entre los calibres unitarios de cada sitio experimental. Se observaron algunos pares de ambientes con un buen nivel de asociación en sentido práctico, como Tres Arroyos 2 con Cabildo y Puán del año 2008 ($r=0,70$ y $0,81$ respectivamente), Puán y Cabildo 2008 ($r=0,77$) (Tabla 7.2 de Anexo)

Posteriormente, se ordenaron de mayor a menor los promedios de calibre y se dividieron los datos por cuartiles (Tabla 3.4.3) realizando comparaciones entre grupos.

Tabla 3.4.3: Análisis por cuartiles de los calibres promedio de cada ambiente

AMBIENTE	CALIBRE	IDENTIFICACION
Puan 2011	93,5	A1
TA 1 2011	93,1	A2
Puan 2010	91,8	A3
La Dulce 2011	87,1	A4
Cabildo 2010	86,9	A5
TA 2007	84,2	B1
TA 2 2010	83,5	B2
TA 1 2010	82,0	B3
La Dulce 2008	81,3	B4
La Dulce 2009	79,7	B5
TA 1 2008	66,5	C1
Cabildo 2008	66,5	C2
La Dulce 2010	66,4	C3
Cabildo 2011	59,3	C4
TA 2 2009	51,2	D1
TA 1 2009	51,0	D2
TA 2 2008	38,9	D3
Puan 2008	26,3	D4
Puan 2009	15,4	D5

Teniendo en cuenta la importancia del tamaño de los granos en la calidad comercial, y el problema conocido de la producción de bajos calibres en condiciones de sequía y altas temperaturas, la siguiente tabla de correlaciones se concentra en las asociaciones entre ambientes del cuartil más bajo.

Tabla 3.4.4: Coeficientes de correlaciones de Pearson (bajo diagonal) y probabilidades asociadas (sobre diagonal) entre ambientes dentro del 4to. Cuartil

	TA 2 2009 (D1)	TA 1 2009 (D2)	TA 2 2008 (D3)	Puán 2008 (D4)	Puán 2009 (D5)
TA 2 2009 (D1)	---	0,000	0,000	0,000	0,000
TA 1 2009 (D2)	0,52	---	0,000	0,000	0,000
TA 2 2008 (D3)	0,52	0,40	---	0,000	0,000
Puán 2008 (D4)	0,60	0,39	0,82	---	0,000
Puán 2009 (D5)	0,46	0,36	0,34	0,32	---

Todas las correlaciones dentro del cuartil de menor calibre fueron altamente significativas, con pares de ambientes en los que se existió una fuerte relación (Puán 2008 con TA 2 2008, por ejemplo).

3.4.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)

El ACP se basó en la distancia euclídea entre individuos doble haploides con sitios como variable. La primera y segunda componentes explicaron el 46,8% de la variación total. Las componentes CP 1 y CP 2 tuvieron porcentajes de reconstrucción entre 1% y 74,9%, mientras que la CP 3 tuvo porcentajes mucho más bajos, entre 2% y 23,2%. Para la CP1 el ambiente Tres Arroyos 2 2008 fue el de mayor contribución en la explicación de la variación (68,2%) mientras que la CP2 estuvo más asociada con Tres Arroyos 2 2010 (55,1%). La distribución de los

ambientes con relación a los ejes 1 y 2 mostró, por ejemplo, una alta correlación positiva entre Tres Arroyos 2 y Puán 2008, Puán 2010 y Cabildo 2011, una correlación media y positiva entre Tres Arroyos 2011 y La Dulce 2008 , y ausencia de correlación entre Tres Arroyos 2 2010 y La Dulce 2008 (Figura 3.4.1.1.).

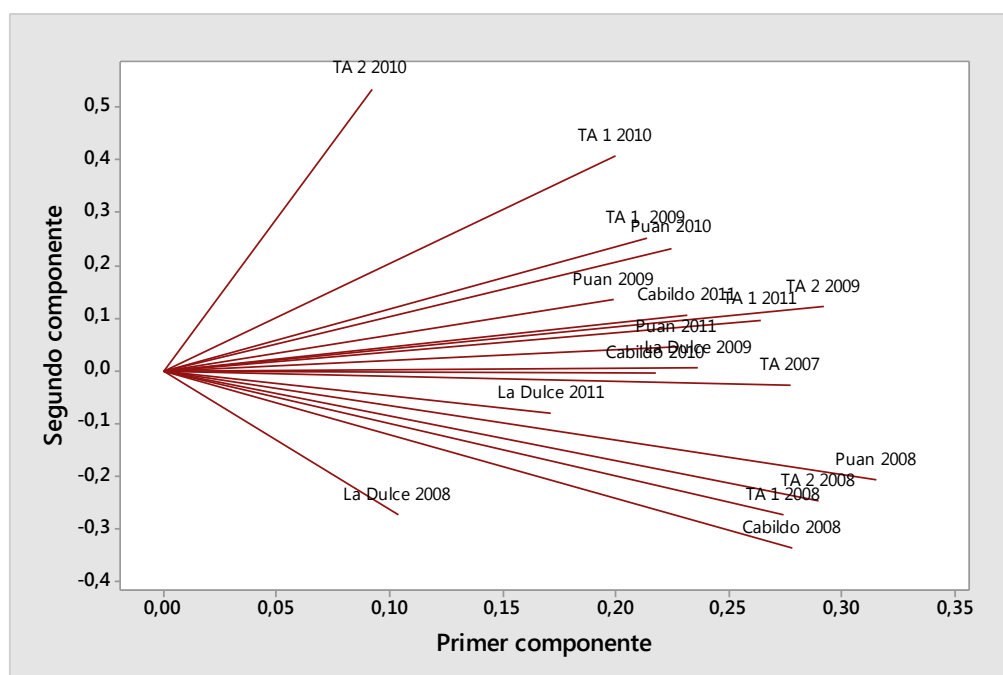


Figura 3.4.1.1: Gráfico biplot para calibre (porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm). Componentes 1 y 2.

El ambiente La Dulce 2010 estuvo representado por un vector de corta longitud y de dirección opuesta al resto de los vectores. El biplot que muestra las componentes 1 y 3 no cambió la posición de La Dulce 2010 y en el análisis de las componentes 2 y 3, dicho ambiente no apareció. La reconstrucción de LD 2010 por las tres componentes fue sólo del 2,5% (Figuras 3.4.1.1 y 3.4.1.2).

3.4.2. Comparación de análisis entre Modelos Mixtos y Modelos Espaciales

Se compararon los resultados de calibre y la relación entre medias ajustadas por modelos mixtos y espaciales, eligiendo también el modelo con criterio de información de Akaike (AIC) y coeficientes de variación (CV) más bajos.

Se realizaron los análisis de todos los ensayos con todos los modelos espaciales. En la tabla 3.4.5 se encuentra la comparación de los métodos por coeficiente de variación y AIC, incluyendo además el modelo general no espacial de diferencia mínima significativa para el ensayo Puán 2010. Se observa la reducción del CV en todos los modelos espaciales, comparado con el análisis lineal. En este caso, los modelos Fila x Columna (FxC) y Matern tienen el menor AIC, y el método FxC el menor CV, de manera que se tomó como ejemplo el ajuste de calibre realizado por FxC para verificar la relación con el método de modelos lineales generales mixtos (MLGM).

En todos los casos, el valor de mejor predictor lineal insesgado (BLUP) obtenido por modelos espaciales se comparó con la media ajustada por modelos mixtos. Como lo observado para rendimiento, el ranking de genotipos entre ambos métodos fue similar, aunque los valores de calibre ajustados por el modelo espacial (BLUP) fueron menores que los calibres ajustados por el modelo mixto en el rango de calibres más altos, y mayores en el rango de calibres más bajos.

Tabla 3.4.5: Información de modelos espaciales para el ambiente Puán 2010

Metodología	Media del Modelo	Error Estándar del Modelo	Coefficiente de Variación del Modelo	AIC
Diferen Mín Significativa	91,83881579	4,701688827	5,119500711	
Fila x Columna	91,83881579	3,55550836	3,871465816	1761,132
Esférico	91,83881579	3,55550834	3,871465796	1763,132
Exponencial	91,83859476	3,561800085	3,878325985	1763,064
Power	91,83859478	3,561799465	3,878325309	1763,064
Anisotrópico	91,84057598	3,62997551	3,952474678	1763,593
Matern	91,86191578	3,559113761	3,874417087	1760,680

En la figura 3.4.2.1 se observan las relaciones entre ambos sistemas. Se tomaron como ejemplos el ambiente de mayor calibre promedio (Puán 2011) y el ambiente de menor calibre (Puán 2009) comprobándose en ambos grupos la misma tendencia, es decir, menor pendiente en los datos ajustados por el modelo espacial, al igual que lo sucedido para rendimiento.

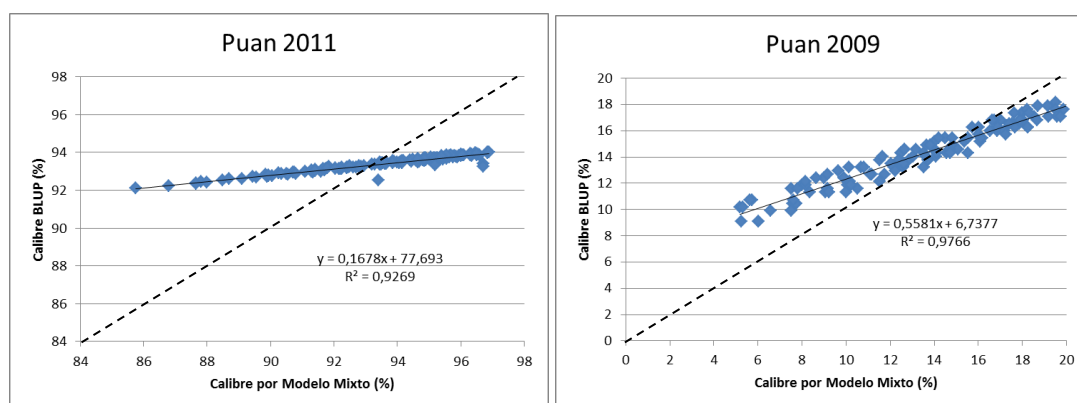


Figura 3.4.2.1. Relación entre calibres (porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm) ajustados por MLGM y FxC, en Puán 2011 (coeficiente de correlación 0,962) y Puán 2009 (coeficiente de correlación 0,988)

3.4.3 Ensayos con y sin irrigación

Complementando los resultados de estos ensayos presentados para rendimiento, la figura 3.4.3.1 corresponde a los histogramas de la variable calibre en el ambiente irrigado y no irrigado del ensayo realizado en Fort Collins, EEUU.

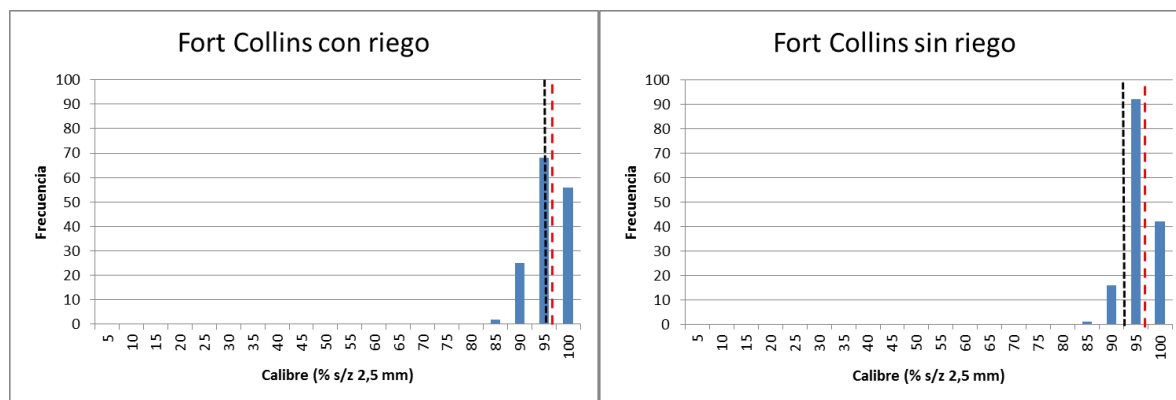


Figura 3.4.3.1.: Distribución de frecuencias de calibre (porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm) de líneas en ensayo irrigado y no irrigado. Línea llena: cv. Aspen, línea punteada: Mut 6519

Con el fin de verificar si existió relación entre los calibres obtenidos en el ensayo irrigado y no irrigado con cada uno de los ensayos realizados en Argentina se calcularon los coeficientes de correlación y su significancia estadística, obteniéndose los resultados detallados en la Tabla 3.4.6.

Tabla 3.4.6: Coeficientes de correlación y probabilidades entre los ensayos de Argentina con los ensayos irrigado y no irrigado de Fort Collins, EEUU. Se ordenaron los sitios de mayor a menor calibre promedio.

Identificación	Ambiente	IRRIGADO		NO IRRIGADO	
		r	p	r	p
	NO IRRIGADO	0,6759	0,000	--	--
A1	Puan 2011	-0,1746	0,031	-0,051	0,529
A2	TA 1 2011	-0,1720	0,034	-0,072	0,379
A3	Puan 2010	-0,2613	0,001	-0,122	0,134
A4	La Dulce 2011	-0,1288	0,114	-0,126	0,122
A5	Cabildo 2010	-0,2080	0,010	-0,086	0,289
B1	TA 2007	-0,0801	0,327	-0,031	0,702
B2	TA 2 2010	0,1045	0,200	0,146	0,073
B3	TA 1 2010	0,0912	0,264	0,153	0,061
B4	La Dulce 2008	-0,0694	0,397	-0,043	0,599
B5	La Dulce 2009	-0,0385	0,638	-0,031	0,702
C1	TA 1 2008	-0,2772	0,001	-0,170	0,037
C2	Cabildo 2008	-0,0616	0,451	-0,018	0,827
C3	La Dulce 2010	0,2046	0,011	0,121	0,136
C4	Cabildo 2011	-0,1997	0,014	-0,100	0,220
D1	TA 2 2009	-0,1556	0,056	-0,068	0,406
D2	TA 1 2009	-0,1376	0,091	-0,046	0,576
D3	TA 2 2008	-0,1575	0,053	-0,112	0,171
D4	Puan 2008	-0,0493	0,546	0,020	0,808
D5	Puan 2009	-0,1032	0,206	-0,060	0,460

En el mismo sitio experimental, con la única diferencia de la aplicación de riego, el coeficiente de correlación fue alto (0,673). La regresión entre los rendimientos del ensayo irrigado y no irrigado fue altamente significativa ($R^2 = 0,453$ $F=126,19$ $p<0,0001$, Figura 3.4.3.2).

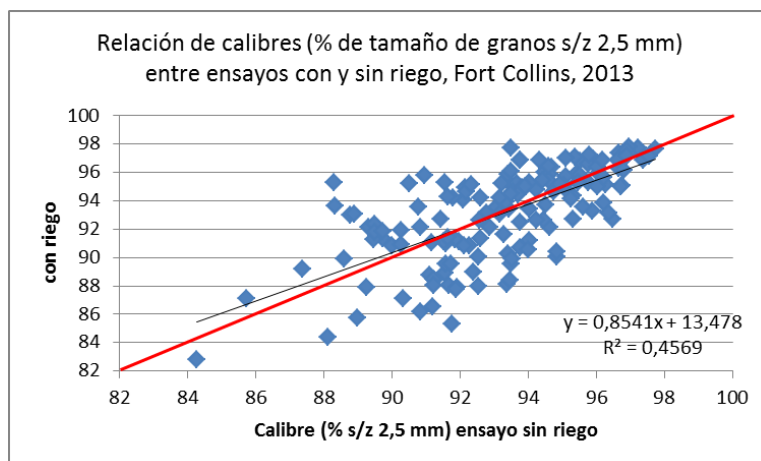


Figura 3.4.3.2: Regresión entre calibres (porcentaje de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm) en ensayo irrigado y no irrigado. La línea roja indica la relación 1:1 y la línea punteada el ajuste de regresión lineal.

Con respecto a la relación con los otros sitios, en general las correlaciones fueron bajas, con un máximo de $r = 0,277$ ($p=0,000$) para el ensayo Tres Arroyos 1 2008 con ensayo FC irrigado, hasta un mínimo de $r = 0,02$ ($p=0,808$) para el ensayo Puán 2008 con ensayo FC no irrigado.

Se obtuvieron bajas relaciones entre ambientes, incluso tomando conjuntos de datos procedentes de situaciones de mayor y menor disponibilidad hídrica. En este caso, los calibres del ensayo no irrigado podrían correlacionarse positivamente con los calibres obtenidos en ambientes de sequía terminal (Puán 2008 y 2009, por ejemplo). Sin embargo, dichas correlaciones tuvieron valores $r = 0,020$ y $-0,060$, respectivamente.

Con el fin de observar la relación entre los ensayos de Fort Collins con los ambientes de Argentina, se realizó un gráfico H-plot con los dos primeros componentes principales (Figura 3.4.3.3). Los vectores de ambos ensayos tuvieron una posición divergente respecto de la mayoría de los ambientes. Comparando los ángulos que forman los vectores de los ensayos irrigado y no irrigado para rendimiento y calibre, para este último el ángulo es mayor que para rendimiento, confirmando una menor correlación entre los genotipos, como se estableció en la Figura 3.4.3.2.

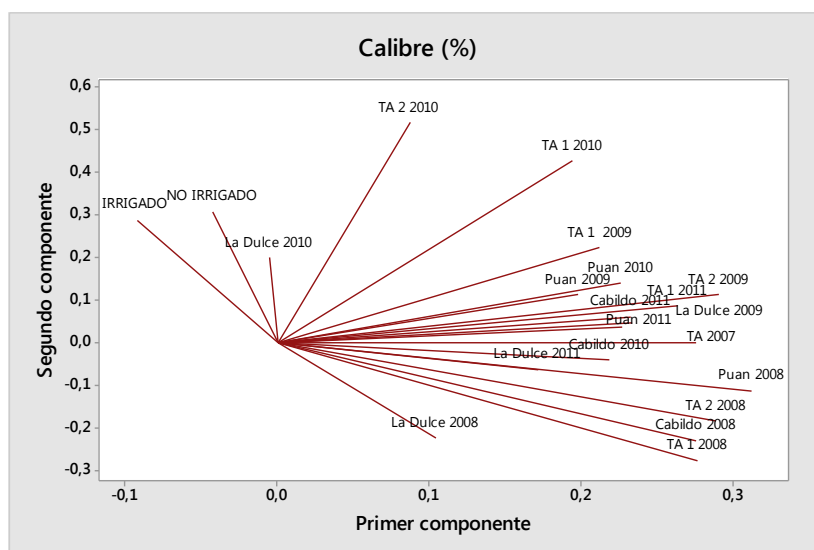


Figura 3.4.3.3: H-plot incluyendo los datos del ensayo “Irrigado-No Irrigado” al análisis de componentes principales

3.5 Temperatura de canopeo (TC)

Se realizaron nueve mediciones de TC con termómetro infrarrojo en diferentes ensayos con combinaciones de sitio/año. La mayor temperatura del aire registrada fue en Puan 2da. medición 2008 (31,6 °C), y la menor en La Dulce 2007 (19,3 °C), dando diferencias de TC-TA entre los DH de mayor y menor TC de 1,9 °C en La Dulce (ensayo con muy buena disponibilidad de agua en el suelo), y de 6,2°C entre los DH extremos en Puan 2008 (suelo con déficit hídrico severo y mayor temperatura del aire).

El promedio de TC en La Dulce 2007 fue 14,67 °C, lo que da una depresión de temperatura de canopeo con la TA de 4,63 °C. En Puan 2da. medición 2008, el promedio de TC de todos los genotipos fue de 30,57 °C, marcando una diferencia con la TA de 1,03 °C. En este último caso, hubo 31 DHs con TC que superó la TA. En este ambiente, con condiciones muy adversas, el promedio de calibre sobre zaranda 2,5mm fue 30% en los 31 DHs con TC mayores que TA, mientras que el promedio de los 121 restantes DHs (TC < TA) fue 25%.

Se estudió la relación que existe entre mediciones tomadas en diferentes momentos del ciclo. La figura 3.5.1 muestra un ejemplo en el que se graficaron los registros de TC en dos momentos del período de llenado de los granos (Z 73 y Z 83 del cv. Aspen, representados como Puan 1 y Puan 2, en un ambiente con fuerte déficit de agua (Puán 2008).

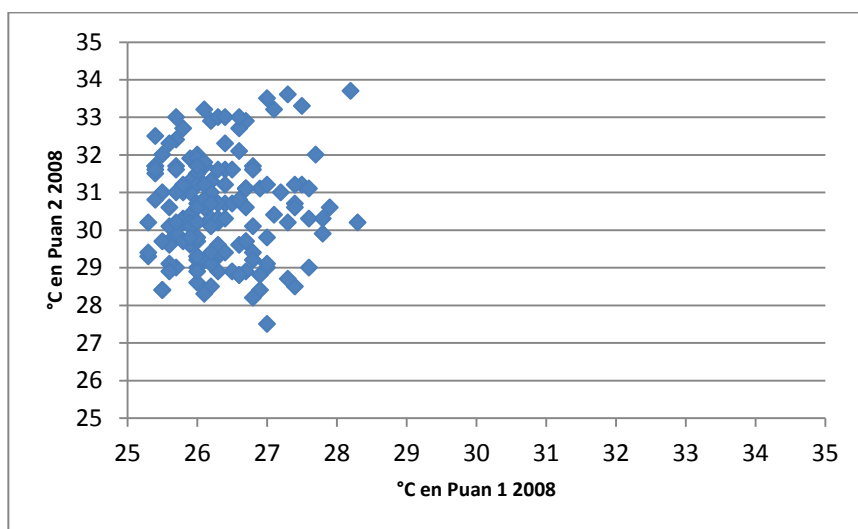


Figura 3.5.1: Mediciones de temperatura de canopeo tomadas en dos momentos (1 y 2) del período de llenado de los granos (Z 73 –Puan 1- y Z 83 -Puan 2- del cv. Aspen), Puán 2008

Se halló falta de correlación entre una medición y otra, motivada probablemente por demandas atmosféricas diferentes en los momentos de las determinaciones. La falta de correlación entre mediciones en situaciones con y sin déficit de agua fue comprobada en todos los ensayos realizados. En la primera medición, el valor promedio de la TC de los 152 genotipos fue 26,33°C, mientras que el promedio de la segunda medición fue 30,57°C. Entre una medición y otra no se produjeron precipitaciones.

Las tablas 3.5.1, 3.5.2 y 3.5.3 corresponden a la temperaturas de canopeo tomadas en los estados Z73 y Z83 del cultivar Aspen (recordar que existen diferencias de ciclo en la población de 150 DHs + líneas parentales), y a las diferencias de temperatura entre dichos estados fenológicos. Por simplicidad, se muestran solamente los 15 primeros genotipos (10% de la población)

Tabla 3.5.1. Genotipos ordenados por temperatura de canopeo (°C) tomadas en el estado Z73 del cultivar Aspen. Se muestran los primeros 15 datos (temperaturas más bajas)

DH	Puan 2008 (1) TC (°C)	Puan 2008 (2) TC (°C)	Dif TC (°C) 2 - 1
DH60	25,3	29,3	4
DH85	25,3	30,2	4,9
DH91	25,3	29,4	4,1
DH5	25,4	31,7	6,3
DH63	25,4	31,7	6,3
DH81	25,4	31,5	6,1
DH82	25,4	31,6	6,2
DH102	25,4	30,8	5,4
DH148	25,4	32,5	7,1
DH40	25,5	28,4	2,9
DH54	25,5	28,4	2,9
DH61	25,5	32	6,5
DH62	25,5	31	5,5
DH64	25,5	29,7	4,2
DH7	25,6	30,6	5

Tabla 3.5.2. Genotipos ordenados por menor temperatura de canopeo (°C) tomadas en el estado Z83 del cultivar Aspen. Se muestran los primeros 15 datos (temperaturas más bajas)

DH	Puan 2008 (1) TC (°C)	Puan 2008 (2) TC (°C)	Dif TC (°C) 2 - 1
DH123	27	27,5	0,5
DH34	26,8	28,2	1,4
DH90	26,1	28,3	2,2
DH40	25,5	28,4	2,9
DH54	25,5	28,4	2,9
DH22	26,9	28,4	1,5
DH33	26,2	28,5	2,3
DH132	27,4	28,5	1,1
DH28	26	28,6	2,6
DH135	27,3	28,7	1,4
DH35	26,6	28,8	2,2
Mut6519	26,6	28,8	2,2
DH18	26,9	28,8	1,9
DH48	25,6	28,9	3,3
DH67	26	28,9	2,9

Tabla 3.5.3. Genotipos ordenados por menor diferencias de temperatura de canopeo (°C) tomadas en los estados Z73 y Z83 del cultivar Aspen. Se muestran los primeros 15 datos (menores diferencias)

DH	Puan 2008 (1) TC (°C)	Puan 2008 (2) TC (°C)	Dif TC (°C) 2 - 1
DH123	27	27,5	0,5
DH132	27,4	28,5	1,1
DH34	26,8	28,2	1,4
DH135	27,3	28,7	1,4
DH134	27,6	29	1,4
DH22	26,9	28,4	1,5
DH128	28,3	30,2	1,9
DH18	26,9	28,8	1,9
DH17	27	29	2
DH130	27,8	29,9	2,1
DH38	27	29,1	2,1
DH90	26,1	28,3	2,2
DH35	26,6	28,8	2,2
Mut6519	26,6	28,8	2,2
DH111	26,7	28,9	2,2

De las tablas 3.5.1 y 3.5.2 surge que solamente los DHs 40 y 54 coincidieron como temperaturas más bajas en ambas mediciones. Estas líneas tuvieron mayores diferencias entre una y otra medición porque en la primera tuvieron mediciones bajas y en la segunda, si bien las diferencias entre una y otra fueron de 2,9°C, estuvieron muy por debajo del promedio de la población (30,57 °C). Por tal motivo, el gráfico de ranking resultó conveniente para seleccionar por bajas temperaturas de canopeo en ambas mediciones de un mismo sitio (como en este caso), como entre ensayos diferentes.

En la figura 3.5.2, se indicó el límite del cuartil de temperaturas más bajas (38 DHs para cada medición), resultando ocho genotipos con las combinaciones más bajas (Tabla 3.5.4)

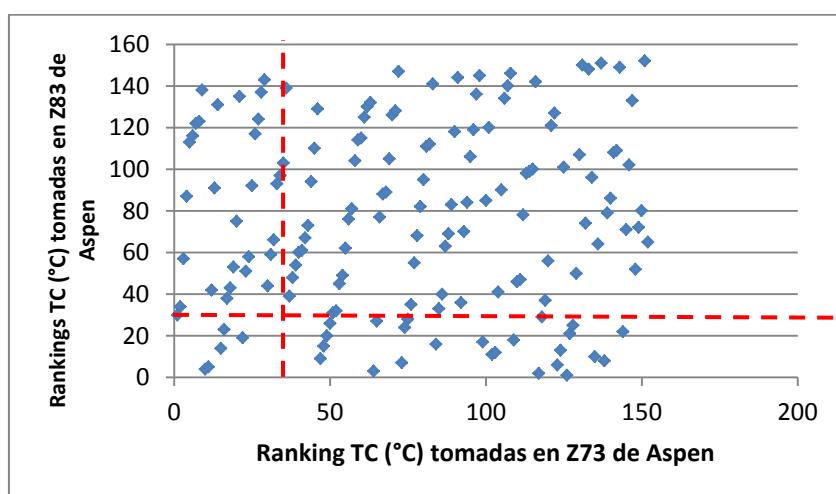


Figura 3.5.2 Combinación de rankings entre las temperaturas tomadas en el estado Z73 y en el estado Z83 del cultivar Aspen.

Tabla 3.5.4 Lista de genotipos que mantuvieron la Temperatura de Canopeo (TC °C) más bajas en las dos mediciones realizadas en Puan 2008.

DH	Puan 2008 (1) TC (°C)	Ranking	Puan 2008 (2) TC (°C)	Ranking	Dif TC (°C) 2 - 1
DH40	25,5	10	28,4	4	2,9
DH54	25,5	11	28,4	5	2,9
DH48	25,6	15	28,9	14	3,3
DH39	25,7	22	29	19	3,3
DH41	25,6	16	29,1	23	3,5
DH60	25,3	1	29,3	30	4
DH91	25,3	2	29,4	34	4,1
DH58	25,6	17	29,6	38	4

Las líneas que mantuvieron más fresco el canopeo son las detalladas en la Tabla 3.5.4. En la tabla 3.5.5 se muestran el orden que ocuparon dichas líneas en el ranking promedio de rendimiento y tamaño de los granos (% retenido sobre zaranda 2,5 mm).

Tabla 3.5.5. Ranking de rendimientos y calibres de los genotipos que mantuvieron menor temperatura de canopeo (1er. cuartil de cada medición en Puan 2008).

DH	Orden Rendimiento	Orden Calibre
41	31	39
39	49	41
54	52	54
60	69	58
91	120	48
58	123	60
40	136	40
48	152	91

Solamente el DH 41 se ubicó en el primer cuartil de rendimiento y calibre para toda la población analizada.

Los histogramas de la Figura 3.5.3 muestran la distribución de frecuencia de las TC de todas las líneas y los parentales en dos momentos del ciclo. La temperatura del aire en la primera medición fue de 27°C, y en la segunda, de 31,6°C.

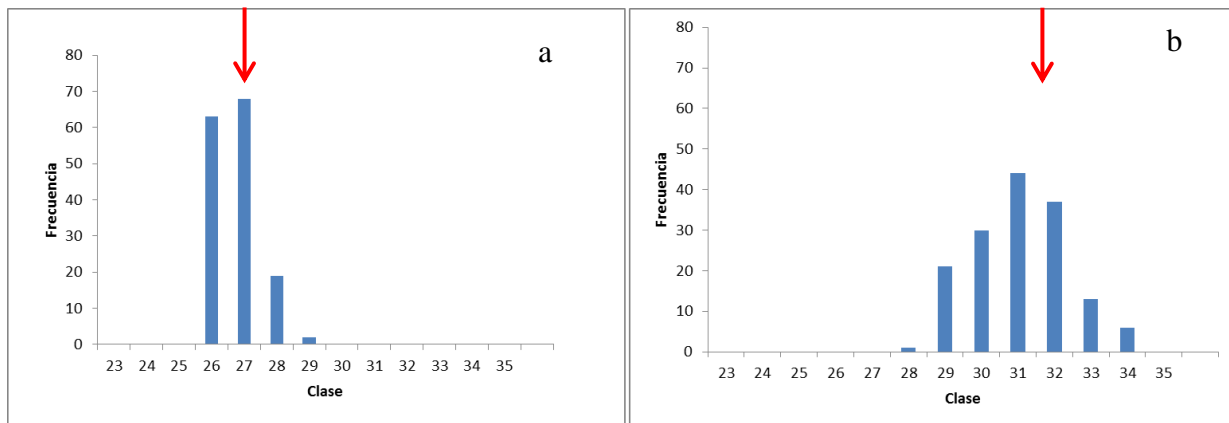


Figura 3.5.3 Temperatura de canopeo registradas en los estados fenológicos Z73 (a) y Z83 (b) del cv. Aspen, en Puán 2008. Las flechas rojas indican la temperatura del aire: 27°C el día 26/9/2008 y 31,6°C el día 11/11/2008.

La medición de TC en el ensayo de Puan 2008, realizada cuando el cultivar Aspen se encontraba en el estado Z83, se realizó en un momento de alta demanda atmosférica (TA = 31,6°C, 13 Km/hora viento Norte). Algunos de las líneas en estas condiciones tuvieron TC iguales y mayores a la TA. Se relacionaron estas TC con el promedio del cuartil más bajo de calibres, que corresponden a los ensayos con mayor nivel de deficiencia de agua (TA 2 2009, TA 1 2009, TA 2 2008, Puan 2008 y Puan 2009). No se encontró correlación entre las TC tomadas en dichas condiciones y el promedio de calibres de ensayos con fuerte déficit de agua.

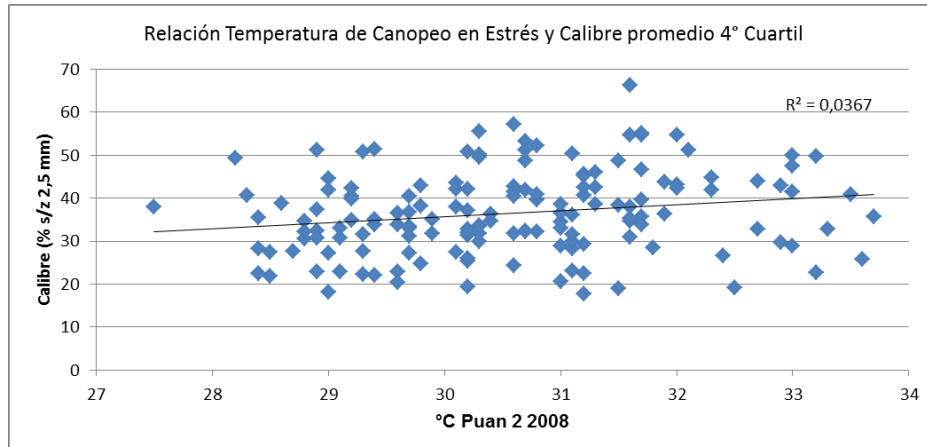


Figura 3.5.4. Relación entre TC y Calibre (s/z 2,5 mm), estado Z83 en Puán 2008.

La temperatura del aire (TA) en Tres Arroyos 2007 al momento de la medición fue 28°C, mientras que en La Dulce 2010 fue 19,3°C. Por lo tanto, en ambos ambientes, todos los genotipos tuvieron una TC menor a la TA. No se observaron relaciones de TC entre ambas situaciones, debido probablemente a la forma diferente de las líneas de reaccionar a las demandas atmosféricas.

La figura 3.5.5 muestra otra relación entre la temperatura de canopeo tomada en Cabildo 2009 (estado Z 83 del cultivar Aspen) y el rendimiento obtenido en Kg/Ha.

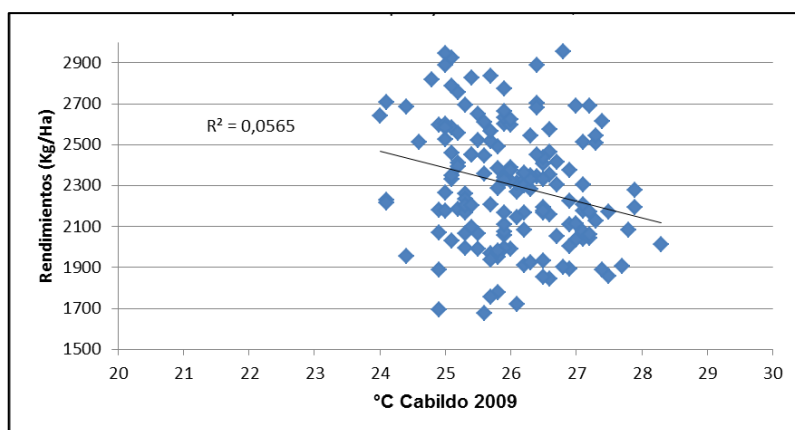


Figura 3.5.5: Relación entre temperatura de canopeo y rendimiento (kg/ha) en Cabildo 2009

Como se observa en la Figura 3.5.5, la dispersión de rendimientos para una misma TC es alta, puede ser hasta de 1000 kg/ha para algunas temperaturas registradas. En la tabla 3.5.5 se promediaron los rendimientos registrados para las TC 25°C, 26°C y 27°C. Entre 25°C y 26°C, la caída de rendimiento no fue significativa, como tampoco entre 26°C y 27°C. La diferencia fue significativa entre 25°C y 27°C.

Tabla 3.5.6 Resultados de rendimiento promedio (kg/ha) tomando tres TC como ejemplo

TC (°C)	Rendimiento Promedio (Kg/Ha)	Desvío Estándar (Kg/Ha)	N	p de las diferencias	
25	2568	286,93	7		
26	2383	228,46	6	0,22142 (25-26)	
27	2279	217,96	9	0,078341 (26-27)	0,02944(25-27)

Otro enfoque que se exploró fue ordenar los promedios de rendimiento y calibre de mayor a menor, dividiendo los grupos por cuartiles. Dichos promedios se relacionaron con TC tomadas en diferentes ambientes y momentos. Por ejemplo, la Figura 3.5.6 muestra la relación entre la TC tomada en el estado de llenado de grano avanzado (Z 83) en Puán 2008 con los rendimientos promedio del cuartil más bajo. El valor de R^2 obtenido fue 0,046, una baja relación que se repitió en todas las relaciones buscadas.

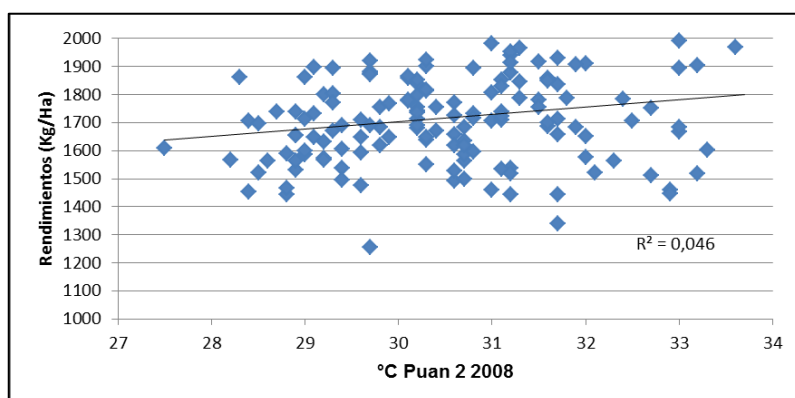


Figura 3.5.6: Relación entre temperatura de canopeo tomada en estado Z83 en Puán 2008 y rendimiento (kg/ha) basado en los promedios del 4to cuartil.

Los análisis presentados hasta aquí corresponden a temperaturas de canopeo como tales y no de diferencias con la temperatura del aire (DT, depresión por temperatura), de acuerdo a Amani et al. (1996), debido a que las temperaturas se tomaron siempre a la misma hora (rango entre 12.00 y 14.00 horas), sin nubosidad, completando el ensayo, y controlando con sonda de temperatura en cada inicio de bloque que la temperatura del aire no variara.

De todas maneras, teniendo en cuenta el trabajo de Reynolds et al. (1994), en el que se relacionó la depresión de temperatura de trigo irrigado con el rendimiento en condiciones de alta demanda atmosférica, se consideró al ambiente La Dulce 2007 (en el que se registró la TC pero que no se cuenta con datos de rendimiento por pérdida por granizo) como el ensayo con muy buena disponibilidad de agua (como si hubiese sido irrigado) y con el mayor valor promedio de DT (4,68°C), y se lo relacionó con los rendimientos obtenidos en ensayos con condiciones de alta demanda atmosférica, sin ser extremas (Cabildo 2008, Puan 2008, promedios de 2310,5 Kg/Ha y 2765,2 Kg/Ha), y con otro ensayo (La Dulce 2008) en el que se obtuvieron los rendimientos más altos de toda la red (promedio de 6189,6 Kg/Ha)

La figura 3.5.7 muestra las relaciones comentadas precedentemente, en la que se observan valores de R^2 entre 0,01 y 0,035.

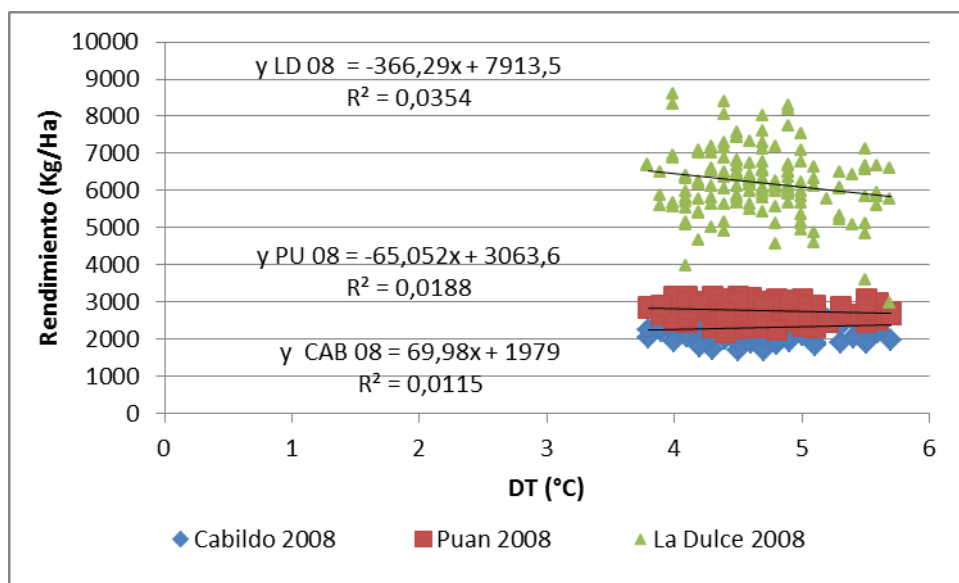


Figura 3.5.7. Relaciones entre Depresión de Temperatura (TC-TA expresadas con signo positivo) obtenida en el ensayo La Dulce 2007, y rendimientos (Kg/Ha) en los ensayos Cabildo 2008, Puan 2008 y La Dulce 2008.

En un ambiente de alta demanda atmosférica (bajas precipitaciones, $T_A=31,6$ °C y velocidad de viento de 13 Km/hora, dirección Norte), se midió la TC a todos los DHs y a las líneas parentales, en el estado fenológico Z83 del cultivar Aspen. Esas mediciones se relacionaron con el tamaño de los granos (calibre sobre zaranda 2,5 mm), dando un valor de $R^2 = 0,04$ (Figura 3.5.8)

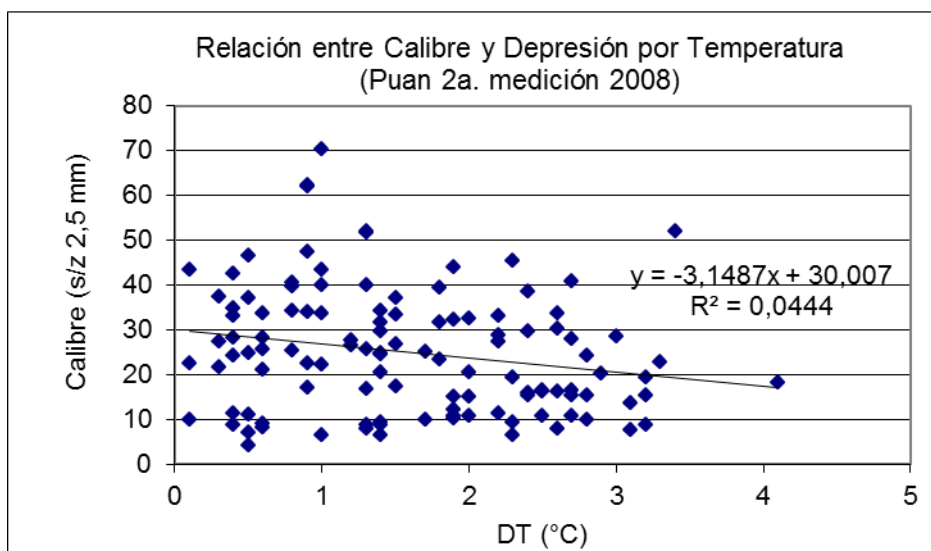


Figura 3.5.8. Relación entre valores de depresión por temperatura (DT, °C) con calibre (% retenido sobre zaranda 2,5 mm), Puan 2008, al estado fenológico Z83 del cv. Aspen.

Finalmente, la Figura 3.5.9 relaciona la DT promedio de todas las mediciones realizadas con el rendimiento y el calibre promedios. Los valores R^2 dieron 0,037 y 0,016 respectivamente.

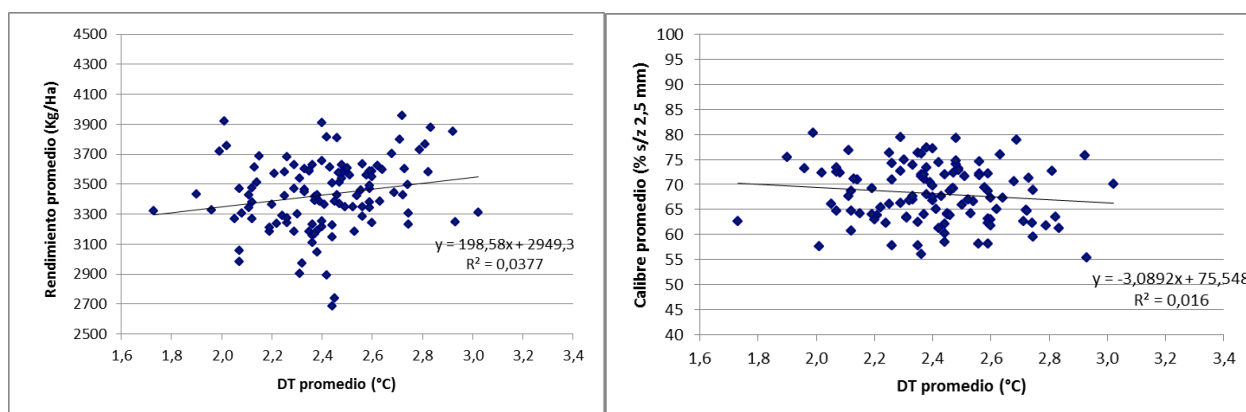


Figura 3.5.9. Relaciones entre Depresión por Temperatura de Canopeo (DT °C) –promedio de todos los datos- con Rendimientos promedio (Kg/Ha) y Calibres promedio (% de granos retenidos sobre zaranda 2,5 mm.).

3.6. Respuesta al fotoperíodo

Las pendientes de respuesta al fotoperíodo, medidas en ensayos realizados en siete fechas de siembra para este fin (Tres Arroyos, entre 5 de mayo y 7 de agosto de 2009), tuvieron un rango entre -0,6305 días/día (mínima pendiente o respuesta) y -0,9793 días/día (máxima pendiente o respuesta). Las líneas parentales de la población tuvieron pendientes de -0,9096 días/día (línea Mut 6519) y -0,6305 días/día (cv. Aspen). Esto significa que el período emergencia-floración, disminuyó en mayor medida en la línea Mut 6519 que en el cv. Aspen, a medida que se atrasó la fecha de siembra (mayor fotoperíodo). La Figura 3.6.1 muestra la relación entre tiempo a floración y fecha de siembra de las líneas parentales y de la línea DH 88. Aspen fue el genotipo

con menor respuesta fotoperiódica, mientras que la línea DH 88 fue la de mayor respuesta (-0,9793 días/día) (Figura 3.6.1).

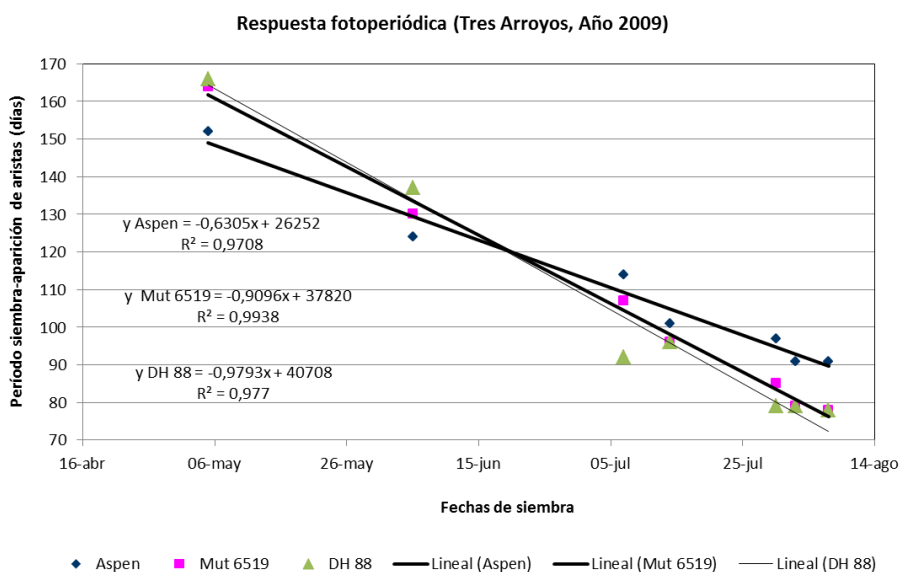


Figura 3.6.1: Respuesta al fotoperíodo en la línea Mut 6519 y el cv. Aspen (genotipos parentales), y del DH 88 (mayor respuesta fotoperiódica) en siete fechas de siembra, Tres Arroyos 2009.

En la primera fecha, el cv. Aspen fue 14 días más precoz que la línea DH 88 (166 días del período Emergencia – Floración para DH 88 y 152 días para cv. Aspen). En cambio, en la última fecha de siembra, Aspen fue 13 días más tardía que DH 88 (91 días para cv. Aspen, 78 días para DH 88 del período Emergencia - Floración).

La figura 3.6.2 corresponde a la distribución de frecuencias de la respuesta fotoperiódica de los 152 genotipos. Hubo una mayor frecuencia de líneas con pendientes de fotoperíodo menor a Mut 6519 (padre de mayor respuesta o pendiente). Esto significa que cv. Aspen aportaría alelos de menor respuesta fotoperiódica que la línea Mut 6519.

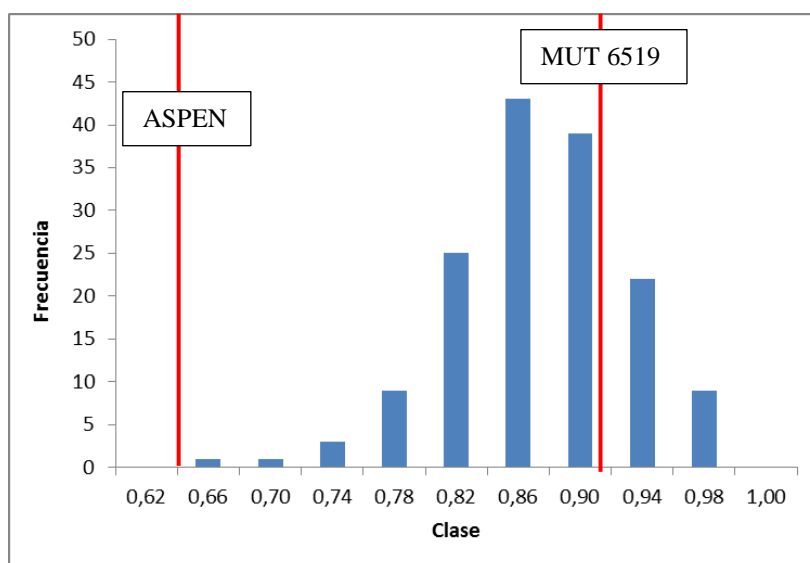


Figura 3.6.2: Distribución de frecuencias de la respuesta a fotoperíodo (clases = pendiente de respuesta en unidad días/día) correspondiente a la población completa del cruzamiento Mut 6519 x Aspen, medida en siete fechas de siembra. Eje x indica el centro del rango, por ejemplo 0,66 es el rango 0,64 – 0,68 días/día.

Ordenando las pendientes de respuesta de mayor a menor, y tomando el promedio del primer cuartil, la correlación entre pendiente y promedio general de calibre fue $r=0,365^{**}$ ($R^2=0,133$), mientras que la correlación con promedio general de rendimiento fue $r=-0,065$ (ns). El promedio de calibre general del primer cuartil de respuesta fue 71,8% y el promedio del cuarto cuartil fue 66,6%. La prueba t que compara ambos grupos de datos dio una probabilidad asociada menor a 0,00001.

También ordenando los calibres por fecha de floración, de mayor a menor precocidad, el primer cuartil dio como fecha de floración promedio el día 21 de octubre, mientras que el cuarto cuartil tuvo una fecha de floración promedio el día 6 de noviembre. Los calibres promedios del primero y cuarto cuartil dieron 71,7% y 66,0%, muy similares a los obtenidos por ordenamiento de la pendiente de respuesta.

La figura 3.6.3 muestra las relaciones entre las pendientes de respuesta a fotoperíodo y los tamaños de grano obtenidos en ensayos sembrados en dos fechas de siembra, separadas aproximadamente en un mes. Los coeficientes de correlación fueron $r=0,471^{***}$ y $0,321^{**}$ respectivamente.

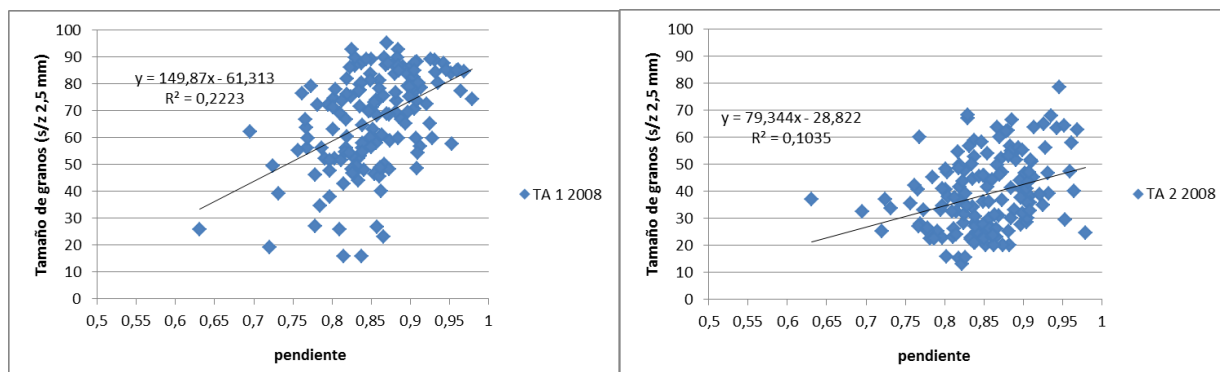


Figura 3.6.3: Relación entre pendiente de respuesta fotoperiódica y tamaño de grano, obtenida en dos ensayos realizados en Tres Arroyos 2008, en fechas de siembra 3 de julio (TA 1) y 6 de agosto (TA 2).

En la figura 3.6.4 se relaciona la nota de ciclo tomada en cada línea (1=líneas con ciclo más tardío, 9=líneas con ciclo más precoz), en el ensayo de Tres Arroyos 2009, sembrado a principio de julio, con el valor de pendiente de respuesta a fotoperíodo (días/día). En la figura se indican la posición de las líneas parentales y el DH 88, con el mayor valor de pendiente.

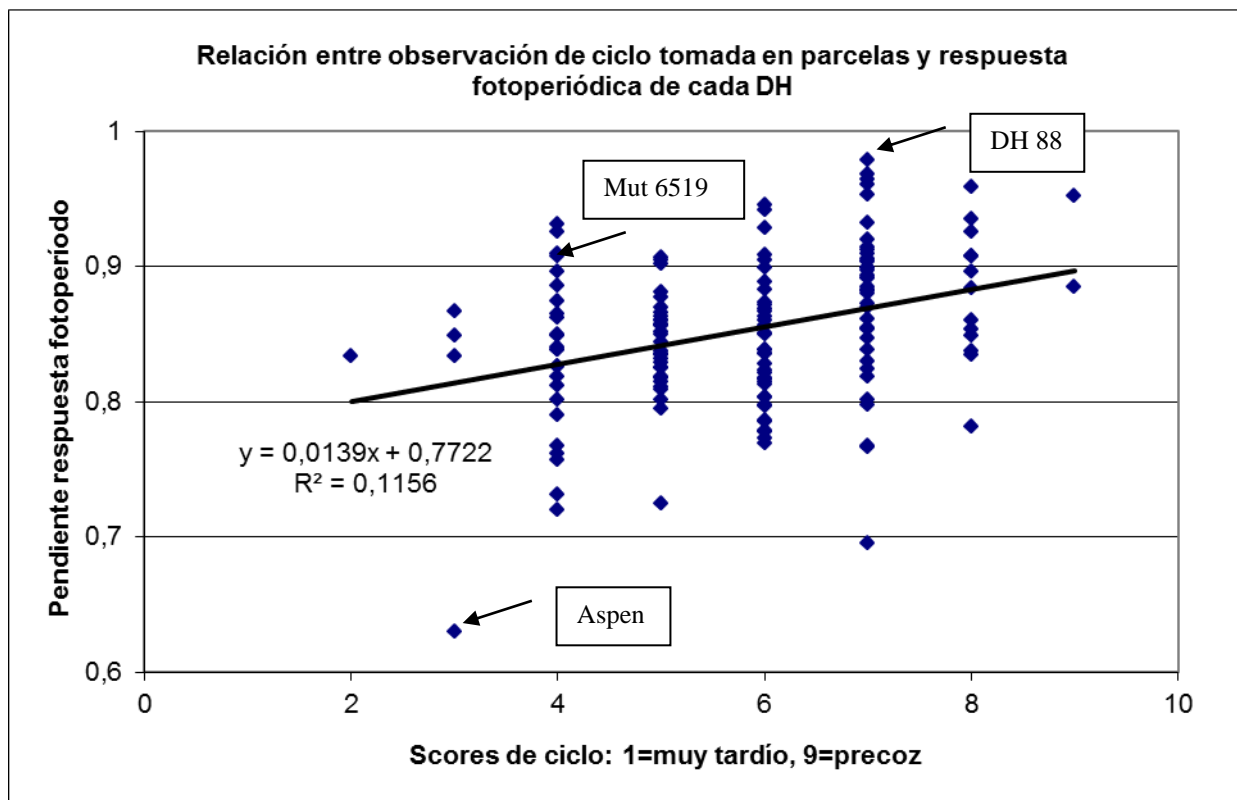


Figura 3.6.4. Relación entre longitud de ciclo (calificado de 1 a 9) tomado en el ensayos Tres Arroyos 2009 1ª época de siembra, y la pendiente de respuesta a fotoperíodo (en unidad días/día), obtenida en la serie de ensayos de fecha de siembra en la misma localidad y año.

La floración de DH 88 fue registrada el 24/10 (score 7), Mut 6519 el día 5/11 (score 4) y Aspen el día 10/11 (score 3). Teniendo en cuenta que entre DH 88 y Mut 6519 existió una diferencia de 12 días, y que esa diferencia en score de ciclo fueron 3 puntos (de 7 a 4), cada punto representaría una diferencia de 4 días. Entre Aspen y Mut 6519 la diferencia de fechas de antesis fue 5 días, con una diferencia de score de ciclo de 1 punto (4 vs 3).

El DH 16 fue el más tardío (fecha de antesis 12/11, score 2), mientras que los DHs más precoces fueron DHs 66 y 61 (fechas 18 y 20/10 respectivamente, score 9)

Una práctica habitual en mejoramiento, es tomar el ciclo como una nota de campo, ya que no es posible registrar con exactitud la fecha de floración en todas las localidades. Esas notas van de 1 (ciclo muy tardío) a 9 (ciclo muy precoz). Relacionando dichas notas de ciclo (1 a 9) con los datos de rendimiento del ensayo con mayor potencial (La Dulce 2008, para tener mayor discriminación de rendimiento entre los genotipos), en la Figura 3.6.6 se observa, con un valor de $R^2 = 0,03$, una tendencia negativa de rendimiento hacia ciclos más precoces. El mayor rendimiento, 8609 Kg/Ha, se logró con el único DH con score 2, el DH 16. Sin embargo, hay otros DH con rendimientos muy cercanos (8336, 8397 y 8305, DHs 82, 142 y 148 respectivamente) con ciclos de score 5. No es posible, con los ensayos realizados, evaluar cómo descende el rendimiento en función del atraso en la fecha de siembra, ya que para ello hubiese sido necesario realizar diferentes siembras en un mismo ambiente. En este caso, como se explicó en la sección de M&M, las siembras se concentraron en los primeros días de Julio, en todos los ambientes.

Los dos DHs más precoces, (61 y 66), tuvieron rendimientos de 5673 y 5347 Kg/Ha, 52% menos de rendimiento que el DH 16.

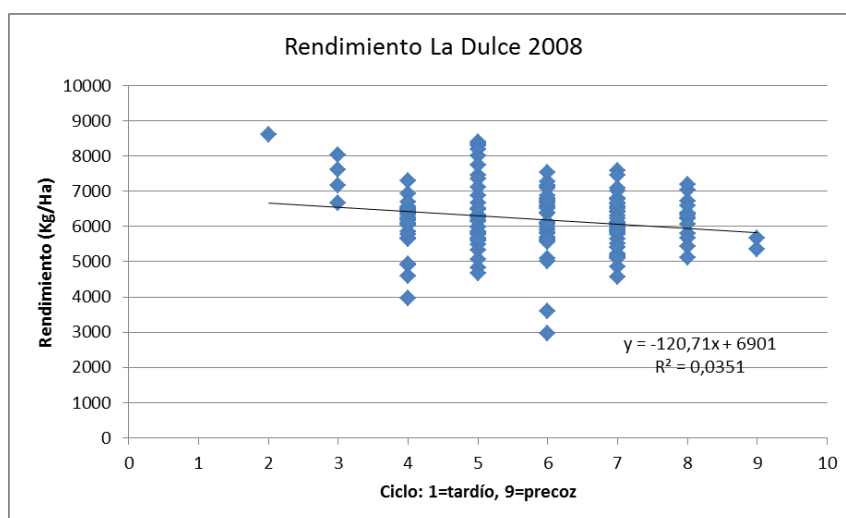


Figura 3.6.5. Relación entre ciclo a floración (1= muy tardío, 9= muy precoz) y rendimiento (Kg/Ha), en La Dulce 2008.

Con respecto al promedio de rendimiento de todos los ensayos (Figura 3.6.7), los DHs 147 (4135 Kg/Ha, ciclo 6), 16 (4115 Kg/Ha, ciclo 2), 148 (4087 Kg/Ha, ciclo 3) y 82 (4060 Kg/Ha, ciclo 4), tuvieron los máximos rendimientos. La relación entre rendimientos promedio con scores de ciclo dio un valor de $R^2 = 0,065$.

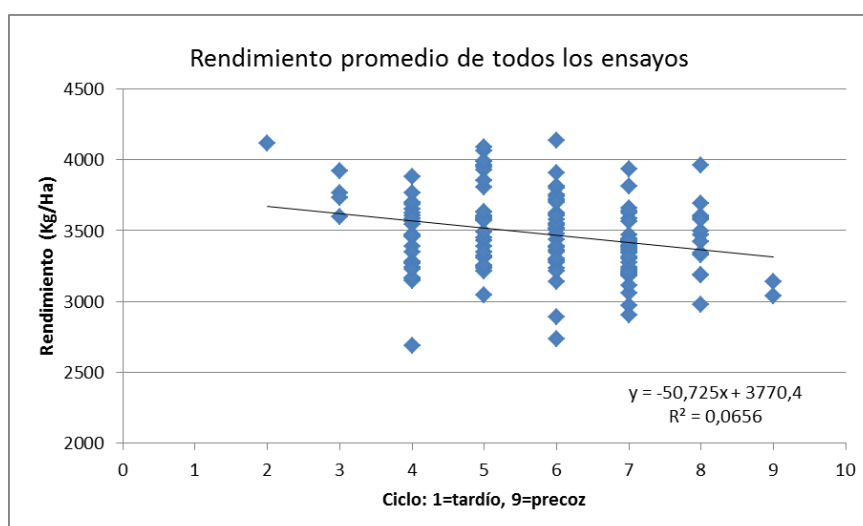


Figura 3.6.6. Relación entre ciclo a floración (1= muy tardío, 9= muy precoz) y promedio de rendimiento (Kg/Ha) de todos los ensayos.

En la Figura 3.6.7 se muestran los promedios de rendimientos (considerando todos los ensayos) obtenidos para cada grupo de scores de ciclo tomados en el campo. La regresión con función logarítmica ajustó mejor a la caída de rendimiento por acortamiento de ciclo que la función lineal ($R^2 = 0,83$ vs. $R^2 = 0,75$ para la función lineal).

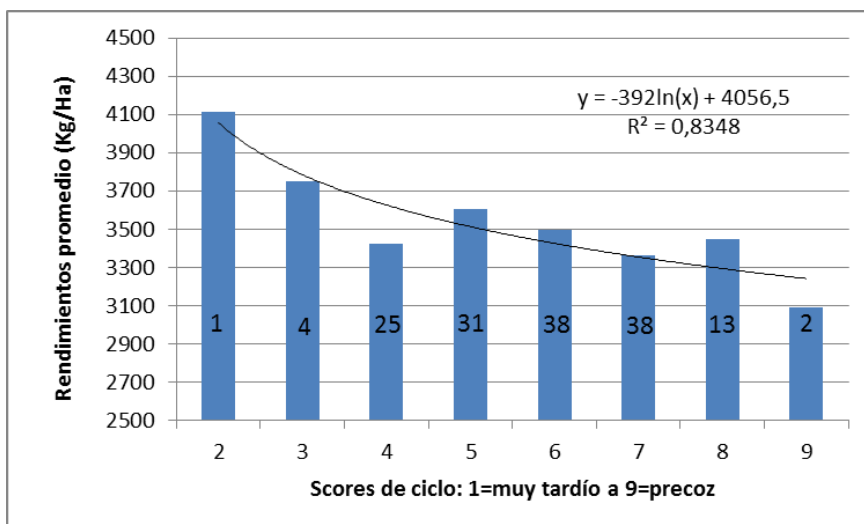


Figura 3.6.7. Relación entre longitud de ciclo (calificado de 1=tardío a 9=precoz), y promedios de rendimiento (Kg/Ha) de todos los ensayos, obtenidos para cada nota. El valor dentro de cada barra es la cantidad de genotipos con cada nota.

Considerando la caída de rendimiento entre los grupos 5 (promedio 3602,3 Kg/Ha), 6 (3496,4 Kg/Ha) y 7 (3365,4 Kg/Ha), y comparando dichos grupos por la cantidad similar de genotipos que los representan, no existe diferencia estadística entre los grupos 5 y 6 ($p=0,1189$), y si existe diferencia entre los grupos 6 y 7 ($p=0,0200$).

Con respecto al calibre de los granos, en la Figura 3.6.8 se graficaron los promedios de todos los ensayos para cada grupo de scores de ciclo. De manera inversa a lo observado con rendimiento, la tendencia se incrementó linealmente a medida que los genotipos eran más precoces. Sin embargo, las diferencias de calibre entre los grupos 5, 6 y 7 no fueron significativas ($p = 0,7493$ entre grupos 5 y 6, y $p = 0,0846$ entre grupos 6 y 7). Esto estaría mostrando una relación inversa entre rendimiento y calibre, clasificando los genotipos por scores de ciclos.

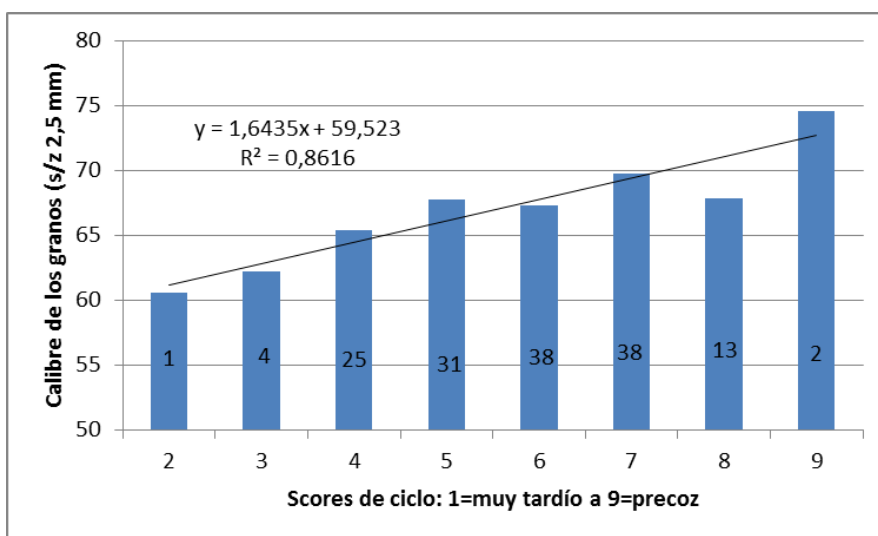


Figura 3.6.8. Relación entre longitud de ciclo (calificado de 1=tardío a 9=precoz), y promedios de calibres de los granos de todos los ensayos, obtenidos para cada nota. El valor dentro de cada barra es la cantidad de genotipos con cada nota.

Considerando como ejemplos dos ensayos ambientalmente diferentes (La Dulce 2008 y Tres Arroyos 1^a. época 2009), en la Figura 3.6.9 se observa la variabilidad en resultados de calibre para los ciclos 5, 6 y 7 en ambas situaciones.

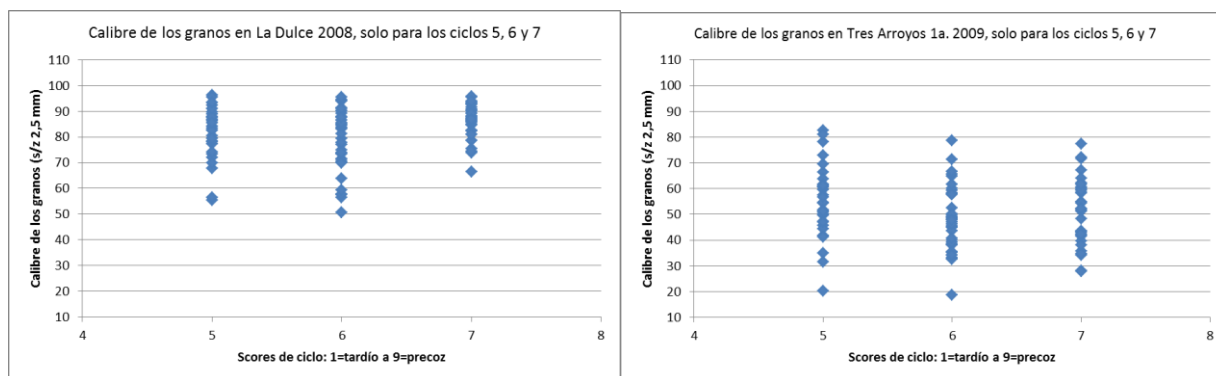


Figura 3.6.9. Variabilidad de calibres para los ciclos 5, 6 y 7, en los ensayos La Dulce 2008 y Tres Arroyos 1 época 2009.

3.7. Otros métodos de selección por resistencia a sequía y estabilidad

Varios índices se han desarrollado para cuantificar la tolerancia al estrés por sequía, por ejemplo, CD (Blum, 2011), coeficiente de resistencia a sequía = Y_s/Y_p (rendimiento logrado en sequía vs. rendimiento sin sequía), DRI (Fischer and Maurer, 1978), índice relativo de sequía = $(Y_s/Y_p) / (Y_s \text{ promedio}/Y_p \text{ promedio})$, este índice relativiza la relación anterior con el promedio del ensayo en sequía y sin sequía, y Tolerancia (Rosielle y Hamblin, 1981) = $Y_p - Y_s$, entre otros. Todos ellos benefician a aquellos genotipos de menor rendimiento potencial (es decir, el rendimiento logrado en condiciones sin estrés), porque la diferencia de rendimiento (y también de otros caracteres de calidad) se hace menor por el hecho de tener menor rendimiento máximo comparado con otros. Las siguientes tablas muestran ejemplos de esto último.

La tabla 3.7.1 muestra algunos genotipos con alto Índice Relativo de Sequía (Fischer and Maurer, 1978), ordenados de mayor a menor hasta el ranking 13 de DRI. El índice fue mayor cuando las diferencias de rendimiento en las condiciones ensayadas fueron menores. El ranking es el orden (de 1 a 152, 150 DHs más los parentales) de rendimiento de mayor a menor.

Tabla 3.7.1. Genotipos con mayor Índice Relativo de Sequía

Genotipo	Rendimiento irrigado	Ranking Rendimiento Irrigado	Rendimiento en estrés	Ranking Rendimiento en estrés	DRI	Ranking DRI
DH 3	5208,7	95	5329,3	45	1,3474	1
DH 11	4875,7	112	4586,7	73	1,2388	2
DH 138	6461,0	58	6063,9	14	1,2360	3
DH 10	6604,8	52	6150,6	11	1,2263	4
DH 98	5791,0	77	5371,7	42	1,2215	5
DH 4	5340,2	89	4943,4	66	1,2190	6
DH 128	7935,6	10	7247,0	1	1,2026	7
DH 44	5779,3	78	5229,4	51	1,1916	8
DH 53	4970,5	106	4451,4	76	1,1794	9
DH 63	4929,0	110	4403,5	79	1,1765	10
DH 24	7221,7	36	6444,8	6	1,1752	11
DH 99	3944,4	147	3519,2	117	1,1750	12
DH 6	6353,2	66	5628,2	30	1,1666	13

En cambio, la tabla 3.7.2 corresponde a los rendimientos de genotipos con menor índice, ordenados de menor a mayor. Se observa que los índices son bajos cuando la diferencia de rendimiento es grande. Esto significa que los índices propuestos en la bibliografía, que tienen en cuenta la diferencia de rendimientos, no están considerando la potencialidad genética de cada genotipo, que puede manifestarse en condiciones no limitantes como en aquellas con algún tipo de déficit. Por ejemplo la línea Mut 6519 tuvo un rendimiento de 7866,3 Kg/Ha en el ensayo irrigado, y 4894,2 Kg/Ha en condiciones de secano. A los fines de selección, resultan convenientes aquellos genotipos con altos rendimientos en ambas situaciones, lo que se traduce en un DRI también alto. Es el caso de los DHs 128 (7935,6 y 7247 Kg/Ha con un DRI = 1,2026), y el DH 24 (7221,7 y 6444,8 Kg/Ha con un DRI = 1,1752)

Tabla 3.7.2. Genotipos con menor Índice Relativo de Sequía

Genotipo	Rendimiento irrigado	Ranking Rendimiento Irrigado	Rendimiento en estrés	Ranking Rendimiento en estrés	DRI	Ranking DRI
DH 118	3600,9	152	1944,7	152	0,7112	152
DH 41	5162,1	97	2823,5	146	0,7203	151
DH 74	6152,1	69	3448,2	120	0,7381	150
DH 137	5733,0	81	3244,8	130	0,7454	149
DH 57	5458,3	86	3182,6	133	0,7679	148
DH 19	4934,8	109	2957,5	142	0,7892	147
DH 120	4429,2	130	2667,4	150	0,7931	146
DH 37	4712,3	123	2912,7	143	0,8140	145
DH 25	4566,3	126	2833,3	145	0,8171	144
Mut 6519	7866,3	12	4894,2	68	0,8193	143
DH 66	4757,5	120	2971,8	139	0,8226	142
DH 2	4387,9	131	2742,7	148	0,8232	141
DH 5	4322,2	138	2702,3	149	0,8233	140

La figura 3.7.1 muestra la relación entre rendimientos en el ensayo irrigado y en el ensayo sin riego con el Índice de Resistencia a Sequía (DRI)

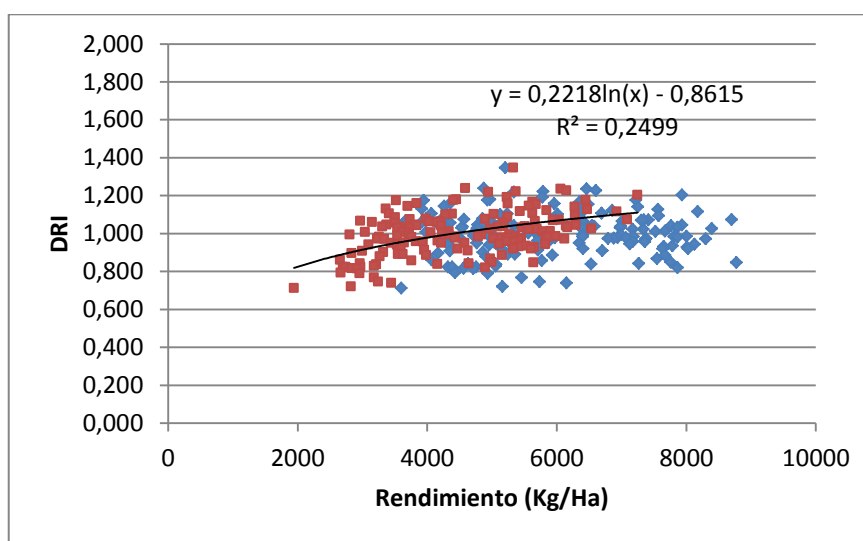


Figura 3.7.1: Regresiones entre los rendimientos en ensayos con riego (puntos rojos) y sin riego (puntos azules) con el Índice de Resistencia a Sequía.

Considerando las regresiones lineales por separado, no se encontró relación entre los rendimientos obtenidos en el ensayo irrigado con el DRI, mientras que el valor de R^2 entre los rendimientos sin riego adicional y el DRI fue significativo ($R^2 = 0,231$, $p < 0,01$).

La Figura 3.7.2 muestra que la relación entre las diferencias de rendimiento entre los dos ensayos con el DRI fue mucho más significativa, lo cual es lógico por la naturaleza matemática del índice. Pero, lo que demuestra el gráfico es que a mayores diferencias de rendimiento el valor de DRI es menor, ignorando si esa mayor diferencia se debe a una disminución importante del rendimiento en condiciones de sequía, o un alto potencial de rendimiento de las líneas en condiciones de mayor potencial. A partir de un valor aproximado de 1700 kg/ha de diferencia

entre las dos situaciones, el valor de DRI se encuentra en 0,800, con una leve dispersión dentro de cada valor de diferencia.

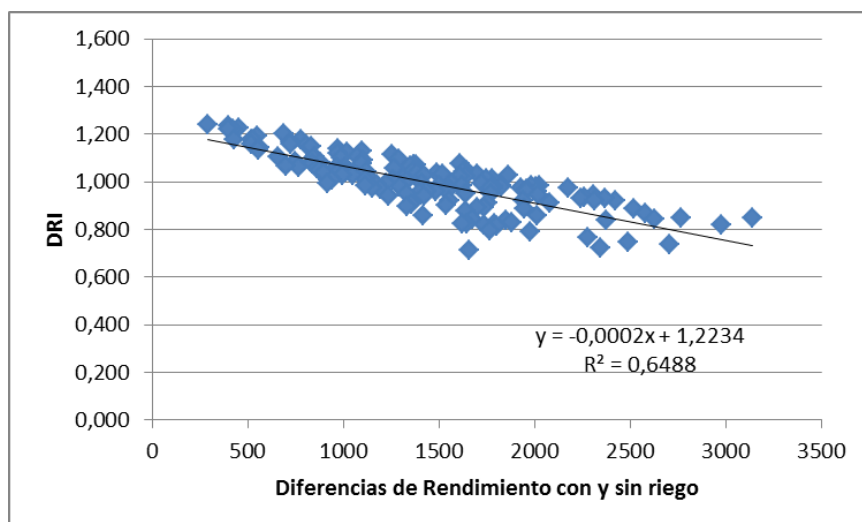


Figura 3.7.2: Regresión entre las diferencias de rendimiento entre los ensayos con y sin riego con el Índice de Resistencia a Sequía (DRI)

Como herramienta de selección, un método que considera ambos rendimientos (potencialidad y tolerancia al estrés), ordena cada genotipo de acuerdo a su rendimiento, y a partir de la conjunción de rankings en cada situación, se decide la presión de selección a ejercer. Por ejemplo, en la Tabla 3.7.3 se presenta el ranking de cada genotipo en el ensayo irrigado y sin riego, ordenados por el ranking de irrigado, y cada integrante del ensayo tiene el correspondiente ranking en el ensayo sin irrigar. Arbitrariamente se consideran solamente los 30 primeros genotipos en el ambiente sin limitación. De esos primeros 30 puestos, en el ensayo con estrés están marcadas las posiciones que son menores o iguales a 30, quedando finalmente 19 integrantes que tienen una combinación “irrigado-estrés” menor o igual a 30.

Tabla 3.7.3. Ranking de genotipos en sitios irrigado y no irrigado

Genotipo	Rendimiento irrigado	Ranking Rendimiento Irrigado	Rendimiento en estrés	Ranking Rendimiento en estrés	DRI
Aspen	8772,9	1	5639,5	29	0,8465
DH 64	8698,9	2	7090,1	2	1,0733
DH 78	8395,7	3	6535,3	4	1,0251
DH 27	8299,0	4	6123,1	13	0,9716
DH 31	8177,9	5	6926,0	3	1,1153
DH 68	8128,6	6	5822,0	23	0,9432
DH 39	8026,3	7	5605,9	32	0,9198
DH 77	8014,1	8	5651,0	28	0,9286
DH 8	8002,4	9	5982,6	16	0,9845
DH 128	7935,6	10	7247,0	1	1,2026
DH 126	7933,1	11	6292,0	7	1,0445
Mut 6519	7866,3	12	4894,2	68	0,8193
DH 145	7863,9	13	5857,2	20	0,9809
DH 143	7863,2	14	6163,5	10	1,0322
DH 46	7809,9	15	5831,3	22	0,9833
DH 7	7786,2	16	5529,2	35	0,9352
DH 85	7767,2	17	6143,3	12	1,0416
DH 22	7761,6	18	4999,5	63	0,8483
DH 149	7673,9	19	5157,3	57	0,8850
DH 48	7673,7	20	5900,5	19	1,0126
DH 49	7651,0	21	5413,9	41	0,9318
DH 73	7637,1	22	5328,0	46	0,9187
DH 72	7572,2	23	6283,1	8	1,0927
DH 90	7564,1	24	6470,8	5	1,1266
DH 36	7550,3	25	4972,5	65	0,8673
DH 131	7526,6	26	5779,1	24	1,0112
DH 135	7416,1	27	6036,9	15	1,0720
DH 86	7382,7	28	5454,0	38	0,9729
DH 14	7372,2	29	5417,1	40	0,9677
DH 117	7359,4	30	5347,0	44	0,9568

La figura 3.7.3 es otra forma de ver los resultados anteriores. La particularidad que tiene esta figura comparada con otras, donde los ejes son ambientes que tienen entre sí una menor correlación, es la clara asociación que existe entre los rendimientos de las dos situaciones.

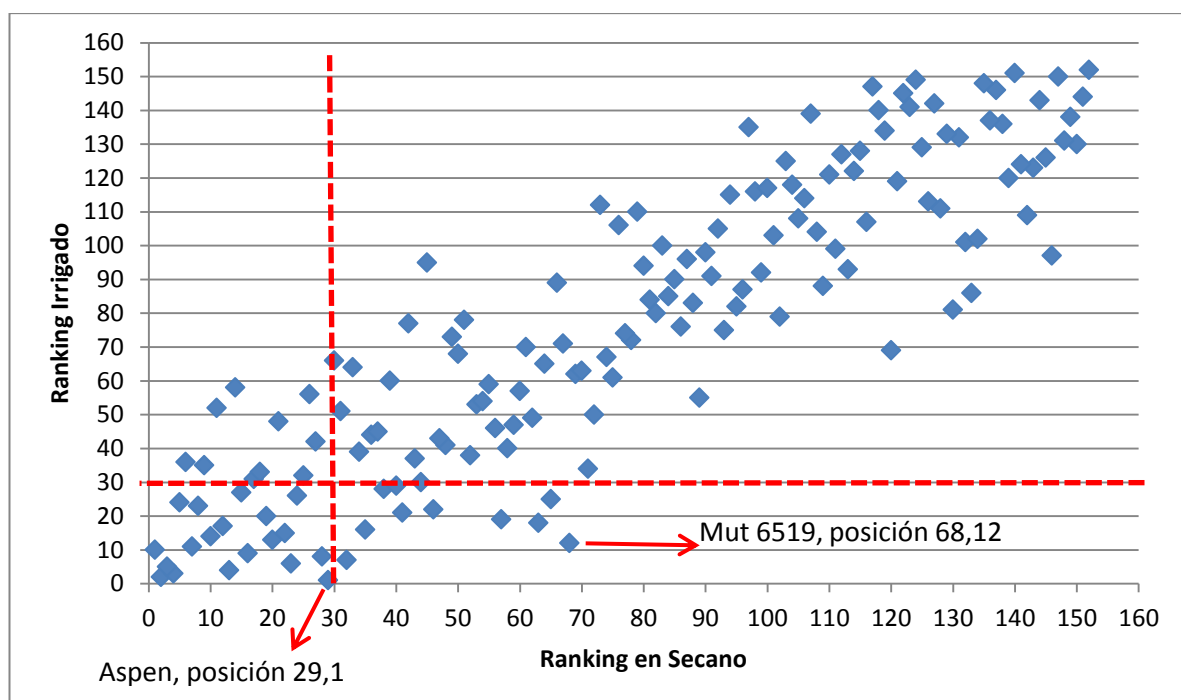


Figura 3.7.3 Ranking de rendimientos de todos los genotipos ensayados en seco e irrigación. Se indica la posición del cv. Aspen y de la línea Mut 6519.

De este método surge que hay 19 combinaciones de máximos rendimientos de los ensayos con y sin riego. La tabla 3.7.4 muestra la lista de genotipos que corresponden a dicha combinación.

Tabla 3.7.4. Combinaciones de máximos rendimientos en ensayos con y sin riego adicional

Genotipo	Rendimiento irrigado	Ranking Rendimiento Irrigado	Rendimiento en estrés	Ranking Rendimiento en estrés	DRI
Aspen	8772,9	1	5639,5	29	0,8465
DH 64	8698,9	2	7090,1	2	1,0733
DH 78	8395,7	3	6535,3	4	1,0251
DH 27	8299,0	4	6123,1	13	0,9716
DH 31	8177,9	5	6926,0	3	1,1153
DH 68	8128,6	6	5822,0	23	0,9432
DH 77	8014,1	8	5651,0	28	0,9286
DH 8	8002,4	9	5982,6	16	0,9845
DH 128	7935,6	10	7247,0	1	1,2026
DH 126	7933,1	11	6292,0	7	1,0445
DH 145	7863,9	13	5857,2	20	0,9809
DH 143	7863,2	14	6163,5	10	1,0322
DH 46	7809,9	15	5831,3	22	0,9833
DH 85	7767,2	17	6143,3	12	1,0416
DH 48	7673,7	20	5900,5	19	1,0126
DH 72	7572,2	23	6283,1	8	1,0927
DH 90	7564,1	24	6470,8	5	1,1266
DH 131	7526,6	26	5779,1	24	1,0112
DH 135	7416,1	27	6036,9	15	1,0720

Considerando las combinaciones de máximos rendimientos y máximos Índices de Resistencia a Sequía, se observa que tomando los primeros 30 rankings (30 es un número arbitrario de presión de selección), solamente 4 genotipos se ubican en el primer cuadrante. Ellos son DH 128, DH 90, DH 31 y DH 72, que lógicamente también se ubican en el primer cuadrante en el gráfico de la Figura 3.7.3.

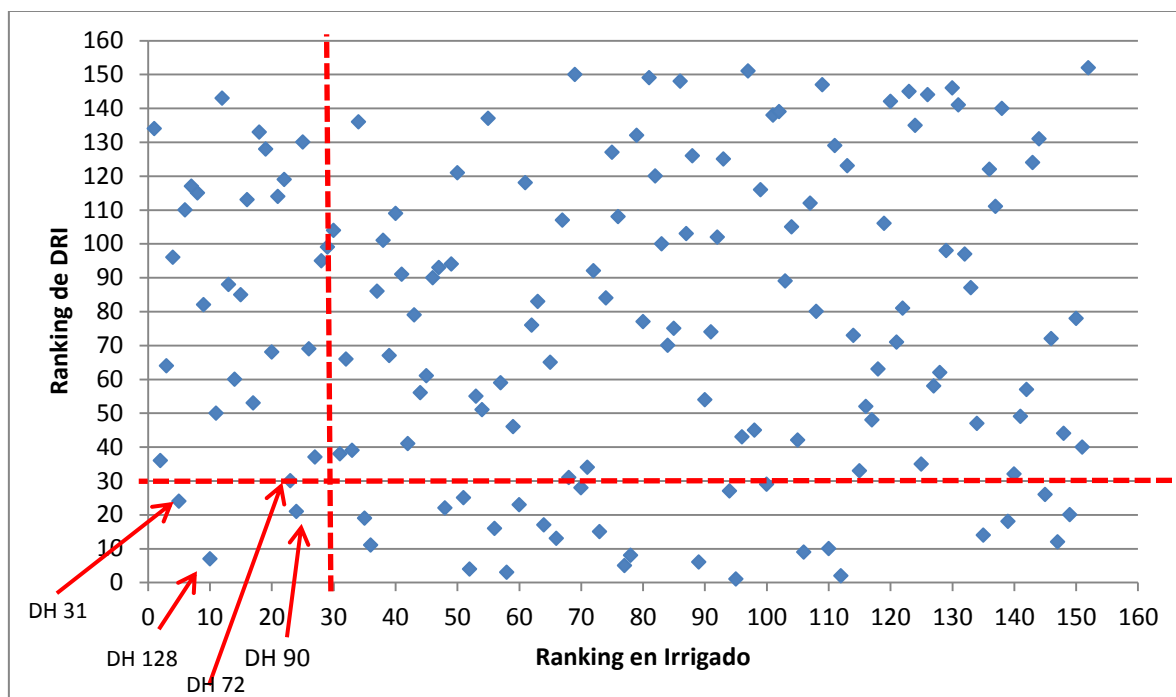


Figura 3.7.4 Ranking de rendimientos y del Índice de Resistencia a Sequia (DRI) de todos los genotipos ensayados en secano e irrigación.

Cuatro genotipos sobre 152 representa un porcentaje de selección de 2,63%, valor extremadamente exigente teniendo en cuenta la cantidad de caracteres agronómicos y de calidad que hay que tener en cuenta en la selección global. Un total de 19 genotipos sobre 152 (Figura 3.7.3 y Tabla 3.7.4) resulta ser el 12,5% de selección, presión de selección más lógico en un programa de mejoramiento, aunque dicho valor depende del criterio del mejorador y por ello, es arbitrario.

Para obtener la misma cantidad de genotipos seleccionados sobre 152, habría que tomar hasta el ranking 30 de rendimiento en ensayo irrigado, y hasta el ranking 110 de DRI. Con este criterio, de los 19 genotipos seleccionados en el gráfico anterior, los DHs 86 y 14 quedan afuera de dicha selección, ocupando los lugares 38 y 40 del ranking en el ensayo sin riego (Tabla 3.7.5). Esto representa un 89,5% de coincidencia entre los dos criterios, por lo que pueden considerarse casi equivalentes.

Tabla 3.7.5. Combinaciones de máximos rendimientos e Índice de Resistencia a Sequía (DRI) en ensayos con y sin riego adicional.

Genotipo	Rendimiento irrigado	Ranking Rendimiento Irrigado	Rendimiento en estrés	Ranking Rendimiento en estrés	DRI	Ranking DRI
DH 128	7935,6	10	7247,0	1	1,2026	7
DH 90	7564,1	24	6470,8	5	1,1266	21
DH 31	8177,9	5	6926,0	3	1,1153	24
DH 72	7572,2	23	6283,1	8	1,0927	30
DH 64	8698,9	2	7090,1	2	1,0733	36
DH 135	7416,1	27	6036,9	15	1,0720	37
DH 126	7933,1	11	6292,0	7	1,0445	50
DH 85	7767,2	17	6143,3	12	1,0416	53
DH 143	7863,2	14	6163,5	10	1,0322	60
DH 78	8395,7	3	6535,3	4	1,0251	64
DH 48	7673,7	20	5900,5	19	1,0126	68
DH 131	7526,6	26	5779,1	24	1,0112	69
DH 8	8002,4	9	5982,6	16	0,9845	82
DH 46	7809,9	15	5831,3	22	0,9833	85
DH 145	7863,9	13	5857,2	20	0,9809	88
DH 86	7382,7	28	5454,0	38	0,9729	95
DH 27	8299,0	4	6123,1	13	0,9716	96
DH 14	7372,2	29	5417,1	40	0,9677	99
DH 68	8128,6	6	5822,0	23	0,9432	110

La figura 3.7.5 muestra un ejemplo de baja correlación, realizado entre un ambiente con déficit (Puán 2008) y con otro de alto potencial (La Dulce 2008).

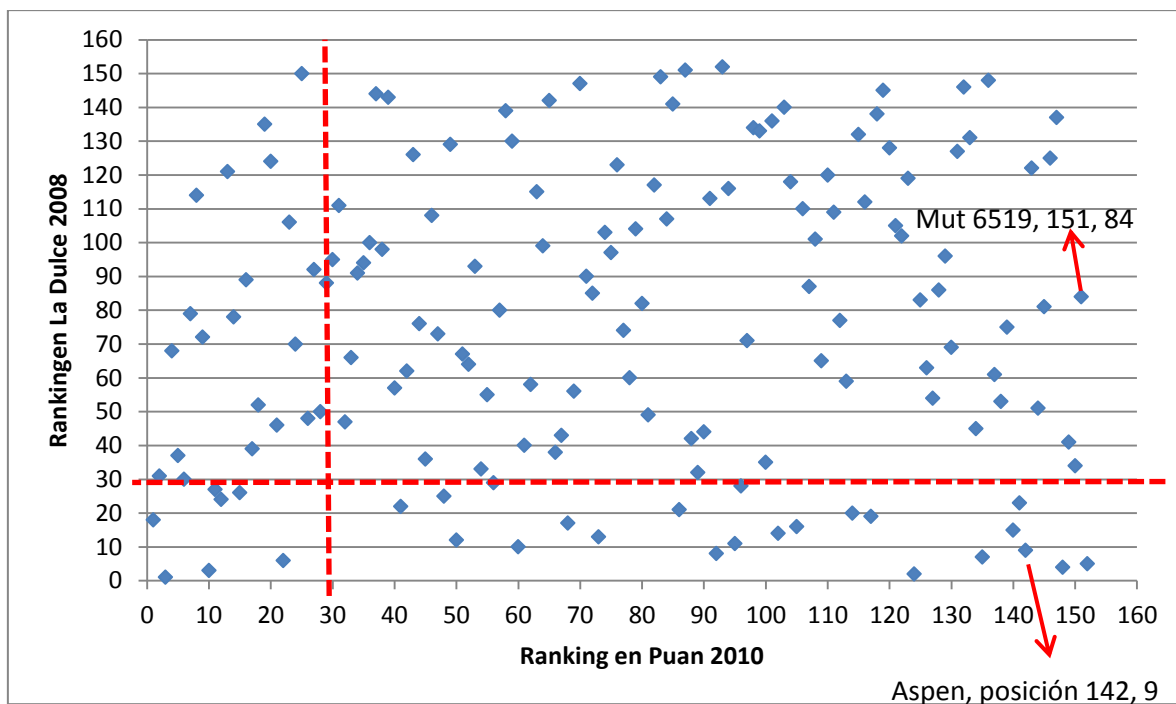


Figura 3.7.5 Ranking de rendimientos de todos los genotipos ensayados en los ambientes Puán 2010 y La Dulce 2008. Se indica la posición del cv. Aspen y de la línea Mut 6519.

Para solucionar la situación de baja correlación de resultados entre ambientes, los enfoques para la selección por tolerancia a sequía podrían ser los siguientes:

- A) Ensayos con irrigación y en secano en los momentos claves de definición de rendimiento y tamaño de los granos. Este método tiene la ventaja de neutralizar el efecto de otras variables ambientales y las interacciones que estas generan con las disponibilidades de agua.
- B) Ensayos en ambientes de alta y baja calidad ambiental, luego promediar los resultados obtenidos en los cuartiles superior e inferior y graficar.

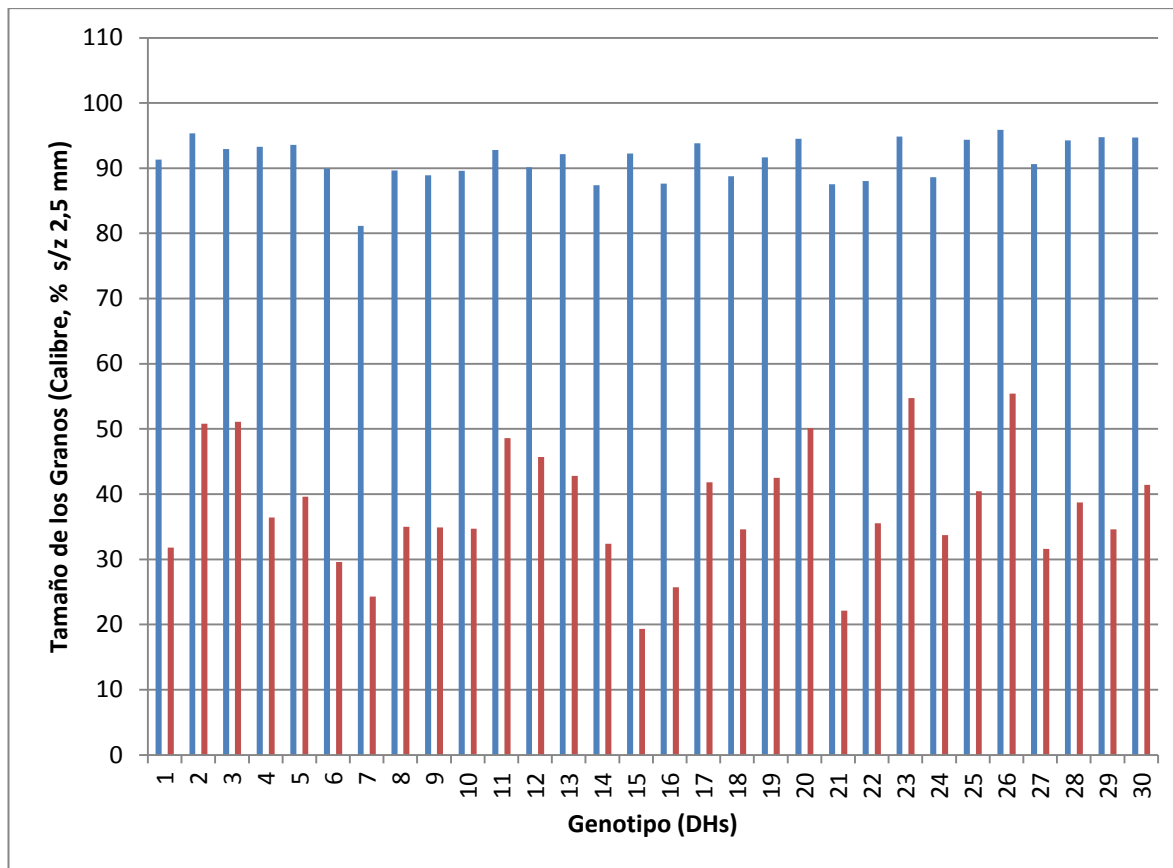


Figura 3.7.6. Tamaño de granos (%), promedio del primer cuartil (barras azules) vs. promedio del cuarto cuartil (barras rojas).

La figura 3.7.6 representa un ejemplo de esta metodología realizada con 30 genotipos. Con la excepción del DH 7 que no alcanzó la especificación comercial de 85% (según Normas de Calidad y Comercialización de Cebada, Resolución 446/2007, B.O. 31.303 Primera Sección, 14/12/2007), todos los genotipos superaron dicho requerimiento, hecho esperable en ambientes con bajo o nulo nivel de limitación. Lo relevante en este caso es la capacidad de seleccionar los genotipos con mayor calibre, aún sin alcanzar la especificación, en situaciones extremas como las registradas en este grupo de ambientes (Puán 2008 y 2009, Tres Arroyos 2008 y 2009).

- C) Selección en base al método de Finlay y Wilkinson (1963) utilizando como variable independiente el promedio de rendimientos o calibres de un número elevado de genotipos en un ambiente (índice ambiental), que describe indirectamente la complejidad natural de los ambientes, sin la dificultad de definir o analizar las interacciones de los factores edáficos y estacionales, y como variable independiente, el rendimiento o calibre promedios de cada línea en cada uno de los ambientes. El valor R^2 da una idea de la estabilidad a través de todos los ambientes. Si los rendimientos o calibres se encuentran sobre la línea de regresión, indican una adaptabilidad general.

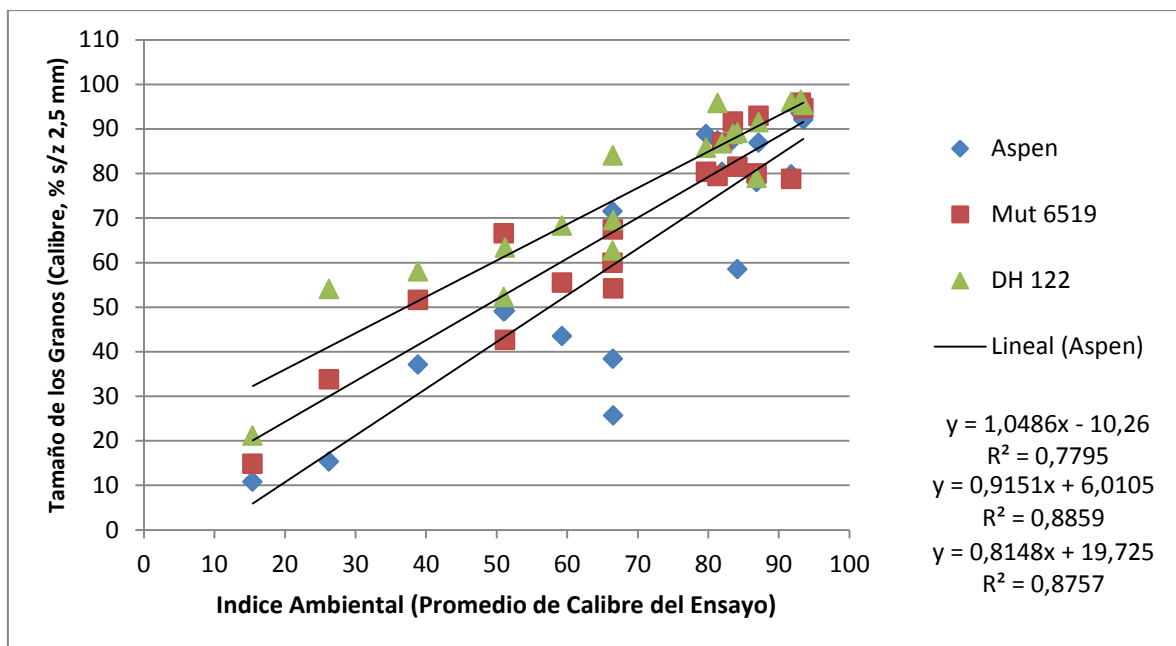


Figura 3.7.7. Relación entre los calibres promedio en cada ambiente y el calibre de cada genotipo (Método de Finlay y Wilkinson, 1963)

Para ejemplificar este método, en la Figura 3.7.7 se observan las líneas de regresión entre los calibres promedio de cada ambiente y los calibres de Aspen, Mut 6519 y DH 122. El menor valor R^2 encontrado corresponde a Aspen (0,78) y el mayor a DH 122 (0,875), que demuestra así una mayor estabilidad a través de todos los ambientes, según lo indicado por el método. El gráfico muestra que todos los genotipos llegaron a valores similares de calibre ante altos valores del índice ambiental, es decir, no habría una verdadera selección por tamaño de grano en este tipo de ambientes, solamente los habría en aquellos con restricciones moderadas a altas. Con respecto a rendimiento (Kg/Ha), la línea DH 122 ocupa en promedio el ranking 82 (ranking de Aspen = 25, ranking de Mut 6519 = 126), mientras que las pendientes en relación al índice ambiental fueron 1,271 para Aspen, $R^2 = 0,88$; 1,010 para Mut 6519, $R^2 = 0,91$; y 0,941 para DH 122, $R^2 = 0,85$), es decir, mostrando mayor estabilidad para rendimiento comparado con las líneas parentales y con un rendimiento promedio intermedio entre Aspen y Mut 6519. De todas maneras, esta es una información adicional que no define la selección final, ya que para dicha selección se tienen en cuenta, además de los comportamientos potenciales y la estabilidad frente a diferentes condiciones, todos los atributos combinados para desarrollar variedades con las mejores características posibles, como resistencias a enfermedades, vuelco, y todos los caracteres de calidad, también considerando estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales. Este ejemplo toma solamente el carácter “calibre” (% de granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm), sin desestimar los demás atributos agronómicos y de calidad. Sin duda, una línea que muestra inestabilidad en calibre, o que muestra estabilidad, pero no manifiesta un rendimiento que supere los testigos, debería ser inmediatamente descartada.

- D) Ordenar los rendimientos y calibres de cada línea de mayor a menor y dividir la secuencia en cuatro cuartiles, tomando en cuenta el promedio del primero y del último cuartil. Esos dos puntos determinan una recta, permitiendo comparar las rectas de cada uno de los genotipos de la serie de ensayos, en términos de estabilidad (pendientes de la rectas) y de ordenada al origen (indicativo de mayores rendimientos, calibres o cualquier otro carácter en ambientes de menor calidad, Figura 3.7.8). Este es el método llamado de “estabilidad no paramétrico”, utilizado en el Instituto de

Genética “Ewald A. Favret” en la década de 1980 (Hugo Savio, comunicación personal, método no publicado) y utilizado en el Programa de Mejoramiento de Cervecería y Maltería Quilmes S.A. desde la misma década y actualmente en uso.

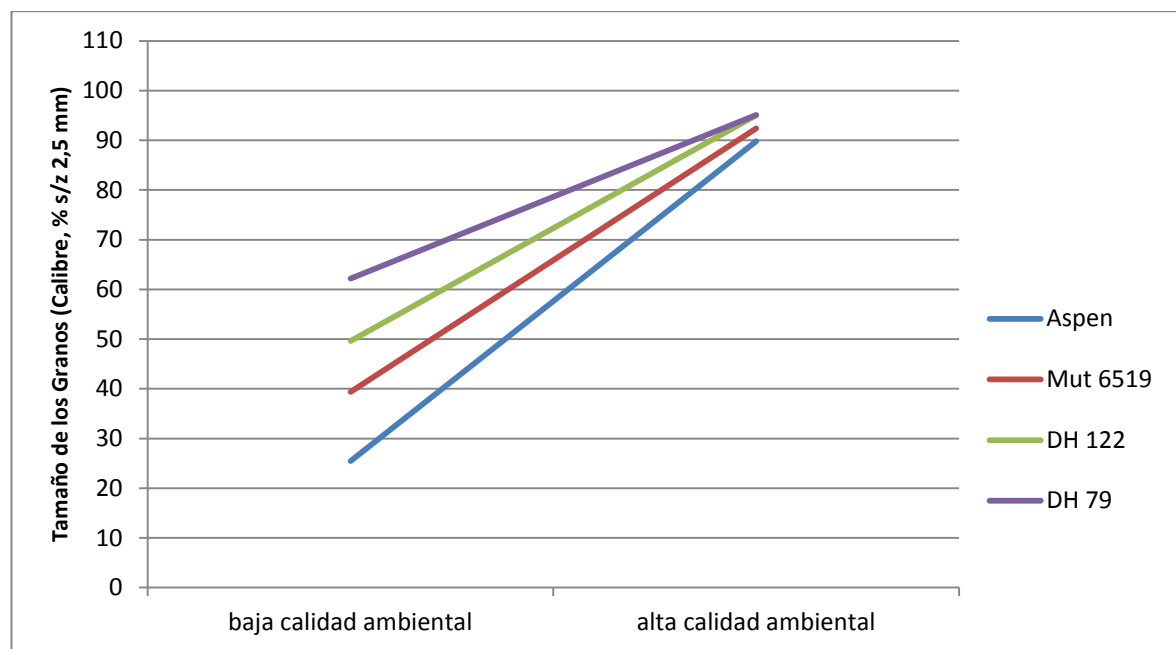


Figura 3.7.8 Método no paramétrico del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” como estimador de la estabilidad de los genotipos a través de los ambientes

En este ejemplo, a los genotipos considerados en el método anterior se agregó el DH 79 que sería más estable debido a una menor pendiente de la recta, y al tener un mejor calibre promedio en los ambientes de menor calidad. Con respecto a rendimiento (kg/ha), esta línea tuvo una pendiente de 1,045 ($R^2 = 0,96$), demostrando mayor inestabilidad que la línea DH 122 y que Mut 6519. Teniendo en cuenta que en el ranking de rendimiento promedio estuvo en la posición 81, casi idéntico al DH 122, si se considerara solamente estos dos atributos (rendimiento promedio y estabilidad), el DH 122 sería seleccionado y el DH 79 sería eliminado. Si se incluyera en la decisión la estabilidad de calibre, DH 79 sería el seleccionado. Pero nuevamente, a estas informaciones hay que agregar los resultados de todos los caracteres evaluados, para la selección global. Estos gráficos y la inclusión de pocas líneas sirven como ejemplos de metodología de selección, no significando una decisión final de resultado de selección.

- E) Método de estabilidad basado en la regresión entre el \log_{10} de los promedios de rendimiento y el \log_{10} de la varianza de cada genotipo (Döring et al., 2015). La figura 3.7.9 muestra la regresión entre los \log_{10} de los promedios y las varianzas de los calibres. Se observa que a medida que los promedios de calibres aumentan, disminuye la varianza. Esto significa que a mayores calibres promedio, la variabilidad entre ambientes es menor, aspecto relacionado directamente con la estabilidad del carácter.

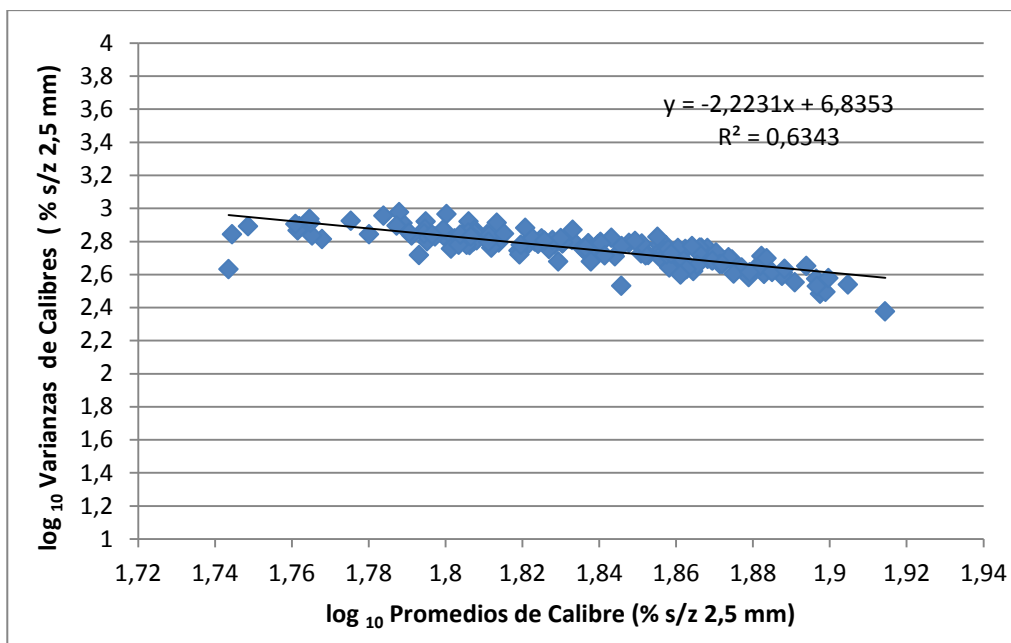


Figura 3.7.9 Método de estabilidad basado en los logaritmos decimales de los promedios y varianzas de calibre.

Tomando los mismos ejemplos que en los métodos anteriores (Finlay y Wilkinson y no paramétrico), los valores de \log_{10} de promedios y varianza de calibres se detallan en la Tabla 3.7.6.

Tabla 3.7.6. Valores de \log_{10} de promedios y varianzas de calibre de las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y de los DH 79 y 122.

Genotipo	Log ₁₀ Promedio	Log ₁₀ Varianza	Orden Calibre	Orden Varianza
DH 79	1,914421105	2,375106212	1	1
DH 122	1,878905609	2,582348045	2	2
Mut 6519	1,837860784	2,678184847	3	3
Aspen	1,790514791	2,85196255	4	4

El orden de ambas variables utilizadas en este método es igual al método no paramétrico, es decir, DH 79 como el promedio de calibre más alto y la varianza más baja, mientras que para el cv. Aspen resulta lo contrario. Con respecto al método de Finlay y Wilkinson, los valores de pendiente y R^2 de cada línea de regresión se encuentran en la tabla 3.7.7.

Tabla 3.7.7. Valores de pendiente de la regresión y el coeficiente R^2 entre el índice ambiental y los valores de calibre de las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y de los DH 79 y 122.

Genotipo	Pendiente	R^2	Orden Pendiente	Orden Ajuste
DH 79	0,5829	0,7221	1	1
DH 122	0,8148	0,8757	2	3
Mut 6519	0,9151	0,8859	3	4
Aspen	1,0486	0,7795	4	2

El orden de las pendientes (de más baja a más alta) es el mismo que los dados en los métodos no paramétrico y logarítmico.

Para el caso de rendimientos, el método logarítmico muestra gráficamente que las varianzas se incrementan a medida que aumenta el rendimiento promedio (Figura 3.7.10).

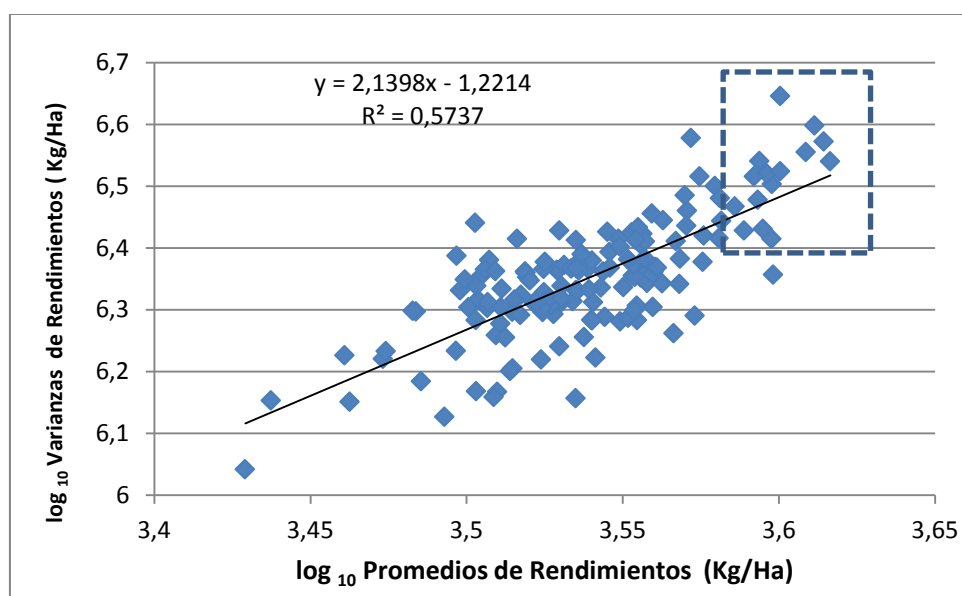


Figura 3.7.10. Método de estabilidad basado en los logaritmos decimales de los promedios y varianzas de calibre. El rectángulo de línea punteada indica la zona del gráfico de mayor rendimiento y mayor varianza.

La Tabla 3.7.8 muestra los valores de \log_{10} de promedios y varianzas de rendimiento de cuatro ejemplos, en la que se observa que Aspen fue el genotipo de mayor rendimiento y también mayor varianza, mientras que el parental Mut 6519 tuvo el rendimiento promedio más bajo y una varianza menor que Aspen.

Tabla 3.7.8. Valores de \log_{10} de promedios y varianzas de calibre de las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y de los DH 79 y 122.

Genotipo	Log ₁₀ Promedio	Log ₁₀ Varianza	Orden Rendimiento	Orden Varianza
DH 79	3,5357353	6,37047761	3	3
DH 122	3,53558027	6,33096625	2	1
Mut 6519	3,50928706	6,36260254	4	2
Aspen	3,57190631	6,57773615	1	4

La figura 3.7.11 representa la relación de rankings de logaritmos de base 10 del promedio de rendimiento y de la varianza. Como en la figura 3.7.7 se observa que a mayor rendimiento (ranking más bajo) las varianzas son mayores (mayor concentración de puntos en los rankings de varianza más altas).

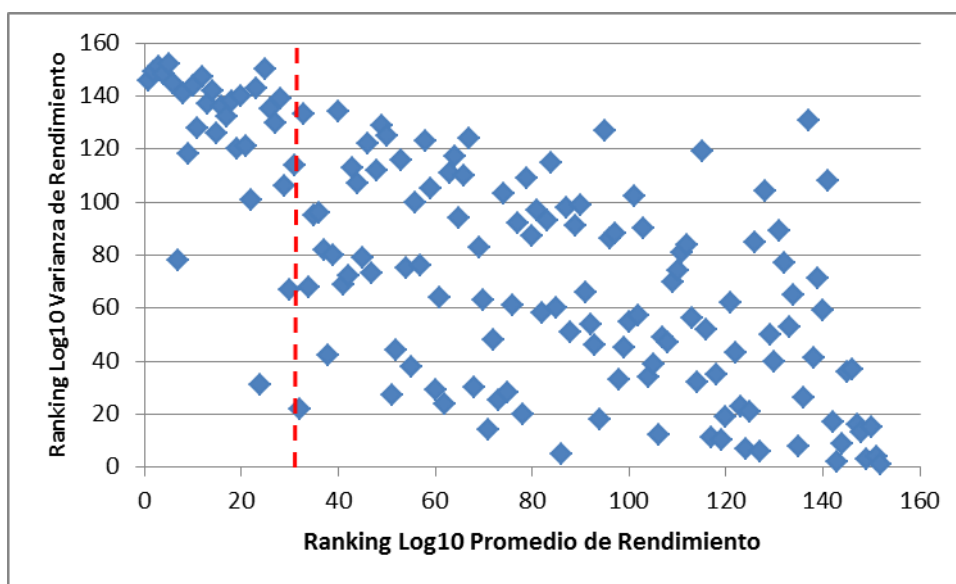


Figura 3.7.11. Relación entre los rankings de Log10 de los promedios de rendimiento con las varianzas.

Desde el punto de vista de la selección, considerando solamente rendimiento, los genotipos seleccionados entre los 152 del total de la población serían los DHs 97, 127 y 138, por mayor rendimiento (se fijó hasta el orden 30) y menor varianza (hasta el orden 80).

Tabla 3.7.9. Resultado de la selección de rendimientos basadas en el método de logaritmos.

DH	log10 promedio rendimiento	ranking	log10 varianza	ranking
97	3,59814482	7	6,35661292	78
127	3,5730698	24	6,29025194	31
138	3,56812265	30	6,34170777	67

La figura 3.7.12 representa la relación de rankings de logaritmos de base 10 del promedio de calibre (% de granos retenidos sobre zaranda de 2,5 mm) y de la varianza. Se observa que a mayor calibre (ranking más bajo) las varianzas son menores (mayor concentración de puntos en los rankings de varianza más bajas), siendo esto contrario a lo que ocurre con rendimiento.

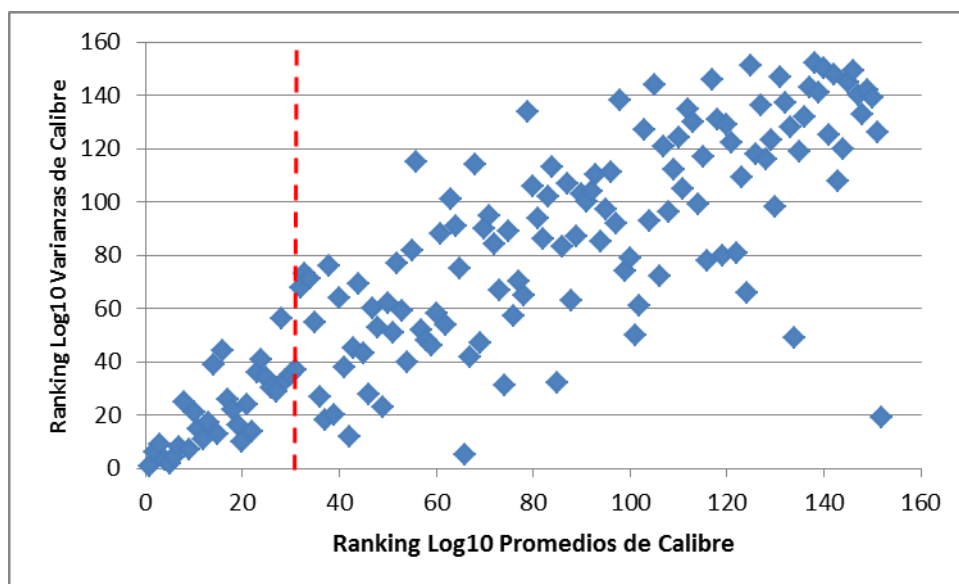


Figura 3.7.12. Relación entre los rankings de Log10 de los promedios de calibre (s/z 2,5 mm) con las varianzas.

En este caso, se tomó como ejemplo de selección los 30 DHs que tuvieron mayor porcentaje de calibre, y solamente 10 DHs con los valores de varianza más bajos. La tabla 3.7.10 muestra el resultado de ese criterio de selección, observando que los DHs 79 y 122 se encontrarían seleccionados también por este método, no así la variedad Aspen y la línea Mut 6519.

Tabla 3.7.10. Resultado de la selección de calibres (s/z 2,5 mm) basada en el método de logaritmos.

DH	log10 promedio calibre	ranking	log10 varianza	ranking
79	1,91442111	1	2,37510621	1
51	1,89754318	5	2,48315896	2
52	1,89889254	4	2,49472271	3
125	1,89670312	6	2,52810864	4
26	1,90476393	2	2,53772226	6
82	1,89091496	9	2,5514135	7
23	1,89654652	7	2,57405802	8
56	1,89969382	3	2,57825972	9
122	1,87890561	20	2,58234804	10

Estos métodos y criterios de selección se complementan con el resto de los caracteres (resistencias, calidad), en sucesivos ciclos de elección y descarte hasta llegar al resultado final.

Ejemplificando solamente con rendimiento y calibre, las mejores combinaciones de rendimiento y estabilidad (menor nivel de varianza) fueron las correspondientes a los DHs 97, 138 y 127. Para calibre, el DH 127 tuvo un orden de calibre de 84 y de 113 de varianza. Dichos valores son muy altos para que este DH sea seleccionado, a pesar del buen nivel y estabilidad de rendimiento. El DH 138 en cambio, estuvo en los puestos 39 y 20 de promedio y varianza de calibre, valores muy convenientes desde el punto de vista de la selección (Tabla 3.7.11)

Tabla 3.7.11. Resultado de la selección de calibres (s/z 2,5 mm) basada en el método de logaritmos, posterior a la selección por rendimiento (Kg/Ha).

DH	log10 promedio calibre	ranking	log10 varianza	ranking
138	1,86277142	39	2,63248077	20
97	1,86616915	34	2,76051382	71

3.8. Discusión

La disponibilidad de agua es reconocida como uno de los factores más limitantes en las regiones mediterráneas. En muchas áreas, las lluvias se distribuyen de manera inadecuada y heterogénea durante la estación de crecimiento (Vahamidisa et al., 2017). Los ambientes explorados en esta tesis tienen dichas características. Como respuesta al déficit hídrico, en las plantas se desencadenan varios procesos fisiológicos (Chaves et al., 2009). Desde un punto de vista agronómico, el estrés por sequía que ocurre durante la etapa reproductiva (temprana y tardía) puede reducir el rendimiento por el efecto que ejerce en sus componentes (Saini y Westgate, 2000). Además, desde el punto de vista industrial, la sequía puede afectar los caracteres de calidad, como por ejemplo, el tamaño de los granos y el nivel de proteína (Bertholdsson, 1999). Se ha demostrado que el estrés por sequía durante el período de llenado de los granos causa un efecto negativo en el peso y en el tamaño de los mismos, en principio debido a una reducción en la duración de la fase de llenado (Savin y Nicolas, 1999), y probablemente también por una tasa de llenado menor (González et al., 2008). En los gráficos de temperatura de suelo de cada ensayo (irrigado y no irrigado) de las Figuras 3.3.3.4 y 3.3.3.5 se observa una mayor temperatura en el sector no irrigado. Desde el estado Zadocks 3.0 (momento en el que se detuvo el riego en el sector no irrigado), el rango de temperaturas a 7'' (17,7 cm) de profundidad en el sector no irrigado estuvo entre 18°C y 23,4 °C, mientras que en el sector irrigado, el rango fue 17°C a 22,3°C. Si bien no hubo medición de temperatura de canopeo en estos ensayos, cabría esperar que un suelo que tiene una mayor temperatura sea componente de un ambiente general más cálido. Sin embargo, pese a un mayor estrés (medido por un potencial agua del suelo más negativo) y a una posible mayor temperatura del cultivo, lo que podría haber reducido el período de llenado por acumulación más rápida de la suma térmica de la fase, se observó que los promedios de calibre de la población no tuvieron diferencias significativas (promedios de 93,12% y 93,25%, $p=0,695$). Esto podría deberse a la diferencia de rendimiento entre los ensayos irrigado y no irrigado (promedios de 5965 y 4530 kg/ha, $p < 0,000$), al tener una cantidad menor de granos para llenar (31,7% menos de granos en el ensayo no irrigado con respecto al irrigado), es probable que los recursos del ambiente hayan alcanzado para un llenado normal.

García del Moral et al. (1995) y Arisnabarreta y Miralles (2008) concluyeron que en el período pre-antesis se determinan, por un lado, una gran proporción del número de espigas por unidad de superficie, y por otro, la cantidad de granos por espiga. Estos dos componentes, que juntos determinan el número total de granos por unidad de superficie, y el peso de los mismos, son la base del rendimiento en cebada y otros cereales. Peso y tamaño de los granos es determinado fundamentalmente durante el período post-antesis (Ugarte et al., 2007). Calderini et al. (1999, 2001) determinaron que las temperaturas en pre-antesis y el tamaño de los carpelos en trigo pueden modificar el peso final de los granos mientras que las temperaturas promedio y máximas en post-antesis no explicaron el peso final.

En la iniciación floral el meristema apical comienza la diferenciación de estructuras florales hasta que se alcanza el número máximo de primordios (estado Zadocks 3.0). De allí en más, algunas de las espiguillas iniciadas no progresan suficientemente para producir una espiguilla fértil, proceso conocido como “aborto de espiguillas”. De ambos procesos, iniciación floral y aborto de espiguillas, el último parece resultar más relevante que el primero en determinar el número final de granos por espiga (García del Moral et al., 2002).

Grashoff y D'Antuono (1997) sometieron un cultivo de cebada a sombreados durante diferentes etapas. De todos los tratamientos realizados, el tratamiento S3 (inicio de encañazón a espigazón) redujo significativamente el número de granos por unidad de superficie, principalmente porque hubo 35% menos de granos por espiga. García del Moral et al. (1991) encontró que la pérdida de primordios de flores desde primordio de lemma hasta antesis fue del 28% en genotipos de ciclo medio y 26% en genotipos precoces y esta proporción estuvo condicionada por factores ambientales. La competencia por fotosintatos entre el crecimiento de las estructuras florales y el tallo produjo aborto de primordios de espiguillas (García del Moral et al., 2002).

Basado en los resultados anteriores, parece claro que el componente de rendimiento más afectado en el ensayo no irrigado fue el número de granos por unidad de superficie, teniendo en cuenta que hasta el estado Z3.0 ambos ensayos tuvieron el mismo tratamiento de agua (reserva en el suelo y precipitaciones), y que el tamaño de los granos no mostró diferencia entre estas dos situaciones.

La importancia de este tipo de ensayos radica en que permite evaluar en forma más clara la influencia de la disponibilidad de agua sobre los genotipos. Dicha disponibilidad resulta ser la única variable ambiental, ya que el suelo y las demás variables climáticas son iguales para ambas situaciones. En los ensayos descriptos en las Tablas 3.3.4 y 3.4.4, las correlaciones de resultados de rendimiento y calibre entre los ambientes fueron bajas a muy bajas, incluso cuando dichas correlaciones se calcularon con los datos de ambientes ubicados en los mismos cuartiles (Dr. Gustavo Slafer, sugerencia y aporte personal). Quizás esa falta de correlación se deba a que los estreses no son del mismo tipo, es decir, que en un determinado sitio podría haber estrés por sequía, mientras que en otros sitios el estrés por sequía podría estar potenciado por temperaturas más altas, por ejemplo.

Los valores de correlaciones entre los ensayos irrigado y no irrigado fueron altos: 0,892 ($R^2=0,795$) para rendimiento y 0,673 ($R^2=0,453$) para calibre. Sin embargo, se observa que hay un 20% para rendimiento y un 55% para calibre que no fue explicado por el potencial de los genotipos (suponiendo que dicho potencial se lograra para las condiciones de suelo y clima en el ensayo irrigado). Dentro de ese porcentaje no explicado se encuentra el error experimental y quizás la interacción cultivar*disponibilidad de agua, dados por la manera en que el estrés podría

afectar en más o en menos a cada genotipo, por ejemplo, por diferencias de ciclo (incluso pequeñas).

Esta situación podría ser la base de la explicación de la baja correlación entre ambientes. Si aún en situaciones donde solo los genotipos y la disponibilidad de agua son las variables fijas, se encontraron proporciones de la varianza que no dependen de la variable irrigación, resultaría lógico pensar que el cambio de ambiente (sitio/año) trajo aparejadas otras variables fuera de control.

Una cuestión que en general pretende orientar el mejoramiento de las especies para situaciones de estrés es el tipo de ambiente donde realizar la selección. Los sitios sin estrés muestran los genotipos que tienen mayor rendimiento y calidad potencial. Los sitios con estrés, los que resisten esas situaciones, dando rendimientos y calidades aceptables. En ambientes mediterráneos, como ocurre en una parte muy importante de la zona de producción de cebada de Argentina, son necesarios los cultivares que puedan resistir situaciones de estrés pero que a su vez expresen alto rendimiento cuando las condiciones ambientales son favorables.

Varios trabajos sugieren que el rendimiento, en ambientes limitados en agua, fue determinado principalmente por el potencial inherente de rendimiento. Esto puede explicarse considerando que los objetivos principales de selección (alto índice de cosecha en trigo y cebada, “stay green” en maíz y sorgo, resistencia a plagas y enfermedades, eficiencia de uso de nitrógeno, entre otros), son igualmente beneficiosos en condiciones tanto secas como húmedas y, a menudo, los mejores comportamientos por estos caracteres sobrepasan las diferencias debido a la adaptabilidad a la sequía. De todas maneras, hay ejemplos donde la selección por resistencia a estrés fue efectiva en mejorar rendimiento en ambientes limitados (Bänziger et al., 1999; Morgan, 2000). Los progresos adicionales dependerán de la introducción de caracteres que mejoren la tolerancia a sequía en genotipos de alto rendimiento, reduciendo así la brecha entre el máximo potencial y el obtenido en ambientes secos. Esta meta podría ser alcanzada por la identificación y la subsecuente manipulación de genes relacionados con la tolerancia, que puedan ser incorporados mediante selección asistida y/o transformación.

En un ambiente mediterráneo típico, los años con una buena disponibilidad hídrica alternan con años en los cuales ocurren sequías terminales, como así también, años con sequía temprana durante el crecimiento vegetativo y floración, como se comentó anteriormente para las zonas de producción de cebada de Argentina. En condiciones de sequía moderada, caracterizadas por rendimientos de cebada de 2 a 5 tn/ha, la selección por rendimiento frecuentemente conduce a mejoras de rendimiento en condiciones de estrés (Araus et al., 2002). En estos casos los mejoradores seleccionan plantas caracterizadas por alto rendimiento y alta estabilidad, atribuido esto último a una mínima interacción genotipo-ambiente ($G \times A$). Esto implica que los caracteres que maximizan productividad, normalmente expresados en ausencia de estrés, pueden también sostener una mejora significativa de rendimiento bajo condiciones moderadas de sequía (Slafer et al., 2005; Tambussi et al., 2005). Un ejemplo es el éxito de variedades de trigo y arroz mejorados en CIMMYT y IRRI, donde mediante la selección en ambientes libres de estrés se identificaron genotipos con alto rendimiento en un amplio rango de condiciones, incluyendo regiones con bajo potencial (Trethowan et al., 2002). La razón fundamental de esta estrategia está sostenida por varios estudios donde el rendimiento de grandes conjuntos de cultivares fueron evaluados en campos paralelos bajo regímenes de agua diferentes, posibilitando así la comparación directa del comportamiento en condiciones de sequía e irrigado. Cuando 89 genotipos de cebada, representando una muestra del germoplasma desarrollado en Europa, fueron evaluados en el sur de Italia en condiciones de riego y secano, se identificaron ocho genotipos con alto potencial y mínima interacción $G \times A$. Ellos estuvieron entre los mejores en

tratamientos irrigados y no irrigados y, aunque con rendimientos considerablemente menores en ausencia de irrigación suplementaria, sus rendimientos fueron superiores en todas las condiciones ensayadas (Rizza et al., 2004). Las viejas variedades se caracterizaron por bajos rendimientos en condiciones de secano y por una mínima habilidad de incrementar el rendimiento cuando el agua estaba disponible. Por otra parte, los cultivares modernos mostraron rendimientos más altos en secano y fuertes incrementos en respuesta a la irrigación. Se encontró una correlación altamente significativa ($r = 0,73^{***}$) entre rendimientos en condiciones de secano y de riego (Rizza et al., 2004), sugiriendo que en un ambiente mediterráneo típico, la selección basada en el rendimiento absoluto de los genotipos a través de los ambientes fue más exitoso que la selección por el mínimo detrimento de rendimiento bajo estrés con respecto a la condición favorable.

Notablemente, entre los genotipos con mayor capacidad de rendimiento hubo una gran predominancia de variedades seleccionadas en regiones usualmente no afectadas por estrés, demostrando que la selección hecha en ambientes favorables tiene además un efecto positivo cuando las plantas son cultivadas en ambientes con estrés. Un experimento incluyendo 46 genotipos de remolacha azucarera, representando diferentes fondos genéticos, realizado en condiciones de sequía e irrigados, condujeron a resultados similares (Ober et al., 2004). Las variedades que tuvieron alta capacidad de rendimiento cuando fueron irrigadas, también rindieron bien en sequía ($r = 0,64^{***}$), mientras que aquéllas con una mínima pérdida de rendimiento bajo estrés no pertenecieron al grupo de alto rendimiento en ambas condiciones, irrigado y secano.

La temperatura de canopeo (TC) es una medición indirecta del estado hídrico del cultivo, ya que situaciones de alta demanda atmosférica sin un adecuado abastecimiento de agua a las raíces tiene como consecuencia una elevación de temperatura de las hojas por cierre estomático. En una población de 167 RILS de trigo del cruzamiento Seri x Babax, Olivares et al. (2007) tomaron TC en condiciones de sequía, en estados vegetativo y reproductivo, antes y después del mediodía, y encontraron valores de R^2 entre TC y rendimiento entre 0,61 y 0,68. En esta tesis, los valores de R^2 encontrados fueron mucho más bajos (por ejemplo, $R^2 = 0,0565$ en Cabildo 2009, Figura 4.5.5). En el trabajo de Olivares, los rangos de TC en cada medición fueron bajos, entre 2°C y 3,5°C. Basado en eso, se tomaron conjuntos de datos de TC de 2°C, por ejemplo, en el ensayo Puán 2008 de alta demanda atmosférica, y se los relacionó con el rendimiento y calibre obtenidos en los genotipos que estuvieron dentro de esos rangos (27 a 29°C, 29 a 31°C, 31 a 33°C), no encontrando relaciones entre ellos. También se analizó por cuartiles (dentro de un mismo ensayo), dando en el promedio del cuartil más bajo de TC un promedio de 28,8°C con 2701 Kg/ha de promedio de rendimiento, y en el cuartil de TC más alto, 32,28°C con 2823 kg/ha, confirmándose así la falta de relación entre ambas variables.

Es probable que la TC no guarde relación con el llenado de granos, ya que aun habiendo condiciones de cierre estomático en algunos momentos del día (las mediciones se hicieron en horas de mayor demanda atmosférica), el resto de las horas de fotosíntesis efectiva haya sido suficiente como para llenar normalmente los granos. También, en la población se registró una variabilidad de tamaño de los granos que no dependió solamente de la intensidad de llenado, es decir, diferencias observadas aún en condiciones no limitantes. Por esta razón, la utilización de la temperatura de canopeo como herramienta de selección para rendimiento y calibre, en ambientes con y sin limitaciones hídricas, parece limitada al menos en las condiciones de ambientes y población analizados en este trabajo.

Teniendo en cuenta varios trabajos en los que se relacionó el rendimiento de trigo con la depresión de temperatura de canopeo (Amani et al, 1996, Reynolds et al., 1994, Fisher et al., 1998), se realizaron diversas regresiones entre rendimiento y calibre con DT, no encontrándose relaciones sólidas que pudiesen explicar las diferencias de resultados debido a esas diferencias. Observando los resultados y las condiciones ambientales presentadas en dichos trabajos, existen diferencias ambientales entre las ensayadas por esos autores y las condiciones que se presentaron en esta tesis. Por ejemplo, en el trabajo de Amani et al (1996), las DT encontradas para trigos irrigados y en condiciones de alta demanda atmosférica estuvieron entre 5,7 y 7,7°C a las 14.00 horas. En condiciones de buena disponibilidad hídrica, por ejemplo, en el ensayo de La Dulce 2007, la DT promedio fue de 4,63°C, con diferencias entre genotipos de 1,9°C. Es decir, valores bastante más bajos que los documentados en los trabajos mencionados. Además, en La Dulce la demanda atmosférica no es tan alta como en ensayos realizados en México. Por otra parte, en un ambiente de alta demanda (Puan 2008) la DT promedio fue 1,03°C, con diferencias entre genotipos de 6,2°C entre la mayor y la menor DT, pero en este caso, las condiciones fueron de muy baja disponibilidad hídrica, condiciones poco comparables a las mencionadas en los trabajos detallados anteriormente.

Considerando también los trabajos en los que se encontraron correlaciones positivas entre apertura de estomas o conductividad estomática con rendimiento de trigo (Fisher et al., 1981, 1998), y que la depresión de temperatura de canopeo estuvo positivamente correlacionada con la conductividad, se relacionaron las TC del ensayo de Puan 2008 (2ª. medición), con el tamaño de los granos (calibre sobre zaranda 2,5 mm) del cuartil de menores calibres, ya que sería posible suponer que los genotipos más sensibles a las condiciones de estrés (manifestado por tener igual o mayor TC que la temperatura del aire), tuviesen menor conductividad estomática y con ello mayor restricción a la fotosíntesis actual, lo que perjudicaría el llenado de los granos, resultando calibres más chicos. Sin embargo, esto no se mostró así suponiendo que podría haber efectos compensatorios, por ejemplo, por mayor tasa de llenado durante el período de intercambio gaseoso normal, o un llenado de granos suficiente durante las horas de menor demanda atmosférica, pero estas especulaciones escapan al objetivo de esta tesis y deberían ser estudiados con objetivos específicos.

Con respecto a la respuesta a fotoperíodo, se detectaron relaciones entre las pendientes de respuesta a fotoperíodo y precocidad con calibre, no así con rendimiento. El grado de asociación con calibre fue significativo y por ello podría tomarse en cuenta para ambientes en que el llenado de los granos sería afectado por limitaciones hídricas terminales. Sin embargo, analizando las relaciones entre calificación por ciclo (scores de 1 a 9, tomados por el mejorador de acuerdo a su criterio), y promediando los rendimientos y tamaños de grano, las relaciones entre estos caracteres con ciclo fueron más evidentes, aunque cada grupo de ciclo no tuvo la misma cantidad de cantidad de genotipos, con lo cual, las conclusiones deberían tomarse con cuidado. En el caso de la comparación entre los ciclos 5, 6 y 7, con cantidad similar de genotipos, solamente se detectó diferencia significativa entre los grupos 6 y 7 (7 es más precoz que 6) en rendimiento, pero el resto de las comparaciones fueron no significativas. Existe una alta variabilidad de resultados para cada grupo (Figura 3.6.10), con lo cual, a los fines de selección por rendimiento y calibre, el ciclo evaluado en fechas de siembra óptimas y la respuesta a fotoperíodo, no resultaron ser efectivas. Además de la conveniencia de ubicar el período de llenado en condiciones de temperaturas templadas, y que la posibilidad que eso ocurra está dada por el ciclo a floración, no solamente las condiciones de post-antesis definen el tamaño y peso de los granos (Ugarte et al., 2007), sino que también lo hacen las temperaturas en el período de pre-antesis y el tamaño potencial de los carpelos (Calderini et al., 1999, 2001).

En cebada cervecera, la precocidad es uno de los caracteres que se asocian con tamaños de grano adecuados para la industria, debido a la velocidad de llenado y que dicho llenado se realice en condiciones de temperaturas adecuadas para cereales de invierno. La respuesta a fotoperíodo es uno de los componentes que genera mayor precocidad a partir de una determinada fecha de siembra. La combinación de genes Ppd-H1 y Ppd-H2 de respuesta a fotoperíodo (Laurie, 1994) con genes de precocidad “per se” como Eam 5, eam 7, Eam 1 y otros (Tsuchiya, 1985) condiciona la longitud de ciclo de los cultivares. En esta tesis se observó una interacción entre la sensibilidad al fotoperíodo y la fecha de siembra ya que se observó un cruce de pendientes de respuesta fotoperiódica la que se produjo aproximadamente en una fecha de siembra posterior al 20 de junio (Figuras 3.6.1 y 3.6.2). De este modo, los genotipos de mayor respuesta fueron más precoces a partir de esa fecha. Teniendo en cuenta que las fechas de siembra de los ensayos se concentraron en la primera semana de julio, las líneas con mayor respuesta a fotoperíodo habrían expresado mayor precocidad.

Tanto la temperatura de canopeo (TC) como la respuesta a fotoperíodo (RF), si bien resultan tener un fundamento teórico que avalaría su relación con el peso de los granos, en la práctica de selección de líneas homocigotas dicha relación no se observa claramente. Posiblemente, la causa de esta observación sea la variabilidad genética generada a partir del cruzamiento, en la que se expresan no solamente las diferencias en TC y en RF, sino también aquellas relacionadas con otros caracteres, como por ejemplo, el número potencial de granos o el tamaño de los carpelos. En la Figura 3.4.3.2 se observa que la regresión entre el ensayo irrigado y no irrigado dio un coeficiente $R=0,45$, valor altamente significativo pero que muestra el nivel de variabilidad que no tiene explicación en una regresión simple, con el único cambio de la disponibilidad de agua a partir de un determinado momento. Quizás, si fuese posible aplicar el corte de riego a todos los genotipos exactamente en el mismo estadio ontogénico, la relación de resultados entre irrigado y no irrigado sería mucho más alta. Pero tal prueba podría hacerse solamente con pocos genotipos y con sistemas de riego de aplicación individual por parcela, que no es el caso en las condiciones normales de selección en el campo.

Aplicando el mismo razonamiento anterior, cuando se toma la TC en un momento determinado (por ejemplo, en el estado Z83 del cultivar Aspen), la variabilidad de ciclos en la población podría afectar la relación entre este carácter y el rendimiento y el peso de los granos, ya que el impacto de una alta TC sería quizás diferente dependiendo del momento de ocurrencia. También existe una cuestión, que es el tiempo de ocurrencia de alta TC. En todos los casos, y de acuerdo a las recomendaciones de uso de la herramienta dada por Blum (2009), la TC se tomó en horas de máxima demanda atmosférica. Es posible también pensar que fuera de esos períodos, el llenado de los granos ocurre de manera normal y que el tiempo de menor demanda resulte suficiente para un llenado adecuado, dando pesos de granos con mayor influencia de otras características del genotipo que de la TC.

La utilización de métodos de análisis de estabilidad tiene como objetivo la selección de genotipos que posean buen rendimiento, tamaño de grano y calidad industrial en condiciones de sequía (u otros tipos de estreses) como así también en condiciones de alto potencial. La observación gráfica de las variables en ambientes de alto y bajo potencial, y la magnitud en que los resultados varían a través de ellos, permite obtener las conclusiones necesarias para una industria que requiere seguridad de abastecimiento en cantidad y calidad.

Mediante el análisis de datos climáticos, representados en cuatro localidades de una zona de producción de cebada de alta importancia estratégica para Argentina (cuatro malterías y dos

puertos de cereales ubicados en la zona explorada), es fácilmente observable la variabilidad de precipitaciones que existe entre zonas y años.

Los trabajos de Slafer et al. (2005) y Tambussi et al. (2005) muestran que la selección por alto rendimiento en ambientes sin limitaciones podría resultar beneficiosa también en situación de estrés. Siguiendo esa idea, los métodos de estabilidad muestran gráficamente, de manera muy sencilla para seleccionar, los genotipos de mayor potencial en los mejores ambientes y aquellos que aún en condiciones más limitantes, penalizan menos su rendimiento. Independientemente de las razones fisiológicas de tal comportamiento, lo más importante es detectar aquellos genotipos con las características mencionadas para producir en zonas donde la variabilidad climática es la condición habitual.

Por el contrario, los Índices de Resistencia a Sequía publicados (Blum, 2011; Fischer and Maurer, 1978; Rosielle y Hamblin, 1981) no se consideran aptos para ser utilizados en las condiciones de Argentina, ya que estos índices relacionan rendimientos potenciales con aquellos logrados en condiciones de sequía, favoreciendo aquellos genotipos que tienen menores rendimientos máximos.

En la sección de Resultados se mencionaron solamente algunos ejemplos para rendimiento y tamaño de los granos. Además de estos caracteres, estos métodos podrían aplicarse perfectamente para las determinaciones de calidad, ya que para el abastecimiento de cebada como materia prima para las industrias de malterías y cervecerías, resulta fundamental el volumen necesario con un nivel de calidad que sea afectado lo menos posible por condiciones climáticas adversas.

3.9 Conclusiones

Los cuatro años de evaluación en esta tesis, 2008 a 2011, fueron muy diferentes en cantidad de precipitaciones durante el ciclo del cultivo. Considerando el período Julio- Noviembre de cada año y en cada localidad, el año con menor cantidad de lluvias fue 2008, mientras que el año más lluvioso fue 2011. Un patrón similar a la distribución anual se observó en el mes de Noviembre, mes de desarrollo y llenado de los granos de cebada, mostrando así la variabilidad climática entre sitios y años que puede ocurrir en la zona de producción de cebada cervecera.

El efecto de la variabilidad ambiental se observó por el promedio de rendimientos de la población de DHs, siendo el máximo en La Dulce 2008 con 6190 Kg/ha y el mínimo en Puan 2009 con 885 Kg/ha, y por el tamaño promedio de los granos, con calibres entre 93,5% en Puan 2011 y 15,4% en Puan 2009.

En los mejores ambientes, la media de rendimiento de los genotipos parentales se ubicó entre la media de la población de DHs y los rendimientos más altos. Contrariamente en los ambientes de menor potencial, la media de los parentales se ubicó por debajo de la media de la población. Esto significa que en los ambientes con mayor limitación, la media de rendimiento de la progenie fue superior a la media de cada parental.

En el análisis de varianza, dentro de cada sitio el factor “años” aportó más a la variabilidad que los factores “genotipo” y “interacción GxA”.

Los coeficientes de correlación entre los rendimientos unitarios de cada sitio experimental, siendo estadísticamente significativos, fueron bajos como para considerar similitudes entre ambientes. El coeficiente r máximo fue 0,582 (La Dulce 2008 con Tres Arroyos 2ª. época 2010).

Las correlaciones entre promedios de cuartiles ordenados por rendimientos promedio fueron más altas que entre ambientes particulares dentro de un mismo cuartil (máximo $r = 0,57$ entre cuartiles 1 y 2, mínimo $r = 0,19$ entre cuartiles 2 y 4), todos estadísticamente significativos.

El calibre promedio de Aspen y Mut 6519 no mostraron diferencias significativas en ambientes de calibre promedio igual o mayor a 80% (Aspen = 86%, Mut 6519 = 88,4%). En los ambientes cuyos promedios fueron iguales o menores a 79%, el calibre promedio de Aspen fue 53% y el de Mut 6519 fue 61,8%.

Para calibre y en cada localidad el componente de varianza “años” aportó mayor variabilidad que los factores “genotipos” e “interacción GxA”.

Se detectaron algunas correlaciones altas en calibre entre pares de localidades (Tres Arroyos 2ª. época 2008 con Cabildo 2008, $r = 0,70$, TA208 con Puan 2008, $r = 0,82$, PU08 con CAB08, $r = 0,77$), todas ellas en ambientes con limitaciones de agua.

Los ambientes del cuartil de calibres más bajos corresponden a los años 2008 y 2009.

En el ensayo irrigado, Aspen fue el genotipo de mayor rendimiento (8772 Kg/Ha), superando a la otra línea parental (5639 Kg/Ha) y a toda la población derivada del cruzamiento Mut 6519*Aspen. En seco, Aspen ocupó el ranking 29 (5639 Kg/Ha), superando también en esta condición a Mut 6519, que ocupó el ranking 67 (4894,2 Kg/Ha).

La regresión entre los valores unitarios en el ensayo irrigado (considerando dicho ensayo como rendimiento potencial para esa condición suelo/clima y sin limitaciones de agua) y no irrigado (condición de déficit hídrico) dio un coeficiente $R^2 = 0,795$.

Las correlaciones entre los rendimientos de estos ensayos y todos los ambientes ensayados de Argentina fueron bajas, con un valor máximo del coeficiente $r = 0,3$ ($p = 0,000$) entre el ensayo no irrigado y Puan 2009.

Para calibre, los valores promedio de las líneas con irrigación tuvieron correlaciones muy bajas con los resultados de los ambientes de Argentina (valor r máximo = 0,28 con Tres Arroyos 1ª. época 2008, $p = 0,001$), mientras que en el ensayo no irrigado en el mismo sitio, la única correlación significativa fue también con TA 1 2008, cuyo valor $r = 0,17$, $p = 0,037$

La regresión entre los valores unitarios en el ensayo irrigado (considerando dicho ensayo como tamaño de grano potencial) y no irrigado (condición de déficit hídrico) dio un coeficiente $R^2 = 0,45$. Es decir, que en dos situaciones cuya única diferencia ambiental fue la disponibilidad de agua, existió un 55% de la variación que no se explica por el tamaño potencial de los granos.

No se observó correlación entre las mediciones de temperatura de canopeo, realizadas en un sitio con déficit de precipitaciones (Puan 2008) tomadas en todos los genotipos, en los estados Z73 y Z83 del cultivar Aspen, mostrando así las diferencias en reacción a las demandas atmosféricas de diferentes estados fenológicos, al momento de realizar las lecturas.

Tampoco se observó correlación entre las TC tomadas en el mismo estado Z83 del cultivar Aspen, en dos ambientes sin restricción de agua (Tres Arroyos 2007 y La Dulce 2010).

Para la población de DHs analizada en el ensayo de Puan 2008, la explicación del tamaño de grano por la TC fue baja ($R^2 = 0,04$), conclusión lógica ya que el tamaño de los granos se define por otros aspectos además de un período de llenado más o menos largo debido a temperaturas más bajas o altas. Para otro sitio con déficit de agua (Cabildo 2009) el coeficiente R^2 entre TC y rendimiento fue 0,046.

Aspen fue el genotipo con menor respuesta fotoperiódica de todos los participantes (pendiente -0,6305 días/día), mientras que el DH 88 tuvo la mayor respuesta (pendiente -0,9793 días/día), mayor incluso que Mut 6519, el parental caracterizado como de alta respuesta a fotoperíodo (pendiente = -0,9096 días/día).

De los 150 DHs de la población, 19 DHs tuvieron pendientes mayores y 131 DHs tuvieron pendientes menores que Mut 6519, mostrando así una influencia mayor de Aspen sobre Mut 6519 en la reducción de la respuesta a fotoperíodo.

La correlación entre el primer cuartil de mayores pendientes y el promedio general de calibre de las líneas de ese grupo fue significativa ($r = 0,365^{**}$), mientras que con el promedio de rendimientos fue no significativa ($r = 0,065$).

El cuartil de mayor respuesta fotoperiódica dio un promedio general de calibre de 71,8%, mientras que el promedio de calibre de las líneas con la menor respuesta (cuartil de menor pendiente) fue 66,6%.

En el sitio Tres Arroyos 2008, en dos fechas de siembra separadas 33 días, las correlaciones entre pendiente de fotoperíodo y calibre fue 0,471*** y 0,321*** respectivamente.

Se observó una tendencia negativa de rendimientos y positiva de tamaño de los granos hacia ciclos más precoces, aunque con valores de R^2 bajos cuando se relacionaron los rendimientos de todos los genotipos con el score de ciclo correspondiente. Sin embargo, los promedios de rendimiento y calibre por grupos de scores de ciclo, dieron valores de R^2 muy altos, $R^2 = 0,83$ para rendimiento y $R^2 = 0,86$ para calibre.

Los índices de resistencia a la sequía (o a ambientes limitantes en general), no demostraron ser eficaces para seleccionar simultáneamente por alto potencial de rendimiento en ambientes sin limitaciones, con los máximos rendimientos posibles en ambientes con limitaciones.

Los métodos que estiman la estabilidad de los genotipos a través de los ambientes (como el método de Finlay y Wilkinson, el método no paramétrico, y el método de logaritmos de rendimientos y varianzas) resultan ser efectivos para seleccionar aquellas líneas con alto potencial de rendimiento en ambientes favorables, y que a su vez tienen un comportamiento aceptable en situaciones de déficit, en este caso, de precipitaciones.

Siendo esta la característica de la principal zona de producción de cebada de Argentina (variabilidad de precipitaciones entre sitios y años), la selección basada en estabilidad es la

forma más conveniente para desarrollar variedades con mayor seguridad de cosecha y abastecimiento.

4. RESULTADOS DE CALIDAD INDUSTRIAL

En este capítulo se detallan los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de los materiales, previa enumeración de las hipótesis y objetivos expuestos en la Introducción.

4.1 Hipótesis 2

Las variaciones ambientales generan diferencias de calidad industrial, afectando el porcentaje de proteína de los granos de cebada, y otros parámetros de calidad de la malta obtenida.

Objetivo 1: Evaluar los resultados de calidad industrial en diversas situaciones ambientales.

Objetivo 2: Analizar el contenido de proteína del grano y los factores que lo afectan.

Objetivo 3: Evaluar conjuntamente caracteres de calidad aparentemente relacionados, con el fin de buscar correlaciones que permitan disminuir el número de determinaciones analíticas para seleccionar eficientemente.

4.2 Proteína de Cebada

Los promedios de proteína obtenidos en cada sitio experimental (ambientes) se encuentran detallados en la Tabla 4.2.1.

Tabla 4.2.1: Promedios, máximos y mínimos de proteína de la población de doble haploides y sus parentales en cada sitio experimental o ambiente

PROTEINA (% sustancia seca)					
	Promedio DH	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 2007	13,1	12,6	13,8	11,4	14,9
TA 1 2008	14,1	14,5	16,0	11,4	16,3
TA 2 2008	15,5	14,6	15,8	14,3	17,9
LD 2008	13,7	13,3	14,3	11,6	15,5
Cabildo 2008	12,7	13,1	14,0	10,8	15,4
Puán 2008	15,7	17,1	17,7	14,1	17,7
TA 1 2009	16,3	17,8	17,9	14,4	19,0
TA 2 2009	16,6	18,1	19,4	14,4	19,4
LD 2009	14,6	14,6	16,3	13,1	17,4
Puán 2009	16,8	18,7	17,6	14,4	19,4
TA1 2010	13,4	11,8	15,8	11,7	15,8
TA 2 2010	12,6	10,7	13,7	10,4	14,5
LD 2010	12,5	11,7	12,0	11,1	15,3
Cabildo 2010	16,4	15,1	17,3	14,9	18,0
Puán 2010	13,3	14,9	17,1	11,4	17,1
TA 1 2011	14,4	13,6	15,4	11,4	16,8
LD 2011	13,7	13,4	15,1	11,4	15,2
Puán 2011	10,3	8,4	9,2	8,2	12,3
Promedio General	14,2	14,1	15,5	12,2	16,5

El rango de promedios de proteína obtenidos en los ensayos realizados fue muy amplio, desde 10,33% a 16,70%. Como ejemplos, los histogramas de la Figura 4.2.1 muestran los resultados de los dos ambientes extremos (Puán 2009 y Puán 2011) y la posición de los genotipos parentales de la población, el cultivar Aspen y la línea Mut 6519. Estos dos genotipos tuvieron comportamientos diferentes con relación al resto de las líneas: en el ambiente con mayor nivel de sequía, las líneas parentales estuvieron a la derecha del histograma (mayor porcentaje de proteína), mientras que en la situación de mejor ambiente, dichas líneas se ubicaron a la izquierda de la distribución, es decir, que la mayor parte de las líneas de la población resultaron con mayor nivel de proteína. Este es un comportamiento interesante a la hora de planificar los cruzamientos y seleccionar las líneas segregantes, es decir, cómo van a distribuirse las líneas en función del comportamiento de los padres en estos ambientes.

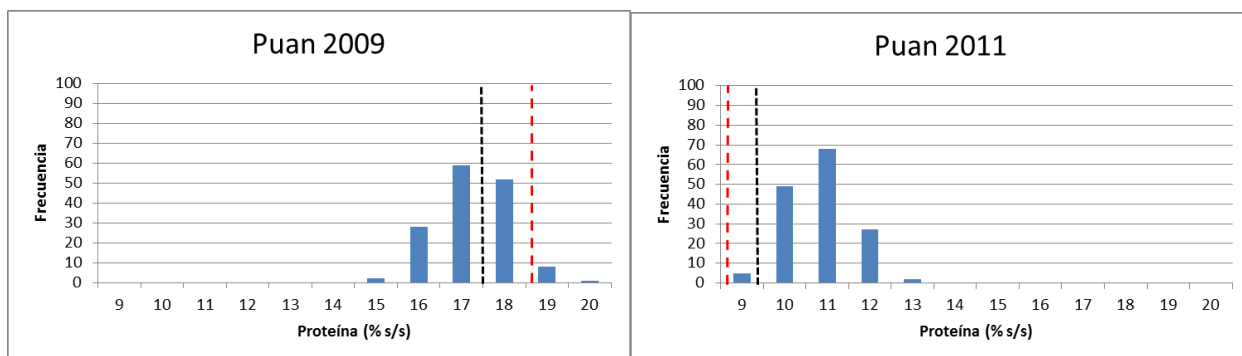


Figura 4.2.1: Distribución de frecuencias de Proteína de Cebada en los ensayos Puán 2009 y Puán 2011. Línea roja cultivar Aspen, línea negra, Mut 6519

La Figura 4.2.2 muestra los promedios mensuales de precipitaciones y temperaturas medias en los ambientes Puán 2009 y Puán 2011, comparados entre sí y con el promedio histórico.

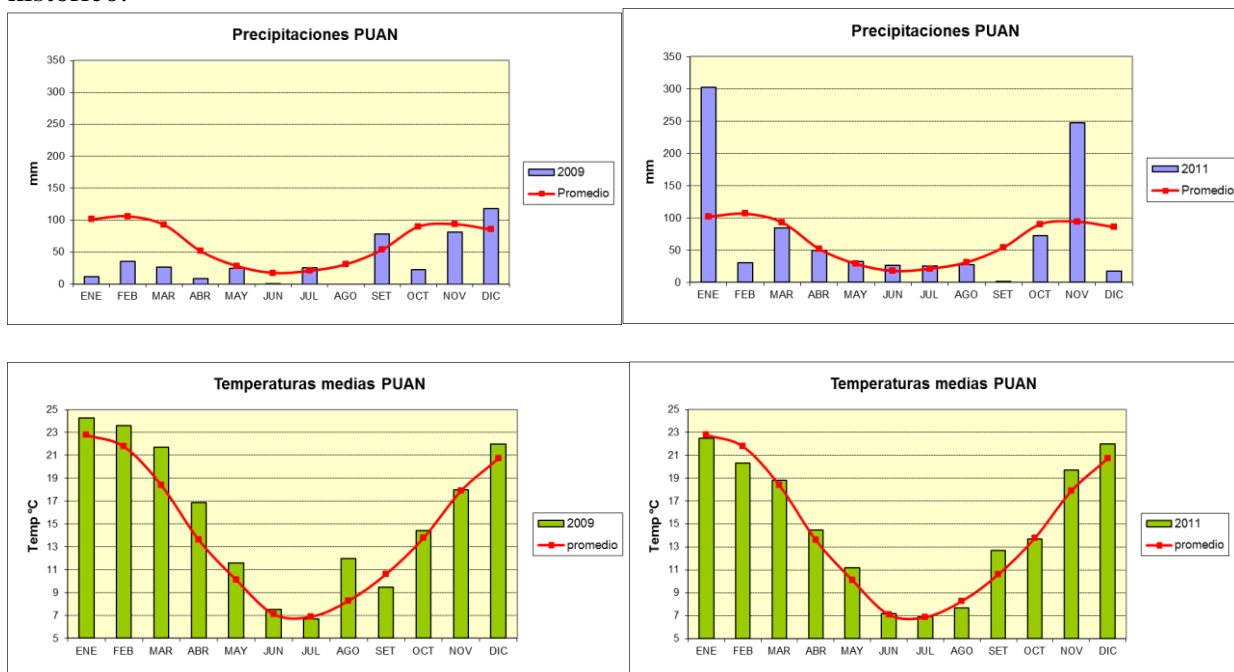


Figura 4.2.2: Precipitaciones mensuales y temperaturas medias registradas en Puán 2009, Puán 2011 y promedio histórico.

Se observa la menor cantidad de precipitaciones de Puán 2009 durante el ciclo del cultivo (fundamentalmente en noviembre y agosto) como así también, una anomalía de temperatura media en el mes de agosto de 2009. Teniendo en cuenta la relación inversa entre rendimiento y proteína, el promedio de rendimiento del ensayo Puán 2011 fue 3130 kg/ha, mientras que en Puán 2009 fue 881 kg/ha. Las condiciones de cultivo limitantes en Puán 2009 podrían haber ocasionado un menor crecimiento vegetativo por déficit de agua y un acortamiento de fase por temperaturas significativamente mayores en el mes de agosto.

En otro par de ambientes contrastantes (La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2009-1), se observó una situación similar a la comentada anteriormente (Figura 4.1.3).

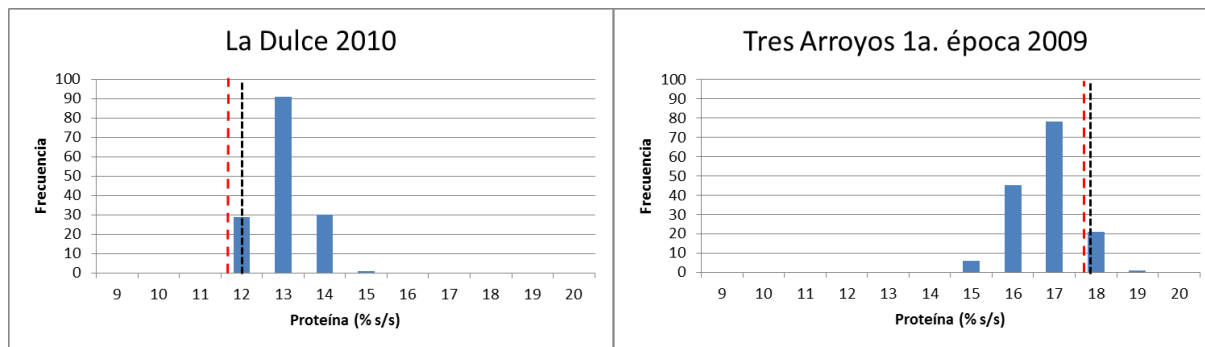


Figura 4.2.3: Distribución de frecuencias de Proteína de Cebada en los ensayos La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2009 1ª época de siembra. Línea llena cultivar Aspen, línea punteada, Mut 6519

Teniendo en cuenta la división en cuartiles del carácter “tamaño de los granos” (Calibre, % s/z 2,5 mm) y aplicando dicha división a los promedios de proteína, en la tabla 4.2.2 se observa que, a excepción de Cabildo 2010 (primer cuartil), los ambientes cuyos resultados estuvieron en el cuarto cuartil para tamaño de los granos son los que resultaron también con los niveles de proteína más altos, debido a la relación negativa entre cantidades de almidón y proteína acumulados (Savin y Aguinaga, 2011). No obstante, la regresión entre calibre y proteína dentro del cuarto cuartil para calibre, aunque significativa ($F = 6,63$, $p = 0,011$) fue muy baja ($R^2 = 0,042$). El rendimiento promedio en Cabildo 2010 fue muy bajo, 1296 kg/ha, seguramente causado por el déficit de precipitaciones registradas en todo el ciclo del cultivo que, a excepción del mes de octubre, todos los meses estuvieron por debajo del promedio histórico (Figura 3.2.1). Con un bajo nivel de formación de biomasa durante el período vegetativo y la etapa reproductiva temprana, es probable que haya quedado nitrógeno disponible en el suelo que se absorbió tardíamente en el cultivo, siendo los granos su principal destino. Con una menor cantidad de granos para desarrollar (por bajo rendimiento), es probable también que las precipitaciones de octubre y noviembre hayan alcanzado para un llenado normal.

Tabla 4.2.2 Promedios de Proteína en Granos, ordenados y clasificados de acuerdo a los cuartiles de Tamaño de los granos. Verde: primer cuartil, Amarillo: segundo cuartil, Naranja: tercer cuartil, Rojo: cuarto cuartil

PROTEINA (% sustancia seca)	
	promedio
Puán 2011	10,3
LD 2010	12,5
TA 2 2010	12,6
Cabildo 2008	12,7
TA 2007	13,1
Puán 2010	13,3
TA1 2010	13,4
LD 2008	13,7
LD 2011	13,7
TA 1 2008	14,1
TA 1 2011	14,4
LD 2009	14,6
TA 2 2008	15,5
Puán 2008	15,7
TA 1 2009	16,3
Cabildo 2010	16,4
TA 2 2009	16,6
Puán 2009	16,8

En el caso de La Dulce 2008, que fue el ambiente de mayor rendimiento promedio, fue clasificado en el segundo cuartil para tamaño de los granos y en el segundo cuartil para proteína, con un promedio de 13,7% que excede lo establecido como tolerancia en las normas de comercialización. La causa de este exceso podría explicarse por dos aspectos, genético y ambiental. En cuanto al primero, en dicho ambiente el rango de proteína estuvo entre 11,6% y 15,5% (Tabla 4.2.1). El rendimiento explicó el 14% de la variable proteína, es decir, que la conocida relación inversa entre rendimiento y proteína también aquí fue estadísticamente significativa ($F=24,38$, $p=0,0000$), pero el rendimiento como tal aportó un nivel muy bajo de explicación de la variable proteína (Figura 4.2.4). Sin duda, existirían otros factores que sumados incrementarían el nivel de explicación; como ejemplo, en la regresión múltiple x_1 : rendimiento, x_2 : calibre, y: proteína, $R^2=0,16$, $F=25,12$, $p=0,0000$, la variable calibre no aportó una proporción importante al resultado de proteína. El factor genético debería tener una influencia grande en la determinación del porcentaje de proteína, por caracteres como eficiencia de uso de nitrógeno, o partición del nitrógeno absorbido con destino a los granos o al resto de la planta (Savin y Aguinaga, 2011).

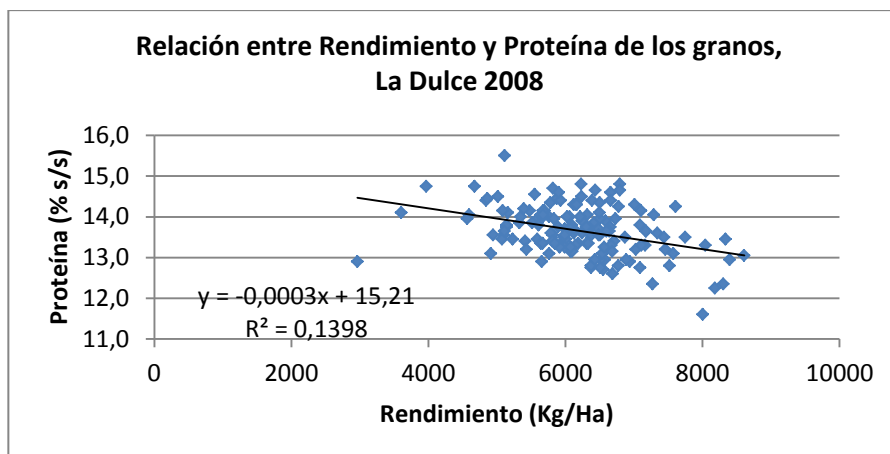


Figura 4.2.4 Relación entre Rendimiento (kg/ha) y Proteína de los granos (%), en el ambiente La Dulce 2008

Como factor ambiental, el contenido de materia orgánica del suelo donde se realizó el ensayo era alto, 4 a 5%, suelos profundos y con buen desarrollo, con alta capacidad de retención de agua (Sección Suelos de Materiales y Métodos). Además, en 2008 se registraron 300 mm de precipitaciones en el mes de marzo, en junio y julio fueron iguales al promedio histórico, y a partir de agosto hasta la cosecha, las precipitaciones siempre fueron menores al promedio, menos de 50 mm mensuales. La biomasa generada durante el período vegetativo y reproductivo fue muy alta (por el agua acumulada desde marzo), lo que se tradujo en una gran cantidad de granos formados (fue el ambiente de mayor rendimiento), aunque las precipitaciones no alcanzaron para lograr un llenado normal de los granos.

El análisis de regresión entre Rendimiento (Kg/Ha) y porcentaje de Proteína de la Cebada por cuartiles fue significativo, con dispersiones grandes para un mismo rendimiento. La Figura 4.2.5 muestra los promedios de las dos variables del primero y cuarto cuartiles. El primer cuartil (el de mayor rendimiento promedio) estuvo integrado por los ambientes Tres Arroyos 2007, Tres Arroyos 1ª. época 2008, La Dulce 2008 y La Dulce 2010. El cuarto cuartil estuvo representado por los ambientes Cabildo 2008 y 2010 y Puan 2009 y 2010.

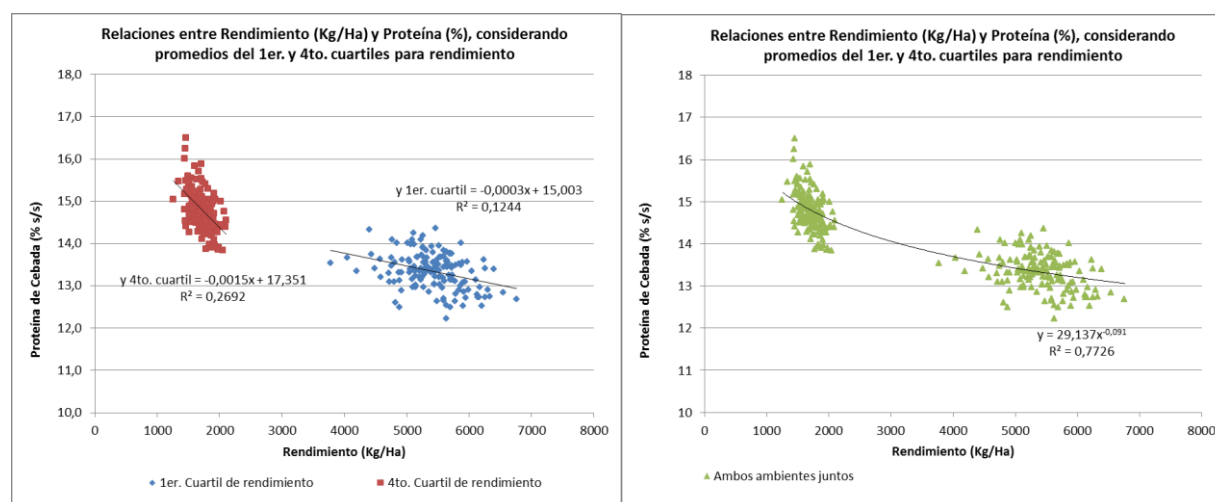


Figura 4.2.5. Relaciones entre promedios de Rendimiento (Kg/Ha) y Proteína de Cebada (% s/s) obtenidos del primer y cuarto cuartil para rendimiento.

Ambas regresiones fueron altamente significativas ($F = 21,32$ $p < 0,0000$ para el cuartil 1, y $F = 55,25$ $p < 0,0000$ para el cuartil 4). Si bien los valores F y R^2 del cuarto cuartil fueron más altos que los del primer cuartil, la dispersión de los valores de proteína para un mismo rango de rendimientos, fueron también mayores en el cuarto cuartil, es decir, la regresión es más significativa por la influencia de la pendiente y no por la distancia de los cuadrados medios a la línea de regresión. En el primer cuartil, considerando el rango 5398,7 – 5454,2 Kg/Ha, alrededor del promedio 5417,7 Kg/Ha, la dispersión de proteína fue 14,2% - 15,2%. En el cuarto cuartil, en el rango 1706,4 – 1724,5 Kg/Ha, la dispersión de proteína fue 14,1% - 15,9%, es decir una dispersión de 1,8% versus 1,0% del primer cuartil. El ajuste de ambos grupos de datos con una función potencial dio un valor de R^2 mucho más alto = 0,77.

El análisis de componentes principales se representa en el H-plot de la Figura 4.2.6. Las dos primeras componentes explicaron el 42% de la varianza total.

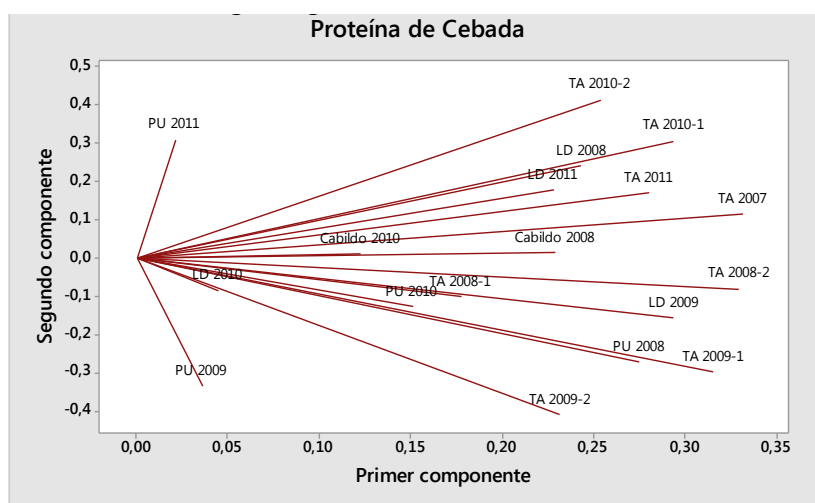


Figura 4.2.6: Gráfico H-plot de Proteína de Cebada, componentes 1 y 2.

Se observa que los vectores de Puán 2009 y Puán 2011 se encuentran en posiciones opuestas entre sí, y separados del resto de los ambientes. La segunda componente diferencia 2 grupos de vectores: uno con preponderancia de ambientes del año 2008 y 2009, y el otro grupo con preponderancia de los años 2010 y 2011. Esta distribución coincide con el ordenamiento de la Tabla 4.1.2, donde se observa mayor proporción de valores más altos de proteína en los años 2008 y 2009.

Continuando con los ejemplos de los años 2009 y 2011 en Puán, las líneas parentales de la población tuvieron resultados muy diferentes en rendimiento, calibre y proteína (Tabla 4.2.3).

Tabla 4.2.3. Resultados de Rendimiento, Calibre y Proteína de Cebada, Puán, años 2009 y 2011. Promedios de DH, Aspen y Mut 6519

	Puán 2009			Puán 2011		
	promedio	Aspen	Mut 6519	promedio	Aspen	Mut 6519
Rendimiento (kg/ha)	881,3	337,2	836,7	3130	3159,4	3013,9
Calibre (%)	15,4	10,8	14,8	93,5	92,1	94,7
Proteína de Cebada (%)	16,8	18,7	17,6	10,3	8,4	9,2

En las condiciones de Puán 2009, la variedad Aspen fue el parental más afectado, demostrado por un rendimiento y calibre menor al promedio y un nivel de proteína mayor al promedio. Ocurrió lo mismo con la línea Mut 6519, a excepción de un rendimiento mayor al promedio de la población.

En Puán 2011, los niveles de proteína de las líneas parentales fueron menores al promedio. En las condiciones de Puán 2009 un alto porcentaje de la población mostró menores niveles de proteína que los parentales. Por el contrario, en Puán 2011 los parentales tuvieron menores niveles de proteína comparado con la mayoría de los individuos de la población (Figura 4.2.1). Esta es una observación que merecería una investigación adicional, ya que a los fines comerciales e industriales, Aspen y Mut 6519 tienen un comportamiento para el contenido de proteína opuesto a lo que requiere la industria, es decir, mayor porcentaje de proteína en ambientes con estrés, y menores porcentajes en ambientes sin estrés, pero generando una progenie con mejores resultados en estos tipos de ambientes.

Tabla 4.2.4. Resultados de Rendimiento, Calibre y Proteína de Cebada, Tres Arroyos-1 2009 y La Dulce 2010. Promedios de DH, Aspen y Mut 6519

	La Dulce 2010			Tres Arroyos 2009-1		
	promedio	Aspen	Mut 6519	promedio	Aspen	Mut 6519
Rendimiento (kg/ha)	5568,0	5584,4	5525,4	3321,2	3091,8	3446,8
Calibre (%)	66,4	71,5	60,0	51,0	49,0	66,5
Proteína de Cebada (%)	12,5	11,7	12,0	16,3	17,8	17,9

En la Tabla 4.2.4 se presentan resultados de dos ambientes contrastantes (Tres Arroyos-1 2009 y La Dulce 2010), donde se observa una tendencia a menor nivel de proteína en los parentales en el ambiente más favorable (La Dulce 2010), y un mayor nivel en el ambiente más limitante (Tres Arroyos-1 2009). Es notable que en La Dulce 2010, con rendimientos muy similares entre Aspen, Mut 6519 y el promedio de la población, los porcentajes de proteína de los parentales están a la izquierda de la distribución de frecuencia de la población. Estos resultados muestran que la conocida relación inversa entre rendimiento y proteína se cumple solamente cuando se considera un mismo genotipo en un mismo ambiente, ya que diferentes genotipos pueden tener diferentes índices de cosecha de nitrógeno (relación de partición del nitrógeno que se destina a los granos con relación al resto de la planta), y así, con rendimientos similares, dos genotipos podrían tener diferente contenido de nitrógeno en los granos (Conry, 1997).

La Figura 4.2.7 muestra los valores de rendimientos promedios (y sus desvíos) y los promedios de porcentajes de proteína (y sus desvíos) de todos los ambientes. Para una visualización más clara, se ordenaron de mayor a menor los ambientes por rendimientos promedio. Se observa que una pendiente negativa de rendimiento, causada por el ordenamiento, se corresponde con una pendiente positiva de proteína, aunque con un ajuste a la recta de tendencia relativamente bajo ($R^2 = 0,18$)

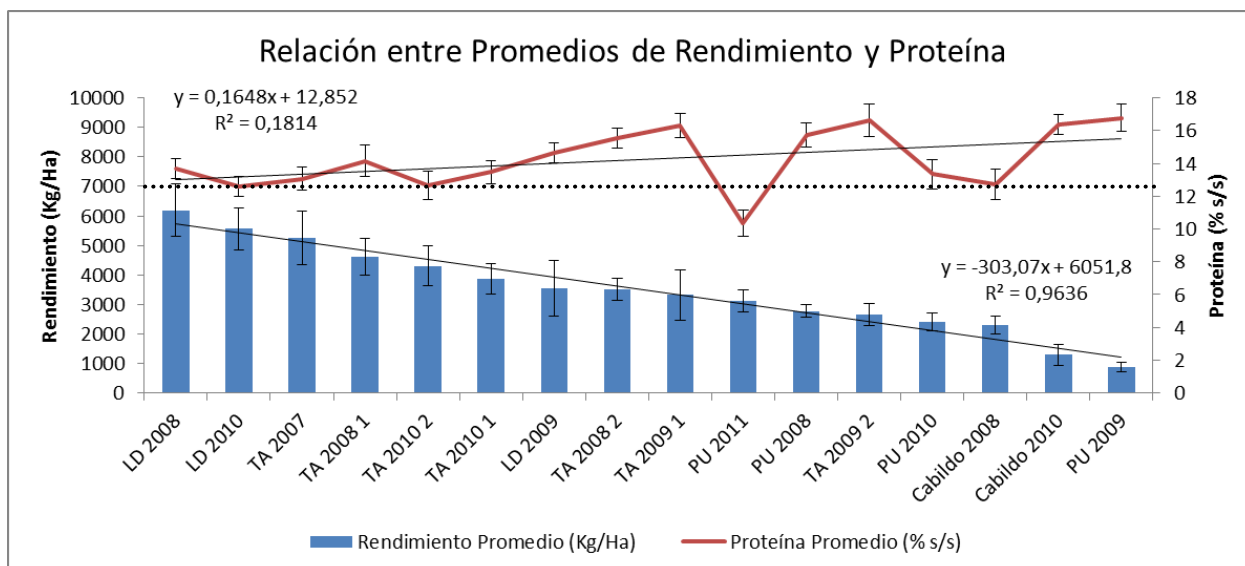


Figura 4.2.7. Valores promedios de rendimiento (en kg/ha) y proteína (% sobre sustancia seca) en cada sitio experimental. Se indica con línea de puntos el valor máximo de tolerancia comercial de proteína (12,5% s/s), y las líneas de ajuste por mínimos cuadrados de cada carácter.

La regresión entre rendimientos promedio y proteínas promedio de todos los ambientes resultó un valor no significativo ($R^2 = 0,22$, $p = 0,0633$, $n = 16$).

Finalmente, la Figura 4.2.8 indica el tamaño promedio de los granos (calibre, % sobre zaranda de 2,5 mm) con el porcentaje de proteína. En este caso, se ordenaron los ambientes por valores de calibre, de mayor a menor. Al igual que en la figura anterior los signos de las pendientes son también opuestos, con un ajuste a la recta de proteína de mayor magnitud que para el caso de rendimiento ($R^2 = 0,35$). La regresión entre calibres promedio y proteínas promedio de todos los ambientes resultó un valor significativo ($R^2 = 0,41$, $p = 0,0042$, $n = 18$).

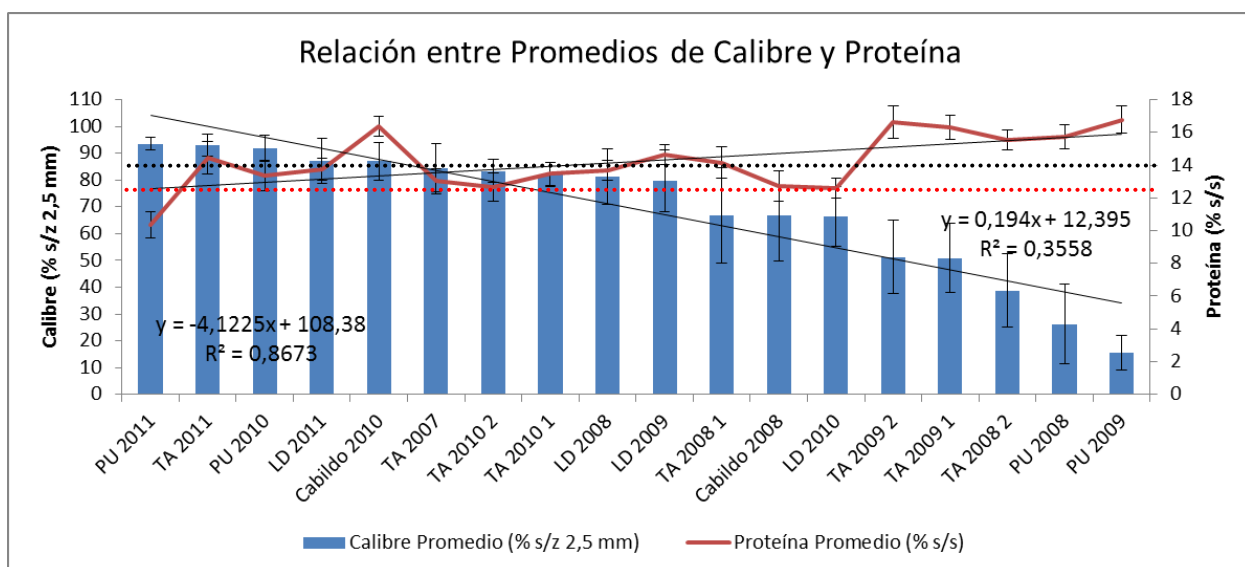


Figura 4.2.8. Valores promedios de calibre de cada sitio experimental (% en peso sobre zaranda 2,5 mm) y el valor promedio de proteína en los mismos sitios (% sobre sustancia seca). Se indica con línea de puntos el valor máximo de tolerancia comercial de proteína (12,5% s/s) (línea de

puntos roja), y de calibre (85% s/z 2,5 mm) (línea de puntos negra) y las líneas de ajuste por mínimos cuadrados de cada carácter.

4.3 Humedad a la Salida de Remojo

Registrar la humedad que los granos absorbieron durante la etapa de remojo tiene importancia por la relación que existe entre el rápido ingreso de agua y la velocidad de modificación del endosperma. Claramente existe un efecto genético (no todos los genotipos absorben la misma cantidad de agua en esta etapa) y otro ambiental (la diferencia de velocidad de absorción para un mismo genotipo en diferentes ambientes). Condiciones frescas durante el crecimiento de los granos tienden a producir endospermas de tipo harinoso, que facilita el ingreso de agua y la modificación, mientras que condiciones secas y cálidas tienden a producir endospermas con menor proporción de almidón (y como consecuencia, mayor de proteína), y por lo tanto más vítreos, afectando la velocidad de ingreso de agua (Mac Gregor, 1996). Además, teniendo en cuenta que cada genotipo y ambiente requiere un contenido de humedad diferente para alcanzar la completa modificación del endosperma (traducido en el cumplimiento de las especificaciones de malta), una menor absorción de agua durante el remojo implica mayor cantidad de riegos durante la etapa de germinación para alcanzar el contenido necesario de humedad.

Los promedios de humedad a la salida de remojo obtenidos en cada sitio experimental se encuentran detallados en la Tabla 4.3.1

Tabla 4.3.1: Promedios, máximos y mínimos de Humedad a la Salida de Remojo (%) en la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

HUMEDAD A LA SALIDA DE REMOJO (%)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 2007	42,1	43,4	41,7	39,0	45,2
TA 1 2008	42,3	45,4	41,2	38,0	46,4
LD 2008	40,7	42,7	40,7	36,3	44,2
Cabildo 2008	43,9	44,9	43,1	40,5	47,7
Puán 2008	42,7	45,7	43,7	39,9	47,2
TA1 2010	42,0	43,0	42,4	39,6	44,2
LD 2010	41,9	41,3	43,2	39,8	45,1
Cabildo 2010	43,8	42,4	44,9	39,4	46,7
Puán 2010	42,0	42,0	43,2	40,0	45,4
TA 1 2011	43,0	45,1	46,2	36,1	46,3
LD 2011	42,5	42,0	44,9	40,5	46,1
Puán 2011	43,5	42,6	43,6	42,2	45,8
Promedio General	42,6	43,4	43,2	39,3	45,9

De estos promedios se desprende que situaciones de ambientes contrastantes (Cabildo 2008 y Cabildo 2010) no siempre se reflejan en diferencias de velocidad de absorción de agua y que las líneas parentales (Aspen, considerada de mejor calidad industrial y Mut 6519 de menor

calidad) no tienen un comportamiento que se mantenga a través de los ambientes, es decir, Aspen absorbió más agua en alguno de los ambientes y Mut 6519 en otros.

La figura 4.3.1 representa los vectores definidos por las componentes principales 1 y 2 para este carácter.

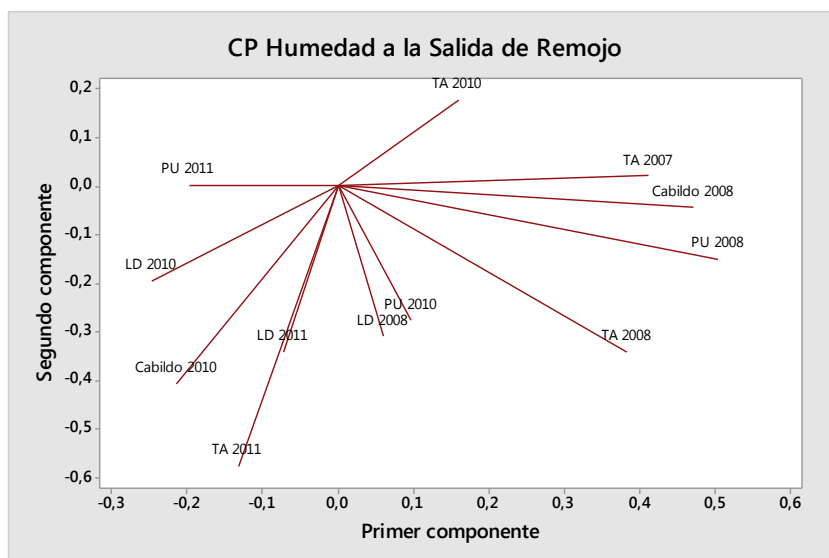


Figura 4.3.1: Gráfico H-plot de Humedad a la Salida de Remojo, componentes 1 y 2.

Los ambientes La Dulce 2011 y Tres Arroyos 2011 están muy correlacionados, aunque con una mayor variabilidad en TA 2011 (vector de mayor longitud sobre la CP 2), también observada en la tabla 4. 2.1 por los rangos de mínimos y máximos.

En la industria de elaboración de malta es comúnmente aceptado que los lotes de cebada con mayor nivel de proteína manifiestan menor capacidad de absorción de agua. Este tipo de afirmaciones de relaciones entre variables, como la relación rendimiento y proteína, y proteína y extracto, no tienen en cuenta la variabilidad genotípica y ambiental. La figura 4.3.2 muestra dos ejemplos de relaciones entre proteína y humedad a la salida de remojo. El primero corresponde a un ambiente sin déficit de agua (Tres Arroyos 2011), y el segundo, una situación con sequía (Tres Arroyos 1 2009).

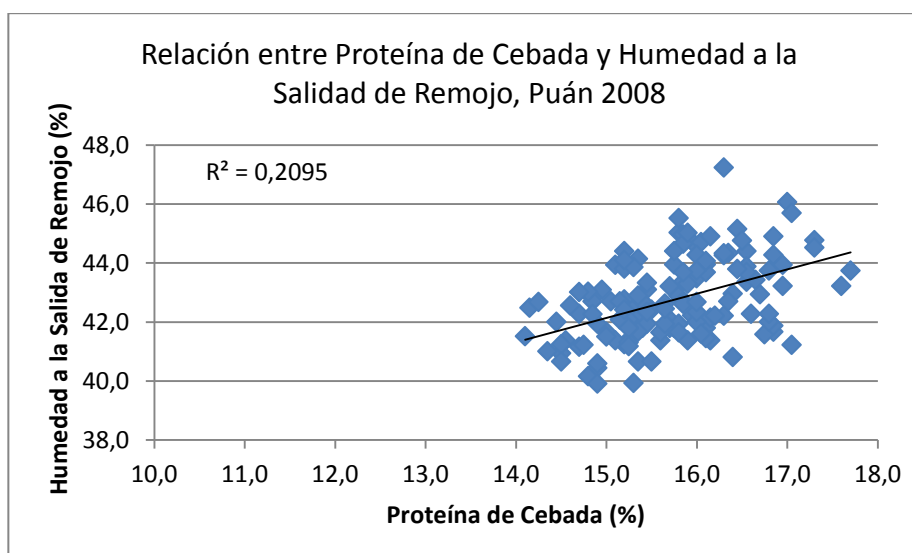
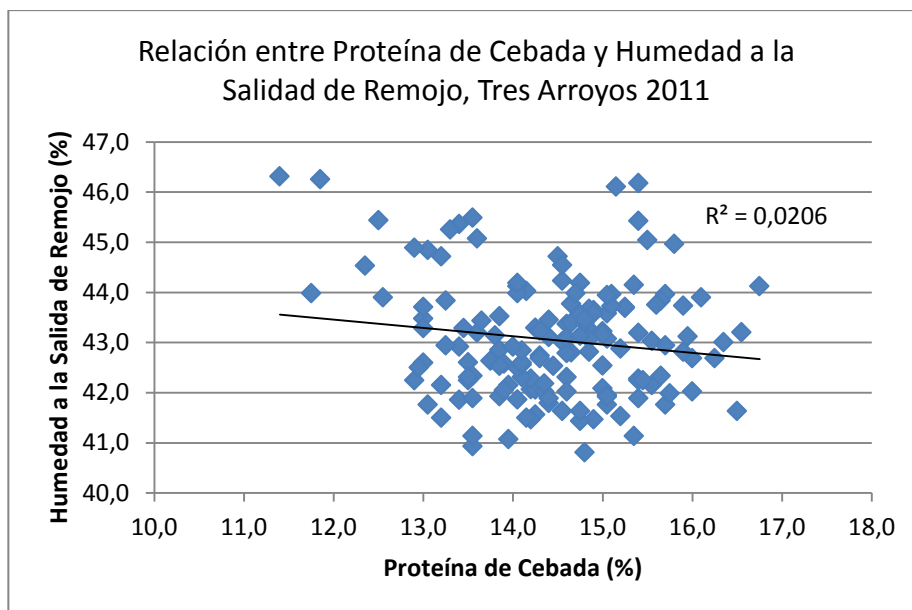


Figura 4.3.2.: Relación entre variables en ambientes contrastantes (Tres Arroyos 2011 y Puan 2008)

En Tres Arroyos 2011 (ambiente sin déficit de agua) no existió relación entre el agua absorbida y el porcentaje de proteína de cebada. En Puán 2008, con un valor R^2 de 0,20, la pendiente de la regresión es positiva, es decir, que a mayor nivel de proteína hubo mayor absorción de agua.

Suponiendo que el tamaño de los granos (calibre) pudiera tener un efecto en el ingreso de agua, por la diferencia en la superficie de exposición (granos más chicos tienen mayor superficie expuesta por unidad de volumen (superficie específica), se realizó una regresión múltiple con las variables “proteína” y “calibre” como independientes, y “humedad a la salida de remojo (HSR)” como dependiente.

En el ambiente Puán 2008 (sequía) todas las regresiones fueron altamente significativas ($p < 0,0000$), con valores de $R^2 = 0,21$ para la regresión “proteína/HSR”, $R^2 = 0,23$ para la regresión “calibre/HSR”, y $R^2 = 0,34$ para la regresión “proteína+calibre”/HSR”.

En Tres Arroyos 2011 (sin déficit) la regresión “proteína/HSR” fue no significativa ($p = 0,0785$), la regresión “calibre/HSR” dio un $R^2 = 0,095$ ($p = 0,0001$) y la regresión múltiple “proteína+calibre/HSR” llevó el R^2 a $0,103$ ($p = 0,0003$).

Para analizar las relaciones de proteína y calibre con HSR de un mismo genotipo (Aspen y Mut 6519) en diferentes ambientes, se realizaron las regresiones múltiples de estas variables tomando el promedio de cada sitio. La tabla 4.3.2 muestra los resultados del análisis.

Tabla 4.3.2: Relación entre Humedad a la Salida de Remojo (y) y promedios de Proteína (x_1), Calibre (x_2) de los genotipos Aspen y Muy 6519, en todos los ambientes

	R^2	p	ordenada al origen	pendiente
Aspen				
proteína (x_1)	0,1792	0,1703	39,456	0,2952
calibre (x_2)	0,4768	0,0129	45,976	-0,0386
(x_1, x_2)	0,4818	0,0519		
Mut 6519				
proteína (x_1)	0,0181	0,6763	41,906	0,0891
calibre (x_2)	0,0878	0,3497	41,306	0,0254
(x_1, x_2)	0,1491	0,4834		

Para Aspen, la regresión con calibre fue significativa, mientras que para proteína fue no significativa. Como en los casos anteriores, la pendiente (b) de proteína es positiva, es decir, se incrementa la HSR con mayores niveles de proteína, mientras que para calibre, la pendiente es negativa, es decir, los calibres más bajos dan mayor HSR, lo que coincide con la observación que menores tamaños de grano se humectan más rápidamente. La regresión múltiple “proteína+calibre/HSR” no incrementa la explicación dada solamente por el calibre.

Para Mut 6519, todas las regresiones, simples y múltiple, resultaron no significativas.

Se analizaron también las relaciones entre HSR y todas las determinaciones de calidad industrial de todos los ambientes, encontrándose valores de R^2 extremadamente bajos que resultados no significativos. La razón de ello es que en la etapa de germinación todas las muestras son corregidas a 45% de humedad, como se explicó en el Capítulo de Materiales y Métodos. De esa manera, todas las muestras alcanzan el valor de humedad de germinación necesaria para desarrollar su calidad potencial.

4.4 Dureza de malta

Esta determinación se refiere al momento (fuerza x distancia) realizado para moler una muestra de malta. Es indicativo de la disolución de la estructura física de los granos, compuesta por paredes celulares y matriz proteica, que deja libre los gránulos de almidón para ser descompuestos por las enzimas amilolíticas, generando azúcares fermentables. El proceso de descomposición de la estructura se denomina “desagregación” o “modificación” del endosperma. Una muestra de malta con adecuado nivel de modificación dará valores de dureza bajos (menor a 100 Newtonmetros), mientras que maltas parcialmente modificadas darán valores de dureza altos.

Debido a que la matriz proteica es un componente de la dureza de malta, existe una alta correlación entre estos dos componentes. Por lo tanto, en aquellos ambientes que se registraron valores de proteína altos (mayores a 12%), se registraron también valores altos de dureza.

Los promedios de dureza de malta obtenidos en cada sitio experimental se encuentran detallados en la Tabla 4.4.1. Se observó variación ambiental (promedio de los sitios y dispersión de máximos y mínimos) y variación genética, muy notables incluso entre las líneas parentales.

Tabla 4.4.1: Promedios, máximos y mínimos de Dureza de Malta (Nm) de la población de DH y sus parentales en cada ambiente.

DUREZA DE MALTA (Newtonmetros)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 2007	118,7	104,4	164,8	91,2	164,8
TA 1 2008	105,3	96,8	141,8	82,8	145,5
LD 2008	114,5	88,8	153,1	87,8	153,1
Cabildo 2008	105,4	94,4	140,1	76,5	144,6
Puán 2008	117,3	123,4	157,4	98,1	157,4
TA1 2010	135,5	119,5	144,4	101,7	176,6
LD 2010	144,0	144,0	144,4	74,9	202,0
Cabildo 2010	156,3	144,0	189,6	122,0	198,5
Puán 2010	127,9	131,9	194,7	99,7	194,7
TA 1 2011	114,5	118,4	157,7	85,0	157,7
LD 2011	119,0	104,9	152,0	92,4	159,5
Puán 2011	99,8	74,2	93,2	63,3	196,1
Promedio General	121,5	112,1	152,8	89,6	170,9

Para interpretar los resultados de dureza en cada sitio experimental, en la Figura 4.4.1 se observa la distribución de frecuencia de la población, ubicando la posición de las líneas parentales y del promedio. Los colores del cuadro de la izquierda indican el tipo de ambiente clasificado por tamaño de grano (verde: sin déficit de agua, rojo: alto déficit), y se agregó además el porcentaje de proteína de cebada en cada sitio.

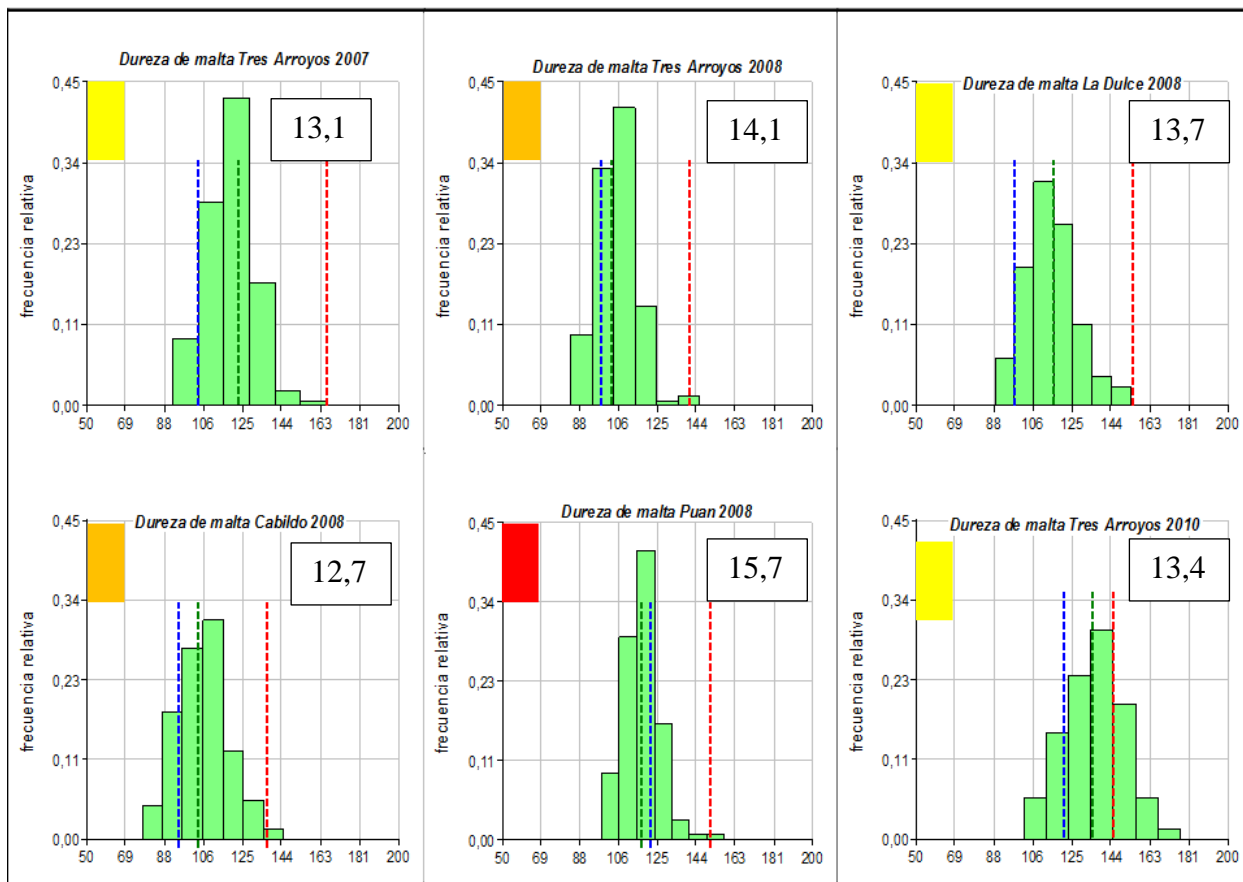
La primera observación que resalta es que la línea Mut 6519 tiene máxima dureza en casi todos los sitios, a excepción de Tres Arroyos 2010, La Dulce 2010 y Puán 2011 donde se ubica cercana al promedio.

Por el contrario, Aspen da siempre valores de dureza muy inferiores a Mut 6519. La progenie parece genéticamente más influenciada por este comportamiento de Aspen, ya que a excepción de los sitios mencionados, en todos los demás las líneas DH tienen valores de dureza más bajos que la línea Mut 6519.

----- Aspen

----- Mut 6519

----- Promedio



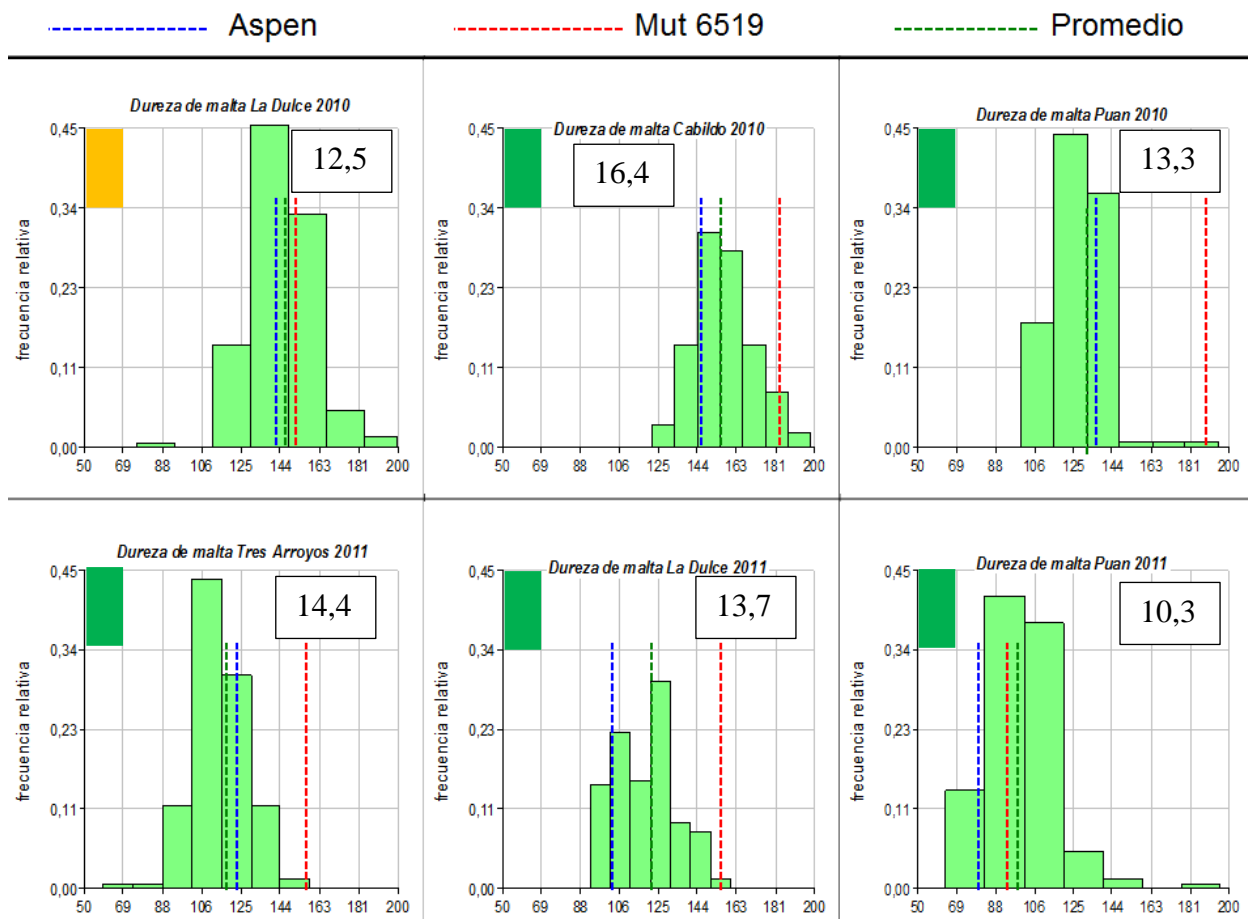


Figura 4.4.1: Distribuciones de frecuencia de Dureza de Malta de todos los sitios experimentales analizados. Cuadros de color verde: sin déficit de agua, naranja: déficit intermedio alto, amarillo: déficit intermedio bajo, rojo: alto déficit. El recuadro indica el % promedio de proteína.

Los valores de dureza más altos corresponden al ambiente que tuvo el nivel de proteína también más alto: Cabildo 2010. Si bien este sitio no tuvo condiciones de sequía durante el llenado de los granos, el bajo rendimiento promedio causado por déficit de agua en etapas tempranas, y quizás la absorción tardía del nitrógeno remanente del suelo, ocasionó un porcentaje de proteína muy alto: promedio de 16,4%.

La figura 4.4.2 muestra las relaciones entre porcentaje de proteína de cebada y dureza de malta en dos ambientes extremos en cuanto al promedio de proteína.

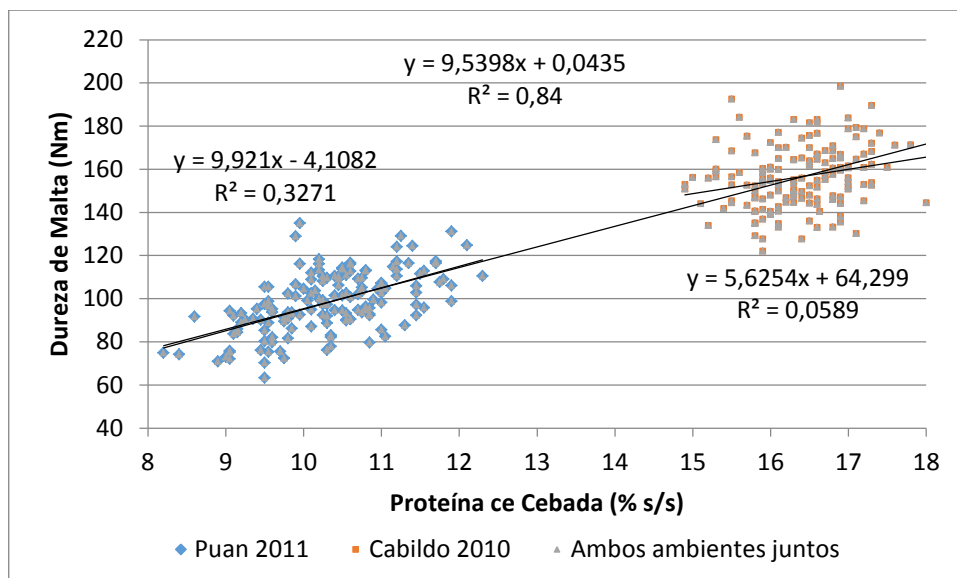


Figura 4.4.2: Relaciones entre Proteína de Cebada (% s/s) y Dureza de Malta (en Newtonmetros) en los ambientes Puán 2011 (10,3% promedio de Proteína) y Cabildo 2010 (16,4% promedio de Proteína). Regresiones individuales por ambiente y unión de los datos de ambos

Si bien la regresión en Cabildo 2010 fue significativa ($p = 0,0026$) los valores de proteína explicaron muy poco la variable dureza ($R^2 = 0,06$). En Puán 2011, luego de la eliminación de cuatro pares de datos por análisis de outliers (R^2 original = 0,25), se obtuvo un valor $R^2 = 0,38$). El mismo análisis de outliers realizado en Cabildo llevó a la eliminación de una cantidad grande de datos, sin mejorar significativamente la dispersión.

En el análisis de comparación de rectas de regresión, el primer paso (hipótesis de igualdad de varianzas) dio significativo ($p = 0,0189$). El segundo paso (hipótesis de igualdad de pendientes) dio también significativo, en el límite de rechazo ($p = 0,0451$). Se acepta la hipótesis de igualdad de ecuaciones ($p = 0,2189$), por lo que ambas poblaciones de datos podrían unirse para obtener una relación más robusta, aunque con el nivel de separación que ambas poblaciones tienen, el valor de ajuste alto ($R^2 = 0,84$) está condicionado por muchos puntos influyentes (Fig 4.4.3)

Las 3 rectas de regresión se observan en la Figura 4.4.2., las correspondientes a cada ambiente, más la recta que considera todos los datos, es decir, la suma de los datos de Cabildo 2010 y Puan 2011.

La Figura 4.4.3 representa el gráfico de componentes principales (CP) para todos los sitios. La componente 1 y 2 explican en conjunto el 49,1% de la variabilidad.

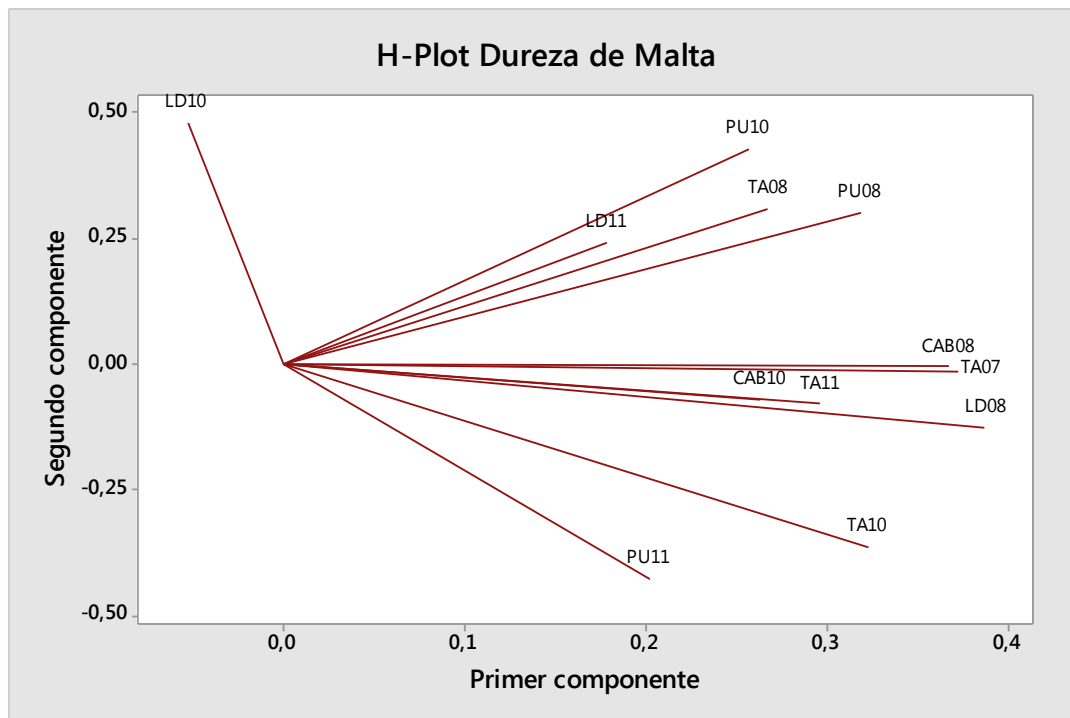


Figura 4.4.3: Gráfico H-plot de Dureza de Malta, componentes 1 y 2.

Con el fin de evaluar la posibilidad de trabajar con mega-ambientes a partir de los resultados del análisis de CP, se tomaron pares de sitios experimentales que se encuentran altamente correlacionados según los vectores generados, por ejemplo Tres Arroyos 2007 y Cabildo 2008, Tres Arroyos 2008 y Puán 2008, y se realizaron análisis de regresión entre ellos para calcular el coeficiente de correlación (Figura 4.4.5)

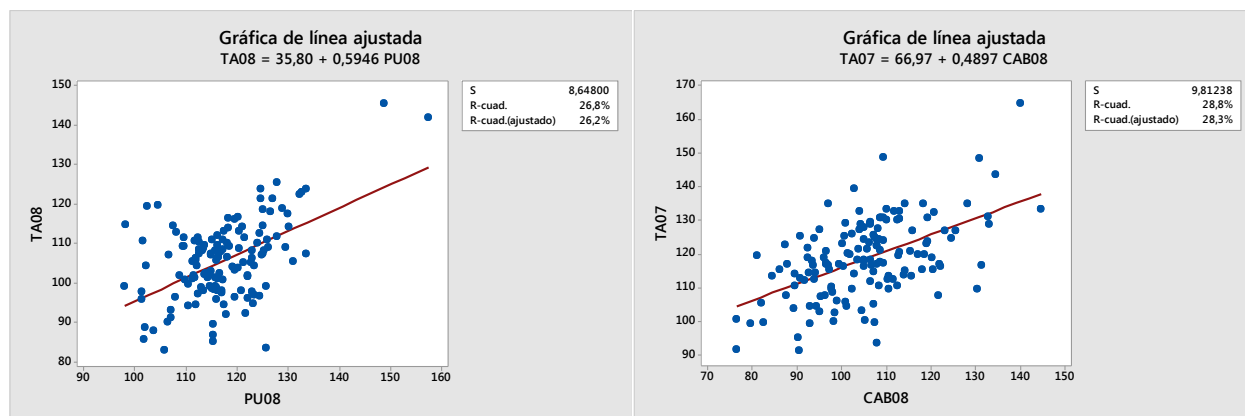


Figura 4.4.5 Regresiones entre los sitios Puán 2008 y Tres Arroyos 2008 (R^2 ajustado = 26,2%), y entre Cabildo 2008 y Tres Arroyos 2007 (R^2 ajustado = 28,3%).

Los coeficientes de correlación (r) entre estos pares de sitios son 0,51 y 0,53, valores que son coherentes con el ángulo que forman los vectores del análisis de CP, ya que las dos primeras componentes explicaron solamente el 49,1% de la variabilidad. La tercera componente explicó un 9,3% adicional. Esto significa que, a pesar de encontrarse los vectores cercanos en el análisis del H-plot, un valor $r = 0,51$ no es suficiente para considerar la selección en un ambiente equivalente a la selección en el otro. En la Tabla 4.4.2 se observan los primeros 15 DHs (como

ejemplos) que tuvieron los menores valores de Dureza de Malta en el ambiente Tres Arroyos 2008. De esos 15 DHs, solamente 6 DHs (indicados en la tabla) estuvieron también dentro de los 15 valores más bajos en el ambiente Puan 2008 (40%).

Tabla 4.4.2. Valores de Dureza de Malta (en Newtonmetros) en el ensayo Tres Arroyos 2008, ejemplos de 15 primeros puestos (valores más bajos de dureza) y la posición de esos mismos DHs en el ambiente Puan 2008.

DH	Dureza de Malta (Nm)	Orden Tres Arroyos 2008	Orden Puan 2008
55	82,8	1	12
58	83,3	2	121
142	85,1	3	56
148	85,6	4	6
82	86,3	5	140
93	86,8	6	141
147	86,8	7	57
97	87,8	8	10
45	88,7	9	7
139	89,5	10	58
41	89,9	11	13
42	91,0	12	16
150	91,9	13	82
143	92,3	14	100
21	92,9	15	15

El promedio de dureza de Malta en Tres Arroyos 2008 fue $105,3 \pm 10,1$ Nm, con un valor máximo de 145,5 Nm.

4.5 Extracto

Se define esta determinación analítica como el total de sustancias solubles que entrega la malta, a partir de un proceso de maceración con temperaturas controladas. El extracto contiene varios tipos de sustancias, entre ellos carbohidratos con diferente grado de complejidad (azúcares simples y dextrinas), aminoácidos, proteínas de bajo, medio y alto peso molecular, sales, y vitaminas. De todos ellos, el principal componente son los carbohidratos, por ser los compuestos mayoritarios en el endosperma de cebada (65% en promedio de peso seco), seguido por las proteínas totales (10% en promedio) (Kreis y Shewry, 1992). Existe una relación inversa entre extracto y proteína, ya que proteína y almidón (principal generador del extracto) se encuentran juntos en el endosperma, al incrementarse el contenido de proteína, se reduce el de almidón. No obstante, de la misma manera que para el carácter dureza de malta, las relaciones dependen de factores genéticos y ambientales.

Los promedios de extracto obtenidos en cada sitio experimental se encuentran detallados en la Tabla 4.5.1

Tabla 4.5.1: Promedios, máximos y mínimos de Extracto (%) en la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

EXTRACTO (% sustancia seca)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 1 2008	76,7	76,6	73,8	72,3	80,5
LD 2008	76,7	80,3	74,6	73,6	80,3
Cabildo 2008	76,1	76,6	74,3	72,4	79,9
Puán 2008	71,6	71,1	68,2	67,7	74,1
TA1 2010	77,7	79,2	75,7	75	80,7
LD 2010	77,5	78,0	77,8	73,4	80
Cabildo 2010	75,0	78,2	71,4	71,3	78,2
Puán 2010	77,5	77,7	72,9	72,9	81,1
TA 1 2011	78,2	80,5	75,7	74,6	81,4
LD 2011	77,2	80,2	75,3	73,3	80,5
Puán 2011	80,3	83,9	79,8	76,9	83,9
Promedio General	76,8	78,4	74,5	73,0	80,0

En la Figura 4.5.1 se observa el contenido de extracto de las líneas parentales Aspen y Mut 6519, en función del promedio de extracto de cada sitio experimental. Como en el caso del carácter dureza de malta, la variedad Aspen tuvo una calidad muy superior a la línea Mut 6519, en todos los ambientes analizados.

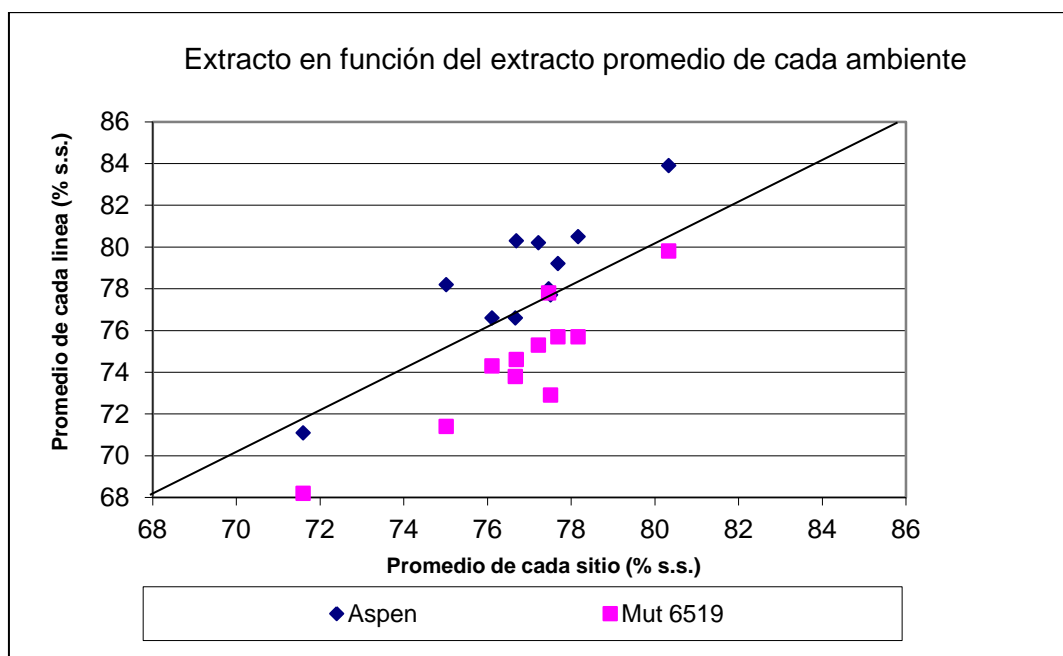


Figura 4.5.1 Extracto (%) de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de extracto de cada sitio experimental. La línea indica la relación 1 a 1.

La Tabla 4.5.2 muestra los coeficientes de correlación entre sitios para Extracto. Dos pares de sitios (Cabildo 2008 con Puán 2008 y La Dulce 2008 con Cabildo 2010) mostraron los mayores coeficientes. Teniendo que cuenta que estos coeficientes máximos significan porcentajes de explicación entre variables de algo más del 20%, a los fines prácticos de selección para mejoramiento, ningún sitio fue buen predictor de otro sitio.

Tabla 4.5.2: Coeficientes de correlación entre sitios. Variable: Extracto.

	TA 2008	LD 2008	CAB 2008	PU 2008	TA 2010	LD 2010	CAB 2010	PU 2010	TA 2011	LD 2011	PU 2011
TA 2008	1										
LD 2008	0,27522879	1									
CAB 2008	0,17867394	0,33835406	1								
PU 2008	0,34437628	0,41422818	0,48773558	1							
TA 2010	-0,13488468	0,2415798	0,30091065	0,34031212	1						
LD 2010	-0,21737102	0,05504786	0,234665	0,06205013	0,26708078	1					
CAB 2010	0,26491448	0,42177573	0,32434814	0,34235207	0,23900839	-0,06813206	1				
PU 2010	0,15290603	0,05729179	0,04626444	0,17480161	0,16844706	0,12941902	0,41730054	1			
TA 2011	-0,11424721	0,30868401	0,37660347	0,36580325	0,23841619	0,07759696	0,16898119	-0,06194305	1		
LD 2011	0,05723454	0,22980615	0,34527081	0,19691795	-0,02299184	0,02976017	0,24639252	-0,13226895	0,19238448	1	
PU 2011	-0,02106029	0,24949376	0,2116518	0,2684545	0,40357875	0,16927786	0,32047828	0,18336667	0,12923018	0,06900126	1

En el gráfico H-plot de la Figura 4.5.2 se ubicaron los dos pares de sitios que mostraron mayor nivel de correlación, comprobándose por el análisis de CP la mayor correlación entre los pares de sitios marcados.

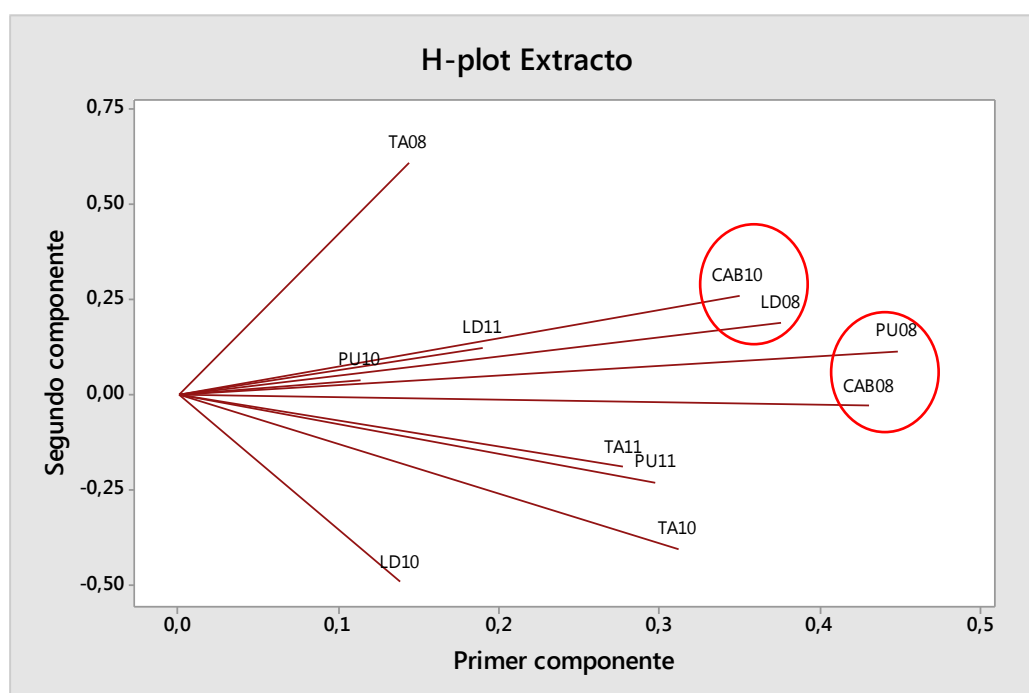


Figura 4.5.2: Gráfico H-plot de Extracto, componentes 1 y 2.

La figura 4.5.2 corresponde al análisis H-Plot de extracto de los sitios analizados. Las componentes 1 y 2 explican el 41% de la variación total.

Con fines prácticos, conviene analizar el gráfico H-plot conjuntamente con los coeficientes de correlación. Es el caso de los sitios Tres Arroyos 2011 y Puán 2011, los que se encuentran aparentemente muy correlacionados en el gráfico. Sin embargo, el coeficiente r entre ambos es 0,129. En este caso, la componente 3 separa en direcciones opuestas los dos sitios

(Tres Arroyos 2011, CP 1 = 0,277, CP 2 = -0,191, CP 3 = 0,371; Puán 2011, CP 1 = 0,298, CP 2 = -0,232, CP 3 = -0,302).

Como ejemplo de influencia climática, la figura 4.5.3 representa la distribución de frecuencia del mismo sitio experimental (Puán) en dos años, 2008 y 2011, indicando la posición de las líneas parentales y el promedio de la población.

Puán 2011 fue el ensayo con mayor nivel de extracto de toda la red realizada (80,3%), como así también, el de más bajo nivel de proteína promedio (10,3%). Además, en ese ensayo la variedad Aspen tuvo el extracto más alto de todos los participantes.

Puán 2008 tuvo un nivel de proteína promedio de 15,8%, mientras que el extracto promedio fue de 71,6%, extremadamente bajo, el menor de toda la red.

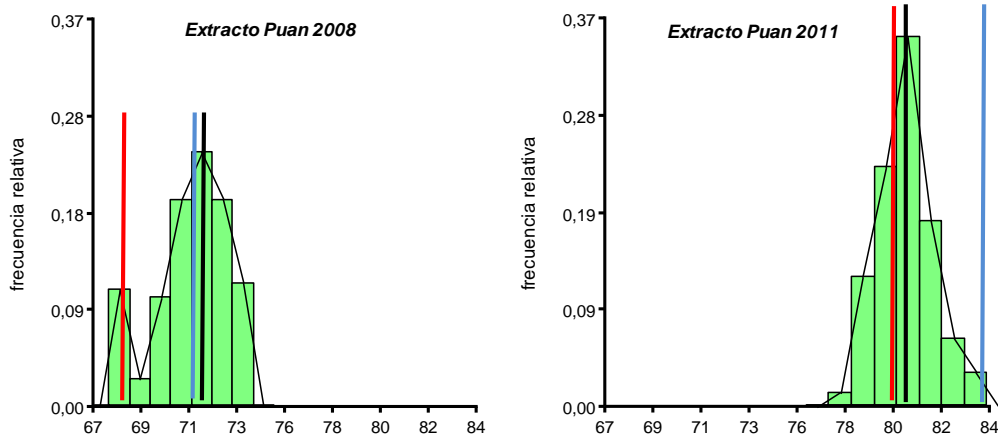


Figura 4.5.3 Distribución de frecuencias de extracto en los sitios Puán 2008 y 2011. Rojo: Mut 6519, Celeste: Aspen, Negro: promedio de la población.

Los gráficos de precipitaciones y temperaturas correspondientes a estas dos situaciones se encuentran en las Figuras 4.5.4 y 4.5.5.

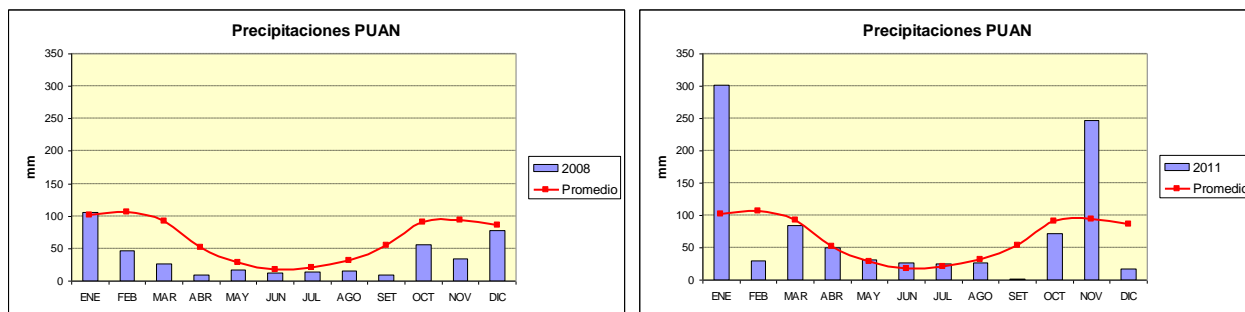


Figura 4.5.4: Precipitaciones de Puán, años 2008 y 2011, comparado con el promedio histórico. Barras: precipitaciones totales mensuales, línea roja: promedio histórico.

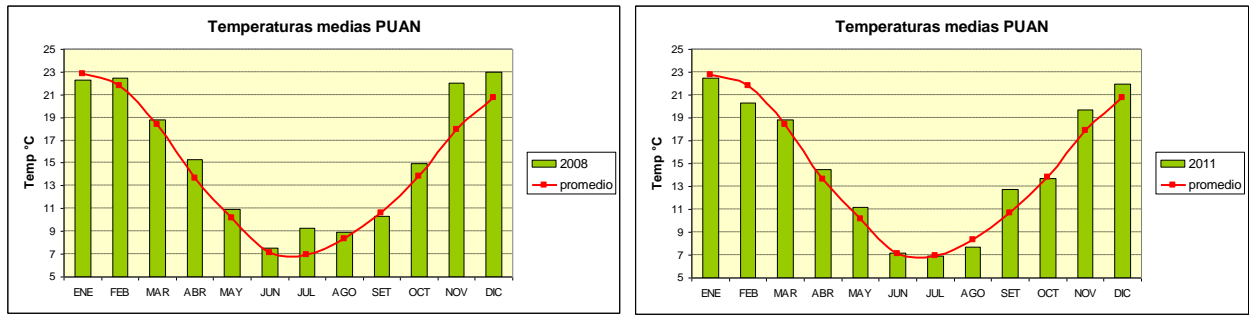


Figura 4.5.5: Temperaturas medias de Puán, años 2008 y 2011, comparado con el promedio histórico. Barras: temperaturas medias mensuales, línea: promedio histórico.

En los gráficos se observa el déficit de precipitaciones en el año 2008, ocurriendo lluvias en todos los meses del año por debajo del promedio histórico, con un marcado déficit en noviembre, mes en que se produce el llenado de los granos. Además, se registró la temperatura media mensual de dicho mes 3,5 °C superior a la media histórica. La combinación de menores precipitaciones y mayores temperaturas produjo un llenado de los granos acelerado, lo que motivó el mayor nivel de proteína y menor de almidón.

En cambio, en el año 2011 las precipitaciones estuvieron cercanas al promedio histórico, a excepción del mes de setiembre, que no llovió, y del mes de noviembre, que registró 150 mm más de precipitaciones que el promedio histórico. La temperatura media mensual de noviembre fue 0,8 °C superior al promedio. Estas condiciones fueron claves para lograr un mejor balance entre proteína y almidón, lo que derivó en los niveles de extracto más altos y la posibilidad de expresión de la calidad de Aspen como una variedad de calidad superior.

4.6 Viscosidad del mosto

Este carácter se refiere a la viscosidad que tiene el producto de la maceración de malta en agua a temperaturas controladas (mosto). Se cuantifica por el tiempo de caída del mosto a través de un capilar, medido en mPa*seg. Es una determinación muy importante porque está relacionada al tiempo de filtración en las cervecerías. El límite superior de la especificación en casi todas las cervecerías del mundo es 1,55 MiliPascal * Segundo.

Los promedios de viscosidad obtenidos en cada sitio experimental se encuentran detallados en la Tabla 4.6.1

Tabla 4.6.1: Promedios, máximos y mínimos de Viscosidad de Mosto de la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

VISCOSIDAD (mPa*seg)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 1 2008	1,5579	1,5110	1,8356	1,4205	1,9662
LD 2008	1,6815	1,5238	1,7523	1,4597	2,1826
Cabildo 2008	1,6969	1,5859	2,0498	1,4858	2,1209
Puán 2008	1,6637	1,6722	1,7499	1,509	1,7499
TA1 2010	1,6575	1,5757	1,6114	1,4916	2,1523
LD 2010	1,7032	1,7316	1,9720	1,3851	2,1397
Cabildo 2010	1,5563	1,5151	1,7665	1,4443	1,7665
Puán 2010	1,5861	1,5735	1,7628	1,4492	1,957
TA 1 2011	1,5262	1,5069	1,5807	1,4284	1,8221
LD 2011	1,5098	1,4786	1,4802	1,4193	1,8073
Puán 2011	1,5606	1,5107	1,5339	1,4463	1,7878
Promedio General	1,6091	1,5623	1,7345	1,4490	1,9502

Las Figuras 4.6.1 y 4.6.2 muestran los resultados de los tres ambientes donde se generó mayor viscosidad y los dos de menor viscosidad (por debajo de 1,55 Mp*s). El propósito es observar las distribuciones de frecuencia, la posición de las líneas parentales y la relación de estos resultados con las condiciones ambientales.

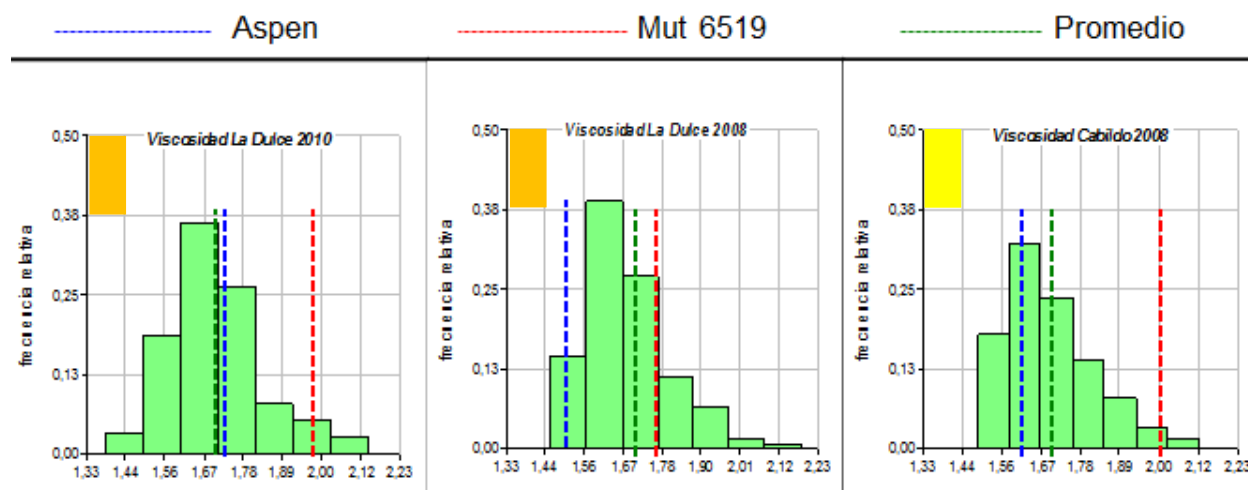


Figura 4.6.1. Distribución de frecuencia de la población en los ambientes que generaron mayor nivel de viscosidad de mosto: La Dulce 2010, La Dulce 2008, Cabildo 2008. Cuadros de color naranja: déficit intermedio alto, amarillo: déficit intermedio bajo.

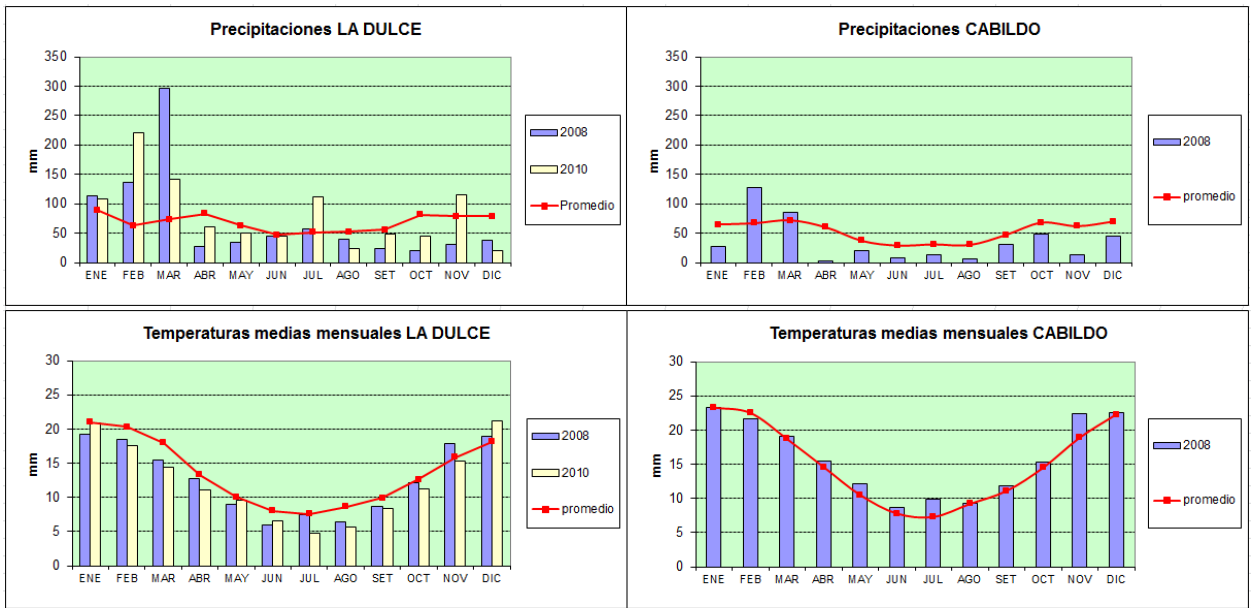


Figura 4.6.2: Precipitaciones mensuales y temperaturas medias mensuales de los sitios La Dulce 2008 y 2010 y Cabildo 2008.

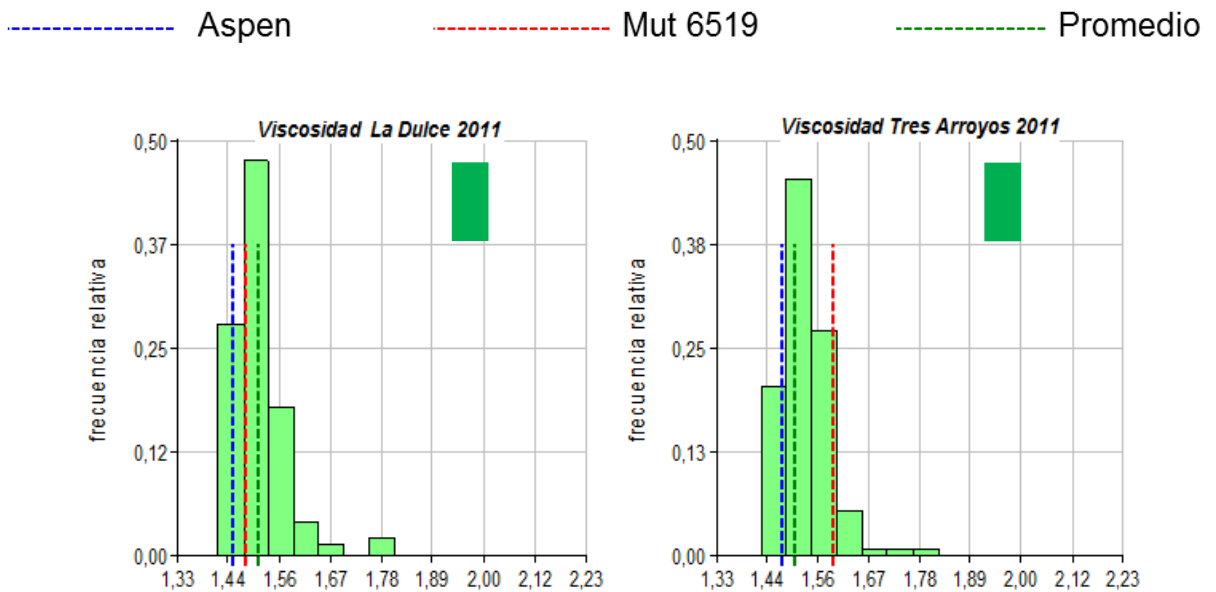
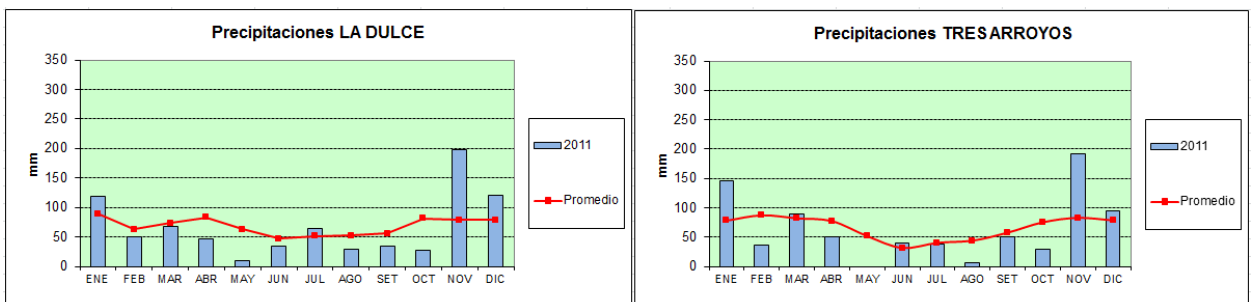


Figura 4.6.3. Distribución de frecuencia de la población en los ambientes que generaron menor nivel de viscosidad de mosto: La Dulce 2011 y Tres Arroyos 2011. Cuadros de color verde: sin déficit hídrico.



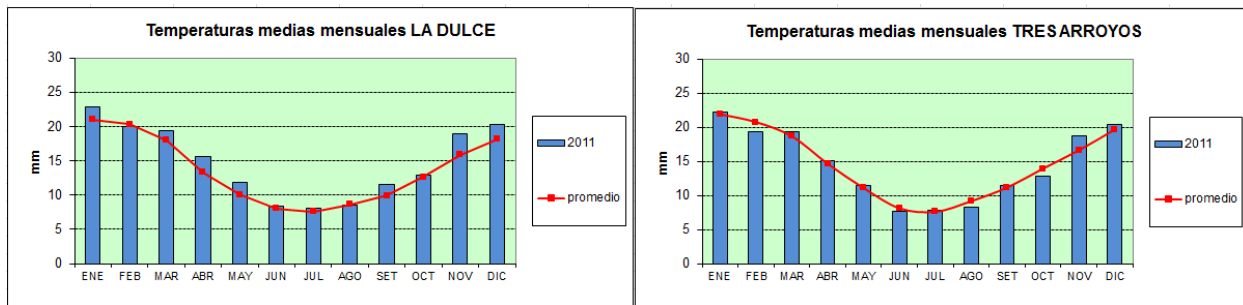


Figura 4.6.4: Precipitaciones mensuales y temperaturas medias mensuales de los sitios La Dulce 2011 y Tres Arroyos 2011

Comparando los dos conjuntos de ambientes se observa que los sitios que tuvieron excesos importantes de precipitaciones en el mes de noviembre (200 mm versus 80 mm de promedio histórico), son los que tuvieron viscosidades de mosto más bajas, incluso con déficit de lluvia en meses anteriores. El ensayo La Dulce 2010 tuvo precipitaciones en noviembre superiores al promedio histórico (116 mm versus 79 mm de promedio histórico), no obstante este sitio se encuentra entre los ensayos que dieron mayor viscosidad, posiblemente por una cantidad insuficiente de lluvias como para compensar el déficit de meses anteriores. Las temperaturas medias mensuales no explicaron estas variaciones, ya que en ambos grupos las temperaturas de noviembre fueron superiores al promedio histórico.

La figura 4.6.5 corresponde al análisis H-Plot de viscosidad. Las componentes 1 y 2 explican el 37% de la variación total. La tabla 4.6.2 muestra los coeficientes de correlación entre sitios. El grupo de ambientes con correlaciones más altas son Tres Arroyos, Cabildo y La Dulce, todos en el año 2008. En el gráfico H-plot, estos ambientes se encuentran juntos, marcados con un círculo. El sitio Puán 2008 tiene baja correlación con los sitios anteriores, y en el H-plot se separa de esos ambientes por la componente 3 (TA08=0,084; LD08=0,028; CAB08=0,079; PU08=0,222).

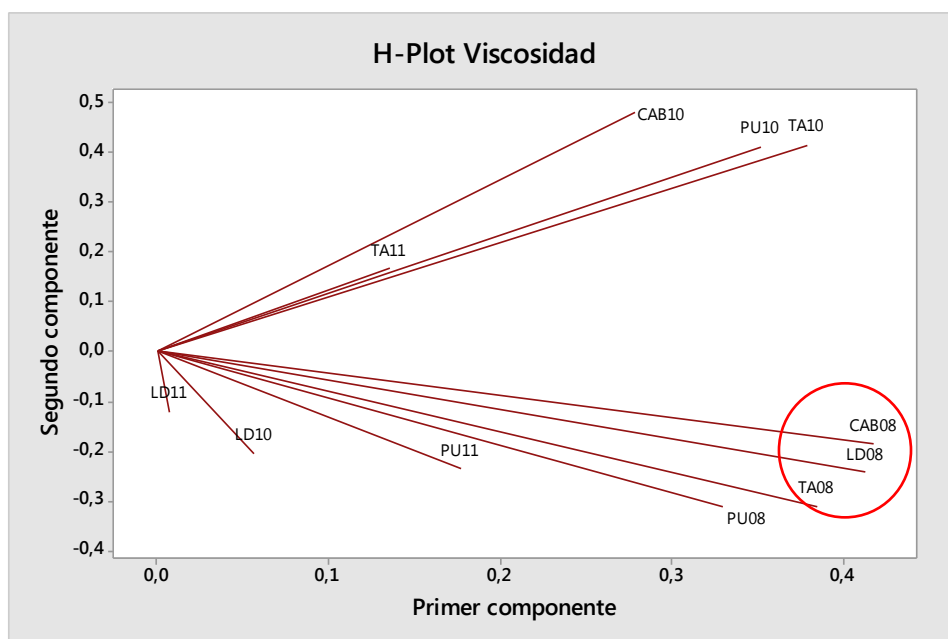


Figura 4.6.5: Gráfico H-plot de Viscosidad, componentes 1 y 2.

Tabla 4.6.2: Coeficientes de correlación entre sitios. Variable: Viscosidad.

	TA 2008	LD 2008	Cabildo 2008	Puan 2008	TA 2010	LD 2010	Cabildo 2010	Puan 2010	TA 2011	LD 2011	Puan 2011
TA 2008	1										
LD 2008	0,46502695	1									
Cabildo 2008	0,4777698	0,48110129	1								
Puan 2008	0,3962605	0,2490812	0,34253048	1							
TA 2010	0,2880455	0,25614475	0,19300546	0,23072982	1						
LD 2010	-0,01926676	0,10409468	0,04521233	0,18321856	0,0532417	1					
Cabildo 2010	0,1670649	0,14450802	0,24904868	0,11231854	0,39324516	-0,0315358	1				
Puan 2010	0,12501954	0,22748194	0,19883851	0,11349651	0,34257391	-0,05258433	0,30012278	1			
TA 2011	0,13200124	0,11750658	0,22182654	0,00896161	0,15351505	0,11726851	0,13474178	0,09570318	1		
LD 2011	0,05842923	0,08074156	0,01931555	-0,08448822	0,05276689	0,14292599	0,14895342	-0,0724091	0,04587612	1	
Puan 2011	0,183491	0,11507462	0,12581487	0,11827788	0,01417782	-0,05883972	0,13543468	-0,01766409	0,13102975	0,15160497	1

4.7 β -glucanos

Estos polisacáridos son los principales compuestos de las paredes celulares del endosperma de cebada. Forman uniones β -1,3 y β -1,4 con moléculas de glucosa, y su mayor importancia radica en el hecho que una descomposición incompleta de los mismos (derivando en β -glucanos de alto peso molecular) lleva a la formación de geles que causan mostos con alta viscosidad, causando problemas durante la fase de filtración. La especificación de malta para esta determinación permite un máximo de 150 partes por millón de β -glucanos de alto peso molecular.

Los promedios de β -glucanos obtenidos en cada sitio experimental se encuentran detallados en la Tabla 4.7.1

Tabla 4.7.1: Promedios, máximos y mínimos de β -glucanos en la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

β-GLUCANOS (ppm)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 1 2008	81,4	37	107	21	473
LD 2008	243,3	83	494	28	704
Cabildo 2008	198,7	197	390	23	558
Puán 2008	163,3	208	232	31	348
TA1 2010	408,4	125	520	111	877
LD 2010	514,8	470	593	137	849
Cabildo 2010	408,3	126	614	111	898
Puán 2010	282,8	265	654	63	654
TA 1 2011	210,3	56	294	27	731
LD 2011	158,4	72	290	45	476
Puán 2011	159,4	51	144	32	615
Promedio General	257,2	153,6	393,8	57,2	653,0

A diferencia de las determinaciones presentadas con anterioridad, para β -glucanos es muy notable la diferencia de valores entre máximos y mínimos (las diferencias son en algunos casos entre 20 y 30 veces), además de las diferencias entre Aspen y la línea Mut 6519.

En la Figura 4.7.1 se observan los resultados de las líneas parentales con respecto al promedio de cada sitio. En todos los casos los valores de β -glucanos de Aspen son varias veces menores a los valores de la línea Mut 6519.

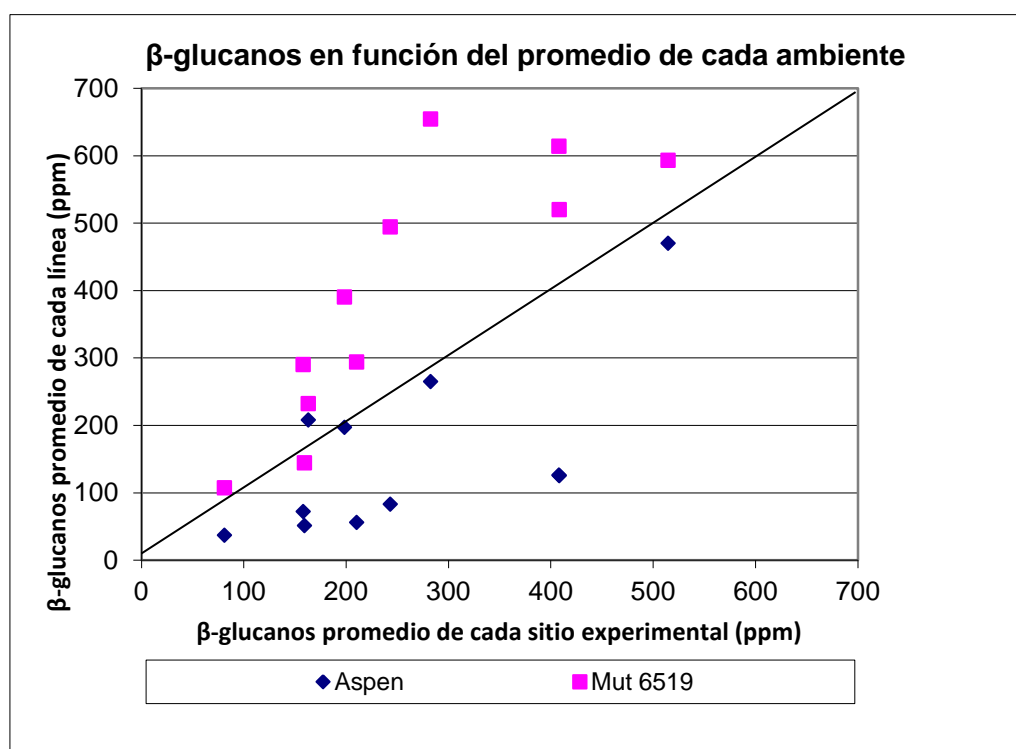


Figura 4.7.1: β -glucanos de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de cada sitio experimental. La línea indica la relación 1 a 1.

La figura 4.7.2 corresponde a la distribución de frecuencia de toda la población y a la posición de los parentales para los valores de β -glucanos. De los 11 ambientes analizados, Aspen dio valores menores a 150 ppm en siete casos, mientras que la línea Mut 6519 solamente en dos.

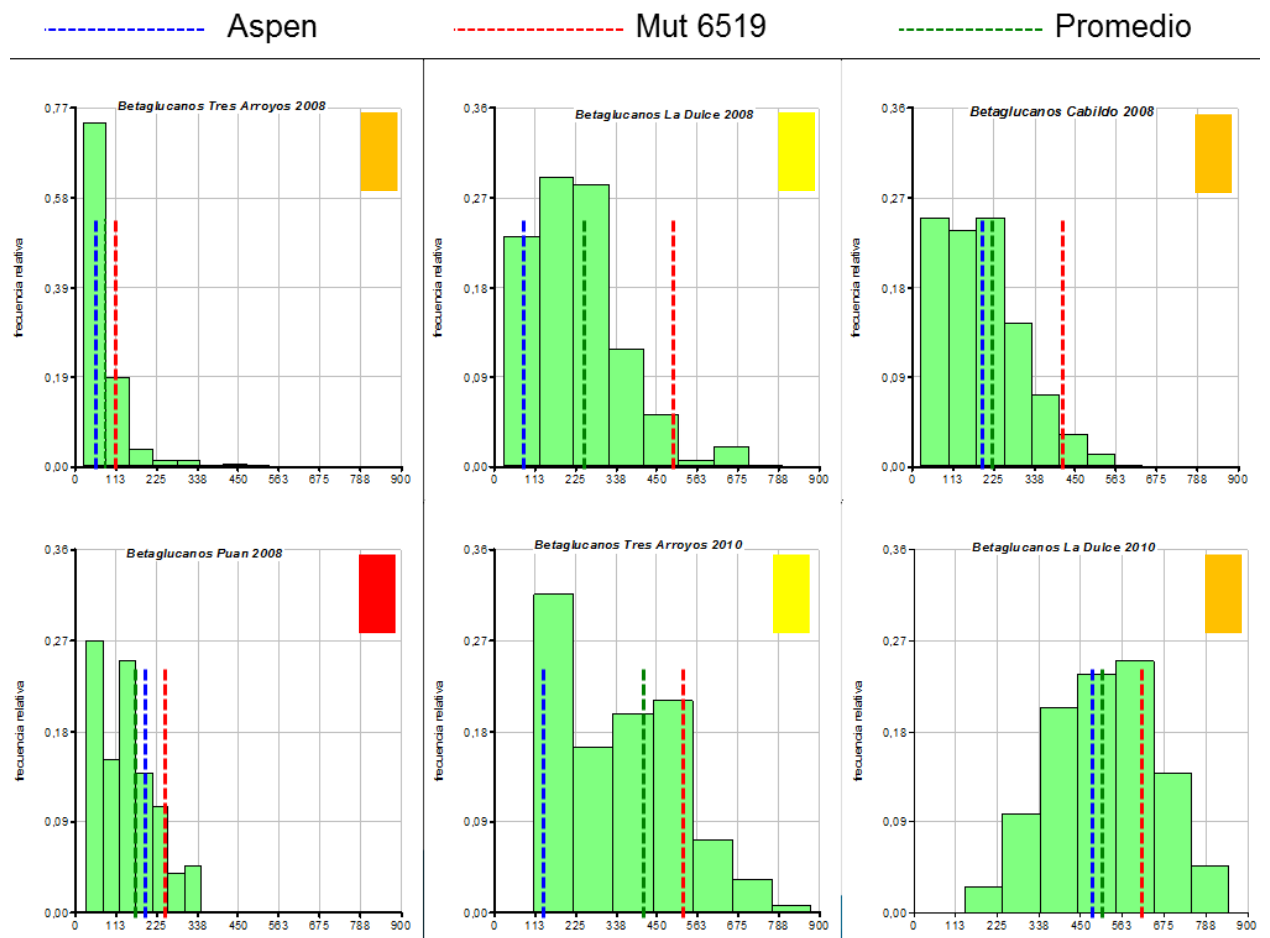
El único ambiente que dio valores promedio por debajo de los 150 ppm fue Tres Arroyos 2008, que también es el único caso en que las dos líneas parentales dieron valores menores. Todos los demás ambientes, incluso en aquellas situaciones en que no hubo déficit hídrico durante el ciclo del cultivo, dieron valores altos a muy altos (por ejemplo, La Dulce 2010).

Los ensayos realizados en 2010 dieron los valores más altos, comparados con 2008 y 2011.

Tabla 4.7.2: Temperaturas medias mensuales de noviembre en las localidades ensayadas

	Temperaturas medias mes de noviembre °C				
	promedio histórico	2008	2009	2010	2011
La Dulce	15,9	17,9	14,9	15,3	19,0
Tres Arroyos	16,6	20,8	16,7	16,1	18,7
Cabildo	18,9	22,4	19,0	17,5	20,1
Puán	17,9	22,0	18,0	16,5	19,7

Analizando las diferencias de precipitaciones y temperaturas medias entre todos los sitios y años, se observó que noviembre de 2010 fue el único caso en que todas las localidades registraron temperaturas medias por debajo del promedio (Tabla 4.7.2). Además, en 2008, si bien todas las temperaturas medias de noviembre superaron el promedio histórico, la más baja registrada (La Dulce 2008) fue la que dio valores más elevados de β -glucanos (Tabla 4.6.1). Otros ejemplos, como la comparación de Puán 2011 (19,7°C, promedio de β -glucanos 159,4 ppm) con Tres Arroyos 2011 (18,7°C, promedio de β -glucanos 210,3 ppm), lleva a concluir que menores temperaturas durante el mes de llenado de los granos inducirían mayor contenido de β -glucanos en la malta, quizás por la formación de paredes celulares con diferente composición, o quizás por un proceso enzimático para disolver esa estructura. Esta observación merece una investigación adicional, debido a la elevada importancia que tiene este carácter para la industria, ya que no se ha encontrado bibliografía que documente este punto.



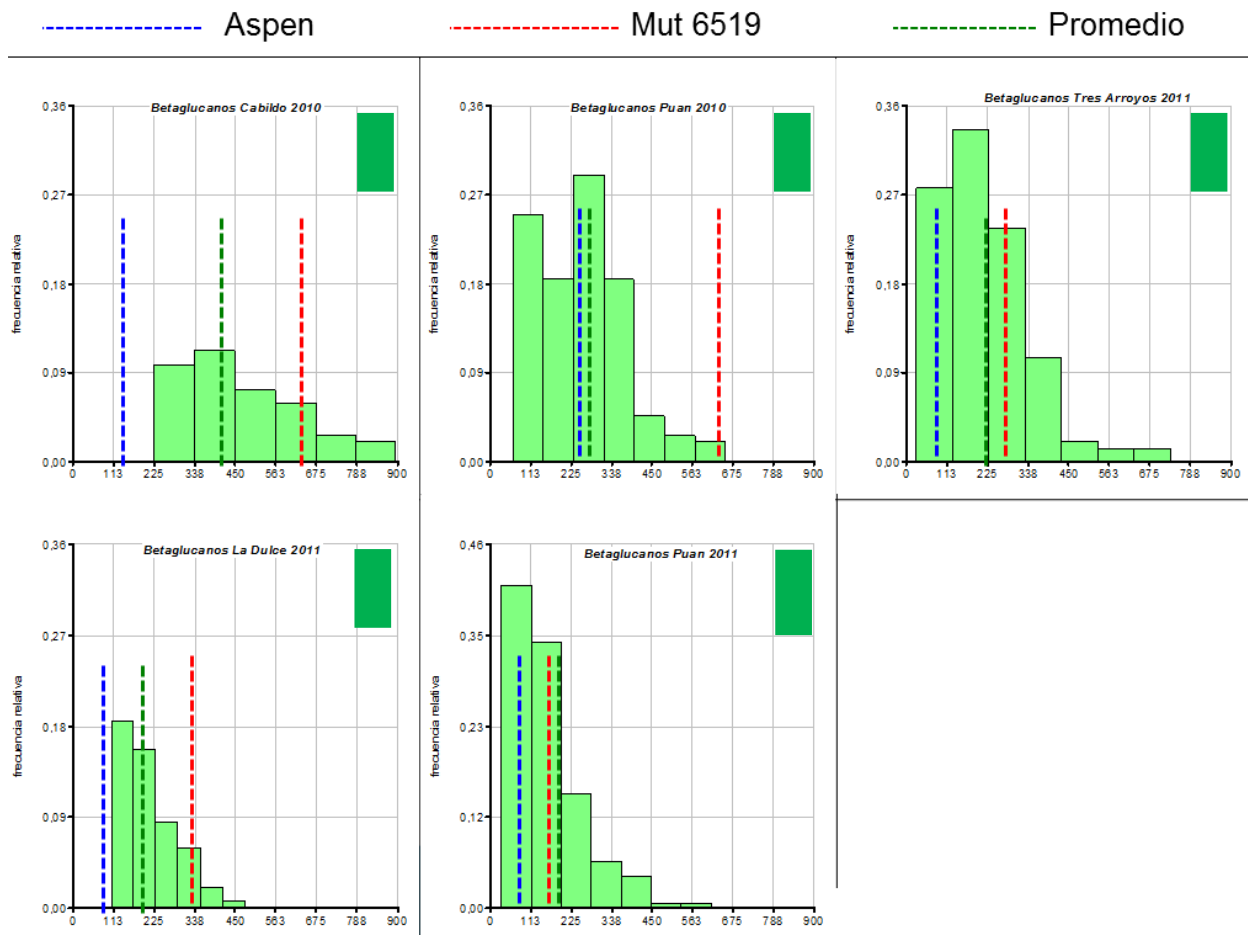


Figura 4.7.2: Distribuciones de frecuencia de β -glucanos de todos los ambientes analizados. Cuadros de color verde: sin déficit de agua, naranja: déficit intermedio alto, amarillo: déficit intermedio bajo, rojo: alto déficit.

Teniendo en cuenta que el carácter dureza de malta mide indirectamente la estructura física del endosperma, que las paredes celulares son parte de esa estructura, y que la descomposición de las paredes celulares podría originar niveles de β -glucanos elevados o bajos dependiendo de la capacidad enzimática para descomponerlos, se analizaron regresiones para determinar la dependencia de β -glucanos a partir del carácter dureza de malta. La figura 4.7.3 muestra dicha relación, tomando los ambientes La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011 como ejemplos.

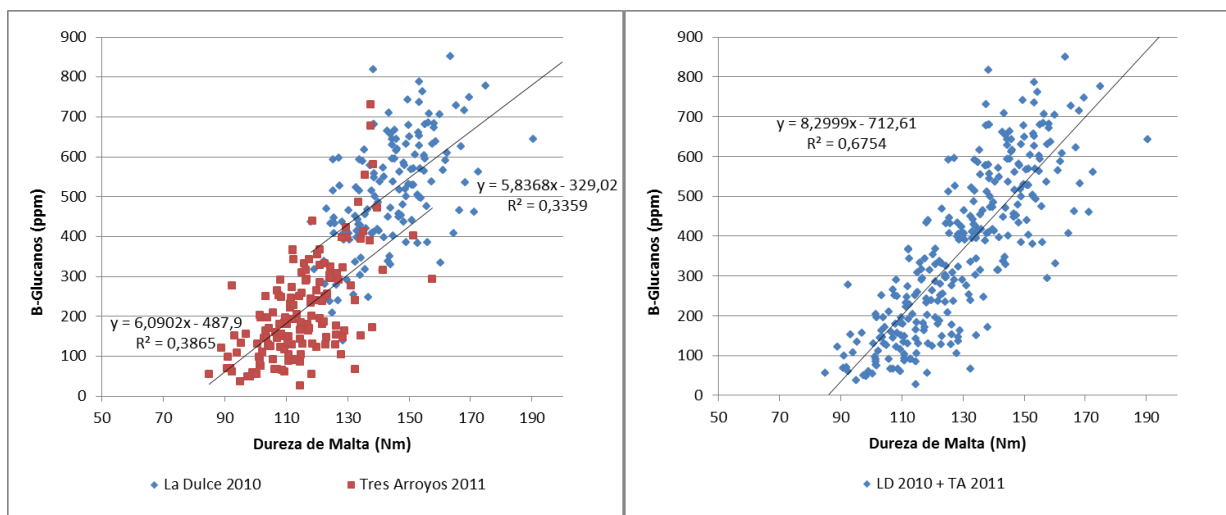


Figura 4.7.3: Relación entre dureza de malta y β -glucanos, en los sitios La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011, y unión de los datos de ambos ambientes

El carácter β -glucanos estuvo explicada en un 39% (Tres Arroyos 2011) y en un 33% (La Dulce 2010) por el carácter dureza de malta.

En el análisis de comparación de rectas de regresión de ambas poblaciones se aceptó la hipótesis de igualdad de varianzas ($p = 0,1985$), también se aceptó la hipótesis de igualdad de pendientes ($p = 0,5324$), y se rechazó la hipótesis de igualdad de rectas ($p = 0,000$) ya que las ordenadas al origen son diferentes. De haber podido unir ambas poblaciones, el valor de R^2 sería mucho más significativo ($R^2 = 0,675$, $p = 0,0000$). Por lo tanto, se unieron ambas poblaciones de datos para ampliar el rango de exploración de relación entre dureza de malta y β -glucanos, obteniendo el valor R^2 comentado

La Tabla 4.7.3 muestra los coeficientes de correlación entre dureza de malta (x) y β -glucanos (y), y el porcentaje de explicación de la variable x para la variable y, para todos los sitios analizados

Tabla 4.7.3: Coeficientes de correlación (r) y de determinación (R^2) de las variables Dureza de Malta (Newtonmetros) y β -glucanos (ppm).

Sitio	r	R^2
Tres Arroyos 2008	0,333	0,111
La Dulce 2008	0,487	0,238
Cabildo 2008	0,618	0,382
Puán 2008	0,476	0,227
Tres Arroyos 2010	0,646	0,417
La Dulce 2010	0,506	0,256
Cabildo 2010	0,715	0,511
Puán 2010	0,383	0,147
Tres Arroyos 2011	0,631	0,398
La Dulce 2011	0,502	0,252
Puán 2011	0,440	0,194

Siguiendo con el mismo razonamiento de dependencia de variables, se realizaron análisis de regresiones múltiples, con dureza de malta como variable dependiente (y) con proteína de cebada (x_1) y β -glucanos (x_2). La Tabla 4.7.4 muestra los resultados para los sitios Cabildo 2008, La Dulce 2010 y Puán 2011. En los casos elegidos como ejemplos, se observa que la adición de la variable β -glucanos a la variable proteína para explicar el carácter dureza de malta es altamente significativa, variando el porcentaje de explicación total entre un 31,7 % y un 68,9 % de la variable dureza.

Tabla 4.7.4: Regresiones múltiples entre Dureza de Malta (y), Proteína de Cebada (x_1) y β -glucanos (x_2), para los sitios Cabildo 2008, La Dulce 2010 y Puán 2011.

Sitio	R ²	F	p
CABILDO 2008			
Proteína (x_1)	0,465	120,589	0,0000
β -glucanos (x_2)	0,382	85,888	0,0000
$x_1 + x_2$	0,689	152,587	0,0000
LA DULCE 2010			
Proteína (x_1)	0,306	65,121	0,0000
β -glucanos (x_2)	0,256	50,908	0,0000
$x_1 + x_2$	0,451	60,293	0,0000
PUÁN 2011			
Proteína (x_1)	0,225	42,963	0,0000
β -glucanos (x_2)	0,194	35,511	0,0000
$x_1 + x_2$	0,317	34,190	0,0000

Con el fin de analizar la relación entre β -glucanos (x) y dureza de malta (y) para un mismo genotipo a través de los ambientes, se realizaron análisis de regresión para las líneas parentales. La Figura 4.7.4 muestra que el porcentaje de explicación de la variable x sobre la y fue 41,6% y 39,2% para Mut 6519 y Aspen, respectivamente. Realizado el análisis para verificar si el punto aparentemente influyente en el gráfico de Aspen (indicado), el valor $q_{(i)} = 3,40940$ para ese dato indica que no es outlier, es decir, que pertenece a la población ($p = 0,1015$).

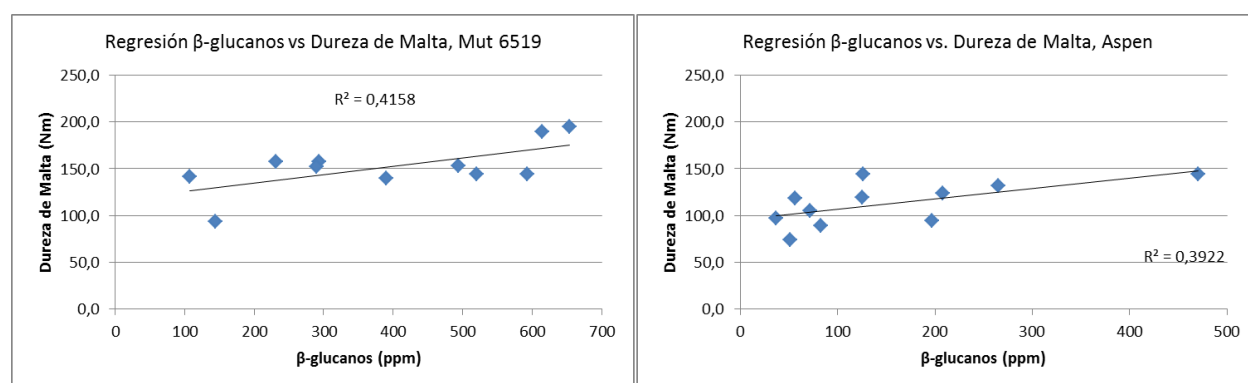


Figura 4.7.4: Relación entre β -glucanos y Dureza de Malta para las líneas Mut 6519 y Aspen, a través de todos los ambientes.

Ambos ajustes tienen pendientes diferentes lo que confirmaría que hay un efecto importante del genotipo cuando se incluyen todos los ambientes para cada genotipo

La relación entre β -glucanos y dureza de malta promedio de ambientes es mucho más significativa, llegando a un coeficiente de determinación de 0,76.

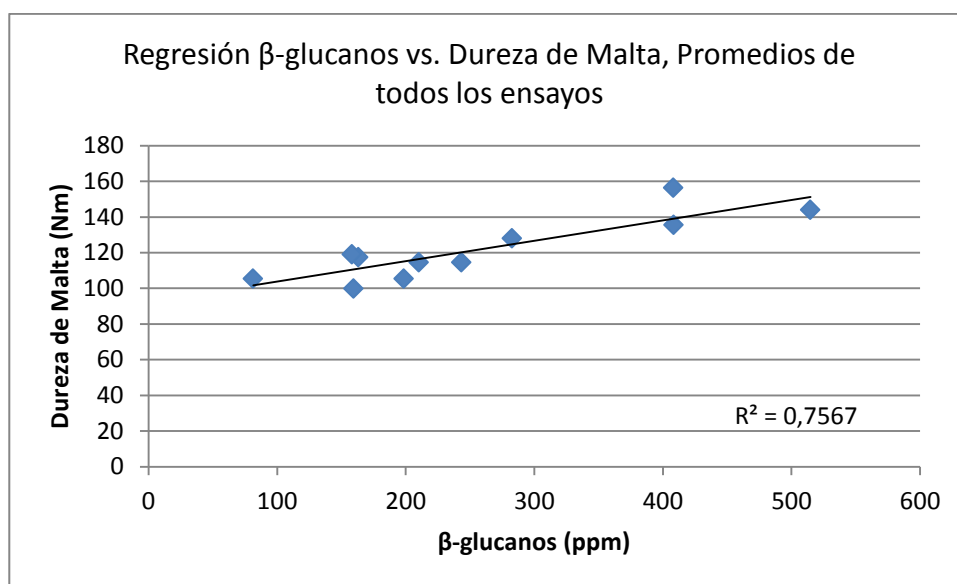


Figura 4.7.5: Regresión entre promedios de β -glucanos y Dureza de Malta, para todos los ambientes analizados.

Por último, se analizó la regresión múltiple por genotipo, tomando las líneas parentales y el promedio de todos los individuos en cada ensayo. Se observó una alta significancia estadística cuando se adiciona la variable β -glucanos a la variable proteína como variables predictoras de dureza de malta, llegando a 58% de explicación para la variedad Aspen, y a 89 % y 92 % para la línea Mut 6519 y los promedios de los ensayos.

Tabla 4.7.5: Regresiones múltiples entre Dureza de Malta (y), Proteína de Cebada (x1) y β -glucanos (x2), para los genotipos Mut 6519, Aspen, y promedio de todas las líneas de cada ensayo.

	R²	F	p
Mut 6519			
Proteína (x1)	0,679	19,039	0,0018
β -glucanos (x2)	0,416	6,406	0,0322
x1 + x2	0,892	32,883	0,0001
Aspen			
Proteína (x1)	0,224	2,592	0,1419
β -glucanos (x2)	0,392	5,809	0,0392
x1 + x2	0,579	5,508	0,0313
Promedios			
Proteína (x1)	0,212	2,426	0,1538
β -glucanos (x2)	0,757	27,997	0,0005
x1 + x2	0,919	45,545	0,0000

4.8 Aminoácidos libres (FAN, por su sigla en inglés, Free Amino Nitrogen)

Mediante este carácter se cuantifica la provisión de aminoácidos para las células de levadura, durante la etapa de fermentación. Depende del nivel de proteína de la cebada, ya que las proteínas de reserva son el sustrato que proveen los aminoácidos, pero depende fundamentalmente de la capacidad proteolítica de la cebada durante la etapa de germinación, ya que esta actividad enzimática es la encargada de hidrolizar las proteínas para liberar sus unidades, los aminoácidos.

En la actualidad, la tendencia de requerimiento de las cervecerías indica un mínimo de 150 partes por millón de aminoácidos totales, pero dependiendo del tipo de cerveza, del uso o no de adjuntos, del tipo de adjuntos (jarabe o cereales no malteados), del tipo de levadura, y por último, de cada marca de cerveza, tal requerimiento mínimo es muy variable, llegando a niveles requeridos de 240 partes por millón.

Los promedios de FAN obtenidos en cada sitio experimental se encuentran detallados en la Tabla 4.8.1

Tabla 4.8.1: Promedios, máximos y mínimos de Aminoácidos Libres (ppm) de la población de DH y sus parentales en cada sitio experimental.

AMINOACIDOS LIBRES (ppm)					
	Promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 1 2008	167,1	164,0	82,0	65,0	259,0
LD 2008	145,7	136,0	121,0	60,0	226,0
Cabildo 2008	139,6	119,0	99,0	96,0	219,0
Puán 2008	160,1	152,0	127,0	118,0	237,0
TA1 2010	170,6	173,0	135,0	127,0	221,0
LD 2010	149,9	137,0	143,0	101,0	195,0
Cabildo 2010	201,7	260,0	180,0	147,0	312,0
Puán 2010	199,2	203,0	149,0	140,0	307,0
TA 1 2011	200,5	225,0	183,0	133,0	309,0
LD 2011	156,7	170,0	140,0	111,0	213,0
Puán 2011	184,0	161,0	131,0	130,0	248,0
Promedio General	170,5	172,7	135,5	111,6	249,6

En la Figura 4.8.1 se observan los resultados de las líneas parentales con respecto al promedio de cada sitio. Los valores de FAN de Aspen fueron más elevados que los valores de la línea Mut 6519 en 10 de 11 sitios experimentales y ambos parentales presentaron menores valores de FAN que el promedio de la población en la mayoría de los ambientes.

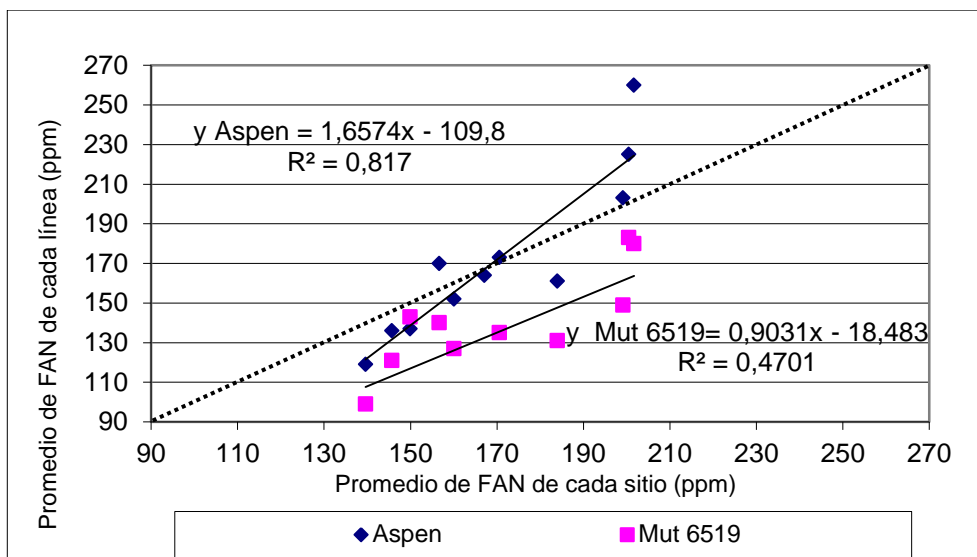


Figura 4.8.1: Aminoácidos libres de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de cada sitio experimental. La línea de puntos indica la relación 1 a 1.

Teniendo en cuenta la dependencia teórica del contenido de proteína como sustrato para la formación de aminoácidos, se analizó la relación entre estas dos variables.

Los porcentajes de explicación de la variable FAN a partir de la variable Proteína de Cebada considerando todos los genotipos resultaron muy bajas. Por este motivo, se utilizó la variable Dureza de Malta como indicador del nivel de modificación del endosperma, suponiendo que ello también podría reflejarse en la actividad proteolítica. Se eligieron para la regresión múltiple las líneas parentales Aspen y Mut 6519 y los promedios de FAN (y) y las variables Proteína y Dureza de Malta como predictoras (x_1 y x_2). Se observa en la Tabla 4.8.2 que el agregado de la variable Dureza mejora la explicación a la variable proteína en los casos de Mut 6519 y Aspen, no así en los promedios. Sin embargo, dichas relaciones resultaron no significativas.

Tabla 4.8.2: Regresiones múltiples entre Aminoácidos Libres (y), Proteína de Cebada (x_1) y Dureza de Malta (x_2), para los genotipos Mut 6519, Aspen, y promedio de todas las líneas de cada ambiente.

Variables	R ²	F	p
Mut 6519			
Proteína (x_1)	0,027	0,252	0,6274
Dureza de Malta (x_2)	0,208	2,366	0,1584
$x_1 + x_2$	0,346	2,121	0,1824
Aspen			
Proteína (x_1)	0,077	0,750	0,4090
Dureza de Malta (x_2)	0,247	2,958	0,1196
$x_1 + x_2$	0,250	1,331	0,3170
Promedios			
Proteína (x_1)	0,049	0,461	0,5141
Dureza de Malta (x_2)	0,077	0,754	0,4078
$x_1 + x_2$	0,088	0,387	0,6912

También se compararon situaciones contrastantes de resultados de FAN, en el mismo sitio y en diferentes años, por ejemplo Tres Arroyos 2008 (promedio de FAN de 167,1 ppm) y 2011 (promedio de FAN de 200,5 ppm). La Figura 4.8.2 muestra las distribuciones de frecuencias de los dos ambientes, con ubicación de las líneas parentales y el promedio de la población.

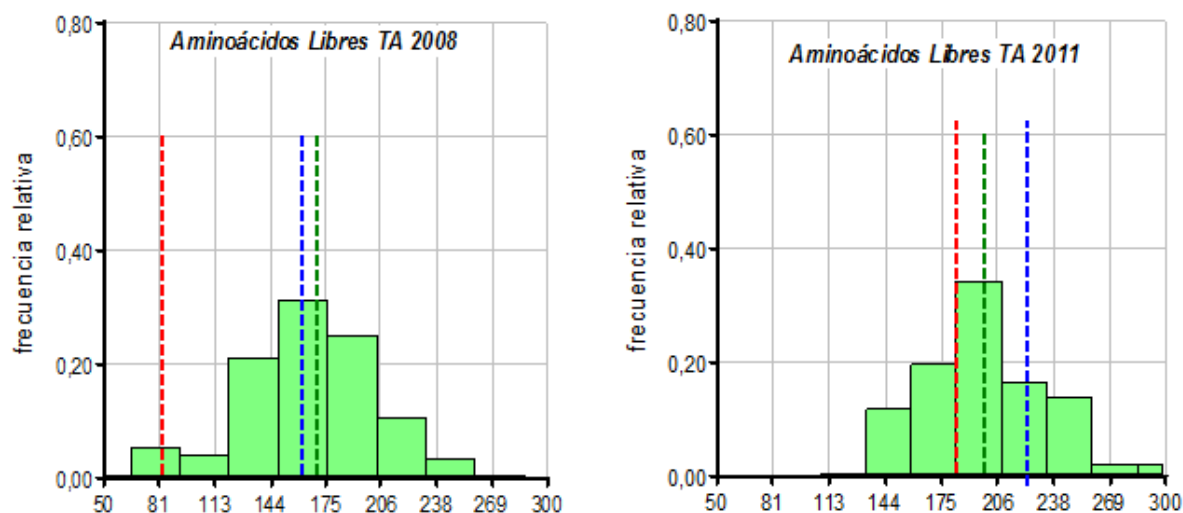


Figura 4.8.2: Distribución de frecuencias para Aminoácidos Libres en los ambientes Tres Arroyos 2008 y 2011. Línea Roja: Mut 6519, Azul: Aspen, Verde: promedio de la población.

La tabla 4.8.3 muestra los niveles de proteína de cebada de estos ensayos para las líneas parentales y el promedio, aunque se vio precedentemente que no existió relación entre proteína y FAN.

Tabla 4.8.3: Proteína de Cebada de los ensayos Tres Arroyos 2008 y 2011 de las líneas Mut 6519, Aspen y el promedio de la población.

PROTEINA ENSAYOS TRES ARROYOS (% s.s.)		
	2008	2011
Mut 6519	16,0	15,4
Aspen	14,5	13,6
Promedio de la población	14,1	14,4

En la Figura 4.8.3 se observan las características climáticas de los años 2008 y 2011 en Tres Arroyos. Como para otros caracteres de calidad, las diferencias más notables que existieron entre estos dos años fue la mayor temperatura media del mes de noviembre de 2008, un déficit de precipitaciones en todo el ciclo de cebada en ese año, mientras que en 2011, el mes de noviembre tuvo un suministro de precipitaciones que duplicó el promedio histórico. Tomando todos los ambientes del 2008 y los del 2011, con diferencias de precipitaciones similares a las vistas para Tres Arroyos, el promedio de FAN del 2008 fue 157,7 ppm, mientras que en el 2011 fue 180,4 ppm, concluyendo que quizás un déficit de precipitaciones durante el llenado de los granos podría resultar en menores niveles de aminoácidos.

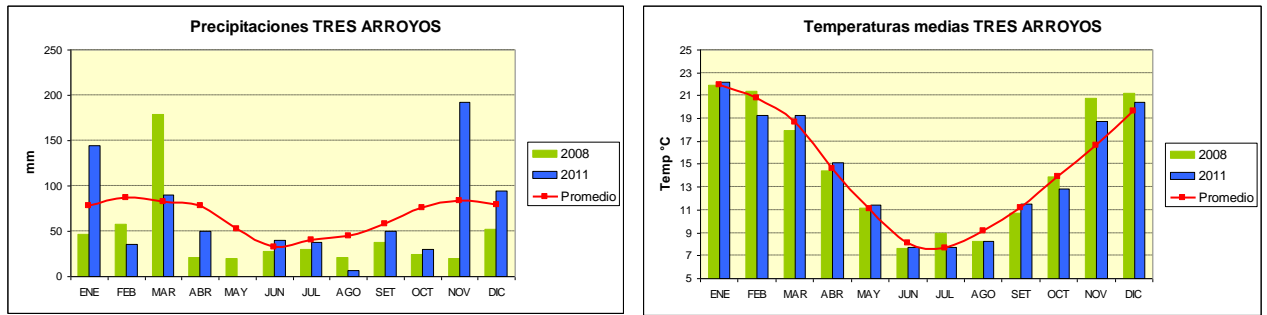


Figura 4.8.3: Precipitaciones (mm) y Temperaturas Medias Mensuales (°C) de los ensayos Tres Arroyos 2008 y 2011.

La Figura 4.8.4 muestra los 11 ambientes en los que se determinó el contenido de aminoácidos en el mosto. El año con menor nivel de precipitaciones en el mes de noviembre (donde ocurrió el llenado de los granos) fue 2008, y fue también el año con menor contenido promedio de aminoácidos. En los años 2010 y 2011, en los que se registró una mayor cantidad de mm de lluvia en todos los sitios, también se generó un nivel más alto de aminoácidos. En el caso de Puan, en 2010 las lluvias registradas fueron 86 mm y el valor de FAN fue de 199,2 partes por millón, mientras que en 2011 las lluvias fueron 247 mm y el valor de FAN fue 184 ppm. La causa de esa inversión a la conclusión anterior pudo haber sido la diferencia del nivel de proteína (sustrato de los aminoácidos a partir de la actividad proteolítica) obtenido en 2010 y 2011, que fue de 13,31% y 10,32% respectivamente. De todas maneras, las lluvias en Puan en noviembre de 2008 fueron sólo 34 mm, generando 160,1 ppm de aminoácidos con 15,71% de proteína promedio, mostrando así que un menor nivel de precipitaciones durante el llenado de los granos estaría condicionando menores niveles de aminoácidos.

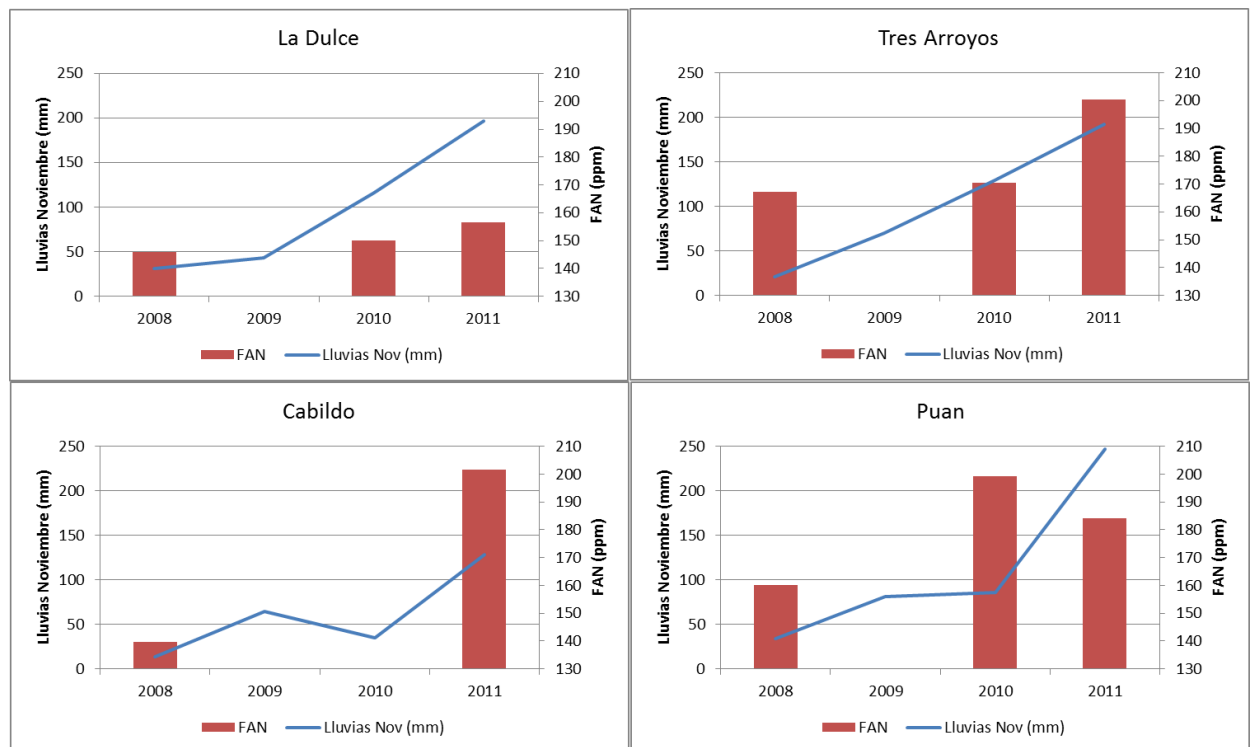


Figura 4.8.4 Relación entre lluvias de noviembre (en mm) y los niveles de aminoácidos libres (FAN, en partes por millón), en cada una de las localidades.

4.9 Índice de Hartong (Vz 45°C)

Este carácter representa el extracto (sustancias solubles) obtenido a partir de una maceración de malta en agua a 45°C constante durante 1 hora (EBC, 1998). Fue introducido por Hartong (1936, 1938), y siendo 45°C la temperatura óptima de las enzimas proteolíticas, durante muchos años se asumió que la mayor proporción de sustancias solubles provenía de la descomposición proteica, es decir, cadenas polipeptídicas de alto, medio y bajo peso molecular, hasta aminoácidos.

Los promedios de Vz 45°C obtenidos en cada ambiente se encuentran detallados en la Tabla 4.9.1

Tabla 4.9.1: Promedios, máximos y mínimos de Índice de Hartong (%) de la población de DH y sus parentales en cada ambiente.

Vz 45°C (%)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
Cabildo 2008	35,5	28,4	33,2	27,7	45,3
Puán 2008	37,0	33,3	40,3	28,4	50,1
TA1 2010	36,2	44,7	41,2	29,3	49,1
LD 2010	31,0	31,1	36,4	25,1	41,6
Cabildo 2010	43,7	35,7	31,2	31,2	58,0
Puán 2010	46,3	42,0	37,7	35,7	62,9
TA 1 2011	42,5	38,0	36,3	29,8	64,2
LD 2011	33,1	32,8	31,5	27,1	42,5
Puán 2011	44,2	40,2	37,0	34,7	58,8
Promedio General	38,8	36,2	36,1	29,9	52,5

Es notable que en el sitio La Dulce 2010 y 2011 se observaron los menores valores promedio de Vz 45°C. En esos mismos años, en el resto de los sitios (Cabildo, Puan y Tres Arroyos), se obtuvieron valores aceptables (36,2 %) hasta muy buenos (46,3 %), con patrones de precipitaciones y temperaturas similares, es decir, sin déficit de precipitaciones y temperaturas en el promedio histórico (2011) o levemente inferior (2010). Las diferencias en proteína entre los sitios no explica esta característica diferente de La Dulce.

Las relaciones entre el carácter Vz 45 °C y ALA (como indicador de actividad amilolítica) y FAN (como indicador de actividad protelítica) se observan en las Figuras 4.9.1 y 4.9.2.

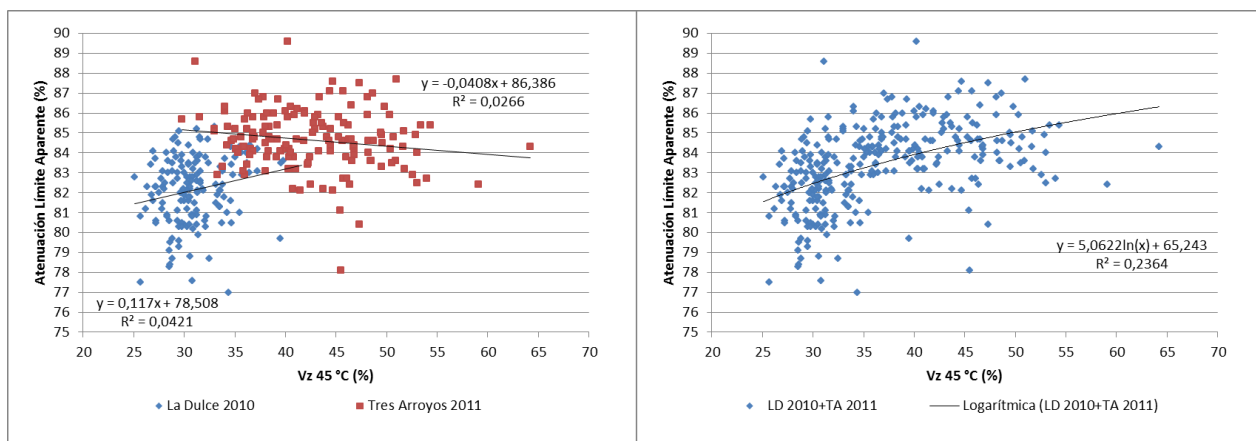


Figura 4.9.1: Relaciones entre Vz 45°C y Atenuación Límite Aparente (ALA), en La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011, y unión de los datos de ambos ambientes.

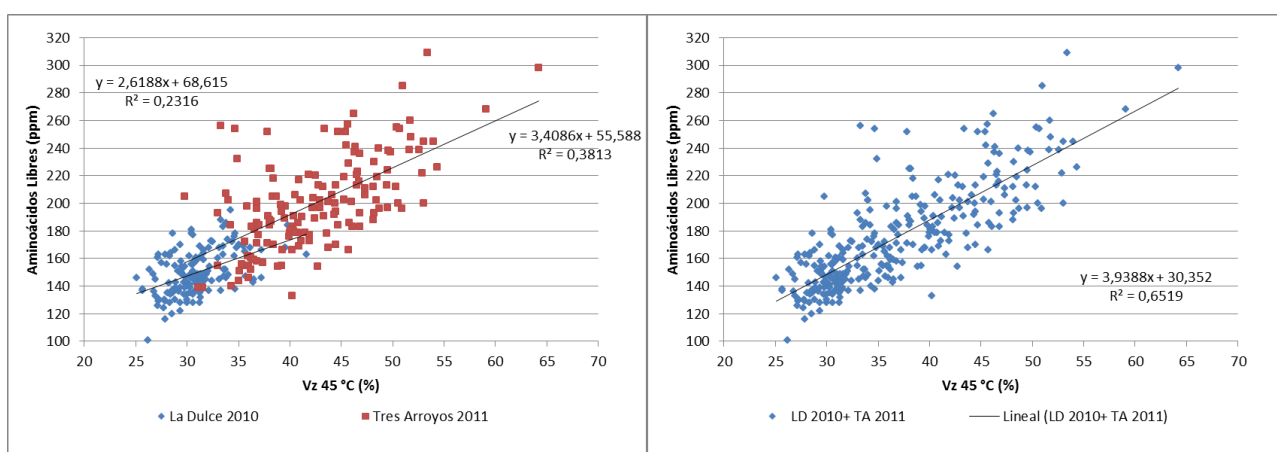


Figura 4.9.2: Relaciones entre Vz 45°C y Aminoácidos Libres (FAN), en La Dulce 2010 y Tres Arroyos 2011, y unión de los datos de ambos ambientes.

Las regresiones entre Vz 45°C y ALA por ambientes son aún menores a las encontradas por Keßler et al. (2005), ya que en los casos elegidos como ejemplos (aunque se analizaron todos los ambientes con resultados similares) los valores de R^2 fueron 0,04 y 0,027. Uniendo los datos obtenidos en ambos ambientes, aún con rectas de regresiones diferentes, ampliando así el rango explorado de Vz 45°C, la regresión con función logarítmica dio un valor R^2 de 0,24.

Sin embargo, en estos mismos ambientes los valores de R^2 entre Vz 45 °C y FAN fueron 0,226 y 0,377, superiores a los encontrados en el trabajo mencionado que fue de 0,174. De la misma forma anterior, la unión de datos de ambos sitios dio un valor de R^2 mucho más significativo, 0,65.

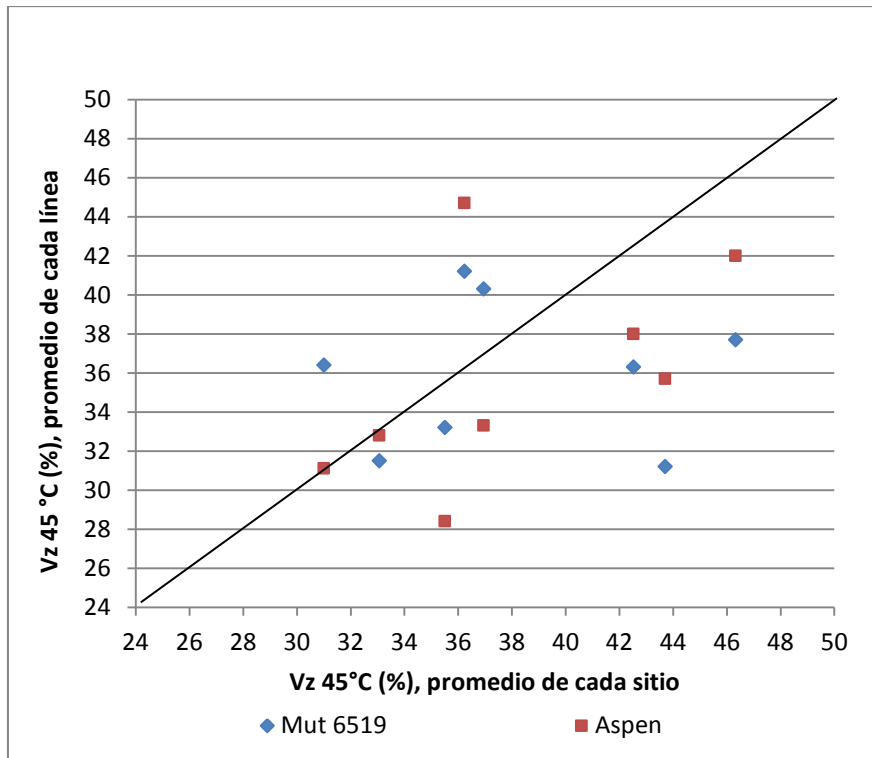


Figura 4.9.3: Valores de Vz 45 °C de las líneas Mut 6519 y Aspen, en relación al promedio de cada ambiente.

La Figura 4.9.3 muestra las posiciones de las líneas Mut 6519 y Aspen con relación con el promedio de cada ambiente. A diferencia de otras determinaciones de calidad, se observa que solamente en un ambiente las dos líneas parentales son superiores al promedio del ensayo, y Aspen en dos casos más. Esto significa una descendencia con una distribución de frecuencia volcada hacia la derecha de los padres, es decir, mejor que la media de las líneas parentales.

4.10 Atenuación Límite Aparente

Se denomina así al porcentaje de azúcares fermentables que contiene un mosto cervecero. Es la relación porcentual entre la densidad del mosto, medida luego de la acción de las células de levadura, con la densidad original. La primera es menor que la segunda, ya que las levaduras fermentan los azúcares y los convierten en CO₂ y alcohol, causando ambos componentes una reducción de la densidad.

El término “atenuación” se refiere a la reducción de densidad luego de la fermentación, “límite” porque en el análisis se utiliza una cantidad en exceso de levadura actuando durante 24 horas, condiciones que se consideran suficientes para fermentar todos los azúcares disponibles (glucosa, maltosa y triosa), y “aparente” porque no hay destilación del alcohol formado, es decir, el alcohol mezclado en el mosto disminuye aún más la densidad.

La especificación de malta para ALA cubre el rango entre 80% a 82%, con tolerancias entre 78% y 84%. El motivo de obtener mostos con menor ALA sería una menor actividad enzimática amilolítica, lo que causa pérdida de volumen de cerveza. Mostos con valores de ALA muy elevados originan cervezas con graduaciones alcohólicas más altas, y disminución de cuerpo (característica organoléptica muy importante).

Los promedios de ALA obtenidos en cada ambiente se encuentran detallados en la Tabla 4.10.1

Tabla 4.10.1: Promedios, máximos y mínimos de Atenuación Límite Aparente (%) de la población de DH y sus parentales en cada ambiente.

ATENUACION LIMITE APARENTE (%)					
	promedio	Aspen	Mut 6519	Mínimo	Máximo
TA 2007	82,7	81,7	82,7	73,3	87,6
TA 2008	84,9	85,0	82,8	81,9	89,1
LD 2008	85,0	85,9	83,3	80,7	90,1
Cabildo 2008	85,2	85,3	83,9	81,8	88,7
Puán 2008	85,5	85,8	84,2	82,8	88,5
TA 2010	83,5	83,5	84,1	77,3	85,9
LD 2010	82,1	83,5	83,0	77,0	85,3
Cabildo 2010	83,1	82,2	83,5	79,9	85,4
Puán 2010	83,7	81,8	84,8	81,0	87,0
TA 2011	84,7	84,5	86,0	78,1	89,6
LD 2011	85,2	83,3	84,4	81,4	88,2
Puán 2011	85,2	84,7	80,2	79,5	89,5
Promedio General	84,3	83,9	83,6	79,6	87,9

Los promedios generales de cada línea parental en todos los sitios fueron muy similares (83,9 % para Aspen y 83,6 % para Mut 6519). Sin embargo, la Figura 4.9.1 muestra que por debajo de 84,7%, el valor de Mut 6519 supera a los valores de Aspen en casi todos los ambientes, mientras que en ambientes con promedios de ALA mayores a 84,7%, Aspen tiene mayores valores de ALA.

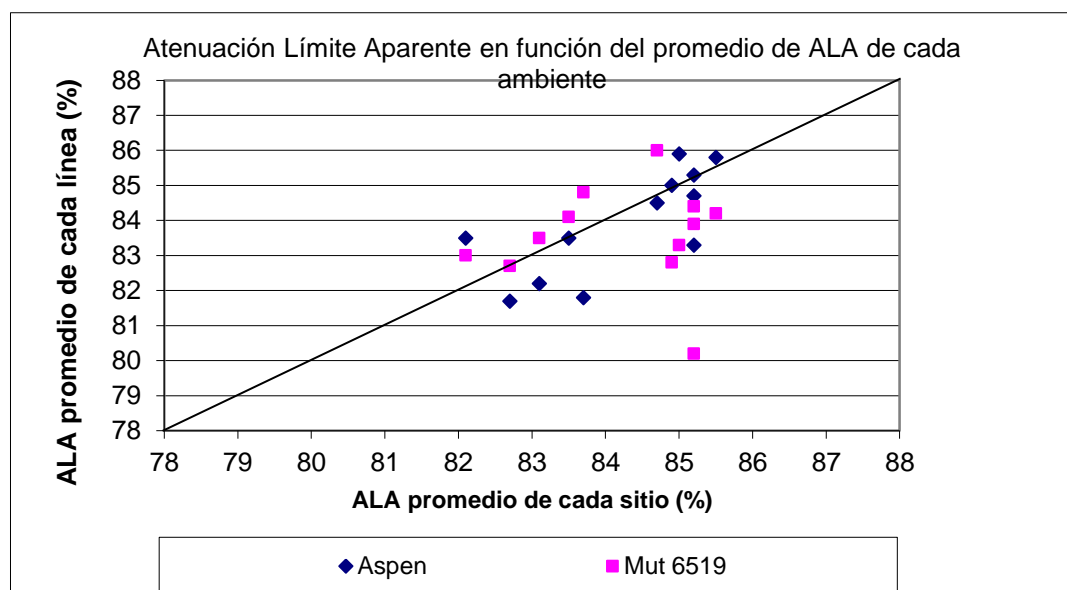


Figura 4.10.1: Atenuación Límite Aparente de las líneas Mut 6519 y Aspen, en función del promedio de cada ambiente. La línea indica la relación 1 a 1.

De dicha observación y de la Tabla 4.10.1 surge que en el año 2008 (donde se produjo el mayor déficit de precipitaciones durante el ciclo del cultivo) la malta de la variedad Aspen tuvo mayores valores de atenuación.

Una diferencia con otros caracteres de calidad medidos, es que el promedio de la población en cada ambiente se ubica muy cercano al valor de las líneas parentales. En las determinaciones anteriores, Mut 6519 mostraba calidades notablemente inferiores a la de Aspen. La figura 4.10.2 compara una única localidad (Tres Arroyos) en los cuatro años evaluados.

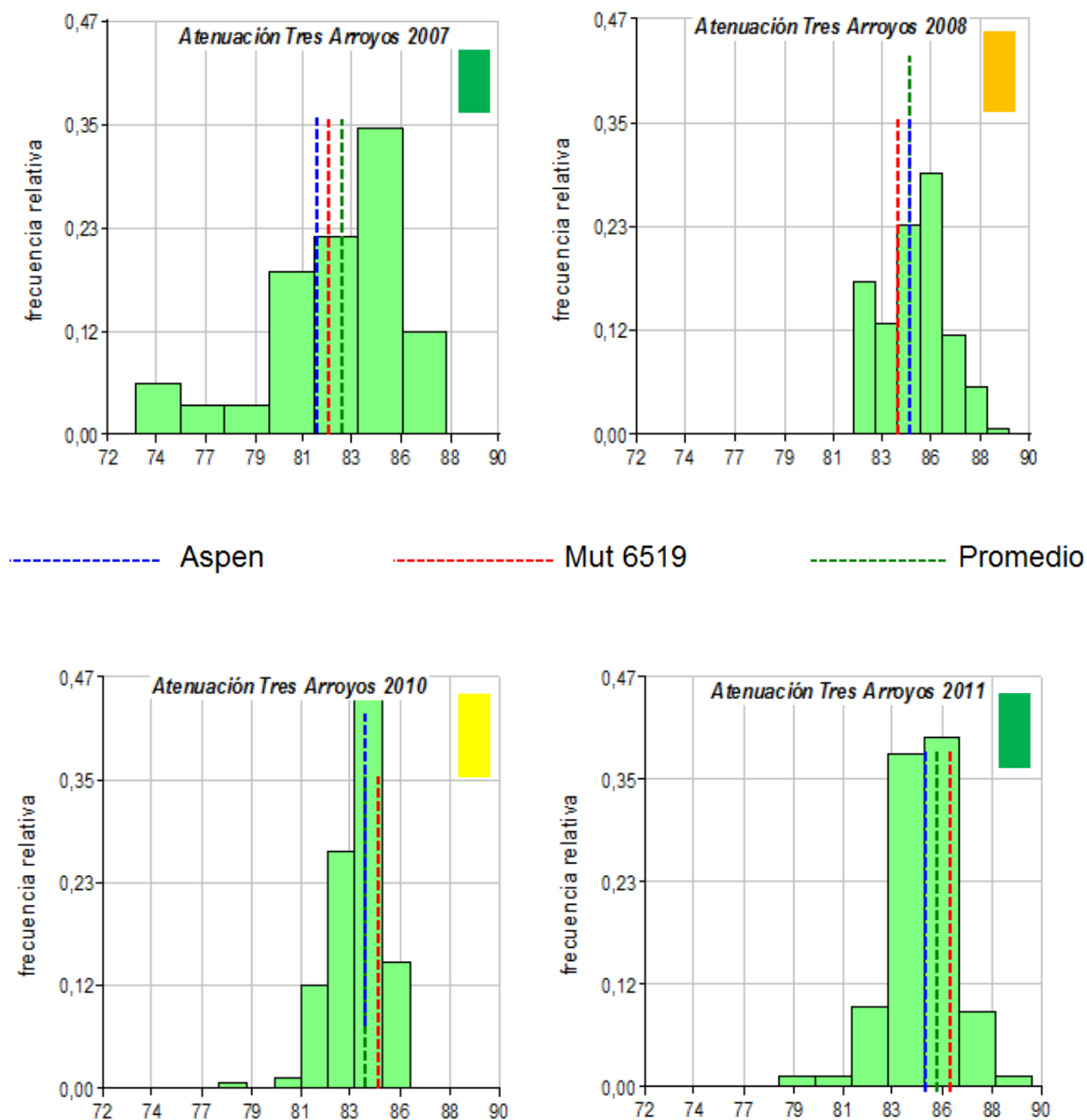


Figura 4.10.2: Distribuciones de frecuencia de Atenuación Límite Aparente en los ambientes Tres Arroyos 2007, 2008, 2010 y 2011. Cuadros de color verde: sin déficit de agua, naranja: déficit intermedio alto, amarillo: déficit intermedio bajo, rojo: alto déficit.

Basado en la idea de la relación entre proteína de cebada y síntesis enzimática, las Figuras 4.10.3 y 4.10.4 muestran las relaciones entre proteína de cebada y atenuación, tomando valores promedio de ensayos, y proteína y atenuación de Aspen y Mut 6519 respectivamente.

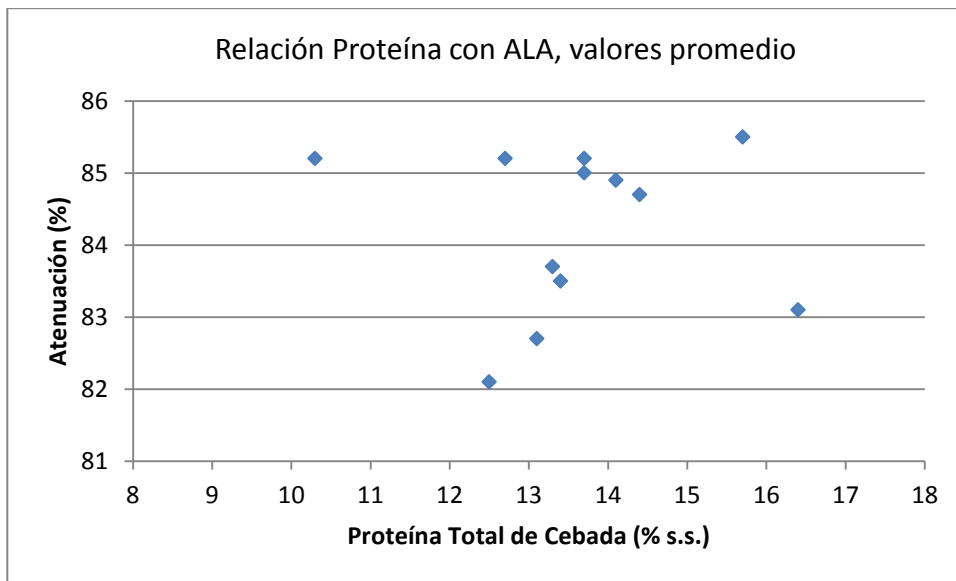


Figura 4.10.3: Relación entre Proteína de Cebada y Atenuación, valores promedio de ambientes.

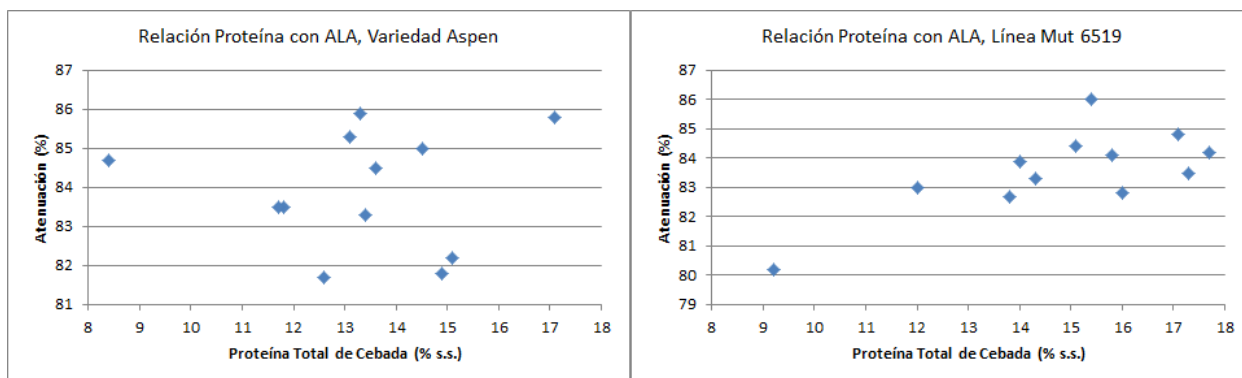


Figura 4.10.4: Relación entre Proteína de Cebada y Atenuación, Variedad Aspen y Línea Mut 6519.

En estos ejemplos se establece claramente la falta de relación entre nivel de proteína y atenuación. Analizando de la misma manera con la totalidad de los individuos de la población en dos ambientes contrastantes, Cabildo 2008 y Puán 2011, se confirma la baja relación entre estos dos caracteres ($R^2 = 0,024$ y $0,012$ respectivamente).

Además de las relaciones mencionadas entre atenuación con proteína y atenuación con Vz 45°C, otras relaciones fueron estudiadas con el mismo propósito: FAN, por su posible relación entre cantidad de aminoácidos disponibles para la fermentación; dureza de malta, por la posibilidad de contar con mayor almidón disponible; y extracto, por la cantidad de azúcares como sustrato para fermentar. En todos los casos, los valores de R^2 fueron extremadamente bajos.

4.11 Discusión

El proceso de malteado representa una utilización muy importante del cultivo de cebada para la elaboración de cerveza (aproximadamente un 20% de la producción mundial se utiliza con este fin, ver Introducción). Los métodos convencionales de análisis para evaluar la aptitud de las cebadas con fines industriales incluyen el análisis de caracteres de los granos, seguido del micromalteo y el análisis de los parámetros de calidad. Los caracteres de cebada y de calidad de malta generalmente exhiben variación cuantitativa y están influenciados por factores genéticos, ambientales y su interacción (Han et al., 1997; Mather et al., 1997). Los análisis de malta son costosos y requieren mucho tiempo de trabajo de laboratorio. Pero sin duda, la mayor complejidad que existe en la evaluación de la calidad es la variación de resultados que se observa entre ambientes, obligando a la necesidad de ensayar en un número grande de ambientes (sitios * años), y con esa información, emplear métodos de análisis de estabilidad o directamente eliminar aquellas líneas que muestren menor calidad al ser expuestas a las diferentes condiciones.

En la industria maltero-cervecera existe una opinión generalmente aceptada sobre la correlación entre el nivel de proteína de los granos con otros atributos de calidad. Incluso, se afirma que el porcentaje de proteína de los granos es una especificación comercial que se relaciona con muchos de los otros caracteres (Marquez-Cedillo et al., 2000). Si eso fuese realmente así, el nivel de proteína sería un carácter ideal para seleccionar indirectamente por calidad industrial, ya que se analiza sobre los granos sin necesidad de maltear. Sin embargo, la relación entre proteína y otros caracteres de calidad es muy baja cuando existe una diversidad ambiental en sitios y años (Aguinaga, 2004) y mucho más baja, cuando hay varios genotipos involucrados en el análisis.

La importancia del nivel de proteína de los granos en la calidad industrial ha sido establecida hace muchos años (Bishop, 1928, 1930, 1934, 1948). También desde una etapa temprana del conocimiento industrial, Mac Gregor (1996) amplió la influencia del contenido proteico a otros atributos de la calidad de aquellos establecidos por Bishop. Además de la relación opuesta entre proteínas y extracto, fueron observados aspectos negativos como la formación de agregados o geles que causan problemas en la filtración por altos porcentajes de proteína, y positivos como la adecuada provisión de aminoácidos para las células de levaduras durante la etapa de fermentación, la producción y retención de espuma y la correcta función hidrolítica durante el malteado y la fabricación de cerveza.

Dichas relaciones establecidas por Bishop entre proteína y extracto, se cumplen en el caso de un único genotipo en el mismo ambiente, por ejemplo, en ensayos de fertilización donde se obtienen muestras con diferente contenido de N en los granos. Incluso, se ha demostrado que el mismo genotipo, con el mismo contenido de proteína, cultivado en ambientes contrastantes (seco y húmedo, por ejemplo) demuestran potenciales de calidad muy diferentes (Aguinaga, 2004).

La cebada utilizada para la elaboración de malta debería tener un contenido proteico mínimo de 10% y máximo de 12%, con tolerancia hasta 13% (Normas de Calidad y Comercialización de Cebada, 2007). En diversas situaciones, estos valores no se obtienen debido a la influencia que tiene el ambiente sobre este atributo (Bathgate, 1987; Smith, 1990). Un nivel proteico por encima del valor establecido para cebada cervecera, puede ser causado por:

1) alta disponibilidad de nitrógeno para el rendimiento objetivo planteado (Varvel y Severson, 1987; Weston et al, 1993; Eagles et al, 1995),

2) situación de stress causada por sequía (Morgan y Riggs, 1981; Coles et al., 1991; Grant et al., 1991; Birch et al., 1997),

3) altas temperaturas combinadas con sequía (Macnicol et al., 1993; Savin and Nicolas, 1996) durante el período de desarrollo del grano.

En los ambientes de Argentina, dos situaciones que ocurren con cierta frecuencia involucran diferentes disponibilidades de agua y de nitrógeno:

En una primera situación ante una sequía en el período previo a la antesis, se produce una menor absorción de N durante el período vegetativo y se reduce el potencial de rendimiento. Mayor cantidad de N se encuentra disponible durante el llenado de grano debido a un menor número de semillas y entonces la concentración de proteína del grano podría aumentar.

En una segunda situación, en la que ocurre una sequía durante el último estadio de llenado de grano, se limita la incorporación de carbohidratos en el grano y causa pre-maduración y menor dilución del N de los granos (Bertholdsson, 1999).

Para conocer la distribución de lluvias y evaluar dentro de qué posibilidades nos encontramos en las dos situaciones presentadas por Bertholdsson, en la tabla 4.11.1 se detallan, como ejemplo, las precipitaciones de Puán en los años 2008 a 2011, agrupadas por momentos claves del ciclo del cultivo.

Tabla 4.11.1 Distribución de precipitaciones en Puán, años 2008 a 2011

PERIODO	PRECIPITACIONES (mm)			
	2008	2009	2010	2011
Antes de siembra	219,3	107	314,8	523,5
Período Vegetativo	94	126,9	218,7	125,4
Llenado de los Granos	34	81,4	86	247
Total hasta cosecha	347,3	315,3	619,5	895,9

Seguidamente, en la tabla 4.11.2 se encuentran los resultados de rendimiento, calibre y proteína de Puán en los mismos años.

Tabla 4.11.2. Resultados de Rendimiento, Calibre y Proteína de Cebada, en Puán, años 2008 a 2011.

	2008	2009	2010	2011
Rendimiento (kg/ha)	2758,9	881,3	2392,7	3130,0
Calibre (%)	26,3	15,4	91,8	93,5
Proteína de Cebada (%)	15,7	16,8	13,3	10,3

En 2008, más de 300mm de precipitaciones acumulados en el período anterior a la siembra + período vegetativo permitió generar una cantidad adecuada de granos, pero solamente 34 mm durante el período de llenado, no fue suficiente para lograr tamaños de granos que

lleguen a la especificación comercial, y como consecuencia resultó en una mayor proporción de N en los granos, ejemplo de la segunda situación mencionada por Bertholdsson (1999).

En 2009, 234 mm acumulados previo a la siembra + período vegetativo, resultaron en una menor cantidad de granos, y además, 81mm durante el período de llenado fueron insuficientes para un llenado de granos adecuado, probablemente como consecuencia también de las pocas precipitaciones durante el resto del ciclo del cultivo (se dio en este caso la situación 1 + situación 2).

Los años 2010 y 2011 tuvieron características similares, sin estrés durante todo el ciclo, aunque una mayor cantidad de precipitaciones en 2011 resultó en mayor rendimiento y menor nivel de N en los granos comparados con 2010.

Howard et al. (1996) afirma que las condiciones climáticas en cada año son las responsables de la variación en la calidad. Existen antecedentes que demuestran que algunas condiciones intrínsecas del grano (además del nivel de proteína total), como por ejemplo, el endosperma tipo harinoso, serían las responsables de la variación en la calidad maltera (Bamforth and Barclay, 1993, Mac Gregor, 1996). Es por eso que, el nivel de proteína sería sólo un primer escalón en la determinación de la calidad.

La descomposición de las proteínas de reserva durante la etapa de germinación es la responsable de la provisión de aminoácidos para las células de levadura. Una manera indirecta de medir dicha descomposición es a través del Índice de Hartong (Kuntze, 2014). Sin embargo, las regresiones entre dicho índice y la cantidad de aminoácidos generados (FAN) fueron generalmente significativas pero bajas. Keßler et al. (2005) determinó que en realidad la alta correlación se verifica entre el Índice de Hartong y la temperatura de gelatinización del almidón ($r = -0,84$, $R^2 = 0,71$), es decir, a menor temperatura de gelatinización (inicio de descomposición del almidón a menor temperatura), el índice resulta mayor.

McGregor (1996) determinó que condiciones de sequía durante el llenado de los granos determinan una prevalencia de gránulos de almidón tipo B, que requieren una mayor temperatura de gelatinización, 75-80 °C (Palmer, 1989, Borem et al., 1999), a diferencia de los gránulos de tipo A, 60-62 °C. Las situaciones de déficit de agua que se registraron en algunos de los ambientes de esta tesis, podrían confirmar o descartar esta afirmación, ya que sería correcto suponer que temperaturas de gelatinización más bajas permiten una descomposición más intensa del almidón, y en consecuencia, una proporción mayor de azúcares simples, fermentables.

Sin embargo, la relación entre Vz 45 °C y Atenuación Límite Aparente encontrada por Keßler et al (2005) fue muy baja, un $R^2 = 0,07$, mientras que en esta tesis las regresiones de los casos tomados como ejemplos fueron aún más bajas.

Tampoco se observaron relaciones sólidas entre variables aparentemente relacionadas, como por ejemplo, Vz 45°C y atenuación, dureza de malta con proteína y proteína con aminoácidos.

Los distintos componentes del grano son sintetizados en forma secuencial y algunas de las vías de síntesis ocurren simultáneamente. Consecuentemente, si un corto período de alta temperatura o sequía ocurre en un cierto punto del período de llenado, puede afectar a uno o a más componentes que están siendo formados concurrentemente y resultar en una diferente composición del grano (Savin y Molina-Cano, 2002). El déficit hídrico durante el llenado de los

granos perjudica la fotosíntesis y la translocación de los fotosintatos –actuales o de reserva- (Marschner, 1997). Las altas temperaturas durante el llenado acortan este período (por cumplimiento de la suma térmica en menor tiempo), resultando en una mayor proporción de gránulos tipo B asociados con hordeínas y beta glucanos. Estas condiciones generan una estructura de endosperma cerrada, que dificulta el movimiento de las enzimas hidrolíticas y con ello, la disolución de los diferentes compuestos estructurales del endosperma (paredes celulares y matriz proteica).

La proporción de azúcares fermentables obtenidas a partir del almidón acumulado durante el llenado de los granos depende de la actividad enzimática amilolítica y de la proporción de gránulos tipo A y tipo B. Por las razones explicadas anteriormente, podría suponerse que en ambientes con menor disponibilidad hídrica los valores de atenuación podrían ser más bajos. A pesar de tener una variabilidad ambiental importante en los ensayos realizados, los valores promedio de la población y de las líneas parentales se encontraron dentro del rango superior de tolerancia y algunos excedidos, pero en ningún caso por debajo de 80%. El hecho que podría explicar estos altos valores de ALA sería el nivel de proteína total registrado en casi todos los ambientes, ya que la producción enzimática está directamente relacionado con el nivel de proteína de los granos, especialmente la enzima β -amilasa (Shewry, 1993). Para el caso del ambiente Puán 2011, si bien los valores de proteína estuvieron dentro de los rangos aceptables para la industria (promedio de proteína menor a 12%), los valores altos de ALA podrían explicarse por las buenas condiciones ambientales durante el llenado de los granos.

Por ello, contar con herramientas simples de selección vinculadas con calidad industrial resulta imprescindible. La temperatura de canopeo ensayada en esta tesis no resultó útil para encontrar relaciones sólidas con caracteres como extracto, dureza de malta o atenuación. Menores temperaturas de canopeo durante el llenado de los granos deberían relacionarse con mayor proporción de gránulos tipo A, con menor temperatura de gelatinización. De ser así, se esperaría que la acción amilolítica fuese más intensa, incrementando la cantidad de azúcares fermentables. Sin embargo, los valores de R^2 obtenidos entre Temperatura de Canopeo y Atenuación en todos los ambientes fueron extremadamente bajos (ejemplos: Tres Arroyos 2008 = 0,0018, Cabildo 2008 = 0,03, Tres Arroyos 2011 = 0,011).

4.12 Conclusiones

Las variaciones ambientales generaron diferencias en los promedios de calidad industrial en Proteína, Extracto, Viscosidad del mosto, β -glucanos, Aminoácidos Libres y Vz 45°C. No hubo tendencias claras para Humedad a la Salida de Remojo ni para Atenuación Límite Aparente.

Analizadas las líneas parentales y los promedios de la población, Aspen siempre manifestó una calidad mejor que Mut 6519 y los promedios de la población (por ejemplo, por mayor extracto, FAN, Vz 45°C, y por menor dureza de malta y β -glucanos), y las distribuciones de frecuencia en algunas situaciones estuvieron cercanas a las medias de los parentales, y en otras, volcadas asimétricamente hacia uno u otro padre, variando con cada ambiente.

El porcentaje de proteína promedio de la población se vio más relacionado con el tamaño de los granos que con el rendimiento ($R^2 = 0,41$ y $0,22$ respectivamente), y en consecuencia, las condiciones ambientales que generaron diferencias en los tamaños de grano, también lo hicieron con el contenido de proteína.

No se detectaron correlaciones entre caracteres de calidad que permitan reducir el número de determinaciones analíticas. Si bien, en promedio, hay ejemplos de relaciones sólidas –por ejemplo, dureza de malta con proteína-, cuando se consideran los genotipos individualmente los porcentajes de explicación de las variables en relación a otras bajan considerablemente como para ser utilizados con fines de selección.

5. MAPA DE LIGAMIENTO Y ANALISIS DE QTL

En este capítulo se detallan los resultados obtenidos en el análisis de marcadores moleculares y su relación con los caracteres fenotípicos y de calidad, previa enumeración de las hipótesis y objetivos expuestos en la Introducción.

5.1 Hipótesis 3

Es posible construir un mapa de ligamiento de marcadores AFLP y SSR a partir de una población de mapeo de doble haploides proveniente del cruzamiento entre las líneas Mut 6519 y Aspen.

Objetivo 5.1.1: Obtener una población de mapeo a partir del cruzamiento de la línea Mut 6519 con la variedad Aspen.

Objetivo 5.1.2: Analizar marcadores AFLP y SSR en dicha población de mapeo.

Objetivo 5.1.3: Establecer las relaciones de ligamiento entre los marcadores moleculares utilizados (AFLP y SSR), posibilitando la construcción de un mapa genético de cebada.

5.2 Hipótesis 4

Es posible identificar regiones genómicas relacionados con rendimiento, tamaño de los granos, respuesta a fotoperíodo, temperatura de canopeo y todas las determinaciones analíticas que caracterizan la calidad industrial de cebada.

Objetivo 5.2.1: Localizar QTL para todos los caracteres agronómicos y de calidad estudiados, utilizando un software de mapeo.

Objetivo 5.2.2: Verificar si las regiones genómicas identificadas con calidad en ambientes de adecuada disponibilidad hídrica son diferentes a las regiones que lo hacen en ambientes con deficiencia, con el fin de utilizar esta metodología para selección asistida en ambientes contrastantes.

Objetivo 5.2.3: Determinar si para caracteres de calidad relacionados (por ejemplo, extracto con proteína) aparecen QTL en posiciones coincidentes o cercanas.

5.3 Construcción de un mapa de ligamiento de cebada

Para una población de doble haploides, la segregación esperada para cada genotipo y para cada marcador polimórfico es 1:1 (homocigota AA y homocigota aa). Los valores de chi cuadrado para 1 grado de libertad (2 clases AA y aa) son 3,84, 6,64 y 10,83, y las probabilidades asociadas a esos valores son 5%, 1% y 0,1% respectivamente.

Se ordenaron los 333 marcadores AFLP y los 27 marcadores SSR (microsatélites) obtenidos de acuerdo a su relación de segregación, Se continuó el análisis con aquellos marcadores que tuvieron una relación en el rango de 1:0,7 a 1:1,3. Los valores de chi cuadrado

dentro del rango de esas relaciones estuvieron entre 0,000 ($p=1$) hasta 8,5964 ($p=0,52\%$). Se eliminaron aquellos marcadores con un LOD (probabilidad de ligamiento) menor a 2. La cantidad total de marcadores que se utilizó para la construcción del mapa después de la selección fue de 231.

Los grupos de ligamiento (GL) se determinaron tomando una frecuencia de recombinación (FR) de 0,30. La elección de dicho valor se decidió luego de probar los resultados de diferentes niveles de recombinación. Por ejemplo, con RF= 0,50 y 0,45 se formó un solo grupo con todos los marcadores, con FR=0,40 se formaron cuatro grupos, pero incluyendo marcadores pertenecientes a distintos cromosomas en dos de los grupos. Así se fueron disminuyendo las frecuencias de recombinación hasta llegar al valor más conveniente de 0,30 en el que se pudieron separar marcadores SSR pertenecientes a diferentes cromosomas. De esta manera, resultaron 29 GL con una densidad promedio de 10,6 centimorgan (cM) por marcador y una longitud total del genoma de 1969 cM. El total de marcadores incluidos en el mapa fue 177, esto es, 54 menos marcadores que los 231 iniciales, por haber quedado varios marcadores aislados y otros agrupados de a dos. Se aceptaron como grupos solamente los que tuvieron un mínimo de tres marcadores.

El estudio de las medidas de diversidad genética (Nei, 1978; Botstein et al., 1980) de los marcadores SSR mostró que en los DH todos los loci resultaron polimórficos, mientras que en las líneas parentales lo fueron el 70% de los loci. También es mayor el número de alelos en los DH (Tabla 5.3.1). Esto es porque al ser los SSR marcadores codominantes, la progenie expresa la sumatoria de alelos de cada padre.

Tabla 5.3.1. Medidas de diversidad genética de marcadores de la población de DH y de sus líneas parentales

Estadístico	SSR		AFLP	
	Parentales	DH	Parentales	DH
Loci polimórficos (95%)	0,696	1,000	0,938	1,000
Heterocigosis promedio ¹	0,000	0,000	0,000	0,000
Heter.insesgada de Nei ²	0,464	0,469	0,625	0,493
Núm promedio de alelos	1,696	2,565	1,938	2,000

¹ Heterocigosis observada

² Heterocigosis esperada según valor condicional de las frecuencias alélicas

Por medio del conocimiento de la ubicación precisa de los microsatélites (número de cromosoma de cebada y brazo), y aceptando niveles de recombinación mayores a 0,3 (pero siempre menores a 0,5, como límite de aceptación de ligamiento), se fusionaron algunos GL, resultando en 7 GL asociados con los 7 cromosomas de cebada, y 4 GL sin identificar.

Por ejemplo, el GL 29 se asoció con el brazo largo del cromosoma 1 por la presencia de los SSR Bmac 213 y GBM 1007 (Figura 5.1.1). El GL 17 se asoció con el brazo corto del cromosoma 1 por la presencia del SSR Bmac 90. Los GL 4 y 11 también se asociaron con el mismo cromosoma por aceptación de una frecuencia de recombinación de 0,37. El software MultiPoint sugiere la combinación de GL en el momento de establecer el orden de los marcadores dentro de cada GL, mostrando una ventana con GL que se encuentran separados, pero a distancias genéticas aceptables como para fusionarlos.

La tabla 5.3.2 muestra cómo los 29 grupos se asociaron en los 7 cromosomas, quedando fuera de ellos aquellos grupos en los que ningún marcador SSR quedó ligado. Un total de 1355 cM se agruparon en ubicaciones conocidas del genoma. De haberse podido integrar los 614 cM restantes a los anteriores, la densidad de marcadores hubiese sido mayor, posiblemente sin incrementar significativamente la distancia total.

Tabla 5.3.2. Grupos de ligamiento, cantidad de marcadores, longitud de cada grupo y densidad de marcadores del mapa construido

Grupo de Ligamiento	Markers	GL más cercano	Distancia al GL más cercano (fr)	Longitud (cM)	Densidad de marcadores (cM/marcador)
1	10	8	0,325	113	11,3
2	15	28	0,170	148	9,9
3	7	27	0,254	98	14,0
4	6	17	0,357	43	7,2
5	4	12	0,358	36	9,0
6	3	8	0,382	10	3,3
7	11	15	0,372	162	14,7
8	10	26	0,280	102	10,2
9	3	22	0,348	46	15,3
10	7	23	0,379	96	13,7
11	3	17	0,385	12	4,0
12	6	5	0,358	40	6,7
13	3	21	0,358	19	6,3
14	3	27	0,333	38	12,7
15	5	21	0,343	28	5,6
16	3	8	0,356	41	13,7
17	6	29	0,174	72	12,0
18	3	14	0,375	28	9,3
19	4	16	0,384	37	9,3
20	9	15	0,359	86	9,6
21	7	15	0,343	77	11,0
22	6	9	0,348	83	13,8
23	4	10	0,379	20	5,0
24	5	2	0,348	83	16,6
25	3	4	0,351	42	14,0
26	3	8	0,280	32	10,7
27	15	3	0,254	233	15,5
28	6	2	0,170	72	12,0
29	7	17	0,174	72	10,3
Total	177			1969	
Promedio					10,6

Tabla 5.3.3. Constitución de cromosomas de cebada de acuerdo a la presencia de marcadores microsatélites en los grupos de ligamiento. Sin ident.: grupos sin ubicación conocida.

Cromosoma	GL asociados	Distancia (cM)
1 HL	29	72
1 HS	4, 11, 17	127
2 HL	28	72
2 HS	2	148
3 HL	16	41
4 HL	25	42
4 HS	10,23	116
5 HL	14, 18, 27	299
5 HS	3	98
6 HLHS	24	83
7 HS	1, 6, 8, 26	257
Total		1355
Sin ident.	5, 7, 9, 12, 13, 15, 19, 20, 21, 22	614

CROMOSOMA 1

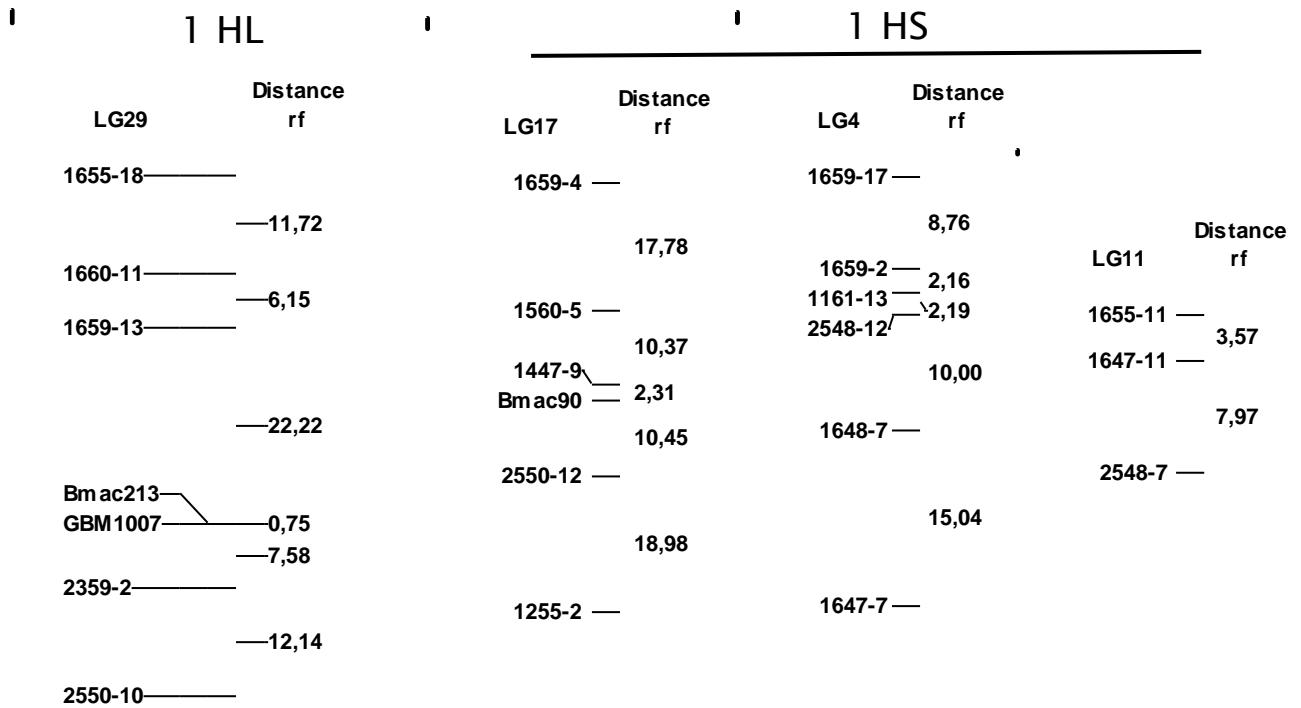
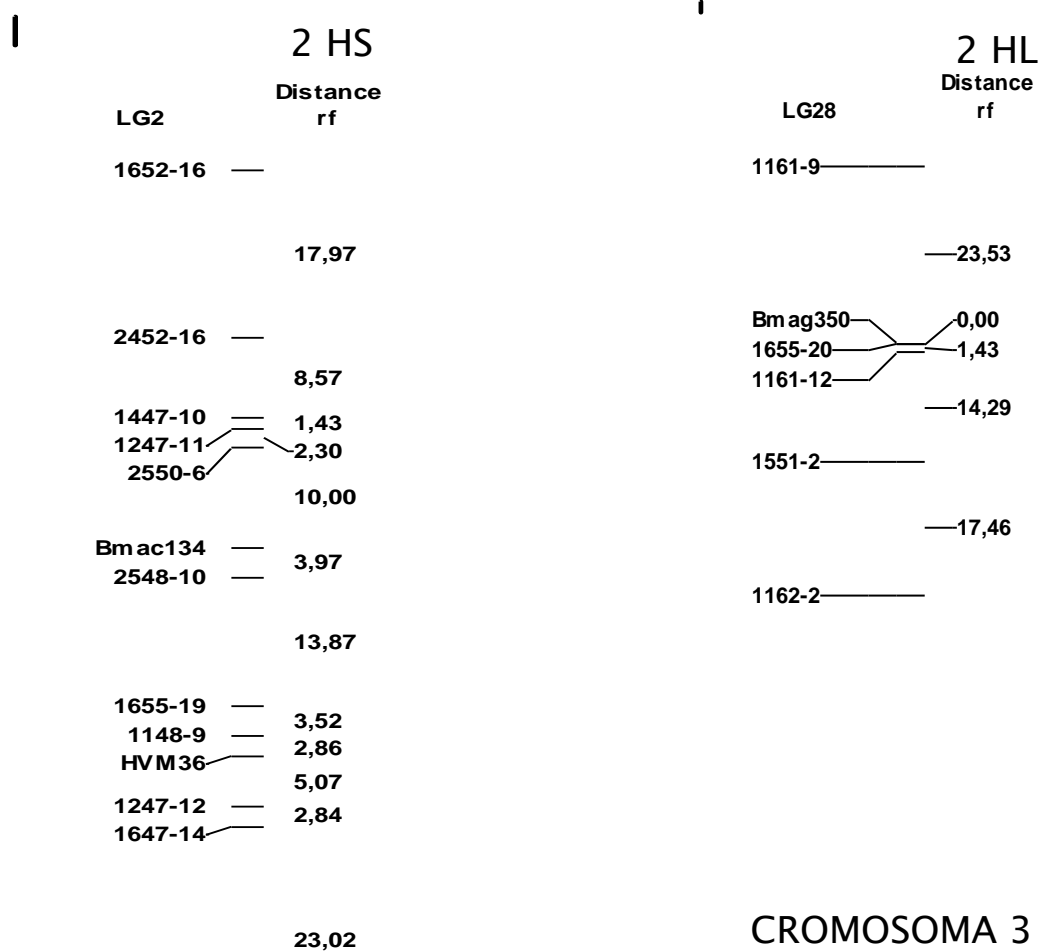
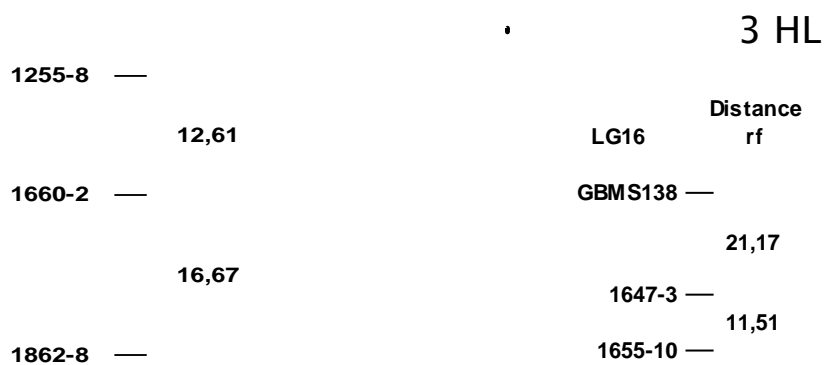


Figura 5.3.1: Conformación de los grupos de ligamiento asociados a los cromosomas de cebada. Mapa de ligamiento derivado de una población de mapeo de doble haploides originada del cruzamiento Mut 6519 x Aspen. Los marcadores aparecen a la izquierda, formato números corresponde a marcadores AFLP (ejemplo: 1659-4), formato letras + números corresponde a marcadores SSR (ejemplo: Bmac213). Las distancias de mapa aparecen a la derecha, en frecuencias de recombinación (rf) que equivalen a cM.

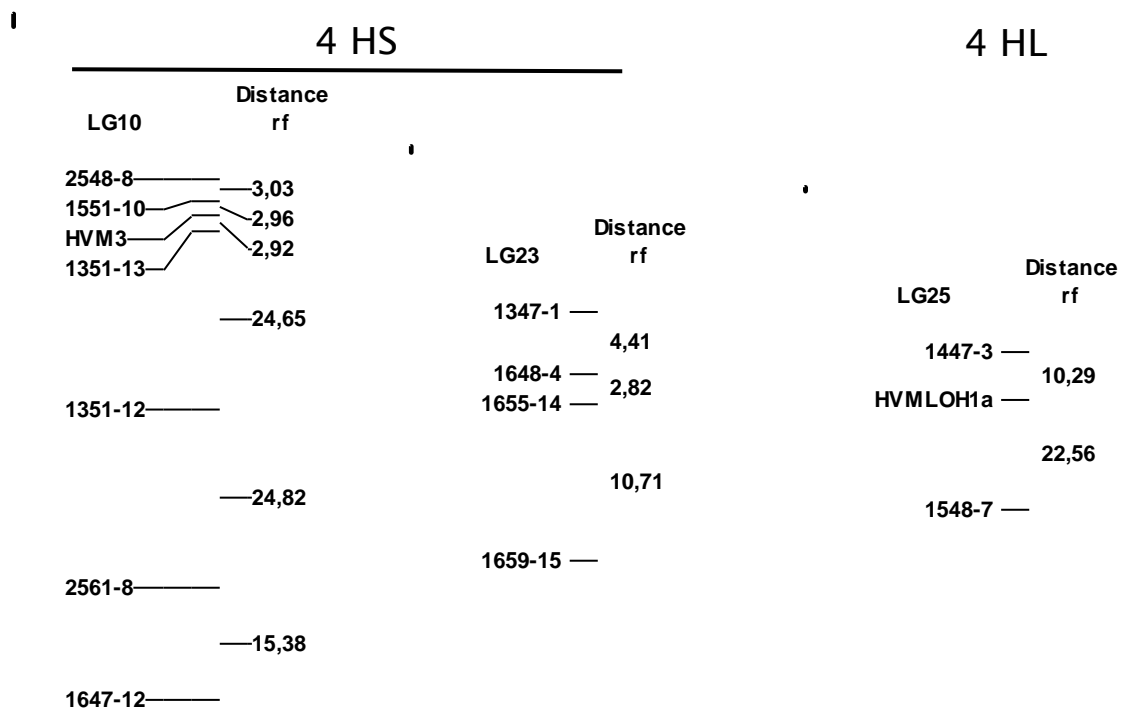
CROMOSOMA 2



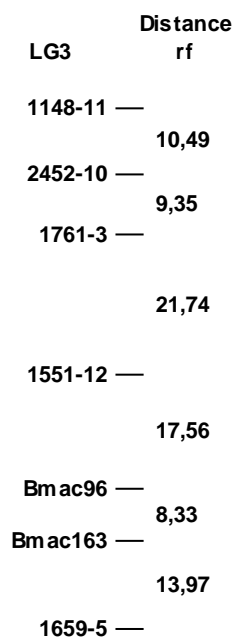
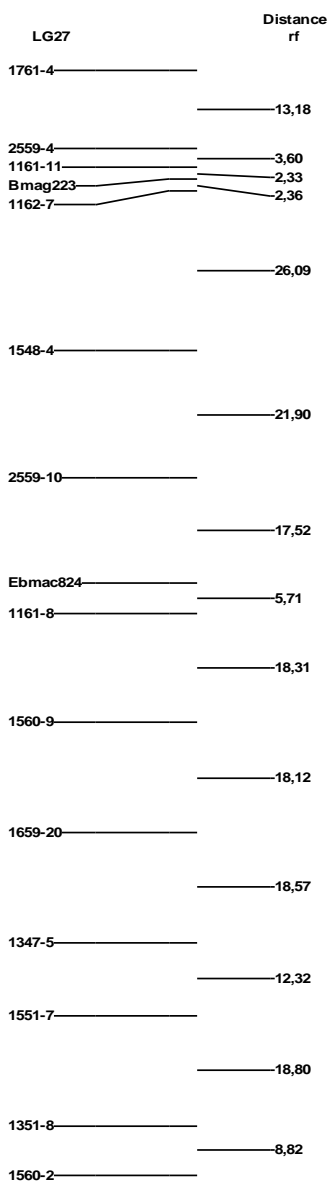
CROMOSOMA 3



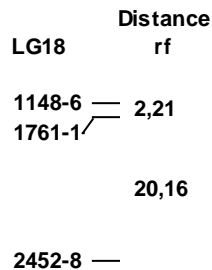
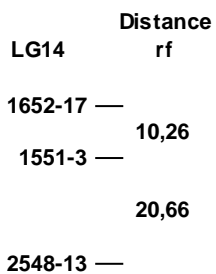
CROMOSOMA 4



CROMOSOMA 5

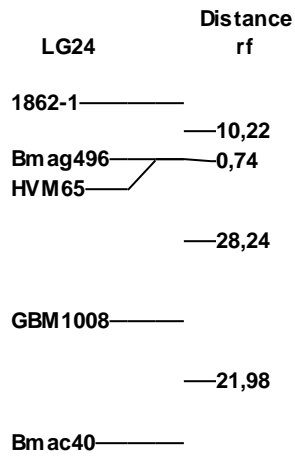


5 HS

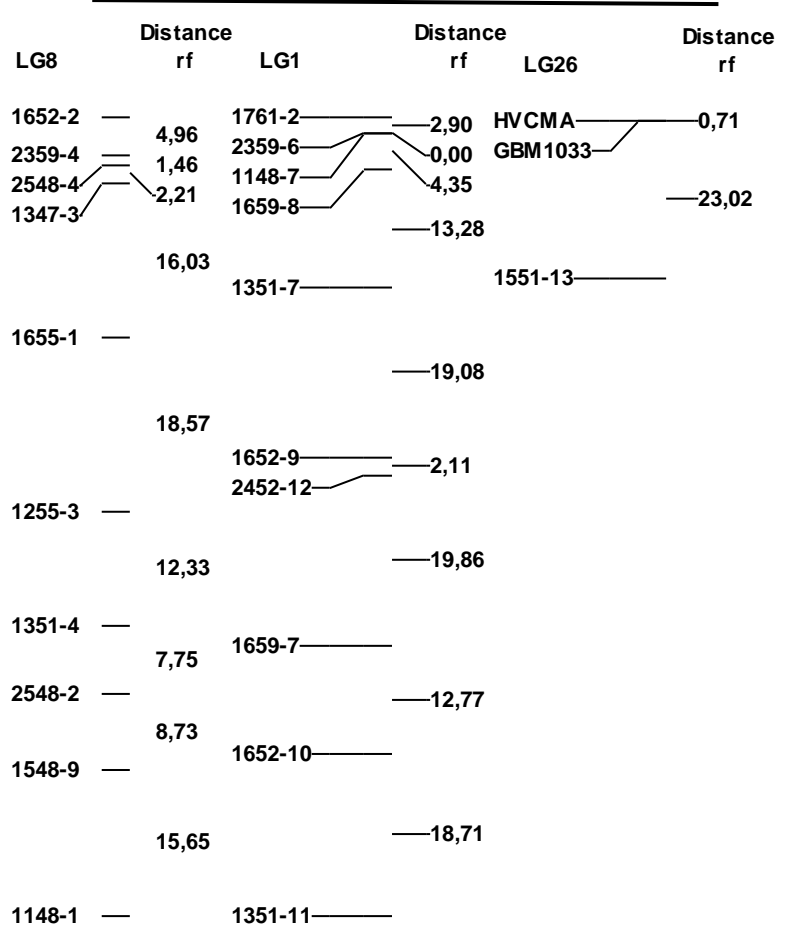


5 HL

CROMOSOMA 6



CROMOSOMA 7



GL SIN IDENTIFICACION

N° 1

LG7	Distance rf
1255-5	3,01
1161-2	1,50
1548-1	12,69
2548-9	
	21,82
1660-4	
1347-6	7,69
	23,94
1247-1	
	15,83
1162-3	
	17,04
2559-11	
	22,06

1648-1	3,76
1148-3	

LG15	Distance rf
1655-8	5,07
1551-8	
	11,59
2561-7	2,16
2550-2	6,98
1660-10	

LG21	Distance rf
2561-3	11,54
1447-8	6,25
1655-12	10,57
1648-3	15,63
1162-9	17,04
1760-6	5,88
1351-1	

N° 2

LG5	Distance rf
1162-6	7,26
1162-11	1,67
1760-2	20,45

2559-1	
--------	--

LG12	Distance rf
1247-4	12,32
2550-5	3,79
2559-7	2,96
2550-4	2,78
1648-6	

1659-18	
---------	--

N° 3

LG9	Distance rf	LG22	Distance rf
1347-4	8,97	1551-14	6,06
1560-7		1760-1	
	25,71	1162-10	7,58
1659-14		1655-21	
			28,15
		1255-7	
			15,45
		1660-3	

N° 4

LG13	Distance rf	LG19	Distance rf	LG20	Distance rf
2359-3	5,71	1652-15	4,58	1351-16	3,70
1652-4		2359-1		2548-1	
	11,43	1560-3	0,72	1148-2	2,50
2550-11		1655-13		1161-4	3,97
				1148-4	5,84
				2561-5	
					13,48
				1255-1	
					22,11
				2548-6	
					18,28
				1647-1	

5.4 Análisis de QTL

Las medias fenotípicas ajustadas por modelos mixtos se asociaron al mapeo cromosómico realizado anteriormente con 231 marcadores, distribuidos en 7 cromosomas más 10 GL sin identificación, con el fin de encontrar regiones genómicas que pudieran explicar la variación en los resultados agronómicos y de calidad.

Los caracteres evaluados para el mapeo de QTL fueron: rendimiento agronómico, tamaño de grano, proteína, humedad a la salida de remojo, dureza de malta, extracto, viscosidad, aminoácidos libres, β -glucanos, e Índice de Hartong (Vz 45°C). El resultado del análisis con el programa MultiQTL (2007), mediante el método de mapeo por intervalo simple, permitió la detección de QTL asociados a todas las características evaluadas en los diferentes ambientes. En la Tabla 5.4.1 se presenta un resumen de las variables y ambientes analizados para la localización de QTL. También se analizó respuesta al fotoperíodo determinada mediante la siembra en siete fechas en Tres Arroyos 2009, y temperatura de canopeo en dos mediciones en los ambientes Puán 2008 y Tres Arroyos 2011, y una medición en Tres Arroyos 2007, Cabildo 2009 (ambiente perdido finalmente por sequía extrema) y La Dulce 2010.

Tabla 5.4.1: Ambientes de evaluación de las variables introducidas en el análisis de QTL: Rendimiento Agronómico (Rend), Calibre (Cal), Proteína de Cebada (Prot), Humedad de Fin de Remojo (HSR), Dureza de Malta (Dur), Extracto (Ext), Viscosidad de Mosto (Visc), Aminoácidos Libres (AA), β -glucanos (B-glu), Índice de Hartong (Vz 45°C). TA Tres Arroyos, LD La Dulce, CAB Cabildo, PU Puán, seguidos del año de ensayo.

Ambiente	Rend	Cal	Prot	HSR	Dur	Ext	Visc	AA	B-glu	Vz 45 °C
TA07	x	x	x	x	x					
TA108	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
TA208	x	x	x	x	x					
LD08	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
CAB08	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PU08	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TA109	x	x	x							
TA209	x	x	x							
LD09	x	x	x							
PU09	x	x	x							
TA110	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TA210	x	x	x							
LD2010	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CAB10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PU10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PU11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TA111		x	x	x	x	x	x	x	x	x
LD11		x	x	x	x	x	x	x	x	x
CAB11		x								

En la primera etapa del análisis, se consideró una probabilidad de ligamiento entre intervalos y caracteres igual o menor a 0,05 (significativo, según la clasificación de Lander y Kruglyak, 1995) para declarar la presencia efectiva de un QTL. Este nivel de significancia estaba asociado con valores LOD (\log_{10} probabilidad de ligamiento/probabilidad de no ligamiento) de 1,2 a 2,05. De esta manera, se detectó un número muy alto de QTL, en ambientes independientes

y a través de ellos. Por ejemplo, para rendimiento agronómico, se encontraron 25 QTL en diferentes ambientes y nueve a través de ellos. Para tamaño de grano, 22 y dos QTL, respectivamente. Los porcentajes de explicación de la varianza fenotípica (PEV) estuvieron entre 3 y 6% en aquellos QTL con valores LOD menores que 2.

Por tal motivo, y basado en la explicación sobre la probabilidad de ocurrencia de falsos positivos de Lander y Kruglyak (1995), se aceptaron solamente aquellos QTL con valores LOD iguales o mayores que 1,89.

En las tablas siguientes para cada carácter se detallan solamente aquellos QTL encontrados con dicho criterio de $LOD \geq 1,89$.

5.4.1 Rendimiento agronómico

El análisis de QTL por ambientes independientes permitió la identificación de regiones genómicas en los cromosomas 4 y 5, además de una en el GL 20 no asociado con un cromosoma.

La tabla 5.4.2 muestra los QTL para rendimiento, encontrados en cada cromosoma y en todos los ambientes en forma individual. Los porcentajes de explicación de la varianza fenotípica (PEV) indican que uno de los QTL detectados es de efecto menor (7%) y dos de efecto mayor (10 y 10,1%), de acuerdo a la clasificación dada por Collard et al. (2005) quien indica un umbral de 10% para clasificar entre QTL de efecto mayor y menor. En este caso, uno de los QTL de efecto mayor fue detectado en el brazo corto del cromosoma 4 en el ambiente Tres Arroyos (segunda época de siembra) 2010, y el otro en el brazo largo del cromosoma 5 en el ambiente Puan 2008.

Cuando se consideraron todos los ambientes juntos, se detectaron dos QTL con niveles de significancia muy altos (valores de LOD superiores a 8), uno en el cromosoma 5 HS y otro en el GL 20.

Tabla 5.4.2. QTL relacionados con rendimiento agronómico en los ambientes evaluados individualmente. TA: Tres Arroyos, CAB: Cabildo, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (Kg/Ha).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
4 HS	LG10_Sk	TA210	2,25	0,006	29	10,1	-428,93
5 HL	LG14_Sk	PU08	2,2	0,007	23	10,0	-132,752
NN	LG20_Sk	CAB10	2,06	0,013	15,5	7,0	-188,318
5 HS	LG3_Sk	TODOS	8,48	0,013	97,8	1,7	-118,21
NN	LG20_Sk	TODOS	8,68	0,003	0	1,6	-40,82

En los siguientes análisis, para los QTL detectados a través de todos los ambientes, los porcentajes de explicación de la varianza fenotípica (PEV) y los efectos de sustitución explicados por estos QTL son el promedio de las PEV y los efectos individuales en todos los ambientes en que se encontraron.

5.4.2 Tamaño de los granos (Calibre sobre zaranda de 2,5 mm)

El análisis de QTL por ambientes independientes permitió la identificación de regiones genómicas en los GL 15 y 21.

La tabla 5.4.3 muestra los QTL para tamaño de los granos, encontrados en cada GL y en todos los ambientes en forma individual. Las proporciones de explicación de la varianza fenotípica (PEV), indican que los QTL detectados son de efecto menor, 6,4-6,6%.

Tabla 5.4.3. QTL relacionados con Tamaño de los Granos en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA: Tres Arroyos, LD: La Dulce, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%)

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
NN	LG15_Sk	LD11	2,1	0,004	20,7	6,6	4,409
NN	LG21_Sk	TA110	2,05	0,017	0	6,4	-2,225
1 HL	LG29_Sk	TODOS	8,85	0,022	50,1	1,5	-2,094

Cuando se consideraron todos los ambientes juntos, se detectó un QTL con un nivel de significancia muy alto (LOD = 8,85), en el cromosoma 1 HL.

5.4.3. Proteína Total de Cebada (%)

El análisis de QTL por ambientes independientes para proteína permitió la identificación de regiones genómicas en los cromosomas 2, 3, 4, 5, y 7, además de otras en GL no asociados con cromosomas definidos.

Las proporciones de explicación de la varianza fenotípica (PEV), indican la existencia de dos QTL de efecto mayor (10,6 y 11,4%), detectados en los ambientes Tres Arroyos 2011 y Tres Arroyos 2007, y 10 QTL de efecto menor, entre 5,9 y 9,8% de explicación.

Tabla 5.4.4. QTL relacionados con Proteína de Cebada en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA: Tres Arroyos, CAB: Cabildo, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
2 HL	LG28_Sk	PU09	1,89	0,009	0	5,9	0,495
3 HL	LG16_Sk	CAB10	2,87	0,003	40,4	9,0	-0,368
4 HL	LG25_Sk	CAB10	2,08	0,008	7,3	7,4	0,335
4 HS	LG10_Sk	TA11	3,5	0,001	1,7	10,6	0,649
4 HS	LG10_Sk	TA210	2,38	0,003	10,9	7,6	0,472
5 HS	LG3_Sk	TA109	2,06	0,010	75,6	8,7	0,421
7 HS	LG8_Sk	TA110	2,16	0,010	0	6,6	-0,327
NN	LG19_Sk	TA07	2,24	0,004	20,6	11,4	-0,466
NN	LG19_Sk	TA11	3,15	0,001	1,1	9,8	-0,627
NN	LG20_Sk	TA07	2,55	0,004	3,6	7,9	0,387
NN	LG20_Sk	TA110	2,68	0,003	23,1	9,5	0,393
NN	LG5_Sk	CAB10	2,01	0,011	1,6	6,8	0,32
4 HS	LG10_Sk	TODOS	13,07	0,001	2,6	2,3	0,175
7 HS	LG8_Sk	TODOS	12,8	0,001	0	2,2	-0,18
NN	LG19_Sk	TODOS	13,33	0,001	19,1	3,2	-0,222
NN	LG20_Sk	TODOS	13,06	0,001	2,2	2,3	0,18

Considerando todos los ambientes juntos, se detectaron cuatro QTL con niveles de significancia muy altos (valores LOD entre 12,8 y 13,33), en los cromosomas 4 HS, 7 HS y dos grupos no identificados. El QTL ubicado en 0 cM en el cromosoma 7 HS coincide con el QTL encontrados en Tres Arroyos (primera época de siembra) 2010.

5.4.4. Temperatura de Canopeo (TC)

El análisis de QTL por ambientes independientes para TC permitió la identificación de regiones genómicas en los brazos largo y corto del cromosoma 5, además de otro en GL 7 no asociado con cromosomas definidos.

Las proporciones de explicación de la varianza fenotípica (PEV), indican la existencia de dos QTL de efecto menor (8,2 y 8,6%), detectados en el ambiente Puán 2008 (primera medición, Z73 del cultivar Aspen) y un QTL de efecto mayor de 12,6% de explicación en Tres Arroyos 2011 (primera medición, Z73 del cultivar Aspen).

Tabla 5.4.5. QTL relacionados con Temperatura de Canopeo en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA1: Tres Arroyos, primera medición (Z73 del cultivar Aspen) PU1: Puán, primera medición (Z73 del cultivar Aspen), seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
5HL	LG14_Sk	PU108	1,90	0,011	0	8,2	0,37
5HS	LG3_Sk	TA111	3,83	0,001	97,2	12,6	0,29
NN	LG7_Sk	PU108	2,88	0,001	56,3	8,6	0,39
5HL	LG14_Sk	TODOS	4,11	0,049	0	2,5	-0,05
5HS	LG3_Sk	TODOS	6,68	0,001	97,8	2,7	0,06
7	LG8_Sk	TODOS	4,65	0,041	41	2,6	-0,02

Considerando todos los ambientes juntos, se detectaron tres QTL con LODs significativos en los brazos largo y corto del cromosoma 5 y en el cromosoma 7. En este caso, existe coincidencia entre los QTL del cromosoma 5 a través de todos los ambientes con algunos de los QTL detectados en Puán 2008 y Tres Arroyos 2011.

5.4.5 Respuesta al fotoperíodo

El análisis de QTL se basó en la determinación de la pendiente de respuesta a fotoperíodo, a partir de la siembra de los 150 DHs más Aspen y Mut 6519, en siete fechas de siembra en el ambiente Tres Arroyos 2009. Se detectó solamente un QTL de efecto menor y con valor de LOD superior al fijado como mínimo para evitar el riesgo de falsos positivos en el cromosoma 2HL. De todas maneras, solamente para este caso, en la Tabla 5.2.5.1 se agregan también dos QTL encontrados con valores LODs de 1,79*** y 1,85***, teniendo en cuenta que las determinaciones se realizaron en un sitio en particular, es decir, no hay QTL encontrados a través de todos los ambientes.

Tabla 5.4.6. QTL relacionados con Respuesta al Fotoperíodo, determinada por la duración en días de la fase Emergencia-Floración en cada una de las siete fechas de siembra en el ambiente Tres Arroyos 2009. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (día/día).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
5HL	LG14_Sk	UN SITIO	1,79	0,014	23,2	7,50	0,34
2HL	LG28_Sk	CON SIETE	2,39	0,006	43,9	8,40	-0,36
1HS	LG4_Sk	SIEMBRA	1,85	0,015	19,9	6,50	0,32

5.4.6. Humedad de Fin de Remojo

El análisis de QTL por ambientes independientes para Humedad de Fin de Remojo permitió la identificación de regiones genómicas en los cromosomas 1, 2 y 4.

Los PEV indican la existencia de tres QTL de efecto mayor (14,4%, 17,6% y 19,9%), detectados en los ambientes La Dulce 2010 y Puán 2011 (2 QTL detectados en este ambiente), y 3 QTL de efecto menor, entre 6,7 y 8,9% de explicación. A diferencia de los QTL detectados

para otros caracteres, se destacan aquí los porcentajes más altos de explicación de los tres QTL mayores.

Tabla 5.4.7. QTL relacionados con Humedad de Fin de Remojo en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA: Tres Arroyos, LD: La Dulce, CAB: Cabildo, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
1 HS	LG11_Sk	PU11	2,7	0,004	8,7	19,9	-0,868
2 HL	LG28_Sk	TA08	2,64	0,002	0	8,1	0,936
4 HL	LG25_Sk	CAB08	2,04	0,01	11,5	6,7	-0,779
4 HL	LG25_Sk	CAB10	2,07	0,015	19,2	8,9	0,65
4 HS	LG23_Sk	PU11	2,58	0,002	15,8	17,6	0,816
NN	LG5_Sk	LD10	3,13	0,001	24,4	14,4	-0,802
4 HL	LG25_Sk	TODOS	6,45	0,004	17,8	2,3	-0,083

Considerando todos los ambientes juntos, se detectó un QTL con un LOD altamente significativo de 6,45 en el cromosoma 4 HL. En este caso, no se encontraron coincidencias entre los QTL tomados en conjunto con algunos de los QTL detectados en forma de ambientes individuales.

5.4.7. Extracto

El análisis de QTL por ambientes independientes para Extracto permitió la identificación de regiones genómicas en el cromosoma 3 y en el GL 12, sin identificación cromosómica. Los PEV indican la existencia de un QTL de efecto mayor (10,1%) detectado en el ambiente Tres Arroyos 2008, y un QTL de efecto menor de 8,7% de explicación.

Tabla 5.4.8. QTL relacionados con Extracto en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA: Tres Arroyos, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
3 HL	LG16_Sk	TA08	3,07	0,001	0	10,1	-0,999
NN	LG12_Sk	TA10	2,75	0,004	39,8	8,7	-0,793
NN	LG12_Sk	TODOS	9,93	0,001	37	3,2	-0,315
1 HS	LG4_Sk	TODOS	6,84	0,004	43,1	2,1	0,284

Considerando todos los ambientes juntos, se detectaron dos QTL con valores LOD de 6,84 y 9,93, en el cromosoma 1 HS y en un grupo no identificado (GL 12).

5.4.8. Dureza de Malta

El análisis de QTL por ambientes independientes para Dureza de Malta permitió la identificación de regiones genómicas en los cromosomas 2, 4 y 5.

Los PEV indican la existencia de cuatro QTL de efecto mayor (10,0%, 11,3%, 13,4% y 13,5%), detectados en los ambientes Puán 2010 (tres QTL) y Tres Arroyos 2011, y cuatro QTL de efecto menor, entre 6,8 y 8,7% de explicación.

Tabla 5.4.9. QTL relacionados con Dureza de Malta en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA: Tres Arroyos, LD: La Dulce, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de LOD de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia X (AA) – X (aa), donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (Newtonmetros).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
2 HL	LG28_Sk	PU10	2,15	0,004	23,1	11,3	-7,733
2 HL	LG28_Sk	TA11	2,64	0,002	14,5	13,4	-9,729
4 HL	LG25_Sk	PU10	2,00	0,008	41,5	7,8	-6,451
5 HL	LG14_Sk	PU10	2,66	0,002	28,2	13,5	8,491
5 HL	LG14_Sk	TA11	2,4	0,004	38,1	8,7	7,863
5 HL	LG27_Sk	LD10	2,11	0,018	230	6,8	7,8
5 HS	LG3_Sk	PU10	2,51	0,008	97,8	10	7,277
NN	LG9_Sk	LD11	2,21	0,002	16,3	8,1	-7,991
2 HL	LG28_Sk	TODOS	11,39	0,001	12,4	4,7	-4,003
5 HL	LG14_Sk	TODOS	10,1	0,001	36,1	3,3	3,13
5 HL	LG27_Sk	TODOS	8,89	0,001	15,3	2,4	2,726

Considerando todos los ambientes juntos, se detectaron tres QTL con valores de LOD altamente significativo. Un QTL detectado en la posición 12,4 cM del cromosoma 2 HL se encuentra cercano a un QTL encontrado en la posición 14,5 cM del cromosoma 2 HL en el sitio Tres Arroyos 2011 (PEV=13,4%). También, en la posición 36,1 cM del cromosoma 5 HL es cercano al QTL encontrado en la posición 38,1 del mismo cromosoma en el ambiente Tres Arroyos 2011 (PEV=8,7%).

5.4.9. Viscosidad de Mosto

El análisis de QTL por ambientes independientes para Viscosidad permitió la identificación de regiones genómicas en el cromosoma 1 y en el GL 20

Los PEV indican la existencia de tres QTL de efecto menor (7,3%, 8,2% y 9,8%), detectados en el ambiente Puan 2008.

Considerando todos los ambientes juntos, se detectó 1 QTL con valor LOD de 6,66.

Tabla 5.4.10. QTL relacionados con Viscosidad de Mosto en los ambientes evaluados individualmente. Ambiente PU08: Puán año 2008. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (MiliPascal por segundo).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
1 HL	LG29_Sk	PU08	2,73	0,001	17	9,8	-0,059
1 HS	LG17_Sk	PU08	2,11	0,01	66,3	8,2	-0,054
NN	LG20_Sk	PU08	2,19	0,007	86	7,3	0,05
4 HS	LG10_Sk	TODOS	6,66	0,01	29,7	2,8	0,017

5.4.10. Aminoácidos libres

El análisis de QTL por ambientes independientes para Aminoácidos Libres permitió la identificación de regiones genómicas en los cromosomas 1 y 7.

Los PEV indican la existencia de dos QTL de efecto menor (8,9% y 9,7%), detectados en los ambientes La Dulce 2011 y Puán 2010.

Considerando todos los ambientes juntos, se detectó un QTL con valor LOD de 6,23 en el cromosoma 7 HS.

Tabla 5.4.11. QTL relacionados con Aminoácidos Libres en mosto en los ambientes evaluados individualmente. LD: La Dulce, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (partes por millón).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
1 HS	LG4_Sk	PU2010	2,50	0,002	11,8	9,7	17,326
7 HS	LG8_Sk	LD2011	2,44	0,007	102,5	8,9	-14,67
7 HS	LG26_Sk	TODOS	6,23	0,003	0,7	2,3	5,234

5.4.11. β -Glucanos en mosto

El análisis de QTL por ambientes independientes para β -Glucanos permitió la identificación de regiones genómicas en el cromosoma 5, y en el GL 9, sin identificar cromosoma.

Los PEV indican la existencia de tres QTL de efecto menor (7,0%, y 2 de 8,8%), detectados en los ambientes La Dulce 2011 (2) y Puan 2010.

Considerando todos los ambientes juntos, se detectaron dos QTL, uno en el cromosoma 4 HS y el otro en el GL 9.

Tabla 5.4.12. QTL relacionados con β -Glucanos en mosto en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes LD: La Dulce, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (partes por millón).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
5 HS	LG3_Sk	LD11	2,35	0,009	11,8	8,8	51,063
5 HS	LG3_Sk	PU10	2,45	0,002	0	8,8	63,643
NN	LG9_Sk	LD11	2,03	0,007	9,9	7,0	-45,616
4 HS	LG10_Sk	TODOS	7,92	0,002	31	3,6	27,707
NN	LG9_Sk	TODOS	6,22	0,011	21,3	3,0	-29,304

5.4.12. Atenuación límite aparente

El análisis de QTL por ambientes independientes para Atenuación permitió la identificación de regiones genómicas en el cromosoma 5 y en el GL 19, sin identificar cromosoma. Los PEV indican la existencia de tres QTL de efecto menor, detectados en los ambientes Puan 2011 (2) y Tres Arroyos 2011.

Considerando todos los ambientes juntos, no se detectaron QTL con niveles de LOD altamente significativos.

Tabla 5.4.13. QTL relacionados con Atenuación Límite Aparente en mosto en los ambientes evaluados individualmente. Ambientes TA: Tres Arroyos, PU: Puán, seguido del año. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%)

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
4 HL	LG25_Sk	TA11	1,96	0,009	41,5	6,3	0,767
4 HS	LG10_Sk	PU11	1,93	0,017	6,2	5,9	-0,799
NN	LG19_Sk	PU11	1,71	0,011	4,8	5,3	0,738

5.4.13. Índice de Hartong (Vz 45 °C)

El análisis de QTL por ambientes independientes para Índice de Hartong permitió la identificación de regiones genómicas en los cromosomas 1 y 7.

Los PEV indican la existencia de dos QTL de efecto menor, detectados en los ambientes La Dulce 2010 y 2011.

Considerando todos los ambientes juntos, se encontró un QTL en el cromosoma 7, con un valor LOD de 6,53.

Tabla 5.4.14. QTL relacionados con Índice de Hartong en los ambientes evaluados individualmente. LD: La Dulce 2010 y 2011. LOD: valor de asociación entre el intervalo y la característica fenotípica. p: significancia estadística del valor LOD. Posición: distancia genética desde el inicio del GL. PEV: porcentaje de explicación de la varianza fenotípica. Efecto de sustitución: representa la diferencia $X(AA) - X(aa)$, donde AA y aa son los dos homocigotas en el locus del marcador, medido en unidades del carácter (%).

Cromosoma	GL	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV	Efecto de sustitución
1 HS	LG4_Sk	LD10	1,96	0,005	0	6,2	1,469
7 HS	LG8_Sk	LD11	2,95	0,001	102,5	9,9	-2,153
7 HS	LG1_Sk	TODOS	6,53	0,007	74,6	2,9	1,238

5.4.14. QTL en posiciones similares

En la tabla 5.4.15 se resume la detección de QTL en posiciones coincidentes o cercanas (grupo de ligamiento y distancia), considerando los QTL más significativos para cada ambiente. El objetivo de este análisis fue verificar la existencia de QTL ubicados en la misma posición en diferentes ambientes, relacionados con los mismos o con diferentes caracteres. Se observan:

- Dos QTL ubicados en el brazo largo del cromosoma 2 en las posiciones 14,5 y 23,1 cM en los ambientes Puán 2010 y Tres Arroyos 2011, explicando 11,3 y 13,4 % del carácter dureza de malta, detectados en ambientes del cuartil superior y medio-superior;
- Dos QTL ubicados en el brazo largo del cromosoma 5 en las posiciones 28,2 y 38,1 cM en los mismos ambientes que los anteriores, explicando 13,5 y 8,7 % del carácter dureza de malta;
- Dos QTL ubicados en el brazo largo del cromosoma 5 en las posiciones 23 y 23,2 cM en Puan 2008 y Tres Arroyos (único sitio con 7 fechas de siembra), explicando 10% del carácter rendimiento y 7,5% del carácter respuesta a fotoperíodo.

- Dos QTL ubicados en el brazo corto del cromosoma 5 en las posiciones 0 y 11,8 cM, en los ambientes Puán 10 (cuartil medio-inferior) y La Dulce 11 (cuartil superior), explicando en ambos casos 8,8 % de la variación del carácter β -glucanos;
- Por último, dos QTL detectados en el brazo corto del cromosoma 7, en la misma posición de 102,5 cM y en el mismo ambiente (La Dulce 2011, cuartil medio-inferior), en este caso explicando dos caracteres diferentes: FAN y Vz 45°C (PEV = 8,9 y 9,9 % respectivamente).

Tabla 5.4.15.. QTL más significativos en posiciones cercanas o coincidentes. Ambientes clasificados por cuartiles, de acuerdo a la posición en el ranking desde mejores a peores valores para cada carácter estudiado: Ambientes 1: cuartil superior, 2 cuartil medio-superior, 3: cuartil medio-inferior.

Cromosoma	GL	Caracter	Ensayo	Ambiente	LOD	p	Posición (cM)	PEV
2 HL	LG28_Sk	Dureza	PU 10	1	2,15	0,004	23,1	11,3
2 HL	LG28_Sk	Dureza	TA. 11	2	2,64	0,002	14,5	13,4
5 HL	LG14_Sk	Dureza	PU 10	1	2,66	0,002	28,2	13,5
5 HL	LG14_Sk	Dureza	TA 11	2	2,4	0,004	38,1	8,7
5 HL	LG14_Sk	Rendimiento	PU 08	3	2,2	0,007	23	10,1
5 HL	LG14_Sk	Fotoperíodo	TA 09	3	1,79	0,014	23,2	7,5
5 HS	LG3_Sk	β -glucanos	LD 11	1	2,35	0,009	11,8	8,8
5 HS	LG3_Sk	β -glucanos	PU 10	3	2,45	0,002	0	8,8
7 HS	LG8_Sk	FAN	LD 11	3	2,44	0,007	102,5	8,9
7 HS	LG8_Sk	Vz 45 °C	LD 11	3	2,95	0,001	102,5	9,9

La tabla 5.4.16 (a) muestra un resumen de los 58 QTL encontrados para caracteres de calidad comercial e industrial, más los cinco QTL detectados para rendimiento, indicando el tipo de ambiente en que fue encontrado cada QTL. La tabla 5.4.14.2 (b) resume los QTL encontrados para temperatura de canopeo y respuesta al fotoperíodo.

Tabla 5.4.16. (a y b). Ambientes en que fueron detectados QTL para cada carácter, indicando el tipo de ambiente. Verde: sin estrés, Amarillo: estrés moderado. Naranja: estrés intenso. Rojo: estrés severo. En celeste se indican los QTL detectados en todos los ambientes.

a)

Rendimiento	PU08	TODOS	CAB10	TA210	PU08												
Calibre	TODOS	LD11	TA110														
Proteína	PU09	CAB10	TODOS	TA210	TA11	CAB10	TA109	TA110	TODOS	TA11	TA07	TODOS	TODOS	TA07	TA110		
Hum remojo	PU11	TA08	PU11	CAB08	CAB10	TODOS	LD10										
Dureza	TODOS	PU10	TA11	PU10	TODOS	LD10	PU10	TA11	TODOS	PU10	LD11						
Extracto	TODOS	TA08	TA10	TODOS													
FAN	PU10	LD11	TODOS														
Glucanos	TODOS	LD11	PU10	LD11	TODOS												
Hartong	LD10	LD11	TODOS														
Viscosidad	PU08	PU08	TODOS	PU08													
Atenuación	PU11	TA11	PU11														

b)

Tempertura de Canopeo	TA 07	PU 1 08	PU 2 08	CAB 09	LD 10	TA 1 11	TA 2 11	TODOS
Respuesta al Fotoperíodo	TA 09							

La figura 5.4.1 muestra la posición de los QTL encontrados. La longitud de los trazos indican el intervalo y el espesor de ellos indica el porcentaje de explicación de la varianza: los trazos finos indican una PEV menor al 10% y los trazos gruesos un PEV mayor al 10%. En los cromosomas 2HS y 6 no se detectaron QTL.

Los caracteres son:



I

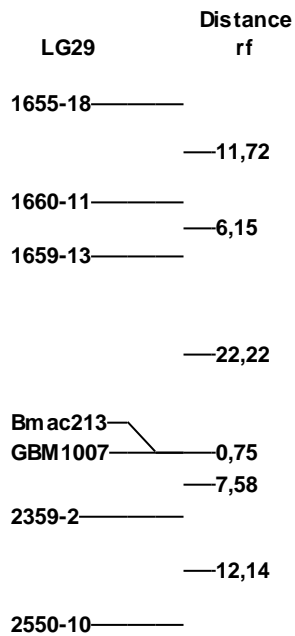
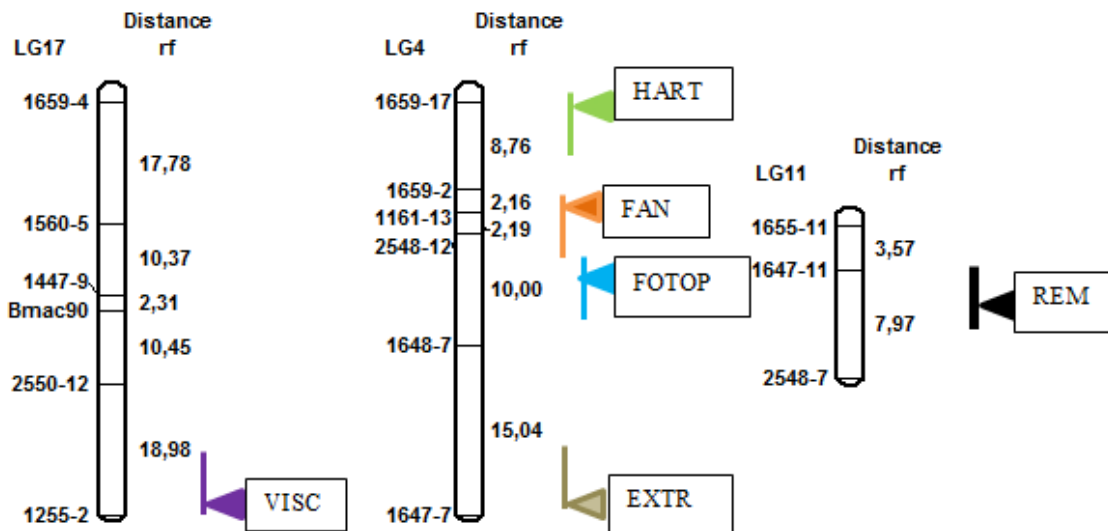
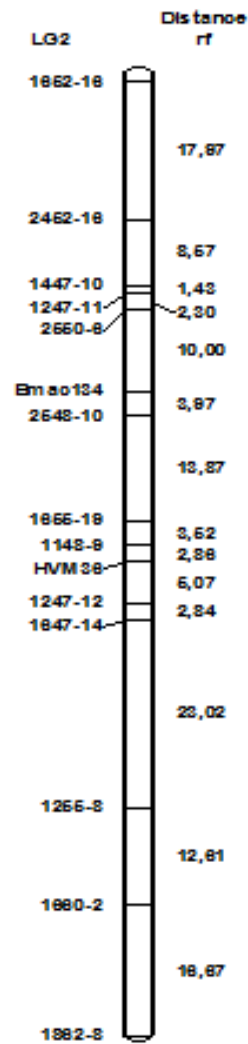


Figura 5.4.1 Mapa de ligamiento de cebada derivado del cruzamiento Mut 6519 x Aspen, mostrando la ubicación más probable de QTLs relacionados con rendimiento y calidad. VISC: Viscosidad, CAL: Calibre, HART: Índice de Hartong, FAN: Aminoácidos libres, FOTOP: Fotoperíodo, EXTR: Extracto, REM: Humedad de salida de remojo, DUR: Dureza de malta, TCAN: Temp de canopeo; PROT: Proteína %, REND: Rendimiento, ALA: Atenuación límite aparente, GLU: Glucanos. El espesor de las líneas al lado del marcador indica si se trata de un qtl de efecto mayor ($PEV \geq 10\%$) o de efecto menor. El resto de las referencias como en Fig.5.3.1.

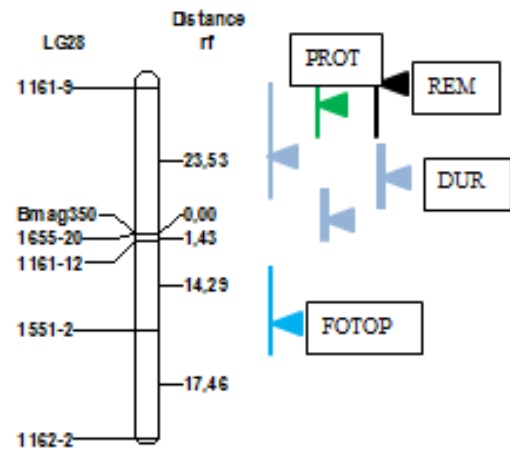
I HS



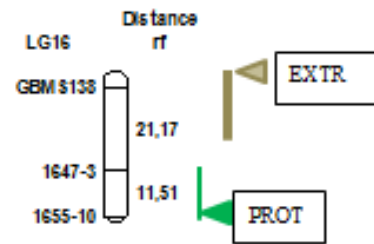
2 HS



2 HL

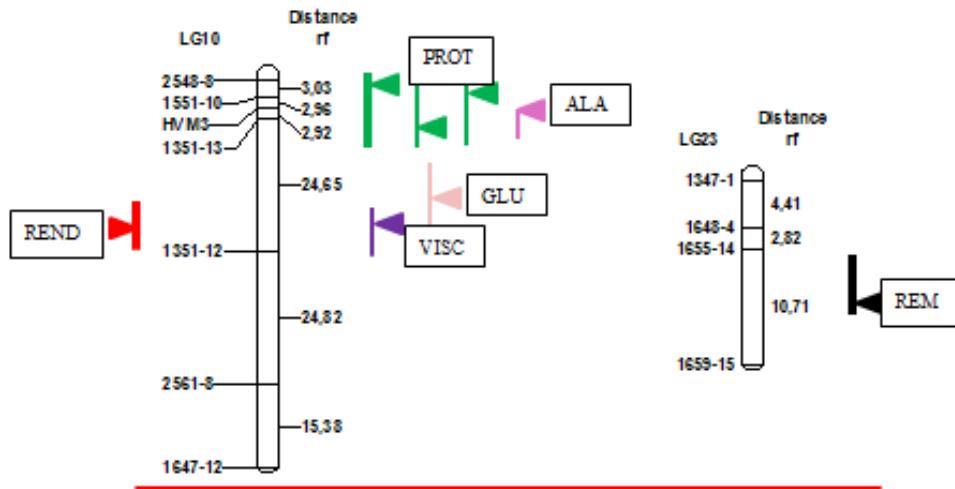


CROMOSOMA 3

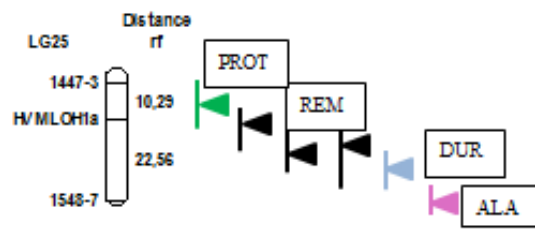


3 HL

CROMOSOMA 4

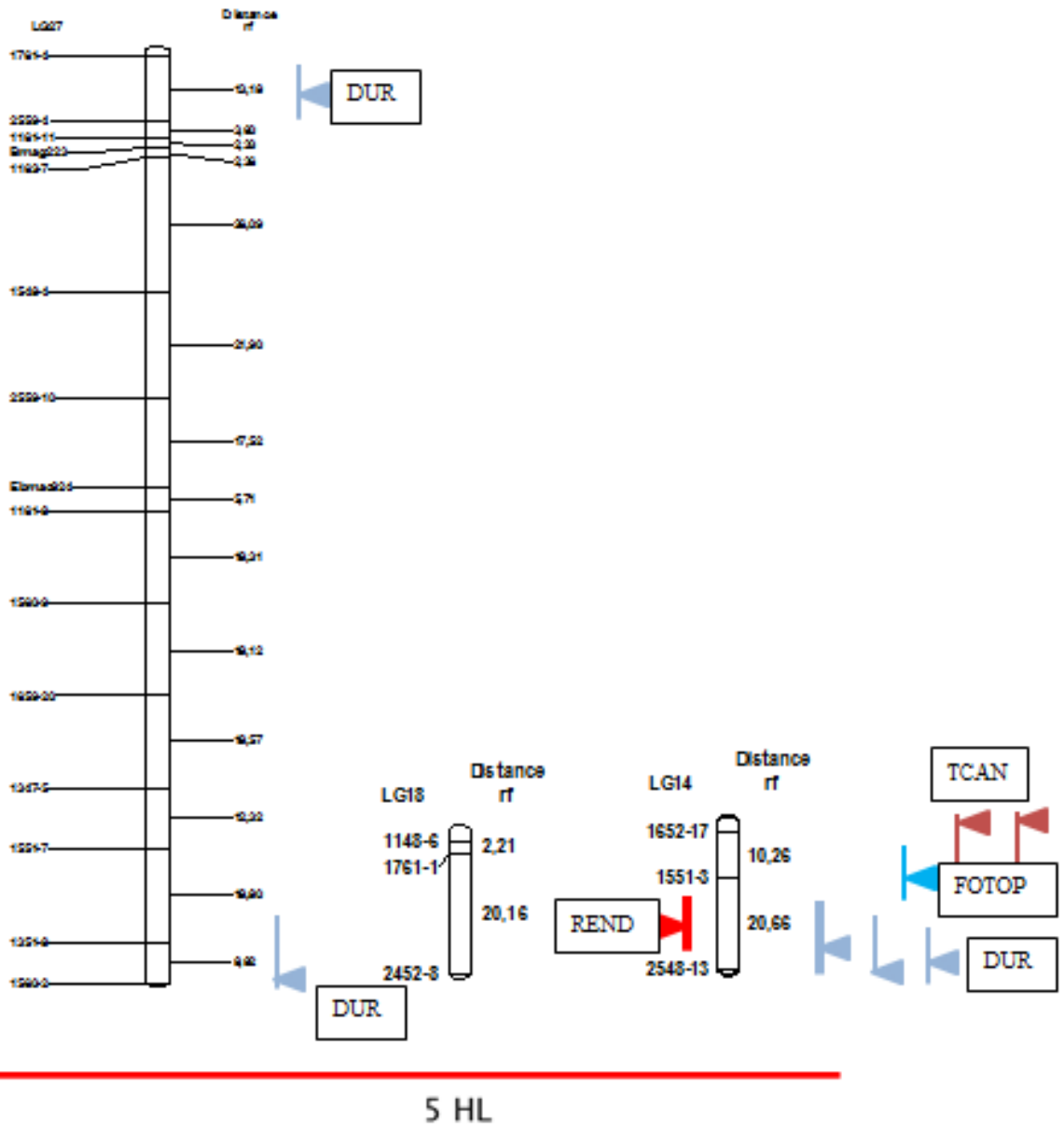


4 HS

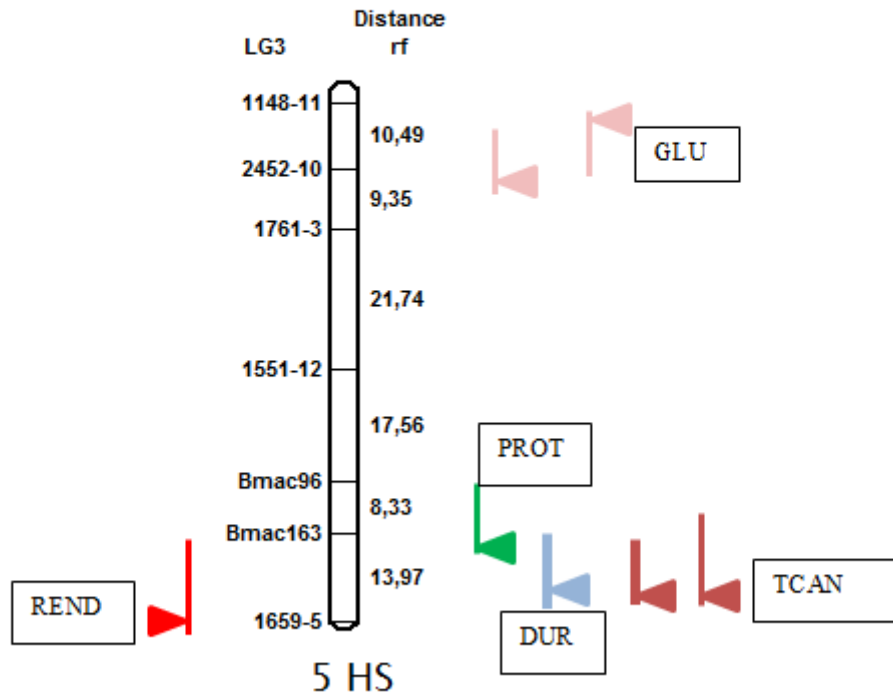


4 HL

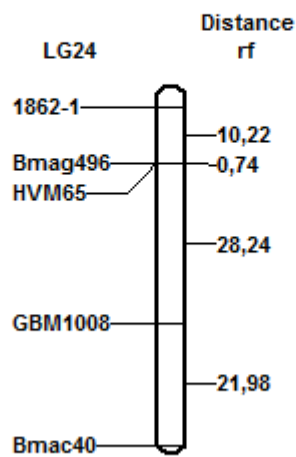
CROMOSOMA 5



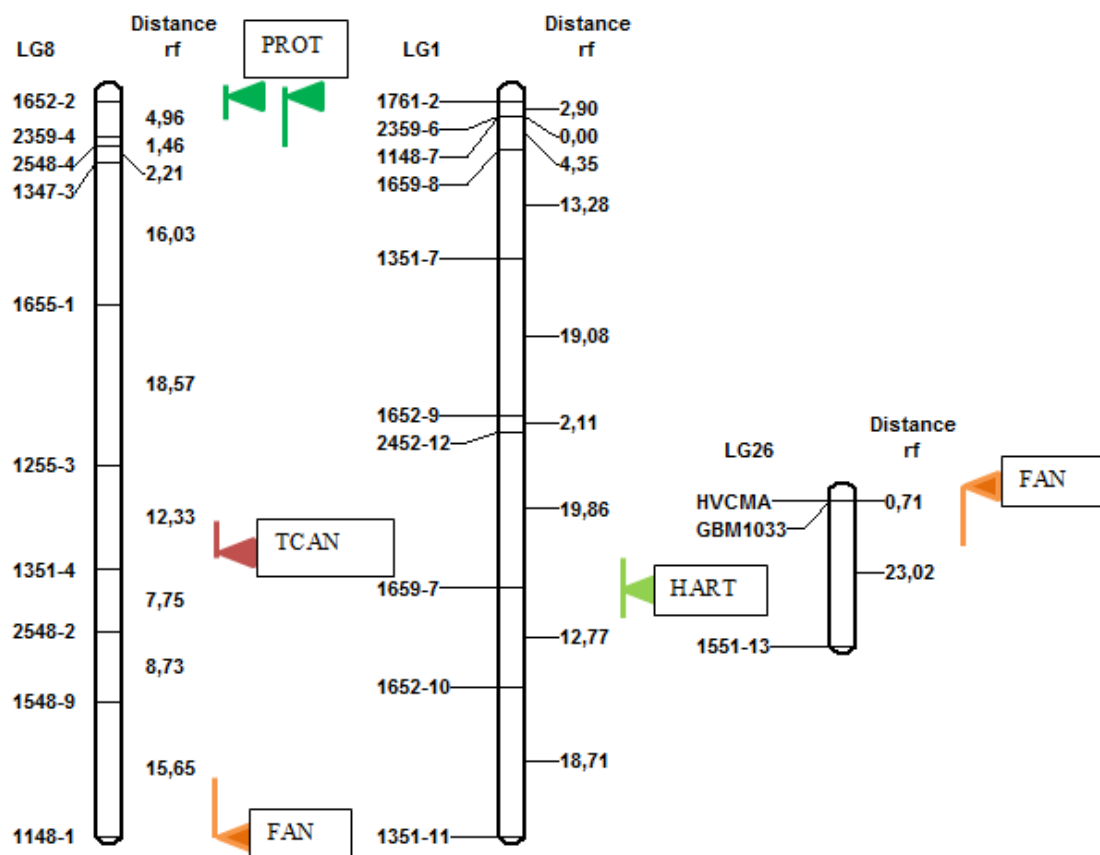
CROMOSOMA 5



CROMOSOMA 6



CROMOSOMA 7



5.5 Discusión

5.5.1 Distorsión de segregación

La distorsión de segregación (DS) es el fenómeno por el cual las frecuencias genotípicas de las progenies son diferentes de aquellas esperadas por la segregación mendeliana (Lu et al., 2002), la cual puede ser causada por competencia gametofítica, aborto de gametas o cigotos, recombinaciones no homólogas, elementos transponibles y agentes ambientales (Xianjun et al., 2011). Dicha distorsión se produce frecuentemente en plantas derivadas del cultivo de anteras, sugiriendo que las regiones con distorsión podrían contener genes que afectan la supervivencia de las anteras (Manninen, 2000).

Los desvíos de las tasas de segregación mendeliana fueron informados en varias especies, entre ellas maíz (Bentolila et al., 1992), arroz (Harushima et al., 1996) y cebada (Graner et al., 1991; Heun et al., 1991; Thompson et al., 1991; Zivy et al., 1992; Devaux et al., 1995).

Zivy et al. (1992) plantean la necesidad de verificar si las técnicas de producción de plantas doble haploides producidas *in vitro* (cultivos de gametofitos masculinos y femeninos o rescate de embriones luego de la hibridación interespecífica *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* inducen presión de selección que conduce a distorsiones de segregación.

En cebada es posible obtener plantas haploides a través de cultivo de anteras, cultivos de microsporas o eliminación cromosómica seguida de una hibridación interespecífica con *Hordeum bulbosum* (Pickering y Devaux, 1992). El método de obtención de DHs resulta un factor importante de distorsión, observándose menor distorsión con la técnica de cruzamiento por *Hordeum bulbosum* que con cultivo de anteras (Li et al., 2010).

Existen ejemplos de trabajos en los que se sostuvo la hipótesis de no selección causada por el cultivo *in vitro* de cebada (Powell et al., 1984; Doll et al., 1989). Sin embargo, Furusho et al. (1990) observaron desvíos de la segregación 1:1 en la resistencia a oídio de la cebada (Powdery mildew) en líneas DH derivadas de plantas F1, y Zivy et al. (1992) también encontraron desvíos de la relación de segregación 1:1 al menos en un segmento cromosómico.

Con la técnica de cultivo de anteras se observó distorsión a favor del padre que manifestó una mayor capacidad de regeneración, por lo que se sugirió que las áreas distorsionadas podrían contener genes que favorecieran la obtención de plantas (Manninen, 2000). Es decir, que la distorsión no sería causada por otros factores, como variación somaclonal por ejemplo, sino por la existencia de áreas genómicas que afectan la tasa de supervivencia de las anteras en cultivo *in vitro*, y en consecuencia, la capacidad de regenerar plantas (Barua et al. 1993). Dos regiones en cromosomas 2H y 4H se asociaron con la respuesta androgénica, tres regiones en 2H (dos áreas) y 3H con la tasa de regeneración, y una región en 4H con la duplicación espontánea. Las regiones cromosómicas que controlaron la respuesta androgénica y las regiones con DS no fueron siempre las mismas (Manninen, 2000).

En un trabajo de Sayed et al. (2002) se compararon dos poblaciones obtenidas del mismo cruzamiento, una población de DH y una población de F₂. La población DH mostró una distorsión mucho mayor que la obtenida en la F₂ (44,2% y 16% respectivamente)

Teniendo en cuenta estos antecedentes, previamente al mapeo cromosómico fue necesario realizar una selección de marcadores con segregación 1:1 (para doble haploides), ya que la

desviación de las frecuencias genotípicas observadas respecto de las frecuencias Mendelianas, podría distorsionar los análisis genéticos posteriores (Lu et al., 2002).

En esta tesis se decidió realizar el mapeo con marcadores que tuvieran una segregación en un rango entre 1:0,7 a 1:1,3 (ampliando la relación esperada de 1:1), con valores de chi cuadrado que estuvieron asociados a probabilidades de aceptación hasta 0,52%. De haber utilizado marcadores con valores de chi cuadrado iguales o menores a 3,84 (aceptación al 5% de probabilidad), de los 360 marcadores totales (AFLP+SSR), solamente se hubiesen empleado en el mapeo un total de 123 marcadores. Los 231 marcadores mapeados representan el 64,2% del total, descartando el 35,8 por mayor distorsión. Esta proporción coincide con el rango de distorsión superior encontrado por Li et al. (2010), quienes investigando cuatro poblaciones de cebada determinaron un rango de distorsión entre 15% y 38%.

5.5.2 Mapeo de marcadores

Realizar un mapa de ligamiento es un prerequisite para muchos análisis genéticos (Liu et al., 1996). Estos mapas encuentran una variedad de usos, no solo en mejoramiento sino también en investigación genómica. Han sido extensamente utilizados en estudios comparativos y de organización de genomas, además de la identificación y mapeo de genes y de locus de caracteres cuantitativos (QTL) morfológicos, fisiológicos y de interés económico (Varshney et al., 2007).

Cebada (*Hordeum vulgare*) es una de las especies más importantes del mundo y ha sido sujeto de estudios genéticos importantes. Es una especie diploide ($2n = 2x = 14$), mayoritariamente autógama y con un tamaño de genoma de $5,3 \times 10^9$ /1C (Ramsay et al., 2000).

Los primeros marcadores moleculares utilizados en cebada para construir un mapa fueron RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), aplicados al genotipado de las poblaciones Igri x Franka (Graner et al., 1991) y Steptoe x Morex (Kleinhofs et al., 1993).

Posteriormente, los marcadores fueron reemplazados por marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), los SNP (Single Nucleotids Polymorphisms) y los SSR (Single Sequence Repeats) o microsatélites (Marcel et al., 2007).

En esta tesis, se utilizaron marcadores AFLP y SSR disponibles en el Laboratorio de Geneanalysis del Bayerische Landsanstalt für Landwirtschaft, Alemania, para el mapeo de los mismos en la población Mut 6519 x Aspen.

Los marcadores SSR tienen información previa de su ubicación en el genoma de cebada, y eso permite identificar los grupos de ligamiento en asociación con los cromosomas. Los grupos de investigación que desarrollaron los microsatélites utilizados fueron Scottish Crop Research Institute (Bmac), Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research-IPK (GBM, GBMS), Virginia Polytechnic Institute (HVM) y Max Planck Institute (HVGene name) (Varshney et al., 2007).

Con el fin de comparar el mapa obtenido en esta tesis con otros publicados, se realizó una búsqueda de mapeo con microsatélites para detectar la coincidencia de ordenamiento y distancias.

Ramsay et al. (2000) publicó un trabajo de mapeo con SSR basado en 10 poblaciones, ocho cebadas primaverales, seis cebadas invernales, y dos líneas de *Hordeum spontaneum*. De los 19 microsatélites que se mapearon en esta tesis, siete de ellos fueron mapeados también en dicho trabajo, en los cromosomas 2, 4, 5, 6 y 7. Los SSR HVM3 y HVMLOH1a del cromosoma 4 y Bmag0223 y EBmac0824 del cromosoma 5 coincidieron en el orden dentro del cromosoma. Los restantes tres microsatélites, no pudieron ser comparados en el orden por encontrarse cada uno en un grupo de ligamiento separado.

Li et al. (2003) mapeó 127 nuevos microsatélites en dos poblaciones ya conocidas y mapeadas (Steptoe x Morex y Igri x Franka), con solamente dos microsatélites coincidentes (Bmac213 en cromosoma 1 y GBMS138 en cromosoma 3). Varshney et al. (2007) realizaron un mapa de consenso de cebada con 775 microsatélites, integrando seis mapas diferentes procedentes de poblaciones ‘Igri x Franka’, ‘Steptoe x Morex’, ‘OWBRec x OWBDom’, ‘Lina x Canada Park’, ‘L94 x Vada’ y ‘SusPtrit x Vada’. Este mapa totaliza 1068 cM, con un promedio de 1,38 cM/marcador.

Continuando con la idea anterior, se comparó la ubicación de los microsatélites que fueron utilizados en los dos trabajos, el mapa consenso y esta tesis.

En la tabla 5.5.1 se comparan las distancias de los intervalos entre marcadores comunes, a excepción del marcador ubicado en el cromosoma 3 que se encuentra aislado, y por ello no hay intervalo para comparar. En el mapa consenso las distancias se indican desde el extremo superior del grupo de ligamiento, sin ubicación del centrómero. En esta tesis, los grupos de ligamiento se individualizaron por brazo (corto o largo) de cada cromosoma. Por ejemplo, en el cromosoma 1, los marcadores GBM1007 y Bmac0213 se ubicaron en el brazo largo, y en ambos trabajos se observa que ambos están muy ligados (4,3 y 0,75cM respectivamente), mientras que el marcador Bmac0090 se ubicó en el brazo corto del mismo cromosoma y la distancia a los otros marcadores en el mapa consenso es mayor (32,9cM).

Tabla 5.5.1. Comparación de intervalos entre marcadores en el mapa consenso y esta tesis

Intervalo	Cromosoma	Distancia Consenso	Distancia Tesis
GBM1007-Bmac0213	1	4,3	0,75
Bmac0213-Bmac0090	1	32,9	brazo diferente
Bmac0134-HVM36	2	20,1	24,2
HVM36-Bmag0350	2	45,6	brazo diferente
GBMS138	3	marcador aislado	marcador aislado
HVM03-HVMLOH1a	4	44	brazo diferente
Bmac0163-Bmac0096	5	15,4	8,33
Bmac0096- Bmac0223	5	33,8	brazo diferente
Bmac0223-EBmac0824	5	38,8	67,87
HVM65-Bmag0496	6	1,7	0,74
Bmag0496-GBM1008	6	31,6	28,98
GBM1033-HVCMA	7	0,5	0,71

Los marcadores Bmac0134 y HVM36 están separados por distancias similares en ambos mapas, 20,1 y 24,2cM, ubicados en el brazo corto del cromosoma 2. En el mismo cromosoma, el mapa consenso ubica a Bmag0350 a 45,6cM de HVM36, pero dicho marcador se encuentra en el brazo largo, por lo cual quedó ubicado en un grupo de ligamiento diferente.

A excepción del intervalo Bmac0223-EBmac0824, que tiene una separación entre marcadores de 38,8cM en el mapa consenso y 67,87cM en esta tesis, aquellos marcadores con distancias mayores a 32cM en el mapa consenso se ubican en brazos diferentes en la tesis, aunque identificados en el mismo cromosoma. Esta distancia mayor en el intervalo (38,8 y 67,87cM) se debe a una baja densidad de marcadores ubicados en el brazo largo del cromosoma 5. Si bien las distancias entre marcadores mostraron ligamiento, los intervalos entre ellos tuvieron valores aproximados a los 20cM, mientras que en el mapa consenso la densidad en ese mismo intervalo es de 1,84cM.

La mayoría de los estudios de QTL en especies vegetales han sido conducidos con poblaciones biparentales. Cruzando plantas con una alta diversidad en la segregación de los caracteres de interés y usando las poblaciones segregantes (por ejemplo, F₂, DHs o RILs) se busca la posibilidad de mapear loci de caracteres cuantitativos. Las poblaciones biparentales son valiosas por el alto poder de detección de QTL, pero su mayor debilidad es la baja resolución de mapeo (es decir, grandes intervalos genéticos) debido a las limitadas oportunidades de recombinación (Sannemann et al., 2015).

Los marcadores muy ligados en el mapa consenso, definidos por la corta distancia entre ellos (GBM1007-Bmac0213, Bmac0134-HVM36, Bmac0163-Bmac0096, HVM65-Bmag0496, GBM1033-HVCMA), se ubicaron también íntimamente ligados en esta tesis.

5.5.3 QTL para los caracteres agronómicos estudiados.

El mejoramiento genético de especies cultivables resulta imprescindible para alimentar a una población mundial en continuo crecimiento. Se estima que para el año 2050 dicha población alcanzará 10 mil millones de personas (Gill y Tuteja, 2010). El mejoramiento genético en el siglo XX ha contribuido significativamente al incremento y a la estabilidad de los rendimientos, como así también, a alcanzar niveles de tolerancia a diversos estreses abióticos (Khush, 2001). Incrementar aún más la tolerancia a tales condiciones resultaría ser la mejor opción para aumentar y sostener la producción de los cultivos (Gill y Tuteja, 2010). Entre todos los estreses abióticos que limitan el rendimiento, la sequía es uno de los más importantes en agricultura (Cattivelli et al., 2008).

En el caso de Argentina, la mayor dificultad en la selección de genotipos con rendimientos y tamaños de granos estables, es la variabilidad climática que se observa entre años. Si bien las isohietas demarcadas en la Provincia de Buenos Aires muestran una disminución de las precipitaciones de este a oeste, frecuentemente ocurren situaciones de estrés por falta de lluvias en regiones normalmente más húmedas, y a la inversa, en algunos años se registran niveles de precipitaciones muy adecuados para lograr altos rendimientos en zonas usualmente identificadas como más secas.

Estas variaciones climáticas llevan a la necesidad de buscar métodos alternativos de selección que permitan neutralizar los efectos ambientales, es decir, la utilización de caracteres de alta heredabilidad que tengan relación con el rendimiento, y también, la búsqueda de QTL que puedan explicar una alta proporción de la varianza fenotípica.

El análisis de QTL es una herramienta poderosa en agricultura y en otras disciplinas. Provee información de la ubicación cromosómica de un determinado locus y puede ser aplicada en programas de mejoramiento utilizando selección asistida por marcadores (Zhang et al., 2016). La cantidad de publicaciones que reportan la identificación de nuevos QTL ha sido muy elevada en los últimos años. Sin embargo, muy pocos de estos QTL han podido ser utilizados eficientemente en selección asistida debido, entre otras causas, a una limitada asociación carácter-marcador (William et al., 2007), al fondo genético, a la interacción genotipo x ambiente, y a los efectos modestos de alelos de efecto cuantitativo en rendimiento (Slafer, 2003). Además, frecuentemente se encuentran inconsistencias en los resultados de tratamientos, ambientes y años de ensayos. Por ejemplo, Kindu et al. (2014), intentando mapear QTL de eficiencia de uso de nitrógeno en una población RIL encontraron que ninguno de los QTL detectados para un determinado carácter en un año se expresaron en otro.

Un preciso fenotipado por tolerancia a sequía continúa siendo un desafío para los mejoradores (Hu y Xiong, 2014). No obstante, aún con fenotipados precisos, la gran mayoría de los QTL que determinan el fenotipo no pueden ser detectados. Tuberosa (2012) compara este hecho con un *iceberg*, en el que gran parte de la masa no es visible en la superficie del mar. Así, la mayoría de los factores genéticos que controlan caracteres cuantitativos se “resisten” a ser detectados porque sus efectos son demasiado pequeños como para ser evidenciados a un nivel estadísticamente significativo (Tuberosa, 2012).

Una de las posibles desventajas de los marcadores moleculares es que el ligamiento genético entre un marcador de ADN y el alelo del locus objetivo, puede ser roto por recombinación genética, aunque un QTL/gen puede ser etiquetado por dos marcadores flanqueantes para reducir el riesgo de recombinación. Además, un mapeo preciso de QTL (es decir, con intervalos pequeños) es un prerrequisito para mejorar la eficiencia de selección. Estas dificultades intrínsecas, junto con la naturaleza poligénica de la tolerancia a sequía y la interacción con el ambiente, hace que la selección asistida por marcadores moleculares sea extremadamente difícil (Francia et al., 2005).

El rendimiento final de un cultivo es el producto de muchos procesos de crecimiento y desarrollo que suceden a lo largo de la vida del individuo, con genes múltiples que tienen efectos directos e indirectos (Slafer, 2003). Los QTL que determinan caracteres favorables para condiciones ambientales particulares, pueden además tener efectos indirectos sobre el rendimiento, por ejemplo, la respuesta a fotoperíodo. Es lógico pensar que muchos QTL podrían ser detectados por su efecto indirecto para rendimiento (Cuesta-Marcos et al., 2009).

Particularmente, en esta tesis se detectaron dos QTL de efecto mayor para rendimiento en los cromosomas 4 y 5, en dos ambientes diferentes desde el punto de vista climático: Tres Arroyos 2ª siembra 2010 y Puán 2008, el primero sin deficiencia de agua y temperaturas medias cercanas al promedio histórico, el segundo con déficit hídrico y temperaturas medias superiores al promedio. Analizando los datos a través de todos los ambientes ensayados, se detectó un QTL en el cromosoma 5 con un nivel de significancia muy alto (LOD=8,48), pero debido a la alta variabilidad ambiental la explicación de la varianza fenotípica fue de sólo 1,7%.

Tondelli et al. (2013), evaluando 18 ambientes (combinación sitios/años) detectaron varias regiones genómicas donde se asocian rendimiento y adaptación a la región mediterránea en términos de fenología. El QTL para rendimiento más importante fue detectado en el cromosoma 2, ligado a un gen de precocidad (EPS 2). Quizás este caso sea un ejemplo de lo

discutido por Cuesta-Marcos et al. (2009) en el sentido que algunos QTL pueden ser detectados por su efecto indirecto, en este caso, precocidad en condiciones mediterráneas.

El segundo QTL en importancia detectado por Tondelli et al. (2013) fue encontrado en el cromosoma 5, asociado al gen de vernalización VRN-H1. En el mismo cromosoma se detectaron cuatro QTL más, con niveles de explicación de la varianza entre 11,7% y 19,4%. Y finalmente, en el cromosoma 4 se detectó un QTL para fecha de espigazón, relacionado con el gen de vernalización VRN-H2, que explicó el 7,2% de la varianza y que podría estar relacionado también con rendimiento.

En esta tesis se encontró un QTL en el brazo largo del cromosoma 5 para respuesta a fotoperíodo, en la misma posición que el QTL detectado para rendimiento (posición 23 cM del GL 14 y posición 23,2 cM en el mismo GL). Esta asociación es relativamente frecuente en la literatura debido a que la sensibilidad fotoperiódica afecta el momento de la espigazón y por lo tanto las condiciones que el cultivo explora en el período crítico modificando el rendimiento. No hay asociación directa entre el QTL (o gen) y el rendimiento sino que esta mediada por la modificación en el ambiente del período en el que se define el rendimiento.

Si bien, lamentablemente no es posible asociar el mapa obtenido con el mapa de Tondelli, el marcador Bmac 0223 del cromosoma 5L es común en ambos mapas, y en el primero se encuentra cercano a QTL de rendimiento y fecha de espigazón. El SSR Bmac 0223 se encuentra a 67,27 cM del SSR Ebmac 824, mientras que en el mapa consenso de Varshney et al. (2007) ambos marcadores están separados 38,8 cM en el mismo orden, lo que indicaría una correcta ubicación del marcador. No es posible comparar las distancias entre el mapa de esta tesis y el de Tondelli, porque este autor identifica grupos de marcadores por bins y no por distancia genética. Excepto Bmac 0223, no hay otros marcadores comunes entre los mapas de Tondelli y el consenso de Varshney.

Mohammadi et al (2005) encontraron en una población biparental de 158 DHs (Wi 2291 x Tadmor) QTL asociados a caracteres de resistencia a sequía utilizando marcadores AFLP y SSR. Uno de ellos, relacionado a días a espigazón, estuvo asociado al microsatélite Bmac163 en el ambiente Breda, con una explicación de varianza fenotípica del 8%, y al microsatélite Bmac96 en el ambiente Tel Hadya, con una explicación de 6%. Ambos marcadores, fueron mapeados también en esta tesis en el brazo corto del cromosoma 5, y se encontraron asociados a QTL de rendimiento, temperatura de canopeo, proteína y dureza de malta.

En el análisis de tamaño de los granos, se identificaron dos QTL sin identificación cromosómica (por falta de microsatélites mapeados en esos GL) en dos ambientes independientes, y cuando se analizó a través de todos los ambientes, se detectó un QTL en el cromosoma 1HL con una explicación de la varianza de solamente 1,5% (LOD=8,85). Este QTL, en la posición 50,1cM y ubicado a 19,7cM del marcador Bmac0213, se encuentra cercano a dos QTL de peso de grano en el mapa de Tondelli et al. (2013) (Bins 7, 8 y 9).

Zhang et al. (2016) realizó un meta-análisis resumiendo los principales QTL encontrados para diferentes tipos de estreses abióticos en cebada. Para sequía, un total de 72 QTL de efecto mayor se encontraron distribuidos en los 7 cromosomas, que incluye: floración temprana, concentraciones de K⁺, senescencia de hojas, sistema radicular, contenido relativo de agua, ajuste osmótico, vigor de plántula, longitud de llenado de los granos, altura de planta, longitud y extrusión de pedúnculo, carbohidratos solubles, y caracteres relacionados con rendimiento.

Comparando dicho meta-análisis con el mapa obtenido en esta tesis, se observaron en el cromosoma 1 dos marcadores coincidentes (Bmac 213 y GBM 1007) distanciados 4cM y 0,75cM. En 19,9cM se detectó un QTL de respuesta a fotoperíodo, que podría corresponderse con el Meta-QTL1H.4 que incluye caracteres como tiempo a floración y longitud de llenado de los granos.

En el 4to cuartil para rendimiento, la línea Mut 6519 y Aspen tuvieron promedios de rendimiento de 1500 kg/ha y 1466 kg/ha respectivamente, con un promedio de rendimiento de la población de 1722 kg/ha, superando el rendimiento de las líneas parentales. Pero en el 1er. cuartil, Aspen superó a Mut 6519 en 726 kg/ha (5866 vs. 5139 kg/ha), y al promedio de la población en 450 kg/ha (5866 vs. 5416 kg/ha). Se observa que a medida que la calidad ambiental disminuye (suponiendo situaciones de mayor estrés), la diferencia entre las dos líneas parentales disminuye. En el ambiente Puán 2008 (3er. cuartil), donde se detectó uno de los QTL para rendimiento en el cromosoma 5, Aspen superó a la línea Mut 6519 en 114,5 kg/ha, valor cercano al efecto de sustitución del alelo favorable en el análisis de QTL (132,7 kg/ha). Si bien la línea Mut 6519 posee características de ciclo y fisiológicas relacionadas con una mayor tolerancia al estrés por sequía, el mayor potencial de rendimiento de Aspen permite que, aún en los ambientes de menor calidad iguale el rendimiento de la primera, pudiendo expresar tal potencial en los ambientes sin estrés y así, superar a Mut 6519. De acuerdo con Jones (2007), los QTL que controlan los caracteres relacionados con rendimiento bajo estrés podrían ser los mismos QTL relacionados con caracteres asociados a rendimiento, más que los QTL que otorgan tolerancia al estrés. Esta afirmación explica por qué aún en condiciones de estrés, aquellos genotipos de mayor potencial obtienen rendimientos similares a las líneas que son tolerantes a dichas condiciones. Para el caso de las regiones productoras de cebada de Argentina, una estrategia de estabilidad de rendimiento podría ser la selección de los genotipos de mayor rendimiento en ambientes de alto potencial, ensayando solamente tales genotipos en situaciones de estrés con posterior selección.

5.5. 4 Discusión sobre QTL para los caracteres de calidad estudiados.

El mejoramiento genético de cebada cervecera posibilitó, a través de métodos convencionales, el desarrollo de un elevado número de variedades de buena calidad industrial en todo el mundo. Debido a que dicha calidad es un carácter complejo controlado por muchos genes, la selección fenotípica se dificulta debido a la alta interacción genotipo x ambiente, además de la complicación que representa la necesidad de micromaltear y analizar la malta obtenida. En los últimos años, las tecnologías moleculares y el análisis de QTL han jugado un rol central en la detección de loci que reflejan caracteres complejos como la calidad (Zhou et al., 2016). Aunque aún no se ha podido explotar totalmente, por las mismas razones expuestas para rendimiento, la selección asistida por marcadores resultaría un método muy eficiente para acelerar el proceso de mejora. Debido a la importancia económica de la calidad industrial de cebada, se han desarrollado muchas poblaciones para el mapeo de QTL de calidad, por ejemplo, Harrington x TR 306 (Mather et al. 1997), Steptoe x Morex (Hayes et al. 1993), Galleonx Haruna Nijo (Collins et al. 2003), Arapiles x Franklin (Panozzo et al. 2007), Triumph x Morex (Elia et al. 2010), entre otras.

En la población Mut 6519 x Aspen de esta tesis se detectaron 57 QTL de calidad, distribuidos principalmente en los cromosomas 1HS, 2HL, 4 HL y HS, 5 HL y HS y 7, además de otros QTL identificados en grupos de ligamiento que no pudieron asociarse con cromosomas por falta de marcadores microsátélites en esos grupos. Esta distribución de QTL y concentración

en algunos de los cromosomas, coincide con el trabajo de Zale et al. (2000), quién resumiendo los QTL de calidad industrial mapeados en nueve poblaciones encontró que las regiones cromosómicas con presencia de QTL estuvieron especialmente concentrados en los cromosomas 1, 2, 4, 5 y 7.

Los QTL para proteína que aportaron mayor explicación fenotípica se detectaron en los cromosomas 3HL, 4HS y GL19 en los ambientes Cabildo 2010, Tres Arroyos 2011 y Tres Arroyos 2007, en los que no hubo déficit de agua durante el llenado de los granos. Las poblaciones con QTL detectados para proteína en los mismos cromosomas fueron Blenheim/E224-3 y Steptoe/Morex (3H), y Dicktoo/Morex, Steptoe/Morex, Harrington/TR306 y Harrington/Morex (4H) (Zale et al, 2000).

Desde un punto de vista genético, los genotipos de bajo nivel de proteína en los granos son deficientes en hordeínas, la fracción de proteína de reserva presente en mayor proporción (Dailey et al. 1988). Los análisis genéticos muestran que todas las hordeínas son codificadas por genes estructurales del cromosoma 5 de cebada. Las hordeínas B y C son codificadas en loci ligados, designados *Hor1* y *Hor2* respectivamente, ubicados en el brazo corto. La hordeína D se codifica en el locus *Hor3*, ubicado en la región proximal del brazo largo. Los genes estructurales que codifican para hordeínas γ corresponden probablemente al locus *Hor5*, distal a *Hor2* (Arias et al., 1987).

Emebiri (2015) trabajando con un mapa saturado de marcadores EST-SSR (microsatélites de secuencias expresadas) en el cromosoma 5HS de la población VB9524 9 ND11231*12, detectó un QTL de proteína muy ligado a los marcadores Bmac163 y Bmac96. En esa misma posición se encontró en esta tesis un QTL de proteína en el ambiente Tres Arroyos 1 2009 (ambiente seco), con una explicación fenotípica del 8,7%. A solo 21,6cM del pico máximo del QTL de proteína se detectó un QTL de temperatura de canopeo. Los efectos de sustitución de ambos QTL son positivos (0,421 y 0,29 respectivamente), lo que estaría indicando que la presencia de estos QTL disminuye el nivel de proteína en 0,42% y la temperatura de canopeo en 0,29 °C.

En el trabajo de Emebiri (2015), grupos de genotipos con alelos de alta y baja proteína en el cromosoma 5H y con mismos días a floración, tuvieron cantidades similares de materia seca acumulada en las espigas en antesis. Durante el llenado de los granos, el grupo de baja proteína acumuló menos nitrógeno en las espigas y más materia seca que el grupo de alta proteína. En madurez, la longitud promedio de las espigas fue mayor en el grupo de baja proteína, dando mayor cantidad de granos por espiga. Esto sugiere que una dilución de N absorbido por el cultivo en mayor cantidad de granos puede ser la primera base fisiológica del efecto del QTL en la región genómica de 5HS.

Muy ligado al QTL de proteína en el cromosoma 5HS se detectó un QTL de rendimiento a través de todos los ambientes con un efecto de sustitución negativo. De esta manera, se observa la relación opuesta entre rendimiento y proteína, de acuerdo a la explicación obtenida por Emebiri (2015).

Ligado al marcador Bmac163 también se encontró un QTL de efecto mayor para el carácter Dureza de Malta. En el rango 37,7-0cM (ubicación de Bmac 163, según el mapa consenso de Varshney, 2007, y el pico del QTL de dureza), el mapa físico de cebada indica la presencia de un gen de la enzima Glucan endo1,3-beta glucosidasa. Esta enzima actúa en la descomposición de las paredes celulares de cebada que, junto a la matriz proteica, forman la

estructura física del endosperma. El esfuerzo de molienda debido a esta estructura física es lo que se denomina dureza de malta.

En el brazo corto del cromosoma 4 se detectaron varios QTL ligados al microsatélite HVM03 (posición 58,3cM en el mapa consenso) para proteína, atenuación límite aparente (porcentaje de azúcares fermentables en el mosto), β -glucanos y viscosidad de mosto. El mapa físico de cebada muestra en el intervalo 30-70cM (alrededor de HVM03), una serie de enzimas relacionadas con el metabolismo de los azúcares, incluyendo la descomposición de los β -glucanos: Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa 7 (posición 35cM), endo-1,4-beta-glucanasa (43cM), Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa 5 (51cM), Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa 7 (57 cM), Alfa-glucosidasa (6 cM) y Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa 4 (62cM). Más alejado de HVM03 (posición 1cM de cromosoma 4) está ubicado físicamente un gen de la enzima β -amilasa.

Las paredes celulares de varias especies de cereales están caracterizadas por la presencia de (1,3, 1,4) β -glucanos, que son polisacáridos de cadenas ramificadas y no ramificadas de residuos β -D-glucosil unidos por enlaces 1,3 y 1,4 glucosídicos. Particularmente en cebada, las paredes celulares del endosperma son ricas en (1,3, 1,4) β -glucanos, con un rango entre 3% y 7% en peso, en cultivares para uso industrial hasta uso forrajero (Kato et al., 1995). Existe mucho interés en los niveles de β -glucanos en los granos de cebada, principalmente debido a las dificultades de filtración atribuidas a este compuesto durante el proceso cervecero (Wong et al., 2015). Dicha dificultad se genera por la descomposición incompleta de los compuestos β -glucanos a partir de las paredes celulares, quedando solubilizados en el mosto los llamados β -glucanos de alto peso molecular, que producen mostos con mayor viscosidad. En el cromosoma 4HS del mapa de QTL de esta tesis, un QTL detectado para β -glucanos y otro para viscosidad se encuentran distanciados a solo 1,3cM, ambos detectados a través de todos los ambientes. Varias de las enzimas ubicadas en el mapa físico en el intervalo 30-70cM están relacionadas con esta descomposición.

En el mismo intervalo la enzima α -glucosidasa participa en la conversión de maltosa a glucosa. La descomposición del almidón del endosperma de cebada ha sido estudiada intensamente en el contexto del proceso cervecero. Cuatro enzimas están involucradas en la conversión de almidón hasta glucosa: α -amilasa (endo-enzima, que corta al azar las cadenas de amilosa y amilopectina), β -amilasa (exo-enzima, que corta en los extremos no reductores generando maltosa), dextrinasa límite (que corta los enlaces 1-6 de las ramificaciones de la amilopectina) y α -glucosidasa (que corta enlaces 1,4 generando moléculas de glucosa) (Bamforth, 2009).

Ampliando el intervalo alrededor de HVM03 hasta el origen del cromosoma 4HS, en 22cM se encuentra el gen de β -glucosidasa (enzima que actúa sobre los enlaces β -1,4 que unen dos glucosas o moléculas con sustituciones de glucosa) y en 1cM β -amilasa, que es una proteína existente ya en los granos no germinados de cebada (Yoshigi et al., 1995). Posiblemente el conjunto de QTL detectados en esta tesis en 4 HS (proteína, atenuación, β -glucanos y viscosidad), estén relacionados con la presencia de los genes que codifican para estas enzimas.

En el brazo largo del cromosoma 4 se mapeó el marcador HVMLOH1a, ligado a QTL de proteína, dureza de malta y atenuación. El mapa de Varshney et al. (2007) ubica a este marcador en la posición 102,3cM. En el mapa físico, a 10cM se encuentra un gen de la enzima β -amilasa, que claramente se relaciona con la producción de azúcares fermentables en el mosto (atenuación).

Comparando los QTL obtenidos en el cromosoma 4 con los mapas de otras poblaciones, se observa que en Calicuchima-sib/Bowman (poder diastásico, α -amilasa), Chebec/Harrington (poder diastásico, α -amilasa y actividad de β -amilasa), Clipper/Sahara (actividad de β -amilasa), Dicktoo/Morex (proteína, poder diastásico, α -amilasa, diferencia de extracto fino-grueso - carácter no medido en esta tesis, pero muy relacionado con dureza de malta-), Galleon/ Haruna Nijo (actividad de β -amilasa), Harrington/TR306 (proteína), Steptoe/Morex (β -glucanos en malta, actividad de β -amilasa, poder diastásico, α -amilasa, proteína, y actividad de β -glucanasa), Harrington/Morex (proteína), hay una alta coincidencia de caracteres relacionados con la actividad de hidrólisis de almidón y de β -glucanos.

El hecho que varios caracteres de calidad aparecen juntos podría indicar efectos génicos pleiotrópicos, o alternativamente, la presencia de clusters de genes. Por ejemplo, los mapas muestran que el poder diastásico está asociado a menudo con la actividad de α y β -amilasa. Sin embargo, hay casos de poder diastásico no asociado con sus enzimas componentes. Esto puede deberse a que las enzimas no se analizaron independientemente o debido a la falta de polimorfismo en las poblaciones de mapeo. Mientras que hay QTL que son similares entre poblaciones, hay otros que están presentes en forma única (Zale et al., 2000). En esta tesis, el carácter medido para actividad amilolítica fue atenuación límite, como producto de la acción conjunta de varias enzimas. Igualmente, en el cromosoma 4 se detectaron dos QTL para proteína y dos QTL para atenuación, muy ligados a los primeros.

Dado que los determinantes de la calidad están distribuidos a lo largo de todo el genoma de cebada, se debe tener cuidado al elegir QTL para selección en los programas de mejoramiento. Un criterio para ser aplicado podría ser la magnitud del efecto. Regiones conservadas podrían ser objetivos de selección para mantener la calidad, aunque la selección de regiones únicas podrían conducir a nuevas mejoras (Zale et al., 2000).

En el cromosoma 2HL se detectaron tres QTL para dureza de malta, dos de ellos de efecto mayor (PEV = 11,3% y 13,4%) en los ambientes Puán 2010 y Tres Arroyos 2011 respectivamente (ambos ambientes sin estrés por sequía), y uno a través de todos los ambientes, todos con efecto de sustitución negativo. Ligado a estos QTL se encuentra el marcador Bmag350, ubicado a 76,6cM en el mapa de Varshney et al. (2007). En la misma posición de dicho marcador, se encuentra el QTL detectado en el ambiente Puán 2010. En el mapa físico, en la posición 74cM, se encuentra un gen de la enzima Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa, nuevamente relacionado con la descomposición de los compuestos β -glucanos.

Ligado a estos QTL de dureza se mapeó un QTL para proteína en el ambiente Puán 2009 (estrés por sequía en llenado de grano) con efecto de sustitución positivo, es decir, efecto contrario a los QTL de dureza, explicado por la relación opuesta entre proteína en grano y dureza de malta. También un QTL de humedad a la salida de remojo (ambiente Tres Arroyos 2008, seco durante el llenado de los granos) estuvo asociado con el QTL de proteína. El efecto de sustitución de este QTL tiene signo positivo como el QTL de proteína. Según Emebiri (2015) un porcentaje de proteína superior a 12% incrementa los tiempos de remojo y la humectación es heterogénea, lo que supone que a un mismo tiempo de remojo, el incremento de humedad de las muestras es menor con niveles de proteína más altos. Esto no se observó en los resultados encontrados en esta tesis. Tomando como ejemplo dos ambientes, uno con estrés y otro sin estrés, los promedios de proteína y humedad a la salida de remojo en el ambiente Cabildo 2010 fueron 12,7% y 43,95%, con un coeficiente de correlación proteína-humedad salida de remojo de 0,373, mientras que en Puán 2011, los promedios fueron 10,3% y 43,55% respectivamente, con

un coeficiente de correlación de 0,154. Tomando todos los ambientes, la correlación entre los promedios de proteína y los promedios de humedad de salida de remojo –de cada ambiente- es 0,038. Es decir, posiblemente existan factores genéticos y ambientales que tienen influencia en la velocidad de ingreso de agua a los granos más allá del nivel de proteína.

Para el carácter Extracto se detectaron cuatro QTL: uno en el cromosoma 1 HS, otro en el cromosoma 3, y dos en el GL 12 (sin detección de número de cromosoma). El primero se encuentra a 23,2 cM de un QTL detectado para respuesta a fotoperiodo. Ambos QTL tienen efecto de sustitución positivo, esto es, la diferencia en unidades del carácter del genotipo AA menos el genotipo aa, es positiva.

El segundo QTL detectado para extracto se encuentra a 40,4cM de un QTL de proteína en el cromosoma 3HL. Es un QTL de efecto mayor (PEV=10,1) detectado en el ambiente Tres Arroyos 2008 (sequía), mientras que el QTL de proteína dio una explicación fenotípica del 9% en el ambiente Cabildo 2010 (sin estrés).

Wang et al. (2015), trabajando con una población de DHs generada a partir del cruzamiento entre una variedad maltera Naso Nijo (Japón) y una variedad forrajera TX9425 (China), detectaron dos QTL para extracto en los cromosomas 1 y 2. El primero, con una explicación de la varianza del 5%, y el segundo con una explicación notablemente alta del 48,4% (LOD=30,1). Posiblemente, este nivel de explicación del QTL pueda deberse a la escasa cantidad de ambientes en que esta población fue testeada (2 sitios x 2 años), y a la diferencia en valores de extracto de los parentales (77,0% y 80,8%).

Zhou et al. (2016), encontraron un QTL en la posición 119,4 del cromosoma 5 que explicó el 11,9% de la variación de extracto. Estos autores trabajaron con una población de DHs generada a partir del cruzamiento entre una variedad australiana (Baudin) y una canadiense (AC Metcalfe), ambas de muy buena calidad maltera, solamente en dos sitios en un mismo año. El QTL para extracto detectado se encuentra muy ligado al marcador GMS002 (118,8cM), que en el mapa de Varshney et al. (2007) se encuentra mapeado en la posición 183,8cM, en ambos mapas en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 5. No es posible comparar en este caso esos dos mapas con el mapa de esta tesis debido a que en el cromosoma 5HL solamente hay una porción del cromosoma con microsatélites, pero hay dos fracciones que se ubicaron dentro de 5HL por sugerencia del software MultiQtl al estar ligados los marcadores de los extremos a una fracción de recombinación levemente mayor al umbral establecido para la construcción del mapa (0,30). Se aceptó hasta un valor máximo de recombinación de 0,37 para fusionar grupos que se encontraban separados a frecuencias de 0,30. En el GL14, mapeado como parte del cromosoma 5HL, en uno de los extremos se detectaron tres QTL de dureza de malta, uno de ellos de efecto mayor, que es un carácter relacionado con extracto (proteína es un carácter opuesto a dureza de malta y a extracto). Esta situación de detectar QTL de caracteres relacionados ocurre con frecuencia. Sólo para citar un ejemplo, Cu et al. (2016) encontraron QTL para β -amilasa, poder diastásico y atenuación límite aparente ligados al gen *Bmy1* en el extremo distal (brazo largo) del cromosoma 4 (mapeado por Yoshigi et al, 1994). QTL para Índice de Kolbach (relación entre proteína soluble y proteína total de la malta), aminoácidos libres, β -glucanos y viscosidad se detectaron en clusters en posiciones coincidentes en los cromosomas 1HS, 4HS, 7HS y 7HL, mostrando interdependencia entre estos caracteres. En este mapeo, se detectaron QTL para extracto en los cromosomas 1, 3, 5, 6 y 7, con porcentajes de explicación fenotípica entre 4,1 y 10,84%.

En esta tesis, ligados al marcador HVMLOH1a en el cromosoma 4HL (posición 102,3cM del mapa consenso) se encontraron un QTL para proteína y otro para atenuación límite, a una distancia de 31cM del gen Bmy1 (posición 133,3 del mapa consenso), coincidiendo con el mapa de Cu et al. (2016) que encontraron los QTL mencionados en el párrafo anterior y que están relacionados a dicho gen.

Para el carácter Aminoácidos Libres (FAN) se encontraron tres QTL, uno en el cromosoma 1HS (Puán 2010, ambiente sin estrés) y dos en el cromosoma 7 (uno en La Dulce 2011, ambiente sin estrés, y otro a través de todos los ambientes). Este último QTL está muy ligado a los marcadores HVCMA y GBM 1033, que en el mapa consenso están ubicados a 67,1 y 67,6cM del cromosoma 7. En el mapa de Zhou et al. (2016), en 121,9 se detectó el pico de un QTL de FAN. En dicho mapa, existe un sector amplio sin marcadores entre 69,7 y 121,9cM. En el mapa de Cu et al. (2016), se detectaron dos QTL en el cromosoma 7: uno de efecto mayor en la posición 73,26cM (13,90%), que podría estar relacionado con el QTL encontrado en esta tesis (posición 67,1cM) y otro en la posición 109,11cM, que estaría más cercano al QTL encontrado por Zhou et al. (2016).

Para definir situaciones de estrés y no estrés, un criterio adecuado para cebada cervecera es tener en cuenta el tamaño de los granos (denominado comercialmente “calibre” como porcentaje en peso de los granos retenidos sobre una zaranda de 2,5 mm). Este atributo se define durante la etapa de pre-antesis y fundamentalmente durante el llenado de los granos, y es una condición conocida que en años o en zonas con déficit de lluvias durante esas etapas, el resultado es un menor tamaño y peso de los granos. Considerando apropiado el criterio de Finlay y Wilkinson (1963), tomando el promedio de rendimiento (o en este caso de calibre) como medida de la calidad ambiental, se ordenaron los calibres de mayor a menor y se dividió la lista en cuatro cuartiles, considerando el primer cuartil como ambientes óptimos, y el último cuartil como ambientes con estrés.

La clasificación de la Tabla 5.4.14.2 muestra que 25 QTL fueron detectados en ambientes sin estrés, ocho en ambientes con estrés moderado, seis en ambientes con estrés intenso, y siete en ambientes con estrés severo; 17 QTL fueron detectados a través de todos los ambientes, aunque la explicación de la varianza fenotípica siempre fue muy baja cuando el análisis se realizó con todos los ensayos.

Solamente para el carácter viscosidad se detectaron tres QTL en un único ambiente con estrés severo (Puán 2008). En el resto de los QTL encontrados, los ambientes sin estrés fueron los más frecuentes. Posiblemente esto sea debido a que los ambientes sin estrés permiten expresar los potenciales de calidad de los genotipos participantes, incrementando la variabilidad para el análisis. En los ambientes con estrés, valores altos de proteína por menor tamaño de los granos, minimizaron los potenciales de extracto y afectaron la dureza de malta, entre otros.

Es interesante observar que hay regiones genómicas conservadas entre las diferentes poblaciones de mapeo. Un ejemplo de dichas regiones es la que se encuentra cercana al marcador HVMLOH1a en el cromosoma 4HL, donde fueron detectados en otras poblaciones QTL de poder diastásico ligados al gen Bmy1. En esta tesis, en esa misma región genómica se encontró un QTL de proteína (que claramente beneficia la expresión del poder diastásico) y un QTL de atenuación, que es el resultado de azúcares fermentables generados por actividad amilolítica. Otros ejemplos del mapa obtenido mostraron la relación entre QTL detectados y la equivalencia en el mapa físico de cebada de enzimas relacionadas con el carácter.

5.6. Conclusiones

A partir de una población de mapeo derivada del cruzamiento entre la línea Mut 6519 y el cultivar Aspen, se construyó un mapa de cebada con marcadores AFLP y SSR.

Mediante el análisis de QTL se detectaron regiones genómicas relacionadas con los caracteres agronómicos y de calidad estudiados.

A excepción del carácter Humedad a la Salida de Remojo, en el que los porcentajes de explicación de la varianza (PEV) de algunos QTL resultaron entre el 15% y el 20%, los PEV máximos para los caracteres agronómicos y de calidad estuvieron alrededor del 10% o menor.

Para los QTL con mayor PEV, se observa una mayor proporción de detección en ambientes sin sequía terminal que en ambientes con déficit de precipitaciones.

25 QTL fueron detectados en ambientes sin estrés, 8 en ambientes con estrés moderado, 6 en ambientes con estrés intenso, y 7 en ambientes con estrés severo.

Aún con valores de LOD altamente significativos, los PEV de cada uno de los caracteres a través de todos los ambientes fueron bajos, máximo 3,6%.

Los QTL detectados en posiciones cercanas y coincidentes, fueron detectados solamente en ambientes sin déficit hídrico.

Los QTL para proteína que aportaron mayor explicación fenotípica se detectaron en ambientes en que no hubo déficit de agua durante el llenado de los granos. Con una explicación del 8,7% en un ambiente con sequía terminal (Tres Arroyos 2009), se detectó un QTL para proteína cercano a un QTL para temperatura de canopeo.

Se detectaron varios QTL en regiones genómicas que se relacionan con diversos genes de enzimas en el mapa físico de cebada (por ejemplo, QTL de Dureza de Malta, β -glucanos y viscosidad relacionados con enzimas β -glucanasas, o QTL de atenuación límite en las regiones de enzimas relacionadas con el metabolismo de los azúcares).

6. CONSIDERACIONES FINALES

Se verificó la hipótesis 1 referida a la influencia de la variabilidad climática en la expresión diferencial de los genotipos en cuanto a rendimiento y calibre de los granos. Las cuatro localidades exploradas revelaron una amplia variabilidad climática (objetivo 1.1). Esa variabilidad pudo relacionarse con los parámetros evaluados (objetivo 1.2), revelando una extensa interacción genotipo*ambiente relacionada principalmente con el año climático. El ensayo con irrigación contribuyó a explicar la importancia de la disponibilidad de agua (objetivo 1.3) sin embargo, la variabilidad tuvo otros componentes, entre los cuales la variación genética fue importante.

No se encontró relación entre la temperatura de canopeo y el rendimiento o el tamaño de los granos (objetivo 1.5) probablemente porque en las condiciones de los ensayos la variabilidad observada tuvo múltiples causas que enmascararon el efecto de este parámetro. Por el contrario, la respuesta al fotoperíodo se asoció significativamente con el tamaño de los granos (objetivo 1.6) aun cuando la relación no resultó lo suficientemente clara como para asistir en la selección de líneas en forma práctica. Los métodos de estabilidad resultaron una buena alternativa que muestran el comportamiento general de las líneas en evaluación, pero para utilizarlos se requiere una cantidad importante de ensayos realizados en ambientes contrastantes (Objetivo 1.4).

La hipótesis 2 fue asimismo comprobada, ya que tanto el contenido de proteína del grano como los parámetros de malteado fueron afectados por las condiciones ambientales. La calidad industrial, revelada por análisis de micromaltesos correspondientes a cada ambiente (objetivo 2.1) reveló una gran variabilidad relacionada con la temperatura y la disponibilidad de agua. Asimismo hubo un fuerte componente genético en la variación en calidad. El contenido de proteína fue principalmente afectado por las precipitaciones durante la formación y el llenado de los granos (objetivo 2.2). Las relaciones entre parámetros no mostraron correlaciones suficientemente claras como para limitar el número de determinaciones analíticas en la evaluación de la calidad (objetivo 2.3).

En cuanto a la hipótesis 4, se localizaron QTL relacionados con los parámetros evaluados en el campo y de calidad de malta (objetivo 4.1): 5 con rendimiento, 3 con tamaño de los granos, 16 con contenido de proteína, 6 con temperatura de canopeo, 3 con respuesta al fotoperíodo, 7 QTL asociados a humedad de fin de remojo, 4 con extracto acuoso, 11 con dureza de malta, 4 con viscosidad de mosto, 3 con contenido de aminoácidos libres, 5 con beta-glocanos en mosto, 3 con atenuación límite aparente, 3 con índice de Hartong. Estos QTL explicaron un porcentaje medio o menor de la varianza fenotípica.

Al menos uno de los QTL hallados para cada carácter se verificaron en todos los ambientes, con excepción de dos caracteres (atenuación límite y respuesta al fotoperíodo). Si bien la mayor parte de los QTL se detectaron en ambientes sin estrés, algunos lo hicieron en ambientes con estrés severo o intenso (objetivo 4.2).

Los QTL hallados en posiciones coincidentes o cercanas (objetivo 4.3) solamente lo hicieron en ambientes no afectados por déficit hídrico.

La selección por calidad industrial de cebada en programas de mejoramiento por medio de micromaltesos y micromaceraciones es costosa en recursos y tiempo. Es altamente deseable llegar a un enfoque más eficiente y factible para identificar los genotipos de mejor calidad. “Con

el advenimiento de los marcadores moleculares es posible mapear e identificar los loci que afectan la calidad”, expresaban Han et al. (1997). Todavía hoy es necesario continuar trabajando en la línea de detección de genes que puedan explicar la variabilidad fenotípica con mayor proporción. La detección de QTL en esta tesis, próximos a genes relacionados con el metabolismo de la germinación en el mapa físico de los cromosomas de cebada, resulta muy promisorio para continuar en esta línea de investigación, orientada a la selección asistida por marcadores moleculares.

7. ANEXOS

1. Origen de la Línea Mutante 6519

Se originó a partir de un tratamiento mutagénico con azida sódica (2×10^{-4} M), sobre semillas de la variedad Quilmes Painé, realizado por el Ing. Agr. Alberto R. Prina del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (Convenio INTA-Cervecería y Maltería Quilmes, 1992), y posterior manejo de las progenies según el siguiente detalle:

1992: Siembra identificada como 92/CAST/34 en Criadero Quilmes, Tres Arroyos. Comprobación de estrías somáticas, Ing. Agr. Alberto R. Prina.

1993: Generación M1. Identificación 93/M/603. Selección y cosecha de plantas individuales. Ing. Agr. Alberto R. Prina y Abel Moglie. Trilla individual.

1994: Generación M2. Las semillas de cada planta fueron sembradas en parcelas individuales (1,40 m x 4,00 m). La parcela 6519, fue el origen de esta línea.

1995: Generación M3. Multiplicación de la línea 6519, parcela 95M105.

1996: Generación M4. Primer ensayo comparativo de rendimiento. Parcelas 602 y 901. Multiplicación 96/M/148. Análisis de calibre, proteína, micromalteo y análisis de malta.

1997: Generación M5. Multiplicación 97/M/594.

1998: Generación M6. Parcela 98/M/544. Primer registro de Resistencia a sequía. Observación 2/11/98: planta totalmente verde (hasta las hojas inferiores) a pesar de la condición de sequía.

1999 y siguientes: Multiplicaciones y ensayos en diversos ambientes.

Tabla 7.1. Resumen de Precipitaciones (mm), Rendimientos (Kg/Ha), Calibre (% retenido sobre zaranda de 2,5 mm), Proteína de Cebada (% sobre sustancia seca), y determinaciones analíticas de calidad de malta.

AÑO	SITIO	PRESIEMBRA (mm)	VEGETATIVO/REPROD TEMPORANO (mm)	LLENADO (mm)	TOTAL (mm)	RENDIMIENTO (kg/Ha)	CALIBRE (% s/z 2,5 mm)	PROTEINA (% s/s)	DUREZA (Nm)	HUM SAL REMOJO (%)	EXTRACTO (% s/s)	VISCOSIDAD (mP*s)	β-GLUCANOS (ppm)	FAN (ppm)	ATENUACION LIMITE (%)	INDICE HARTONG (% 45 °C)
2007	TA	337,7	165,1	40,6	543,4	5262,8	84,4	13,06	118,75	42,13					82,71	
2008	TA 1a.	325	141,6	20,5	487,1	4616,9	66,9	14,11	105,28	42,30	76,67	1,5579	81,36	167,10	84,94	
2008	TA 2a.	382,7	93,9	35	511,6	3519,4	38,8	15,52								
2008	LD	653	139	31	823	6189,6	81,3	13,66	114,50	40,66	76,69	1,6815	243,33	145,74	85,04	
2008	CAB	272	100,6	13,8	386,4	2310,5	66,7	12,72	105,44	43,95	76,12	1,6969	198,68	139,63	85,25	35,52
2008	PU	219,3	94	34	347,3	2765,2	26,3	15,72	117,31	42,75	71,60	1,6637	163,28	160,13	85,55	36,96
2009	TA 1a.	263	179,6	69,6	512,2	3321,9	50,9	16,30								
2009	TA 2a.	357,1	115,4	65	537,5	2644,0	51,3	16,62								
2009	LD	336	131	43	510	3538,7	79,6	14,62								
2009	PU	107	126,9	81,4	315,3	885,2	15,5	16,77								
2010	TA 1a.	503,2	282,7	129,5	915,4	3862,8	81,9	13,44	135,46	42,02	77,69	1,6575	408,36	170,59	83,54	36,24
2010	TA 2a.	623,8	227,1	74	924,9	4301,5	83,4	12,64								
2010	LD	626	228	116	970	5568,2	66,4	12,54	143,96	41,95	77,47	1,7032	514,83	149,95	82,14	31,01
2010	CAB	315	119,2	35	469,2	1290,9	87,0	16,36	156,34	43,79	75,02	1,5563	408,28	201,69	83,12	43,71
2010	PU	314,8	218,7	86	619,5	2402,4	92,0	13,31	127,91	41,97	77,51	1,5861	282,82	199,20	83,72	46,34
2011	TA 1a.	320,2	163,7	192,4	676,3		93,1	14,44	114,45	43,01	78,17	1,5262	210,34	200,51	84,65	42,53
2011	LD	327	156	197	680		87,1	13,73	119,05	42,55	77,22	1,5098	158,35	156,65	85,19	33,07
2011	CAB	127,6	81,8	128,4	337,8		59,4									
2011	PU	523,5	125,4	247	895,9	3130,6	93,5	10,33	99,82	43,55	80,34	1,5606	159,36	184,00	85,19	44,19

Tabla 7.2. Correlaciones entre ambientes (sitios y años) para rendimiento.

La parte inferior de la diagonal indica el coeficiente r de Pearson, la parte superior indica la probabilidad asociada

CORRELACIONES ENTRE SITIOS PARA RENDIMIENTO																
	TA 2007	TA 1 2008	TA 2 2008	CAB 2008	PU 2008	LD 2008	TA 1 2009	TA 2 2009	PU 2009	LD 2009	TA 1 2010	TA 2 2010	CAB 2010	PU 2010	LD 2010	PU 2011
TA 2007	1,0000															
TA 1 2008	0,3910	1,0000														
TA 2 2008	0,2797	0,3864	1,0000													
CAB 2008	0,1260	0,0578	0,2383	1,0000												
PU 2008	0,0351	0,2420	0,1906	0,1282	1,0000											
LD 2008	0,3736	0,4550	0,4791	0,2761	0,2003	1,0000										
TA 1 2009	0,2779	0,3840	0,2755	0,1030	0,4011	0,5340	1,0000									
TA 2 2009	0,1934	0,1606	0,3269	0,0893	0,2105	0,2763	0,2939	1,0000								
PU 2009	0,0709	0,1356	0,1080	0,0220	0,2107	0,0070	0,0424	0,2027	1,0000							
LD 2009	0,2121	-0,0223	0,1502	0,1998	-0,0923	0,3770	0,0653	0,1127	-0,2287	1,0000						
TA 1 2010	0,2798	0,0901	0,1454	0,1180	0,0313	0,4100	0,3779	0,1225	-0,2401	0,2429	1,0000					
TA 2 2010	0,3977	0,2144	0,2600	0,1765	0,0392	0,5821	0,4563	0,3557	-0,0753	0,3869	0,5594	1,0000				
CAB 2010	0,3355	0,2830	0,1851	0,0148	0,2283	0,3541	0,4568	0,2424	0,0614	0,0865	0,3330	1,0000	1,0000			
PU 2010	0,0154	0,1073	0,0463	-0,0294	0,2838	0,0259	0,2290	0,3855	0,3787	-0,2942	-0,0144	0,0163	0,2414	1,0000		
LD 2010	-0,0543	-0,1333	0,0398	-0,1177	-0,1867	-0,0957	-0,0027	-0,0201	0,0210	0,0299	0,0604	0,1446	-0,0892	-0,0876	1,0000	
PU 2011	0,2546	0,0730	0,0464	0,0022	-0,0926	0,0845	0,0515	0,1805	-0,1036	0,2986	0,0745	0,2061	0,2129	-0,1052	-0,0077	1,0000

Tabla 7.3 Correlaciones entre ambientes (sitios y años) para calibre.

La parte inferior de la diagonal indica el coeficiente r de Pearson, la parte superior indica la probabilidad asociada

CORRELACIONES ENTRE SITIOS PARA CALIBRE																			
	TA 2007	TAI 2008	TAZ 2008	LD 2008	CAB 2008	PU 2008	TAI 2009	TAZ 2009	LD 2009	PU 2009	TAI 2010	TAZ 2010	LD 2010	CAB 2010	PU 2010	TA 2011	LD 2011	CAB 2011	PU 2011
TA 2007	1.0000	0.0000	0.0000	0.0013	0.0000	0.0000	0.0009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3130	0.4309	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0118
TAI 2008	0.5748	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0235	0.0000	0.0000	0.0001	0.0044	0.0969	0.0465	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0005	0.1866
TAZ 2008	0.5959	0.5304	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.3055	0.7555	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0504
LD 2008	0.2598	0.4433	0.3276	1.0000	0.0000	0.0001	0.2796	0.0615	0.0020	0.9900	0.1297	0.8154	0.7610	0.0015	0.0012	0.0217	0.0051	0.5964	0.6541
CAB 2008	0.6170	0.6291	0.7001	0.3614	1.0000	0.0000	0.0037	0.0000	0.0000	0.0126	0.0000	0.9464	0.2300	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0005	0.0204
PU 2008	0.5464	0.5822	0.8117	0.3115	0.7736	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.2034	0.8184	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0199
TAI 2009	0.2673	0.1849	0.4818	0.0889	0.2355	0.3953	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7428	0.0176	0.0000	0.0000	0.0000	0.6309	0.4691
TAZ 2009	0.3986	0.5021	0.6233	0.1531	0.4644	0.6377	0.6089	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0385	0.8266	0.0000	0.0000	0.0000	0.0717	0.0000	0.0050
LD 2009	0.4297	0.4004	0.5257	0.2501	0.4302	0.4254	0.4641	0.4835	1.0000	0.0000	0.0007	0.1974	0.5370	0.0115	0.0007	0.0000	0.0000	0.0005	0.1631
PU 2009	0.3464	0.3068	0.3356	-0.0010	0.2033	0.3025	0.3833	0.4232	0.3477	1.0000	0.0019	0.0313	0.4006	0.0750	0.0001	0.0020	0.1800	0.0001	0.1022
TAI 2010	0.3647	0.2316	0.2923	0.1243	0.3594	0.3583	0.3688	0.3929	0.2726	0.2514	1.0000	0.0000	0.4964	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0066	0.0014
TAZ 2010	0.0829	-0.1361	0.0842	0.0192	-0.0055	0.1044	0.3634	0.1692	0.1058	0.1759	0.6174	1.0000	0.5422	0.1180	0.0000	0.0013	0.5935	0.0818	0.2233
LD 2010	-0.0648	-0.1628	0.0256	-0.0250	0.0986	0.0189	0.0270	0.0180	-0.0508	0.0691	0.0560	0.6502	1.0000	0.6761	0.6792	0.7784	0.5464	0.7654	0.9730
CAB 2010	0.4359	0.3931	0.4593	0.2570	0.4489	0.4241	0.1935	0.3734	0.2059	0.1458	0.3447	0.1282	-0.0344	1.0000	0.0000	0.0002	0.0442	0.0000	0.1638
PU 2010	0.4181	0.3998	0.4013	0.2622	0.4199	0.3868	0.3546	0.4705	0.2751	0.3185	0.5550	0.3974	-0.0340	0.4548	1.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.1000
TA 2011	0.4367	0.4749	0.4882	0.1874	0.4904	0.5232	0.3775	0.5449	0.3842	0.4157	0.4157	0.2970	0.0232	0.2970	0.4492	1.0000	0.0005	0.0000	0.0031
LD 2011	0.4606	0.3265	0.3737	0.2278	0.5305	0.4055	0.0395	0.1475	0.2339	0.1101	0.3145	0.0439	0.0496	0.1646	0.2954	0.2796	1.0000	0.0633	0.2930
CAB 2011	0.4059	0.3813	0.4621	0.0509	0.2794	0.4823	0.4205	0.5738	0.2798	0.3111	0.2209	0.1406	0.0246	0.4365	0.3545	0.3295	0.1520	1.0000	0.0045
PU 2011	0.2051	0.1084	0.1601	0.0369	0.1892	0.1899	0.0595	0.2281	0.1145	0.1340	0.2586	0.1000	0.0028	0.1143	0.1348	0.2396	0.0864	0.2906	1.0000

8. REFERENCIAS

Abeledo, G., Calderini, D., Slafer, G., 2002. Physiological changes associated with genetic improvement of grain yield in Barley. In Barley Science: Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality, Chap 13: 361-385.

Akaike, Hirotugu, 1974. A new look at the statistical model identification, IEEE Transactions on Automatic Control 19 (6): 716-723.

Amani, I., Fisher, R. A., Reynolds, M. P., 1996. Canopy Temperature Depression Association with Yield of Irrigated Spring Wheat Cultivars in a Hot Climate. J. Agronomy & Crop Science 176, 119—129.

Anyia, A.O., Herzog, H., 2004. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. Europ J Agron 20: 327-339.

Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? Ann Bot 89: 925–940.

Arias, M. C., Favret, E. A., Solari, R. M., Franzone, P. M., 1987. Análisis genético del cromosoma 5 de cebada en relación con la síntesis de proteínas de reserva y la reacción a *Erysiphe graminis hordei*. Mendeliana 1: 23-43.

Arisnabarreta, S., Miralles, D.J., 2008b. Radiation effects on potential number of grains per spike and biomass partitioning in two- and six-rowed near isogenic barley lines. Field Crops Res 107: 203–210.

Babu, C.R., Nguyen, B.D., Chamarek, V., Shanmugasundaram, P., Chezian, P., Juyaprakash, P., Ganesh, S.K., Palchamy, A., Sadasivam, S., Sarkarung, S., Wade, L.J., Nguyen, T.H., 2003. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. Crop Sci 43: 1457–1469.

Bamforth, C.W., 2009. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. J Cereal Sci 50: 353–357.

Bamforth, C. W. and Barclay, A. H., M., 1993. Malting technology and the uses of malt. In: Barley Chemistry and Technology, Mac Gregor, A., Bhatti, R. Eds. American Association of Cereal Chemists, 486pp.

Barua, U.M., Chalmers, K.J., Thomas, W.T.B., Hackett, C.A., Lea, V., Jack, P., Forster, B.P., Waugh, R., Powell, W., 1993. Molecular mapping of genes determining height, time to heading, and growth habit in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 36: 1080–1087

Bathgate, G. N., 1987. Quality requirement for malting. Aspects Appl Biol 15: 18-32.

Bentolila, S., Hardy T., Guitton C., Freyssinet G., 1992, Comparative genetic analyses of F₂ and anther culture derived plants of maize. Genome 35: 575–582.

Bertholdsson, N.O., 1999. Characterization of malting barley cultivars with more or less stable grain protein content under varying environmental conditions. Eur J Agron 10: 1–8.

- Bishop, L R., 1928.** First report on barley protein. The composition and quantitative estimation of barley proteins. *Journal of the Institute of Brewing*, 34: 101-118.
- Bishop, L R., 1930.** Prediction of Extract. *Journal of the Institute of Brewing*, 36: 421-444.
- Bishop, L R., 1934.** Prediction of Extract III. Application of the carbohydrate principle. *Journal of the Institute of Brewing*, 40: 62-74.
- Bishop, L R., 1948.** The adjustment of prediction to give true extract in malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 54: 330-333.
- Blum, A. Mayer, J. and Gozlan, G., 1982.** Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat. *Field Crops Res* 5:137-146.
- Blum, A. 2005.** Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Austral J Agric Res* 56: 1159–1168.
- Blum, A., 2009.** Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Res* 112: 119–123.
- Blum, A., 2011:** Drought Resistance and Its Improvement. *Plant Breeding for Water-Limited Environments*. Springer, New York, chapter 3, 53-152.
- Blum, A., 2014.** Genomics for drought resistance – getting down to earth. *Functional Plant Biol* 41(11): 1191-1198.
- Bore´m, A. D., Mather, E., Rasmusson, D.C., Fulcher, R. G. and Hayes, P. M., 1999.** Mapping Quantitative Trait Loci for Starch Granule Traits in Barley. *J Cereal Sci* 29:153–160.
- Borevitz, J. O., Maloof, J. N., Lutes, J., Dabi, T., Redfern, J. L., Trainer, G. T., Werner, J. D., Asami, T., Berry, C. C., Weigel, D., Chory, J., 2002.** Quantitative Trait Loci Controlling Light and Hormone Response in Two Accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 160 (2), 683-696.
- Bozdogan, H., 2000.** Akaike's Information Criterion and Recent Developments in Information Complexity. *Journal of Mathematical Psychology* 44(1): 62-91.
- Buyser J de, Henry Y., Taleb G., 1985.** Wheat androgenesis: cytogenetical analysis and agronomic performance of doubled haploids. *Z Pflanzenzuecht* 95:23–34
- Calderini, D.F., Savin, R., Abeledo, L. G., Reynolds, M. P, Slafer, G. A., 2001.** The importance of the period immediately preceding anthesis for grain weight determination in wheat. *Euphytica* 119: 199–204.
- Calderini, D.F., Abeledo, L.G., Savin, R y Slafer, G. A., 1999.** Carpel size and temperature in pre-anthesis modify potential grain weight in wheat. *J Agric Sci*, 132: 453–460.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mare. C., Tondelli, A., Stanca, A.M., 2008.** Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res* 105: 1–14.

Charmet, G., Branlard G., 1985. A comparison of androgenetic doubled-haploid and single-seed descent lines in Triticale. *Theor Appl Genet* 71:193–200.

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103: 551–560.

Coles, G. D., Jamieson, P. D. and Haslemore, R. M., 1991. Effects of moisture stress on malting quality in Triumph barley. *J Cereal Sci* 14: 161-177.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K., 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.

Collins, H.M., Panozzo, J.F., Logue, S.J., Jefferies, S.P., Barr, A.R., 2003. Mapping and validation of chromosome regions associated with high malt extract in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Austr J Agric Res* 54: 1223–1240.

Collins, N.C., Tardieu, F., Tuberosa, R., 2008. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol* 147: 469–486.

Condon, A. G., Farquhar, G. D., Richards, R. A., 1990: Genotype variation in carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in wheat. Leaf gas exchange and whole plant studies. *Aust. J. Plant Physiol.* 17, 9—22.

Conry, M. J., 1997. Effect of fertilizer N on the grain yield and quality of spring malting barley grown on five contrasting soils in Ireland. *Biology and Environment: Proceed Royal Irish Academy, Section B:* 185-196.

Cu, S.T., March, T. J., Stewart, S., Degner, S., Coventry, S., Box, A., Stewart, D., Skadhauge, B., Burton, R. A., Fincher, G.B., Eglinton, J., 2016. Genetic analysis of grain and malt quality in an elite barley population. *Mol Breed* 36:129.

Cuesta-Marcos, A., Casas, A.M., Hayes, P.M., Gracia, M.P., Lasa, J.M., Ciudad, F., Codesal, P., Molina-Cano, J.L., Igartua, E., 2009. Yield QTL affected by heading date in Mediterranean grown Barley. *Plant Breed* 128: 46-53.

Dailey, J.E., Peterson, D.M., Osborn, T.C., 1988. Hordein gene expression in a low protein barley cultivar. *Plant Physiol* 88: 450–453.

Da-wei X., Mei-xue, Z., Xiao-qin Z., Song C., Kang W., Fan-rong Z., Ying M., Fei-bo W., Guo-ping Z., 2010. Identification of QTLs for yield and yield components of barley under different growth conditions. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 11(3): 169–176.

Deery, D. M., Rebetzke, G. J., Jimenez-Berni, J. A., James, R. A., Condon, A. , Bovill, W., Hutchinson, P., Scarrow, J., Davy, R., Furbank, R. T., 2016. Methodology for High-Throughput Field Phenotyping of Canopy Temperature Using Airborne Thermography. *Front Plant Sci* . 2016; 7: 1808.

Devaux, P., Kilian, A., Kleinhofs, A., 1995. Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination-derived double haploid populations. *Mol Gen Genet* 249: 600-608.

Diab, A.A., Teulat, B., This, D., Ozturk, N.Z., Benschler, D., Sorrells, M.E., 2004. Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theor Appl Genet* 109: 1417–1425.

Di Rienzo, J., Macchiavelli, R., Casanoves, F., 2009. Modelos Mixtos en InfoStat

Eagles, H. A., Bedggood, A. G. Panozzo, J. F., and Martin, P. J., 1995. Cultivar and environmental effects on malting quality in barley. *Aust J Agric Res* 46: 831-844.

Elia, M., Swanston, J.S., Moralejo, M., Casas, A., Perez-Vendrell, A.M., Ciudad, F.J., Thomas, W.T.B., Smith, P.L., Ullrich, S.E., Molina-Cano, J.L., 2010. A model of the genetic differences in malting quality between European and North American barley cultivars based on a QTL study of the cross Triumph x Morex. *Plant Breed* 129: 280–290.

E-malt.com., Newsletter 2016. 1, rue Du Cououry 4800 Lambermont, Belgium.

Emebiri, L.C., 2015. Breeding malting barley for consistently low grain protein to sustain production against predicted changes from global warming. *Mol Breed* 35:18

European Brewery Convention, 1998. Analytica – EBC. Published by VERLAG HANS CARL Getränke – Fachverlag, 5th edition.

FAO Website, Faostat Agriculture Database Results, <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Ultima actualización 21 de marzo de 2018.

Fincher, G. B., Stone B. A., 1993. Physiology and Biochemistry of Germination in Barley. In: *Barley Chemistry and Technology*, Mac Gregor, A. and Bhatti, R. Ed.: 247-295.

First Key Consulting, 2013. Web site <https://www.firstkey.com>

Fischer, R.A and Maurer, R., 1978: Drought resistance in spring wheat cultivar I: Grain yield responses. *Aust J Agric Res* 29: 897-912.

Fischer, R.A., Wood, J.T., 1979. Drought resistance in spring wheat cultivars. III. Yield association with morpho-physiological traits. *Aust J Agric Res* 30: 1001–1020.

Fisher, R.A., Bidinger, F., Syme, J.R, Wall, P.C., 1981. Leaf photosynthesis, leaf permeability, crop growth, and yield of short spring wheat genotypes under irrigation. *Crop Sci.* 21, 367—373.

Fisher, R.A., Rees, D., Sayre, K.D., Lu, Z.M., Condon, A.G, Saavedra, A.L., 1998. Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate and cooler canopies. *Crop Science* 38, 1467-1475

Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H., Langridge, P., 2010. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J Exper Bot* 61: 3211-3222.

Forster, B.P., Ellis, R.P., Moir, J., Talame, V., Sanguinetti, M.C., Tuberosa, R., This, D., Teulat-Merah, B., Ahmed, I., Mariy, S.A.E., Bahri, H., El Ouahabi, M., Zoumarou-Wallis, N., El-Fellah, M., Ben Salem, M., 2004. Genotype and phenotype associations with drought tolerance in barley tested in North Africa. *Ann Appl Biol* 144: 157–168.

Franckowiak, J.D., Kleinhofs, A, Lundqvist, U., 2005. Descriptions of barley genetic stocks for 2005. *Barley Genet Newslett* 35: 155–210.

Furusho, M., Hamachi, Y., Yoshida, T., 1990. Varietal difference in crossability between Japanese barley and *Hordeum bulbosum* L. *Japan J Breed* 40:411–417

García del Moral, L. F., Miralles, D. J., Slafer, G. A., 2002. Initiation and appearance of vegetative and reproductive structures throughout barley development. In: *Barley Science* Slafer, Molina-Cano, Savin, Araus, Romagosa, Ed.: 243-268.

García del Moral, M. B., Jimenez Tejada, M. P., García del Moral, L. F., Ramos, J. M., Roca de Togores, F., Molina Cano, J. L., 1991. Apex and ear development in relation to the number of grains on the main-stem ears in spring barley. *J Agric Sci* 117: 39-45.

García del Moral, M.B., García del Moral, L.F., 1995. Tiller production and survival in relation to grain yield in winter and spring barley. *Field Crops Res* 44: 85–93.

Gill S.S., Tuteja, N., 2010. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 5: 26-33.

Golberg, A. D., Ruiz, M. A., Quiroga, A., Fernández, O. A., 2011. “Qué le sucede a un cultivo cuando no llueve” Capítulo 3: Conceptos generales sobre el estrés en las plantas: 53.

Goldstein, D. B.; Pollock, D. D., 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J Hered* 8: 335-342.

González, A., Martín, I., Ayerbe, L., 2008. Yield and osmotic adjustment capacity of barley under terminal water-stress conditions. *J. Agron Crop Sci* 194: 81–90.

Graner, A., Jahoor, A., Schondelmaier, J., Siedler, H. Pillen, K, 1991. Construction of a RFLP map of barley. *Theor Appl Genet* 83: 250-256.

Grant, C. A., Gauer, L. E., Gehl, D. T., Bailey, L. D., 1991. Protein production and nitrogen utilization by barley cultivars in response to nitrogen fertilization under varying moisture conditions. *Can J Pl Sci* 71: 997-1009.

Grashoff, C., D'Antuono, L. F., 1997. Effect of shading and nitrogen application on yield, grain size distribution and concentrations of nitrogen and water soluble carbohydrates in malting spring barley (*Hordeum vulgare* L.) *Europ J Agron* 6: 275-293.

Grausgruber H., Bointner H., Tumpold R., Ruckenbauer P., 2002: Genetic improvement of agronomic and qualitative traits of spring barley. *Plant Breed* 121: 411-416.

Griffiths, A.J.F., Wessler S.R., Carroll, S.B., Doebley, J., 2011. *Introduction to Genetic Analysis*, 10th Edition.

Han, F., Romagosa, I., Ullrich, S.E., Jones, B. L., Hayes, P.M., Wesenberg, D.M., 1997. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Mol Breed* 3: 427-437.

Hartong, B. D. 1938: "Der Lösungsgrad des Malzes III", *Wochenschrift für Brauerei* 55, 1: 5–8.

Hartong, B. 1936: "Der Lösungsgrad des Malzes II", Wochenschrift für Brauerei 53, 15: 116–117.

Hartong, B. 1936: "Der Lösungsgrad des Malzes", Wochenschrift für Brauerei 53, No. 11.: 81–83.

Hartong, B. D. 1938: "Der Lösungsgrad des Malzes III", Wochenschrift für Brauerei 55, No. 1, 5–8.

Hayes, P.M., Liu, B.H., Knapp, S.J., Chen, F., Jones B., Blake, T., Franckowiak, J., Rasmusson, D., Sorrells, M., Ullrich, S.E., Wesenberg, D., Kleinhofs, A., 1993. Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North-American barley germ plasm. *Theor Appl Genet* 87: 392–401.

Held, I. M., Delworth, T. L., Lu, J., Findell, K. L. , Knutson, T. R., 2005. Simulation of Sahel drought in the 20th and 21st centuries. *Proceed Nat Acad Sci* 102: 17891-17896.

Heun, M., Kennedy, A.E., Anderson, J.A., Lapitan, N.L.V., Sorrells, M.E., 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.

Hofmann, K., Diethelm, M., Herz, M., Andreas, A., Winkler, J., Dietrich, E., Schmidhalter, U., Wagner, C., Thümmel, F., Riano-Pachon, D., Kleeßen, S., Lohse, M., Kersten, B., Schweizer, G., 2009. Climatic stress tolerance in barley – Identification of associated genes by comprehensive quantitative expression analysis, 2009. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Volume: pp. 167-170

Hoffman F, Thomas E, Wenzel G., 1982 Anther culture as a breeding tool in rape. 2 Progeny analyses of androgenetic lines and induced mutants from haploid cultures. *Theor Appl Genet* 61:225–232.

Houston, K., Russell, J., Schreiber, M., Halpin, C., Oakey, H., Washington, J.M., Booth, A., Shirley, N., Burton, R.A., Fincher, Robbie Waugh, R., 2014. *BMC Genomics* 15: 907.

Howard, K.A., Gayler, K. R., Eagles, H. A. and Halloran, G. M., 1996. The relationship between D hordein and malting quality in barley. *J Cereal Sci* 24: 47-53.

Hu, H., Xiong, L., 2014. Genetic engineering and breeding of drought resistant crops. *Annu Rev Plant Biol* 65:715–741.

Jiang, G. H., He, Y. Q., Xu, C. G., Li, X. H., and Zhang, Q., 2004. The genetic basis of stay-green in rice analyzed in a population of doubled haploid lines derived from an indica by japonica cross. *Theor Appl Genet* 108: 688–698.

Johnson, W.C., Jackson, L.E., Ochoa, O., van Wijk, R., Peleman, J., St. Clair, D.A., Michelmore, R.W., 2000. Lettuce, a shallow-rooted crop and *Lactuca serriola*, its wild progenitor, differ at QTL determining root architecture and deep soil water exploitation. *Theor Appl Genet* 101: 1066–1073.

Jones, H.G., 2007. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *J Exp Bot* 58: 119–130.

- Juenger, T.E., McKay, J.K., Hausmann, N., Keurentjes, J.J., Sen, S., Stowe, K.A., Dawson T.E., Simms, E.L., Richards, J.H., 2005.** Identification and characterization of QTL underlying whole-plant physiology in *Arabidopsis thaliana*: $\delta^{13}\text{C}$, stomatal conductance and transpiration efficiency. *Plant Cell Environ* 28: 697–708.
- Kato, T., Sasaki, A., Takedam, G., 1995.** Genetic variation of betaglucan contents and beta-glucanase activities in barley, and their relationships to malting quality. *Ikushugaku Zasshi* 45: 471–477.
- Keßler, M & Kreis, S & Zarnkow, Martin & Back, W. 2005.** Investigations about the relative Hartong extract at 45°C. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 58. 56-62.
- Kosambi, D.D. 1944.** The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172—175.
- Khush, G.S., 2001.** Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* 2: 815–822.
- Kindu, G.A., Tang, J., Yin, X., Struik, P.C. 2014.** Quantitative trait locus analysis of nitrogen use efficiency in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Euphytica* 199: 207–221.
- Kleinhofs, A., Kilian, A., Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Hayes, P.M., Chen, F.Q., Lapitan, N.L.V., Fenwick, A., Blake, T.K., Kanazin, V., Ananie, A., Dahleen, L., Kudrna, D., Bollinger, J., Knapp, S.J., Liu, B., Sorrells, M.E., Heun, M., Franckowiak, J.D., Hoffman, D., Skadsen, R., Steffens, B.J., 1993.** A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor Appl Genet* 86: 705—712.
- Kreis, M. and Shewry, P.R., 1992.** The control of protein synthesis in developing barley seeds. In *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, P.R. Shewry, Ed.: 319-333.
- Kumashiro T, Oinuma T., 1985.** Comparison of genetic variability among anther-derived and ovule-derived doubled haploid lines of tobacco. *Japan J Breed* 35:301–310
- Kuntze, W., 2014.** *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin Ed., 5th revised English Edition, 960 Pages.
- Lafitte, H.R., Courtois, B., 2002.** Interpreting cultivar-environment interactions for yield in upland rice assigning value to drought-adaptive traits. *Crop Sci* 42: 1409–1420.
- Lander, E., Kruglyak, L., 1995.** Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet.* 11(3):241-7.
- Lashermes, P., Gaillard, A., Beckert, M., 1988.** Gynogenetic haploid plants analysis for agronomic and enzymatic markers in maize (*Zea mays L.*). *Theor Appl Genet* 76:570–572
- Laurie D. A., Pratchett N., Bezant J. H., Snape, J. W., 1994.** Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare* (barley). *Heredity* 7: 619-627.
- Lazzery, P. A. and Shewry, P. R., 1993.** Biotechnology of cereals. *Biotechnology and Genetic Engin Rev* 11: 79–146.

Levitt, J. (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York. 698 pp.

Li, J. Z., Sjakste, T. G., Rder, M. S., Ganal, M. W., 2003. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. Theor Appl Genet 107:1021–1027.

Li H., Kilian A., Zhou M., Wenzl P., Huttner E., Mendham N., McIntyre L., Vaillancourt, R.E., 2010. Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. Mol Genet Genom 284: 319-331.

Liu Z.W., Biyashev, R.M., Saghai Maroof M.A., 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theor Appl Genet 93: 869-876.

Lu, H., Romero-Severson, J., Bernardo, R., 2002. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. Theor Appl Genet 105: 622–628.

Lundqvist, U., Franckowiak, J.D., Konishi. T., 1997. New and revised descriptions of barley genes. Barley Genet Newslett 26: 22–516.

Mac Gregor, A., 1996. Biochemistry of malting. The way forward. Proceed VII Intern Barley Genetics Symp, University of Saskatchewan, Canada: 1-6.

MacLeod, L. C., 2000. Breeding Barley for Malt and Beer. 8th Intern Barley Genetics Symp, Invited Papers: 81-86.

Macnicol, P. K., Jacobsen, J. V., Keys, M. M., Stuart, I. M., 1993. Effects of heat and water stress on malt quality and grain parameters of Schooner barley grown in cabinets. J Cereal Sci 18: 61-68.

Manninen, O, 2000. Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare L.*). Theor Appl Genet 100: 57-62.

Marcel, T. C., Varshney R. K., Barbieri, M., Jafary, H., de Kock M. J. D., Graner, A., Niks, R. E., 2007. A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defense gene homologues. Theor Appl Genet 114: 487–500.

Marquez-Cedillo, L.A., Hayes, P.M., Jones, B.L., Kleinhofs, A., Legge, W.G., Rossnagel B.G., Sato, K., Ullrich, S.E., Wesenberg, D.M., 2000. QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. Theor Appl Genet 101: 173–184.

Mather, D.E., Tinker N.A., LaBerge, D.E., Edney, M., Jones, B.L., Rossnagel, B.G., Legge, W.G., Briggs, K.G., Irvine, R.B., Falk, D.E. and Kasha, K.J., 1997. Regions of the genome that affect grain and malt quality in a North American two-row barley crops. Crop Sci 37: 544-554.

Mir, R.R., Zaman-Allah, M., Sreenivasulu, N., Trethowan, R., Varshney, R.K., 2002. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. Theor Appl Genet 125: 625-45.

Mohammadi, M., Taleei, A., Zeinali, H., Naghavi, M.R., Ceccarelli, S., Grando, S., Baum, M., 2005. QTL Analysis for phenologic traits in doubled haploid population of barley. *Int J Agri Biol* 7: 820–823.

Morgan, A. G., Riggs, T. J., 1981. Effects of drought on yield and grain and malt characters in spring barley. *J Sci Food Agric* 32: 339-346.

Mueller, U.; Wolfenbarger, L., 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14: 389-394.

MultiQTL Ltd Institute of Evolution University of Haifa, Mount Carmel, Haifa, 31905, Israel, Abraham Korol, Scientific director MultiQTL, <http://www.multiqtl.com>, 2007.

Nguyen, T.T.T., Klueva, N., Chamareck, V., Aarti, A., Magpantay, G., Millena, A.C.M., Pathan, M.S., Nguyen, H.T., 2004. Saturation mapping of QTL regions and identification of putative candidate genes for drought tolerance in rice. *Mol Gen Genom* 272: 35–46.

Olivares-Villegas JJ, Reynolds MP and McDonald GK. , 2007. Drought-adaptive attributes in the seri/Babax hexaploid wheat populations. *Functional Plant biology* 34: 189-203.

Palmer, G. H., Gernah, D. I., McKernan, G., Nimmo, D. H., 1985. Influence of enzyme distribution on endosperm breakdown (modification) during malting. *J Am Soc Brew Chem* 43: 17-28.

Palmer, G. H., 1989: Cereals in Malting and Brewing. In: Palmer, G. H.: Cereal Science and Technology.

Panozzo, J.F., Eckermann, P.J., Mather, D.E., Moody, D.B., Black, C.K., Collins, H.M., Barr A.R., Lim, P., Cullis, B.R., 2007. QTL analysis of malting quality traits in two barley populations. *Aust J Agric Res* 58: 858–866.

Passioura J. B., 2010. Scaling up: the essence of effective agricultural research. *Funct Plant Biol* 37: 585–591.

Pickering, R. A. and Devaux, P. 1992. Haploid production: approaches and use in plant breeding. In: Shewry, P. R. (ed.) *Barley: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB, Wallingford, UK. pp. 511-539.

Piepho, H.P., 2000. A mixture-model approach to mapping quantitative trait loci in barley on the basis of multiple environment data. *Genetics* 156: 2043–2050.

Pinter, J. P. Jr., Zipoli, G., Reginato, R. J., Jackson, R. D., Idso, S. B., Hohman, J. P., 1990. Canopy temperature as an indicator of differential water use and yield performance among wheat cultivars. *Agric. Water Management* 18, 35—48

Pinto, R.S., Reynolds, M. P., 2015. Common genetic basis for canopy temperature depression under heat and drought stress associated with optimized root distribution in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* April 2015, Volume 128, Issue 4, pp 575–585 |

Plantstress.com. <http://www.plantstress.com/Methods/index.asp>.

Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanissevich, D.S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards K.J., Tuveesson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmioli, N., Sjakste, T., Ganal, M., Powell, W., Waugh, R., 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997–2005.

Reymond, M., Muller, B., Leopardi, A., Charcosset, A., Tardieu, F., 2003. Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiol* 131: 664–675.

Reynolds, M. P., Balota, M., Delgado, M. I. B., Amani, I., Fisher R. A., 1994. Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot irrigated conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 21, 717—730.

Reynolds M. P., Ortiz R, 2010. Adapting crops to climate change: a summary. In: Reynolds MP, Eds. *Climate change and crop production*, CAB International: 1–8.

Robin, S., Pathan, M.S., Courtois, B., Lafitte, R., Carandang, S., Lanceras, S., Amante, M., Nguyen, H.T., Li, Z., 2003. Mapping osmotic adjustment in an advanced backcross inbred population of rice. *Theor Appl Genet* 107: 1288–1296.

Rosoielle, A.A., Hamblin, J. 1981: Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. *Crop Sci* 21: 943-946.

Saini, H., Westgate, M.E., 2000. Reproductive development in grain crops during drought. *Adv Agron* 68: 59–96.

Sanchez, A.C., Subudhi, P.K., Rosenow, D.T., Nguyen, H.T., 2002. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Mol Biol* 48: 713-26.

Sannemann, W., Huang, B., Mathew, B., Léon, J., 2015. Multi-parent advanced generation inter-cross in barley: high-resolution quantitative trait locus mapping for flowering time as a proof of concept. *Mol. Breed.* 35(3):1–16.

Saranga, Y., Jiang, C.X., Wright, R.J., Paterson, A.H., 2004. Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity. *Plant Cell Envir* 27: 263-277.

Savin, R., Molina-Cano, J. L., 2002. Changes in malting quality and its determinants in response to abiotic stresses. In: *Barley Science*, Chapter 19. Slafer, Molina-Cano, Savin, Araus, Romagosa, Eds: 523-550.

Savin, R., Nicolas, M.E., 1999. Effects of timing of heat stress and drought on growth and quality of barley grains. *Aust J Agric Res* 50: 357–364.

Sayed, H., Kayyal, H., Ramsey, L., Ceccarelli, S., Baum, M., 2002. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica* 125: 265–272.

Serraj, R., Hash, T.C., Buhariwalla, H.K., Bidinger, F.R., Folkertsma, R.T., Chandra, S., Gaur, P.M., Kashiwagi, J., Nigam, S.N., Rupakula, A. & Crouch, J.H. 2005. Marker-assisted breeding for crop drought tolerance at ICRISAT: achievements and prospects. In: *Proceed Intern*

Congress: In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution, Tuberosa, R., Phillips, R.L., Gale, M. Eds: 217-238.

Shewry, P. R., 1993. Barley seed proteins. In Barley Chemistry and Technology, A.W. Mac Gregor and R. S. Bhatti Eds: 131- 197.

Sinclair, T.R., 2011. Challenges in breeding for yield increase for drought. Trends Plant Sci 16: 289-293.

Smith, D. B., 1990. Barley seed protein and its effects on malting and brewing quality. Plant Var Seeds 3: 63-80.

Slafer, G.A., Satorre, E.H., Andrade, H., 1994. Increases in grain yield in bread wheat from breeding and associated physiological changes. In: Genetic Improvement of Field Crops. Slafer, G.A. Ed., Marcel Dekker, Inc., New York: 1-67.

Syvänen, A.C., 2005. Toward genome-wide SNP genotyping. Nat Genet 37 S5-S10. DOI: 10.1038/ng1558.

Szarejko, I, 2003. Doubled Haploid Production in Crop Plants. M. Maluszynski et al. (eds.). 35-42.

Teulat, B., This, D., Khairallah, M., Borries, C., Ragot, C., Sourdille, P., Leroy, P., Monneveux, P., Charrier, A. 1998, Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.), Theor Appl Genet 96: 688-698.

Thompson, D. M., Chalmers, K., Waugh, R., Forster, B. P., Thomas W.T.B., 1991. The inheritance of genetic markers in microspore-derived plants of barley *Hordeum vulgare* L. Theor Appl Genet 81: 487-492.

Toker, C., C. Luch, N.A. Tejera, R. Serraj, K.H.M. Siddique, 2007. Abiotic stresses. In: Chickpea breeding and management. Yadav, S.S., Edden, B., Chen, W., Sharma, B. Eds. CAB Int., Wallingford: 474-496.

Tondelli, A., Francia, E., Barabaschi, D., Aprile, A., Skinner, J.S., Stockinger, E.J., Stanca, A.M., Pecchioni, N., 2006. Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. Theor Appl Genet 112: 445-454.

Tondelli, A., Francia, E., Visioni, A., Comadran, J., Mastrangelo, A.M., Akar, T., Al-Yassin, A., Ceccarelli, S., Grandi, S., Benbelkacem, A., van Eeuwijk, F.A., Thomas, W.T.B., Stanca, A.M., Romagosa, I., Pecchioni, N., 2014. QTLs for barley yield adaptation to Mediterranean environments in the 'Nure' × 'Tremois' biparental population. Euphytica 197: 73-86.

Tuberosa, R., Salvi, S., 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Trends Plant Sci 11: 405-412.

Tsuchiya, T., 1985. List of Barley Genetic Stocks with BGS numbers. Barley Genetics Newsletter 16, Department of Agronomy, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523, U.S.A.

Tuberosa, R., 2012. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front Physiol* 3: 347.

Ugarte, C., Calderini, D.F., Slafer, G.A., 2007. Grain weight and grain number responsiveness to pre-anthesis temperature in wheat barley and triticale. *Field Crops Res* 100: 240–248.

Vahamidisa, P., Stefopouloub, A., Kotoulasd, V., Lyrac, D., Dercasb, N., Economoua G., 2017. Yield, grain size, protein content and water use efficiency of null-LOX malt barley in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Field Crops Res* 206: 115–127.

van Ginkel, M., Calhoun, D.S., Gebeyehu, G, Miranda, A., Tian-you, C., Pargas Lara, R., Trethowan, R.M., Sayre, K., Crossa, J., Rajaram, S., 1998. Plant traits related to yield of wheat in early, late, or continuous drought conditions. *Euphytica* 100: 109–121.

Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay L., Russell, J, Röder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E., Graner, A., 2007 A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114: 1091-103.

Varvel, G. E., and Severson, R. K., 1987. Evaluation of cultivar and nitrogen management's options for malting barley. *Agron J* 79: 459-463.

Verma, V., Foulkes, M.J., Worland, A.J., Sylvester-Bradley, R., Caligari, P.D.S., Snape, J.W., 2004. Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica* 135: 255–263.

Wang, J., Yang, J., Zhang, Q., Zhu, J., Jia, Q., Hua, W., Shang, Y., Li, C., Zhou, M., 2015. Mapping a major QTL for malt extract of barley from a cross between TX9425 × Naso Nijo. *Theor Appl Genet* 128: 943–952.

Weston, D. T., Horsley, R., Schwarz. P. B. and Goos, R. J., 1993. Nitrogen and planting date effects on low-protein spring barley. *Agron J* 85: 1170-1174.

Wiebke, S., Bevan, E.H., Boby, M., Jens, L., 2015. Multi-parent advanced generation intercross in barley: high-resolution quantitative trait locus mapping for flowering time as a proof of concept. *Mol. Breed* 35:86

William, H.M, Trethowan, R., Crosby-Galvan, E.M., 2007. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica* 157: 307–319.

Winzeler, H., Schmidt, J., Fried, P.M., 1987. Field performance of androgenetic doubled haploid spring wheat lines in comparison with lines selected by the Pedigree system. *Plant Breed* 99:41–48.

Wong, S.C., Shirley, N. J., Little, A., Khoo, K.H.P., Schwerdt, J., Fincher, G.B., Burton, R.A., Mather. D.E. 2015. Differential expression of the HvCslF6 gene late in grain development may explain quantitative differences in (1,3;1,4)- β -glucan concentration in barley. *Mol Breed* 35:20.

Xianjun, L., Jinmei, Y., Leilei, G., Xinchun, L., Yujing H., Jin'e Y., Guoxiang, L., 2011. Genetic analysis of segregation distortion of SSR markers in F2 population of barley. *J Agric Sci* 3: 172-177.

- Xuechen, Z., Sergey S., Koutoulis, A., Lana S., Meixue, Z., 2017.** Meta-analysis of major QTL for abiotic stress tolerance in barley and implications for barley breeding. *Planta* 245: 283–295.
- Yoshigi, N., Okada, Y., Sahara, H., Koshino, S., 1994.** PCR cloning and sequencing of the β -amylase cDNA from barley. *J Biochem Tokyo* 115: 47–51.
- Yoshigi, N., Okada, Y., Sahara, H., Tamaki, T., 1995.** A structural gene encoding β -amylase of barley. *Bios Biotech Biochem* 59: 1991-1993.
- Zadoks, J.C., Chang, T. T. and Konzak, C. F., 1974.** A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14: 415-421.
- Zale, J. M.; Clancy, J. A.; Ullrich, S. E.; Jones, B. L.; Hayes, P. M., 2000.** Summary of barley malting quality QTLs mapped in various populations. *Barley Genet Newsl* 30: 44-54.
- Zheng, B.S., Yang, L., Zhang, W.P., Mao, C.Z., Wu, Y.R., Yi, K.K., Liu, F.Y., Wu, P., 2003.** Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations. *Theor Appl Genet* 107: 1505–1515.
- Zhou, G., Panozzo, J., Zhang, X., Cakir, M., Harasymow, S., Li, Ch, 2016.** QTL mapping reveals genetic architectures of malting quality between Australian and Canadian malting barley (*Hordeum vulgare L.*). *Mol Breed* 36:70.
- Zivy, M., Devaux, P., Blaisonneau, J., Jean, R and Thiellment, H., 1992.** Segregation distortion and linkage studies in microspore-derived doubled haploid lines of *Hordeum vulgare L.* *Theor Appl Genet* 83: 919-924.