



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Identificación de los componentes genéticos que determinan la adaptación de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en condiciones de alto rendimiento

Maximiliano Leonardo VEROCAI BRITOS

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

Octubre 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Silvia Germán, el Dr. Guillermo Galván y el Dr. Pablo González el 21 de octubre de 2021.

Autor: Ing. Agr. Maximiliano Verocai.

Director: Dr. Ariel Castro.

Dedico este trabajo a la memoria de mi padre,
quien supo enseñarme el valor del esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y mis hermanos: Enrique, Celia, Rodrigo y Macarena, quienes me aconsejaron y alentaron al inicio de la carrera.

Agradezco a mi director Ariel Castro, por la confianza en mi depositada, no solo en la realización del presente trabajo, sino que también por permitirme formar parte de otros proyectos colectivos dentro de Facultad.

Al grupo “*de la cebada*”, Juan Danilo Mosqueira, Sebastián Bartaburu y Andrés Ferraz. Hicieron que las tareas de campo fueran más amenas.

Un agradecimiento especial a Mariana y Emilia, quienes en estos últimos dos años me han permitido disfrutar de ser Papá.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN.....	VII
SUMMARY	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. PASADO Y PRESENTE DEL CULTIVO DE CEBADA.....	1
1.2. INVESTIGACIÓN Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS A NIVEL PRODUCTIVO.....	3
1.3. EL MEJORAMIENTO DE CEBADA.....	5
1.3.1. <u>Análisis genómicos</u>	7
2. <u>PHENOLOGICAL AND YIELD RELATED TRAITS DISSECTED IN A BARLEY NESTED ASSOCIATION MAPPING POPULATION REPRESENTATIVE OF ELITE BREEDING IN SOUTH AMERICA</u>	11
2.1. RESUMEN.....	11
2.2. SUMMARY.....	12
2.3. INTRODUCTION.....	13
2.4. MATERIALS AND METHODS.....	15
2.4.1. <u>Experimental materials</u>	15
2.4.2. <u>Field experiments</u>	16
2.4.3. <u>Phenotypic data analysis</u>	18
2.4.4. <u>Genotyping and population structure</u>	18
2.4.5. <u>Association analysis</u>	19
2.4.6. <u>Linkage disequilibrium and QTL identification</u>	20
2.5. RESULTS... ..	21
2.5.1. <u>Descriptive statistics and trait correlation</u>	21
2.5.2. <u>Population structure, LD decay and association analysis</u>	22
2.6. DISCUSSION.....	24
2.6.1. <u>GWAS and QTL hotspot</u>	26

2.6.1.1. QTL hotspot 1H_01	26
2.6.1.2. QTL hotspot 1H_02	27
2.6.1.3. QTL hotspot 2H_01	27
2.6.1.4. QTL hotspot 2H_02	28
2.6.1.5. QTL hotspot 3H_01	29
2.6.1.6. QTL hotspot 5H_01	30
2.6.1.7. QTL hotspot 6H_01	30
2.6.1.8. QTL hotspot 7H_01	31
2.6.1.9. QTL hotspot 7H_02	31
2.6.2. <u>QTL by environment interaction</u>	32
2.6.3. <u>Usefulness of association studies with elite NAM populations</u>	35
2.7. REFERENCES.....	36
2.8. SUPPLEMENTARY	
MATERIAL.....	45
3. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u>	59
4. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	69

RESUMEN

La fenología de cebada determina su adaptación a los distintos ambientes y, por lo tanto, el potencial de rendimiento y la calidad del grano. Con el objetivo de identificar regiones cromosómicas y genes candidatos asociados a rendimiento y variables fenológicas en las condiciones agroecológicas de Uruguay realizamos un mapeo asociativo (GWAS) en una población de mapeo de asociación anidada (NAM) desarrollada a partir de cruza entre cultivares modernos élite. La población fue caracterizada fenotípicamente durante cuatro años consecutivos (2015-2018) en cuatro localidades. Para la caracterización genotípica se utilizó el chip de SNPs iSelect 50K de cebada de Illumina, permitiendo obtener 6340 SNP informativos que se distribuyeron en los siete cromosomas. La estructura de la población estuvo explicada por el diseño de cruzamientos. A través de estudios de asociación pudimos detectar un total de 77 QTLs considerando las 105 combinaciones variable-experimento. Varios de los QTLs se detectaron en más de un ambiente y afectaron a más de una variable. Además, seis regiones genómicas asociadas a seis características, presentaron interacción genotipo por ambiente. Nuestros resultados proporcionan información útil sobre la cebada y podrían tenerse en cuenta para aumentar la eficiencia de selección de fenotipos superiores, ya que el germoplasma utilizado es representativo del utilizado en el Programa de Mejoramiento Genético Nacional. Este estudio demostró que el GWAS en una población NAM generada por cruzamientos entre parentales élites es una herramienta eficaz para detectar regiones genómicas relevantes responsables de características de importancia agronómica.

Palabras clave: población multiparental, cebada, mapeo asociativo, QTL (Quantitative trait loci), floración, mejoramiento genético

**GENETIC FACTORS UNDERLYING BARLEY (*HORDEUM VULGARE L.*)
ADAPATION TO HIGH POTENTIAL ENVIRONMENTS**

SUMMARY

Phenological regulation determines adaptability to specific environments and therefore yield potential and grain quality. We used a nested association mapping population (NAM) developed by crossing elite cultivars to analyze the genetic factors responsible for yield related and phenological variables. We studied ten developmental traits and eight agronomic traits during four consecutive years (2015-2018) at four locations in Uruguay. The population was genotyped with the Illumina barley 50K iSelect SNP array resulting in 6340 informative SNPs covering all chromosomes. Population structure was explained by crossing design. Through genome-wide association studies (GWAS) we were able to detect a total of 77 QTLs considering all 105 trait-experiment combinations. Multiple QTLs were identified in more than one environment and shared by different traits. Moreover, six genomic regions were associated to six trait with stability across environments. Our findings provide useful information about barley and could be taken into account to select superior phenotypes as the founders are highly representative of the Barley National Breeding program. This study demonstrated that conducting a GWAS in a NAM generated by crossing elite founders is an effective tool to detect relevant genomic regions responsible for agronomic traits and specific adaptation as the goal is to achieve a more stable performance in an increasingly challenging environment.

Keywords: Multiparental population; grain yield, Barley, nested association mapping (NAM), flowering time, genome-wide association study (GWAS)

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. PASADO Y PRESENTE DEL CULTIVO DE CEBADA

La cebada cervecera (*Hordeum vulgare L.*) es uno de los cultivos fundadores de la agricultura moderna. Fue domesticada hace aproximadamente 10.000 años en la medialuna fértil (Badr *et al.*, 2000; Zohary *et al.*, 2012), y desde entonces ha acompañado la historia humana (Hayes y Szűcs, 2006). Su migración desde su centro de origen hacia el resto del mundo requirió de adaptación a condiciones ambientales muy diferentes (von Bothmer *et al.*, 2003). Es un cultivo que está presente en un amplio rango de ambientes, siendo sembrado tanto en países escandinavos del norte de Europa, como en regiones desérticas de África y en climas templados de América y Asia (Dawson *et al.*, 2015).

La cebada es el cuarto cereal en términos de producción total en el mundo con más de 147 millones de toneladas, siendo las áreas de mayor producción la Unión Europea, Rusia y Norte América (FAO, 2019). Europa y Rusia abarcan el 65% de la producción mundial, pero se mantiene como un cultivo importante en el norte de África, Asia y América del Sur (Langridge, 2018). Desde 1960 su principal destino es la alimentación animal, abarcando entre un 60 y 77% de la producción total. Sin embargo, la elaboración de cerveza representa un destino importante debido a que se trata de un producto final con alto valor agregado (Langridge, 2018).

El género *Hordeum* está formado, además de las cebadas cultivadas, por más de 30 especies salvajes distribuidas en regiones templadas y áridas de todo el mundo (Blattner, 2018). La cebada cultivada es diploide ($2n=14$), con un genoma haploide de un tamaño aproximado de 5.7Gb que contiene un 80 % de secuencias repetidas (Bennett y Smith, 1976; Mayer *et al.*, 2012). Es una especie autógama, lo que ha facilitado la realización de muchos estudios genéticos, y en consecuencia, es uno de los primeros cultivos en adoptar las nuevas técnicas moleculares que han ido surgiendo con el correr del tiempo (Hayes y Szűcs, 2006).

La cebada es el segundo cultivo de invierno en importancia en Uruguay (MGAP-DIEA, 2020), teniendo como principal destino la producción de malta para la fabricación de cerveza, siendo los cultivares de dos hileras los únicos sembrados con

destino industrial. Es un cultivo de exportación con altos requerimientos de calidad. Se exporta como cebada cruda (sin procesar) o malteada (con alto valor agregado). En la zona litoral oeste es donde se concentra la producción, con una mayor importancia en la región sur, sobre todo en los departamentos de Colonia y Soriano. La cebada se ha caracterizado históricamente por ser un cultivo de menor dinámica varietal en comparación con otras opciones agrícolas, debido principalmente a factores asociados a su destino industrial. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un importante recambio varietal, con una fuerte incursión de germoplasma de origen europeo (Castro *et al.*, 2017a). El material europeo presenta buena calidad maltera y alto potencial de rendimiento, aunque sin embargo posee algunas limitantes asociadas a su fenología, calidad de grano y sanidad (Castro *et al.*, 1997, 2017a).

Actualmente, en Uruguay son dos las empresas instaladas, AB Inbev que cuenta con dos malterías (Maltería Uruguay en Nueva Palmira, CYMPAY en Paysandú) con una capacidad anual de producción de 250 mil toneladas de malta, y Maltería Oriental (MOSA) que opera una maltería en La Paz (Canelones) con una capacidad anual de producción de 220 mil toneladas de malta por año. La capacidad acumulada equivale a 480 mil toneladas de cebada y un área de siembra necesaria para el autoabastecimiento entorno a las 150-180 mil hectáreas.

La producción se regula mediante contratos entre los productores y las malterías, por lo que el precio de comercialización se fija antes de la siembra del cultivo. En caso de que no se alcancen los requisitos de calidad fijados por la industria (porcentaje de proteína, tamaño, humedad) la producción puede ser destinada para el mercado de la alimentación animal. Asimismo, en los últimos años ha surgido el interés del mercado chino por cebadas que en nuestro país no han sido aceptadas por la industria por no cumplir con los requisitos de calidad. Este mercado no tiene requerimientos de pureza varietal, calibre ni proteína, con un precio que ronda los U\$200 por tonelada siendo este superior al pagado por cebadas para alimentación animal (García Pintos, 2021).

1.2. INVESTIGACIÓN Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS A NIVEL PRODUCTIVO

La investigación en el cultivo de cebada durante los últimos 30 años ha sido realizada casi exclusivamente en el marco de la Mesa Nacional de Entidades de Cebada Cervecera (MNECC) o por parte de sus integrantes. La MNECC está integrada por la Facultad de Agronomía (FAGRO), el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), el Instituto Nacional de Semillas (INASE) y todas las malterías instaladas. La MNECC fue fundada en 1992 en base a antecedentes de colaboración iniciados una década antes, con el propósito de coordinar e intensificar la investigación en el cultivo. Esta alianza ha sido considerada un ejemplo de articulación público – privada (Bianco, 2005; Abeledo, 2006). En el marco de este acuerdo, la Facultad de Agronomía e INIA han desarrollado nuevos cultivares de cebada cervecera e información relativa al manejo del cultivo. Las empresas y el LATU han generado información relacionada a la calidad maltera de cultivares y nuevas líneas, que ha sido fundamental para seleccionar líneas con la calidad industrial requerida por los mercados importadores (Castro, 2017c).

Con el comienzo del nuevo siglo el cultivo de cebada experimentó cambios sustantivos en la forma de producción. El sistema agrícola en el Cono Sur de América del Sur sufrió una importante intensificación en el uso de la tierra basada en el doble cultivo anual en siembra directa sin laboreo (Andrade y Satorre, 2015; Wingeyer *et al.*, 2015), priorizándose la siembra del cultivo de soja en fecha óptima (Rizzo *et al.*, 2021). En ese marco la cebada fue, frecuentemente, forzada a ser sembrada en otoño para dejar el campo libre para la siembra del principal cultivo de renta en el mes de noviembre. Por lo tanto, dentro del sistema agrícola actual la cebada es sembrada en los meses de mayo-julio y cosechada en noviembre (Castro *et al.*, 2008). En nuestra región, la temperatura media se incrementa rápidamente a medida que transcurre la primavera, por lo que si la antesis del cultivo ocurre hacia finales del mes de setiembre el llenado de grano ocurrirá bajo condiciones ambientales óptimas (Castro *et al.*, 2017b). Cultivos que florezcan más tarde tendrán condiciones desfavorables de temperatura durante el periodo de llenado de grano, y

por lo tanto el rendimiento y calidad de grano se verán comprometidos (Locatelli *et al.*, 2013).

Los requerimientos de la industria maltera y las exigencias de competitividad de la producción de cebada en Uruguay imponen demandas fuertes (y a veces contradictorias) al mejoramiento genético nacional. Se requiere el desarrollo eficiente de cultivares de muy alta calidad (superior a la de los cultivares liberados anteriormente por el mejoramiento nacional), de alto potencial (para aportar a la competitividad del rubro frente a otras opciones) y con adaptación a siembras posteriores a la fecha óptima recomendada.

La adaptación es uno de los principales propósitos del mejoramiento genético (Paterson, 2005). Se puede definir como la capacidad de las plantas de provocar cambios en su estructura para que su crecimiento y desarrollo se ajuste al ambiente en el que viven. Se trata de una característica cuantitativa de herencia compleja que involucra muchas variables como desarrollo, morfología, fisiología, tipo de reproducción y que a su vez es determinada por factores ambientales como fotoperiodo y temperatura (Ulukan, 2008). Muchas de las plantas cultivadas en la actualidad crecen en ambientes que, hasta cierto punto, no son favorables para su crecimiento y desarrollo. En función de eso han desarrollado en algunos casos adaptaciones que pueden llegar a ser únicas (Boyer, 1982). En el proceso de generación de nuevos cultivares, los mejoradores seleccionan individuos en base a su adaptabilidad al ambiente, siendo esta una compleja mezcla que desafía a los genotipos haciendo visible sus diferencias (Cooper y Byth, 1996).

La variable de mayor importancia a nivel productivo para la mayoría de los cultivos agrícolas es el rendimiento en grano, el cual frecuentemente es considerado sinónimo de adaptación. El rendimiento es una variable cuantitativa, y por lo tanto sensible a cambios ambientales (Slafer, 2003). La fenología (fechas de antesis y madurez fisiológica y de distintos estados de crecimiento) es un factor clave en la adaptación de la cebada a los distintos ambientes (Richards, 1991; Castro *et al.*, 2008) y prácticas de manejo (Castro *et al.*, 2008). La fecha de floración de un cultivar es fundamental para determinar su potencial de rendimiento en nuestras condiciones ambientales, ya que determina el momento y duración del llenado de grano (Castro *et*

al., 1997). Por otra parte, el periodo comprendido entre la siembra y floración debe ser lo suficientemente largo para no comprometer la definición de un alto número de granos por metro cuadrado, lo que se asocia a una mayor duración de la subfase de iniciación de primordios de espiguillas en el meristemo apical (Viega *et al.*, 2006). Las respuestas a fotoperiodo, temperatura y vernalización varían de forma importante entre especies y dentro de ellas (Ulukan, 2008). En interacción con la temperatura, el fotoperiodo es el factor ambiental de mayor importancia para determinar la duración de la etapa vegetativa en cebada (Kirby, 1969; Roberts *et al.*, 1988), principalmente en cultivares de tipo primaveral como los sembrados en nuestro país, los cuales no presentan requerimientos de vernalización (Von Zitzewitz *et al.*, 2005).

1.3. EL MEJORAMIENTO DE CEBADA

El mejoramiento genético vegetal es una de las actividades más antiguas realizadas por el hombre (Hallauer, 2011). Puede definirse como la mejora genética de plantas para el beneficio de la humanidad. Dicho proceso de mejora vegetal incluye ciencia, arte e interés económico (Bernardo, 2010). Aumentar el rendimiento y mejorar la calidad de lo cosechado han sido de los principales objetivos del mejoramiento genético. La adaptación fue históricamente el criterio de selección más utilizado, el cual se basaba en el ideal de cada “mejorador” (Hallauer, 2011).

Si bien a finales de la década del '60 comenzaron a realizarse los primeros cruzamientos para el mejoramiento genético de cebada en Uruguay, recién a finales de los años '80 es que pudo establecerse un proyecto de investigación consolidado. Los primeros logros del mejoramiento fueron la liberación de variedades introducidas buscando cumplir con las exigencias en cuanto a calidad maltera. Desde que se siembra el cultivo en nuestro país un porcentaje importante ha sido ocupado por cultivares introducidos desde Estados Unidos (desarrollados por la Universidad de Dakota del Norte), Australia (desarrollados por el Departamento de Agricultura) y Europa (criaderos privados principalmente de Alemania), introducidos directamente desde origen o desde Argentina (Arias, 1995). Sin embargo, estos materiales presentan características que potencialmente limitan su adaptación a las condiciones ambientales locales (ciclo largo y escasa respuesta al fotoperiodo).

En el año 1991 ingresa a la evaluación oficial la variedad alemana Defra, la cual fue extensamente utilizada como parental por el programa de mejoramiento. En el año 2003 el programa de mejoramiento de INIA libera al área comercial el cultivar INIA Ceibo, siendo la primera variedad del programa de mejoramiento nacional producto de una cruce realizada localmente a partir de cruzamientos con Defra. Hasta el momento los cultivares liberados presentan buena adaptación con una calidad maltera aceptable, sin llegar a igualar a los cultivares de origen europeo.

Esfuerzos previos a nivel nacional han permitido saber cuáles son las variables que hacen a la adaptación del cultivo en el Uruguay (Castro *et al.*, 1997, 2008, 2017b; Locatelli *et al.*, 2013). Para superar las mencionadas limitantes el mejoramiento necesita desarrollar cultivares que presenten el potencial de rendimiento y calidad del germoplasma europeo elite combinado con la flexibilidad y adaptación del germoplasma local. Conocer las bases genéticas de las variables objetivo es fundamental para el desarrollo eficiente de cultivares. En la última década, el Programa de Mejoramiento Genético de Cebada Cervecera de INIA ha dedicado sus mayores esfuerzos en combinar la adaptación a nuestro ambiente y destacada sanidad para manchas foliares de la genética propia, con la superior calidad maltera y buen comportamiento a roya de la hoja y oídio de las nuevas variedades europeas. Al mismo tiempo, el segundo objetivo importante es el desarrollo de variedades de alto potencial de rendimiento de grano de ciclo corto, particularmente adaptados a la zona litoral norte del área de producción de Uruguay.

Los estudios genéticos de cebada a nivel local han sido relativamente escasos. Si bien a nivel mundial la cebada es uno de los cultivos que ha experimentado mayor desarrollo en cuanto a estudios genómicos, y en nuestro país es de los cultivos con mayor número de publicaciones en dicha área, aún queda mucho camino por recorrer, ya que los estudios se han llevado a cabo con germoplasma que no es representativo del utilizado en el mejoramiento nacional. La identificación de los factores genéticos responsables de variables agronómicas que hacen a la adaptación del cultivo de cebada en nuestro país puede hacer más eficiente la obtención de genotipos superiores.

Las publicaciones de mayor importancia sobre el tema en Uruguay han sido sobre la determinación de los componentes genéticos de la fenología de la población biparental BCD47/Baronesse (dos genotipos de ciclo largo y de similares perfiles de crecimiento y desarrollo) mediante el análisis de QTL (Castro *et al.*, 2008, 2017b) y el trabajo realizado por Locatelli *et al.* 2013 en el que por primera vez en nuestro país se utilizó la estrategia de mapeo asociativo. En este estudio se identificaron regiones genómicas responsables de variables agronómicas en genotipos representativos del germoplasma que han sido utilizados históricamente a nivel local. Por otra parte, también se han identificado fuentes de resistencia a enfermedades, tales como mancha borrosa (provocada por *Bipolaris Sorokiniana*) y roya de la hoja (provocada por *Puccinia hordei*) en una colección de germoplasma de América Latina (Gutiérrez *et al.*, 2015).

1.3.1. Análisis genómicos

La identificación de los genotipos de mayor performance (para liberar al mercado) y aquellas líneas que podrían ser utilizadas como parentales en futuras cruzas son dos de los principales objetivos de los programas de mejoramiento (Oakey *et al.*, 2006). Para cumplir con esos objetivos se ha tratado de identificar genes o regiones cromosómicas responsables de variables de interés agronómico (Zeng, 1994). Muchas de las regiones con importancia agronómica/económica tienen patrones de herencia compleja (por tratarse de caracteres “poligénicos” o “multifactoriales”) lo que dificulta la identificación de fenotipos superiores. Aquellas regiones cromosómicas asociadas a variables cuantitativas son denominadas QTL (Quantitative trait loci, por su sigla en inglés) (Collard *et al.*, 2005). Variables tales como rendimiento y calidad son consideradas de importancia en la agricultura y están controlados por muchos genes.

El desarrollo de diversos sistemas marcadores moleculares durante la década del ‘80 (Crossa *et al.*, 2017) y las nuevas técnicas estadísticas y computacionales que le sucedieron han permitido avanzar en la identificación, localización y evaluación del efecto de los factores genéticos determinantes de los fenotipos de interés (Bernardo, 2008). El mapeo de QTL y el mapeo asociativo (GWAS, por su sigla en inglés) son

dos de las estrategias comúnmente utilizadas para el estudio genético de variables complejas (Darvasi y Shifman, 2005). Inicialmente, los estudios genéticos en especies cultivadas se realizaban solamente en población biparentales desarrolladas a partir de cruzamientos entre líneas genéticamente contrastantes (Holland, 2007; Myles *et al.*, 2009). Posteriormente, el GWAS comenzó a ser preferido por tener una serie de ventajas prácticas. Ambas técnicas, utilizan la recombinación meiótica de la reproducción sexual que recombina el genoma en fragmentos que pueden ser correlacionados con variaciones fenotípicas (Myles *et al.*, 2009). Intentan, vía inferencia estadística, detectar la co-segregación de los marcadores moleculares con regiones o genes de efecto cuantitativo. Sin embargo, difieren en algunos puntos fundamentales; el mapeo de QTL requiere construir poblaciones biparentales, las que presentan una marcada estructura y poca historia de recombinación. En contraste, poblaciones no emparentadas, con una base genética amplia y que han sufrido muchos eventos de recombinación son utilizadas en el mapeo asociativo, por lo que el desequilibrio de ligamiento (LD, por su sigla en inglés) es menor (Kraakman *et al.*, 2004; Oraguzie y Wilcox, 2007; Mackay *et al.*, 2009) permitiendo obtener una mayor resolución de mapeo y mayor poder estadístico (Yu *et al.*, 2006). El mapeo de QTL es utilizado para identificar grandes regiones del genoma que son de interés mediante una baja cobertura de marcadores, mientras que el mapeo asociativo ofrece una gran resolución de mapeo gracias a la utilización de un elevado número de marcadores y una mayor historia de recombinación (Thornsberry *et al.*, 2001).

El mapeo asociativo restringido o mapeo asociativo anidado (NAM, por sus siglas en inglés) es un diseño introducido por Yu y Buckler (2006), el cual está basado en el mapeo para el estudio de variables complejas en una población multiparental. Es una metodología reciente que combina las ventajas del mapeo de QTL y mapeo asociativo (Maurer *et al.*, 2015; Hemshrot *et al.*, 2019) obteniendo una excepcional resolución de mapeo a través del análisis conjunto de poblaciones interrelacionadas sin la necesidad de incrementar excesivamente el número de marcadores moleculares (Yu *et al.*, 2008), a la vez que disminuye considerablemente los problemas relacionados a la estructura de la población en estudio (Waugh *et al.*, 2014). Esta estrategia permite estudiar la herencia de caracteres complejos, siendo necesario la

utilización de métodos estadísticos más avanzados (Li *et al.*, 2011). Este enfoque disminuye la brecha existente en estudios genéticos entre poblaciones naturales y poblaciones experimentales (de Koning y McIntyre, 2017), además de disminuir las posibles asociaciones espurias como consecuencia de la estructura poblacional de los paneles de asociación (Myles *et al.*, 2009; Gage *et al.*, 2020), mientras que el número de individuos en la progenie permiten alcanzar un poder estadístico importante (Myles *et al.*, 2009). Una población NAM es una población multiparental construida a través de la cruce dirigida de individuos no emparentados seleccionados de acuerdo a un esquema de cruces dentro de un programa de mejoramiento (Yu y Buckler, 2006). Las poblaciones multiparentales crean nuevas combinaciones alélicas mediante la mezcla del genoma de los fundadores (Oreper *et al.*, 2017), y son un recurso que estima de forma muy precisa la posición y efecto de un QTL, siendo posible además estimar la frecuencia de un alelo en un QTL (King *et al.*, 2012). Muy resumidamente, el diseño NAM puede ser pensado como un conjunto de poblaciones biparentales producto de cruces que incluyen una misma línea parental (Scott *et al.*, 2020). Inicialmente se realizaron análisis en poblaciones NAM de maíz (Yu *et al.*, 2008; Buckler *et al.*, 2009; McMullen *et al.*, 2009; Poland *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2012), los que fueron seguidos por otros cultivos como soja (Song *et al.*, 2017), canola (Li *et al.*, 2016) y cebada (Maurer *et al.*, 2015; Nice *et al.*, 2016; Vatter *et al.*, 2017).

Hasta el momento, todos los estudios de asociación utilizando poblaciones NAM han sido en poblaciones generadas a partir de la cruce entre individuos silvestres y cultivares elites. Este tipo de cruzamientos provoca un desacople de todos los alelos favorables que se han acumulados durante el transcurso de los años gracias al esfuerzo realizado en los programas de mejoramiento genético. El presente estudio supone ser el primer reporte de estudios de asociación llevado a cabo en una población NAM originada a partir de cruces entre genotipos elites.

Nuestro objetivo fue identificar regiones cromosómicas y genes candidatos asociadas a rendimiento y variables fenológicas en las condiciones agroecológicas de Uruguay, estudiar el impacto de la fenología en el resultado agronómico y analizar la estabilidad de los QTLs detectados a través de los diferentes ambientes. Para cumplir

con nuestros objetivos es que instalamos un total de 13 experimentos en cuatro localidades ubicadas en el litoral agrícola de nuestro país. El germoplasma estudiado fue una población conformada por 145 líneas doble haploides, desarrollada a partir de cuatro cruzamientos entre cinco cultivares modernos elite que combinan alto potencial de rendimiento y buena calidad maltera con adaptación local.

2. PHENOLOGICAL AND YIELD RELATED TRAITS DISECTED IN A BARLEY (*HORDEUM VULGARE L.*) NESTED ASSOCIATION MAPPING POPULATION REPRESENTATIVE OF ELITE BREEDING IN SOUTH AMERICA¹

2.1. RESUMEN

La fenología de cebada determina su adaptación a los distintos ambientes y, por lo tanto, el potencial de rendimiento y la calidad del grano. Con el objetivo de identificar regiones cromosómicas y genes candidatos asociados a rendimiento y variables fenológicas en las condiciones agroecológicas de Uruguay realizamos un mapeo asociativo en una población de mapeo de asociación anidada desarrollada a partir de cruces entre cultivares modernos élite. La población fue caracterizada fenotípicamente durante cuatro años consecutivos (2015-2018) en cuatro localidades. Para la caracterización genotípica se utilizó el chip de SNPs iSelect 50K de cebada de Illumina, permitiendo obtener 6340 SNP informativos que se distribuyeron en los siete cromosomas. La estructura de la población estuvo explicada por el diseño de cruzamientos. A través de estudios de asociación pudimos detectar un total de 77 QTLs considerando las 105 combinaciones variable-experimento. Varios de los QTLs se detectaron en más de un ambiente y afectaron a más de una variable. Además, seis regiones genómicas asociadas a seis características, presentaron interacción genotipo por ambiente. Nuestros resultados proporcionan información útil sobre la cebada y podrían tenerse en cuenta para aumentar la eficiencia de selección de fenotipos superiores, ya que el germoplasma utilizado es representativo del utilizado en el programa de mejoramiento genético nacional. Este estudio demostró que el GWAS en una población NAM generada por cruzamientos entre parentales élites es una herramienta eficaz para detectar regiones genómicas relevantes responsables de características de importancia agronómica.

Palabras clave: población multiparental, cebada, mapeo asociativo, QTL (Quantitative trait loci), floración, mejoramiento genético.

¹ Este trabajo será enviado para su publicación a la revista Theoretical and Applied Genetics

2.2. SUMMARY

Phenological regulation determine adaptability to specific environments and therefore yield potential and grain quality. We used a nested association mapping (NAM) population developed by crossing elite cultivars to analyze the genetic factor responsible of yield related and phenological variables. We studied ten developmental traits and eight agronomic traits during four consecutive years (2015-2018) at four locations in Uruguay. The population was genotyped with the Illumina barley 50K iSelect SNP array resulting in 6340 informative SNPs covering all chromosomes. Population structure was explained by crossing design. Through genome association studies (GWAS) we were able to detect a total of 77 QTLs considering all 105 trait-experiment combinations. Multiple QTLs were identified in more than one environment and shared by different traits. Moreover, six genomic regions were associated to six trait with stability across environments. Our findings provide useful information in barley and could be taken into account to select superior phenotypes as the founders are highly representative of the cultivars used in the barley breeding programs. This study demonstrated that conducting a GWAS in a NAM generated by crossing elite founders is an effective tool at detecting relevant genomic regions responsible of agronomic traits and specific adaptation as the goal is to achieve a more stable performance in an increasingly challenging environment.

Keywords: Multiparental population, Grain yield, Barley, Nested association mapping (NAM), Flowering time, Genome-wide association study (GWAS)

2.3. INTRODUCTION

Barley (*Hordeum vulgare L.*) is one of the founder crops of human civilization. It was domesticated approximately 10,000 years ago in the Fertile Crescent (Badr *et al.* 2000; Zohary *et al.* 2012), and since then has long played an important role in human history (Hayes and Szűcs 2006). Currently, barley is the fourth most important cereal crop in the world in terms of total production with more than 147 million tons produced annually (FAO 2019), and the second most important spring crop in Uruguay (<http://www.mgap.gub.uy/SeriesHistoricas/hshistoricas.aspx>), after wheat.

Adaptation is a complex trait determined by the genotype and environmental factors influencing crop growth as temperature and radiation (Ulukan 2008). Grain yield is the consequence of multiple internal plant processes affected by many genes (Slafer 2003), where phenological regulation is essential in determining the adaptation to particular environments as it allows synchronizing between crop development with availability of resources and hence maximizing grain yield (Richards 1991; Andrés and Coupland 2012; Alqudah *et al.* 2014). Optimal flowering time allows long grain filling period and therefore high yield overcoming limitations in grain weight and size (Castro *et al.* 1997), thus tuning flowering behavior with specific regional adaptations is critical for barley production (Hill *et al.* 2019).

Transition from vegetative to reproductive phase is complex (Comadran *et al.* 2012). Barley can be classified into winter and spring types based on the requirements of low temperature exposure (Hu *et al.* 2019). Spring barley does not require vernalization to induce flowering (Von Zitzewitz *et al.* 2005; Turner *et al.* 2005). The major determinant of phenology is the photoperiod response gene *PPD-H1* (Faure *et al.* 2012), a PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 (PPR7) involved in the circadian clock (Turner *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2020), that can perceive environmental cues as drought stress besides those known as temperature and photoperiod (Gol *et al.* 2020).

In the last decade, an important intensification in land use based on double annual cropping under no tilling was implemented in the agricultural system in the Southern Cone of South America (Andrade and Satorre 2015; Wingeyer *et al.* 2015), in which a spring crop as barley frequently is sown in autumn with the aim of having the field

available for soybean optimum sowing date (Rizzo *et al.* 2021). In this context, barley is sown in May-July and harvested in late spring (November) (Castro *et al.* 2008). Temperatures increase rapidly during the spring, so early anthesis at the end of September allows that grain filling generally occur under optimum conditions (Castro *et al.* 2017b). In contrast, later anthesis may lead to grain filling under unfavorable high temperatures, decreasing yield and grain quality (Locatelli *et al.* 2013). Therefore, modifying time to anthesis without affecting grain filling is imperative to achieve grain yield stability under these environmental conditions.

An important purpose in genetics and breeding has been to identify the genes contributing significantly to the variation of agronomic traits (Zeng 1994). Most of the agronomically important traits have complex inheritance patterns that increase the difficulty for discerning genetic factors underlying the phenotype of interest. Those genome regions associated with a particular quantitative trait are known as quantitative trait loci (QTLs) (Collard *et al.* 2005). Even though QTLs can be mapped in individual biparental populations derived from crossing two genetically diverse parents (Holland 2007) or in unrelated individuals through genome wide association studies (GWAS) (Mackay *et al.* 2009) both strategies have a series of constraints (Yu and Buckler 2006; Oraguzie and Wilcox 2007).

The use of multi-parental populations (MPPs) in mapping such as nested association mapping (NAM) emerged as a refined genome-wide complex trait dissection approach that integrates the strengths of linkage analysis and association mapping in a single, unified mapping population (Yu *et al.* 2008). This approach appeared to bridge the gap between natural populations and experimental systems, due to the necessity of the later to incorporate more of the complexity of natural populations (de Koning and McIntyre 2017), and the confounding population structure of association panels (Gage *et al.* 2020). The nested design can be thought as a set of biparental populations linked by a common parent (Scott *et al.* 2020) that addresses complex trait identification at a fundamental level through generating a common mapping resource that enables to efficiently exploit genetic, genomic, and systems biology tools (Yu *et al.* 2008). By crossing multiple lines originating from different subpopulations, trait correlations due to linkage disequilibrium are decoupled and

allele frequencies are balanced (Bouchet *et al.* 2017). Thus, makes possible the knowledge of a trait's genetic architecture via GWAS (Maurer *et al.* 2015). NAM design was first applied in maize (Yu *et al.* 2008; McMullen *et al.* 2009; Poland *et al.* 2011; Monir and Zhu 2018) with great success which helped the development of NAM populations in others major crops as sorghum (Bouchet *et al.* 2017), soybean (Song *et al.* 2017; Xavier *et al.* 2018), rapeseed (Li *et al.* 2016; Hu *et al.* 2018), barley (Maurer *et al.* 2015; Vatter *et al.* 2017; Hemshrot *et al.* 2019; Pham *et al.* 2019) and wheat (Jordan *et al.* 2018).

Up to now, all NAM studies have been performed in MPPs that merge elite and wild cultivars disrupting the favorable yield and quality traits that have been improved over the long course of continuous breeding, but none report from NAM studies was conducted in populations derived from mating elite lines. Thus, our goal was to identify chromosome regions and candidate genes related to yield and phenological traits in Uruguayan environmental conditions in the INNO-NAM population (Bhatta *et al.* 2020) developed by crosses between modern European high yielding barley lines and local well-adapted germplasm, representing the normal crossing strategy of the local breeding programs. Likewise, the effect of phenology impact on agronomic performance and QTL stability across environments was analyzed. For our purpose, field trials have been conducted at four locations in Uruguay under contrasting sowing dates.

2.4. MATERIALS AND METHODS

2.4.1. Experimental materials

Our NAM panel consisted of 145 double haploids lines (DH), developed from four biparental crosses between five elite lines (INNO1, CLE268 x Kalena; INNO2, Kalena x CLE267; INNO3, Kalena x Conchita; and INNO4, Livia x CLE268) made at the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay (Supplementary Figure S1). The number of lines were 33, 39, 45 and 28 for each NAM family. Parental lines were selected in order to combine European high yield elite lines with good malting quality with germplasm fully adapted to local conditions. CLE267 (INIA Arrayán/ND17380) and CLE268 (INIA Arrayán/ Norteña

Carumbé) are experimental lines developed by the INIA Barley Breeding Program that possess a good adaptability to local conditions and acceptable malting quality. On the other hand, Conchita and Livia (KWS Lochow GMBH) and Kalena (Ackermann Saatzucht GMBH) are European barley cultivars introduced from Germany with high yield under optimal environmental conditions and excellent malting quality, but lacking yield stability in Uruguayan environmental conditions (Castro *et al.* 2017a).

2.4.2. Field experiments

The DH lines were evaluated for agronomic and phenological traits in experiments during four consecutive years (2015- 2018) at four locations in Uruguay: “Dr. Mario A. Cassinoni” Experimental Station (EEMAC), Paysandú (32°22’S, 58°03’W); INIA La Estanzuela Experimental Station (EELE), Colonia (30°20’S, 57°42’W); Maltería Oriental Experimental Field (MOSA), Mercedes (33°16’S, 58°02’W); Maltería Uruguay Experimental Field (MUSA), Ombúes de Lavalle (33°54’S, 57°58’W). Experiments conducted in EEMAC in 2017 and 2018 were planted with three and two sowing dates, respectively. The experiments were coded with acronyms indicating the location and the last two digits of the harvest followed by a letter indicating sowing date if it necessary (i.e., 17A, 17B, 17C for the earlier to later date). Experiments were grouped according to the sowing date. Normal sowing date (NSD) corresponds to experiments sowed in the period between June 15 to July 7. Late sowing date (LSD) corresponds to experiments sowed after August 1st, and include a low number of experiments located at EEMAC. As a consequence of location-year combination it was possible to explore phenotypic variation in 13 environments. Agronomic traits were measured in a total of twelve environments, whilst phenological traits were measured in ten. Not all traits were measured in all experiments (Supplementary Table S1).

A total of seventeen agronomic and phenology traits were measured: plant height (PH, cm), grain yield (YLD, kg ha⁻¹), grain plumpness (PML, percentage weight of grains retained over a 2.5 mm sieve), plump yield (PY, yield of grains retained over a 2.5 mm sieve, kg ha⁻¹), thousand grain weight (TGW, g), spikes per square meter

(SM), grains per spike (GS), number of grains per square meter (GN), time from seedling emergence to the beginning of tillering (Z20), to two visible tillers (Z22), beginning of stem elongation (Z30), to awn emergence (Z49), to physiological maturity (Z90). In addition, photoperiodical response (PPR) phases and sub-phases were recorded: length of tillering period (TL, Z20–Z30), stem elongation (SE, Z30–Z49), and grain filling period (GF, Z49–Z90). Awn emergence was recorded when awns of 50% of the plants were approximately 1 cm above the flag leaf sheath. The Z49 stage is considered a synonymous of anthesis date (Castro *et al.* 2008, 2017b). Plant height was measured from ground to the base of the spike at physiological maturity. Spikes per square meter were measured by counting the spikes in three linear meters rows from the middle of the plot at physiological maturity. Grains per spike were measured by counting the grains of ten random spikes per plot at physiological maturity. TGW was measured by counting 300 grains per plot and estimating the weight (g/1000 grains). All phenological variables were recorded in days and expressed as growing degree days (GDD); Eq.1, using 0 °C as base temperature (T_b), except for MUSA16 where temperature records were not available. Photoperiod sensitivity or response (PPR) was calculated following León *et al.* 2001 and Castro *et al.* 2017b, as the GDD taken for each DH line to reach each growth stage when sown under short days subtracted from the time taken when sown under long days in each year and location. Phenological stages were assessed using a decimal code for cereals (Zadoks *et al.* 1974). Grain yield and grain weight were converted to kg ha⁻¹ using harvesting-timed seed moisture to adjust all plot values to 12% seed moisture.

$$\text{GDD (}^{\circ}\text{Cd)} = \sum(\text{T}_m - \text{T}_b) \quad [\text{eq.1}]$$

The experimental design was a partially replicated experiment (Cullis *et al.* 2006) with eight replicated lines in each experiment augmented in a randomized complete block design. The plot size was 5 m length with six rows separated by 0.19 m (total area of 5.7 m²) in MUSA, 6 m length with seven rows separated by 0.20 m (total area of 8.4 m²) in MOSA, 5 m length with six rows separated 0.16 m (total area of 6.7 m²)

in EELE and 5 m length with six rows separated 0.15 m (total area of 3.6 m²) in EEMAC. In EEMAC17C (only phenological record) plots consisted of two rows with a 1 m length and a distance of 0.15 m between rows. Weeds and diseases were controlled in all experiments. Temperature was recorded at an automatic weather station located within 100 m from the field experiments.

2.4.3. Phenotypic data analysis

Best linear unbiased predictors (BLUPs) for each line and each trait were obtained with mixed models for all environments using the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + \lambda_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk} \quad [\text{eq.2}]$$

Where Y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean or intercept, λ_i is a random variable associated with the i_{th} experiment with $\lambda_i \sim N(0, \sigma^2_\lambda)$, β_j (i) is a random variable associated with the j_{th} block nested within the i_{th} experiment with $\beta_j(i) \sim N(0, \sigma^2_\beta)$, γ_k is the effect of the k_{th} genotype, and ε_{ijk} is the residual error with $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2_\varepsilon)$. These analyses were performed with R statistical software (R Development Core Team, 2020) using *lmer* function from the package *lme4* (Bates *et al.* 2015).

The BLUP of each trait were used to compute Pearson's correlations and perform Biplot analysis in order to study relationship among traits for each location separately (biplots not presented) using the *cor* function from *stats* package and the *PCA* function from *FactoMineR* package (Lê *et al.* 2008), respectively.

2.4.4. Genotyping and population structure

Genotyping was performed using the Illumina barley 50K iSelect SNP array (Bayer *et al.* 2017). DNA extraction, SNP calls and quality control were previously described by Bhatta *et al.* (2020). For the present study only SNPs with known genetic position obtained from Barleymap pipeline (available at <http://floresta.eead.csic.es/barleymap>) were used (Cantalapiedra *et al.* 2015). Additionally, individuals with more than 95% missing SNPs were excluded from

analysis, thus the data set contained 6340 markers distributed across the seven barley chromosomes and 145 individuals.

Population structure was assessed by conducting a principal component analysis (PCA) using the 6340 polymorphic SNPs with the *prcomp* function in R statistical software (R Development Core Team 2020). Genetic comparison between parental lines was performed using the *Dist.gene* function from *Ape* R package (Paradis and Schliep 2019).

2.4.5. Association analysis

GWAS was performed separately for each trait, year and environment for QTL identification, followed by a meta-analysis to infer SNPs stability across environments through a genotype by environment interaction (GEI) analysis. Prior to model selection, we tested various association mapping approaches using different R packages to compare their ability to reduce spurious associations. Briefly, we performed GWAS implementing Kinship (mixed model including the coancestry matrix among genotypes as a random effect), Q+K (mixed-effects model including both population structure and coancestry among genotypes), Eigenstrat (mixed-effects model including population structure as a random effect) models from *lmem.gwaser* package (Gutiérrez *et al.* 2016) and P+K model (additive relationship matrix as a fixed effect and principal components as fixed effects) of *rrBLUP* R package (Endelman 2011). The package described by Endelman (2011) was selected for being the best model based on the quantile-quantile (Q-Q) plots of observed p-values from GWAS plotted against expected p-values. The approach with the most uniform distribution of p-values observed was selected as Stich *et al.* (2008). Two principal components were included to correct differences that might be due to population structure.

Meta analyses for every studied trait were performed using the *meta3* function from *NAM* R package developed for multiparental populations by Xavier *et al.* 2015. This model combines information from single environment GWAS to infer which markers present significant GEI. Through likelihood ratio test (LRT) the model that includes the marker effect (null hypothesis) was compared with a model that does not

(alternative hypothesis). A threshold of 15 LRT was used as criteria to define significant regions with GEI. The term environment is used to refer to a specific location-year combination.

2.4.6. Linkage disequilibrium decay and QTL identification

LD was measured as squared allele frequency correlation (r^2) between each pair of markers in the same chromosome using R statistical software (R Development Core Team 2020). All 6340 markers with the most probably genetic position obtained from Barleymap were included in this LD analysis. Intrachromosomal LD r^2 values were plotted against genetic distance to visualize LD decay rate and a cubic smooth line was fitted. Threshold significance level was set by using a false discovery rate (FDR) of 5%. Hence, marker trait associations were considered significant when $-\log(\text{p-value})$ was above 3.82. All significant markers within a region length defined for each chromosome on the basis of intercepts of the smoothing spline curve with basal pairwise LD ($r^2 = 0.20$) were included in the same QTL. Because some QTLs were in close proximity, we determined if markers within a QTL for a given trait were in high LD ($r^2 = 0.7$) with other significant markers on other QTL as reported by Hemshrot *et al.* (2019). The marker with the highest LOD score was used to represent a significant QTL. We defined a QTL hotspot when significant markers for different traits were located within an interval ≤ 10 cM as Herzig *et al.* 2019. A QTL hotspot is considered a pleiotropic region that control multiple traits simultaneously (Fernández-Calleja *et al.* 2021).

The phenotypic variance explained (PVE) by each QTL was estimated by fitting a multilocus model with all significant markers for each trait with *relmatLmer* function from *lme4QTL* R package (Ziyatdinov *et al.* 2018). The fixed effects were all significant SNPs and the random effects were the genotypes. The additive relationship matrix was calculated with *A.mat* function from *rrBLUP* R package and specified in the model as a covariance matrix for random effects. Least-square means for QTL were estimated with the *emmeans* R package. Candidate genes were suggested if a significant SNP for a gene reported in the literature and the SNP in the

peak of a QTL found in the present study were within an interval ≤ 1 cM according to POPSEQ_2017 map available in Barleymap.

2.5. RESULTS

2.5.1. Descriptive statistics and correlation of phenotypic traits

Phenotypic variation was observed in all experiments (Supplementary Table S2 Descriptive statistics), with low variation for phenological traits (coefficients of variation - CV- were lower than 10% in general) and higher variation for yield-related traits (CV typically higher than 10%). A broad range of variation was observed for YLD across environments. The highest grain yields were observed in EELE and MOSA environments, independent of the year, and the lowest in EEMAC. The highest mean grain yield observed was 9112 kg ha⁻¹ (EELE15) and the lowest 3514 kg ha⁻¹ (EEMAC18B).

Moderate to high correlation (0.38 – 0.82) was observed between Z30 and Z49 (Supplementary Table S3), and high correlation (0.72- 0.92) was observed between SE and Z49. With one exception, SE has a higher correlation than Z30 with Z49, suggesting that its duration was the most important component determining flowering time. Z49 and GF are negative and significantly correlated in all environments where they were measured.

YLD and GN showed positive and significant association in all experiments. TGW was highly and positively correlated with YLD only in two out of 14 experiments. GN and TGW exhibited negative and significant correlation in almost all environments. The interaction between YLD, GN and TGW indicates that YLD was largely defined by GN. A positive and significant correlation was observed between PLM and TGW. High GN decreased grain size, thus negative correlation between GN and PML was observed. GS showed a positive and stronger correlation with GN (and with YLD) than SPM (GS and SPM were only measured in 2018 experiments). In LSD (and low yielding) experiments, the correlation between SPM and GS was negative in EEMAC2018B, while in the early experiment EEMAC 2018B there was no correlation.

In general, phenology traits showed low correlation with YLD and its components in NSD (with the exception of EEMAC15 where YLD and GN were negative correlated with Z49). In non-optimal environments (LSD), YLD and GN were negatively correlated with Z49. TGW was negatively correlated with Z49 and positively correlated with GF in EEMAC18B (in EEMAC17B showed no correlation).

2.5.2. Population structure, LD decay and association analysis

The number of markers varied among chromosomes with a minimum of 535 SNPs on chromosome 1H and a maximum of 1148 SNPs on 5H (Supplementary Table S3). The average marker density was 906 per chromosome, with average marker coverage of 6.4 markers per cM.

The two most important components of the PCA assessed with genotypic data accounted for 27.3% of the total variation (Supplementary Figure S2). Genotypes clustered according to the NAM families, and NAM families clustered according to the relationship between the parental lines, as expected.

Linkage disequilibrium decay was studied at the whole genome and intrachromosomal level. The scatter plot showed a slow LD decay for all chromosomes (Supplementary Figure S3) as a consequence of population relatedness and low recombination rate attributable to a single recombination event in a specie in which three crossovers per meiosis are rarely exceed (Mercier *et al.* 2015). Selection for agronomic traits like phenology, disease resistance and malting quality parameters may strongly affect LD leading to extensive conserved haplotype blocks in chromosome regions carrying genes that affect selected traits (Qian *et al.* 2014). Additionally, our population structure favors the presence of big haplotypes blocks. Intrachromosomal LD decay ranged between 9.9 cM and 16.4 cM for chromosomes 6H and 3H, respectively. Average LD decay across all chromosomes was 13.3 cM.

We were able to detect a total of 77 QTLs (Supplementary Table S5) considering all trait-experiment combinations, marker trait associations were not detected in all cases. Most identified QTLs were shared by different traits. However, trait-specific QTLs could be detected. The highest number of QTLs was identified on

chromosome 2H (22) and none QTL were found in 4H. Significant QTLs were detected for all studied traits, except for Z20, SPM and GS.

The meta-analyses enabled us to identify 10 significant associations (Figure 1). The most important phenological associations were detected on chromosome 2H, 5H and 7H, while yield related traits association were identified on chromosome 1H and 5H. We did not detect SNPs with significant GEI in four out of twelve studied traits: Z30, GF, YLD and GN, although some trends were observed that did not exceed the significance threshold.

Table 1. Number of QTLs, proportion of the phenotypic variance explained (PVE) by QTLs identified from GWAS greater than 15% of total PVE, for studied traits with the position of the most significant marker.

Trait id	QTL ^a	PVE (%) ^b	Position (cM) ^c
Z30	1	26.12	2H (19.9)
Z49	3	16.92	3H (55.52)
		15.72	2H (23.16)
		38.06	2H (19.9)
Z90	2	28.45	2H (19.9)
		17.83	1H (0.11)
TL	1	21.31	2H (19.9)
SE	3	19.34	2H (19.9)
		36.66	2H (14.38)
		16.61	2H (19.9)
GF	2	17.37	2H (22.17)
		20.48	7H (43.84)
PPR_SE	1	33.37	2H (19.9)

Continue table 1...

Trait id	QTL ^a	PVE (%) ^b	Position (cM) ^c
PPR_Z49	2	34.17	2H (19.9)
		23.6	2H (16.78)
PPR_GF	2	18.81	1H (4.96)
		24.49	1H (16.43)
PIY	1	17.19	1H (8.43)
YLD	3	21.18	1H (4.96)
		20.05	3H (68.2)
		20.47	1H (8.43)

^a Number of QTL per trait

^b Phenotypic variance explained by the QTL.

^c Chromosome and position of the most significant SNP based on Barleymap

2.6. DISCUSSION

Quality requirements established by the brewing industry demand for cultivars able to fulfill high and continuously evolving standards. This demand accomplished with the introduction of European malting barley cultivars in South American barley production. Although European germplasm fits the industry requirements, it has some drawbacks, in particular their limitations under late sowings and higher temperatures (Castro *et al.* 1997, 2017a). In order to solve this problem, phenological adaptation, high quality and high grain yield must be integrated in new cultivars. The development of fully adapted barley cultivars will contribute to the region's agricultural farming systems reducing risks and increasing productivity.

Multiparental populations have been mentioned as a useful tool in order to dissect the genetic architecture responsible for important agronomic traits (Maurer *et al.* 2017). Targeting the definition of chromosome regions and candidate genes explaining phenological and yield-related traits we used a NAM approach that simultaneously exploits the advantages of linkage analysis and association mapping (McMullen *et al.* 2009).

The INNO-NAM population consists in double haploid (DH) lines originated from four crosses between five modern high yielding barley materials. Parental lines were chosen due to their commercial importance in Uruguay and their significance in national breeding programs, combining high quality European cultivars with adapted lines developed locally. Although DH production results in fewer recombination events, DH lines are useful to perform genetic mapping (Gage *et al.* 2020). QTL precision detection relies on factors such as population size, population structure, marker density, coverage and the method used for statistical analysis (Zeng 1994; Beavis 1998; Meuwissen *et al.* 2001; Mackay and Powell 2007). The mating scheme used in this research reduced population structure, the marker density and coverage were appropriate and the population's size was defined by the phenotyping capacity. The observed LD decay, although relatively low, was adequate for the goals of the study. All factors considered, we concluded that the precision of QTL detection is satisfactory GWAS in our population.

Population structure was clearly related with the crossing design of the population (Supplementary Figure S2). Additionally, SNP data revealed a medium to high degree of genetic similarity between parental lines, ranging from 36 to 74% (Supplementary Table S4).

Results suggest that under optimal conditions (early planting dates, lower spring temperatures) the length of the different developmental phases has no significant effects on YLD and its components, while under sub-optimal environments (LSD or high spring temperatures) the situation can be different, negatively affecting YLD. The experiment EEMAC15, the only exception to this pattern, has a photothermal quotient ($Q=Rinc/T$) around flowering time that is low and similar to the ones of LSD experiments, therefore limiting YLD potential as well (Savin and Slafer 1991), while the temperatures during grain filling period were below the historical average making it possible to attain the grain yield potential generated previously. Earlier reports, under similar conditions, have shown that grain yield decreases with later sowing dates, reducing particularly the performance of genotypes with larger growth cycles as the planting date is delayed. A late anthesis date would determine that grain filling should occur basically during November, late spring under Uruguayan

environments, with risks of high temperature and hence negative effects on grain yield and quality (Castro *et al.* 1997; Locatelli *et al.* 2013). In the northern barley region of Uruguay, as the temperature is in average higher, the stress due to late anthesis is more important as the temperature increase in spring is faster. During this time of the year is when grain filling occurs. In general, our report did not contradict these trends. But through the inclusion of more optimal environments and modern germplasm than the ones used in the mentioned reports, we explored other situations. Our results suggest, that in NSD the length of SE, GF and Z90 phases are not important (little or no correlation) to achieve high grain yields. Nevertheless, in LSD environments, genotypes with shorter cycle are necessary to avoid important yield losses.

In NSD early development stages occur under favorable temperature conditions enabling the plant to generate high yield potential, while late development stages as GF still take advantage of cool temperature that allows the achievements of high grain yield and high quality, regardless of the anthesis date. Contrary, in LSD, genotypes with shorter cycles showed an advantage on adaptation, explained by negative correlation between Z49 and YLD.

2.6.1. GWAS and QTL hotspots

We detected 991 marker trait associations from the GWAS analysis, which resulted in 77 QTLs. The phenotypic variance explained by each QTL ranged from 2.54 % to 38.06 % (Supplementary Table S6). Since most of the QTL were shared by multiple traits, we were able to summarize them in 9 QTL hotspots, detected in all chromosomes, except on 4H.

2.6.1.1. QTL hotspot 1H_01

We detected two QTL hotspots on chromosome 1H. The first one (1H_01) is located between JHI-Hv50k-2016-97 and JHI-Hv50k-2016-8841 markers, comprising 9.81 cM (0.11–9.92 cM). This region showed significant effect on GF, Z90, PIY, PPR_GF, PPR_Z90 and YLD, and was detected in EEMAC17A, EEMAC18B, MOSA15 and MUSA15. The PVE for this hotspot ranged from 8.88% to 21.18 %.

The QTL with the highest PVE was associated to YLD in EEMAC17A (Supplementary Table S6). The favorable allele for GF period and PPR_GF was contributed by Kalena parent, whereas the remaining four parental lines carry the unfavorable allele. For PPR_Z90 the favorable allele is provided by Kalena and Conchita. Adapted lines CLE267 and CLE268 carry the unresponsive allele for photoperiod sensitivity in this region. This region has been previously associated to phenological traits as heading date and anther extrusion by Alqudah *et al.* 2014 in germplasm carrying the reduced photoperiod sensitivity allele (*Ppd-H1*).

2.6.1.2. QTL hotspot 1H_02

The hotspot 1H_02 is located between JHI-Hv50k-2016-10363 and JHI-Hv50k-2016-13004 spanning 12.33 cM (15.08-27.41 cM) with significant effects on PPR_GF, PPR_Z90 and YLD. The PVE for hotspot 1H_02 ranged from 10.82% to 24.49%. The QTL with the highest PVE was associated to PPR_GF in EEMAC 2018. This region has been previously associated to phenological traits as flowering and heading time (Alqudah *et al.* 2014; Pham *et al.* 2020), ripening phase, shot elongation, plant height, and ear number (Pham *et al.* 2020).

2.6.1.3. QTL hotspot 2H_01

We detected two QTL hotspots on chromosome 2H. The 2H_01 region is located between JHI-Hv50k-2016-71617 and JHI-Hv50k-2016-74940 markers, comprising 10.9 cM (14.38-25.28 cM). On this region we detected significant effects only for phenological traits (Z30, Z49, TL, SE, PPR_SE, PPR_Z49, PPR_Z90). The PVE for this hotspot ranged from 10.54% to 38.06%. The QTL with the highest PVE was associated to Z49 in EEMAC17C. The QTL effects were detected only in LSD environments (EEMAC17B, EEMAC17C, EEMAC18B). This includes also the PPR QTLs, which reflects a reduction in LSD environments and no effect in NSD environments. The most significant marker for this QTL region in our study is JHI-Hv50k-2016-73422, which is in the same position (19.9 cM) than marker i_12_30870 reported by Maurer *et al.* (2016) and markers BK_12, BK_13 and BK_15, BK_16 reported by Alqudah *et al.* (2014) all co-segregating with *Ppd-H1*.

The PSEUDO-REGULATOR (HvPPR37) gene, known as PHOTOPERIOD RESPONSE LOCUS1 (*Ppd-H1*) plays a major role in heading time regulation accelerating flowering under long days in barley (Laurie *et al.* 1994; Turner *et al.* 2005). The *Ppd-H1* has a considerable interaction with other genes involved in development pathways, principally with *Vrn-H3* (Fernández-Calleja *et al.* 2021). This gene is also associated with significant effects on plant height, biomass and yield component (Laurie *et al.* 1994) and relative growth rate (Pham *et al.* 2019). Recently it has been shown that *Ppd-H1* can modulate floral development in response to other environmental cues as drought stress, nitrogen deficiency and salt stress (Wiegmann *et al.* 2019; Gol *et al.* 2020). Our results were consistent with the description of the gene's effects. Therefore, we consider a *Ppd-H1* as our candidate for these QTLs. Parental lines CLE267 and CLE268 carry the responsive haplotype at *Ppd-H1*. Since it is a trait that contribute to better adaptation to our farming system (Germán *et al.* 2000) it has been considered relevant by the breeding programs and introduced in national germplasm. Genotypes carrying the responsive *Ppd-H1* allele tend to show the highest PPR_SE, PPR_Z49 and PPR_Z90. These results are consistent with previous findings reporting photoperiod response in pre-anthesis sub-phases (Alqudah *et al.* 2014). Moreover, genotypes with the responsive allele exhibited a shorter duration from sowing to Z30, Z49 and shorter TL and SE length in LSD environments.

2.6.1.4. QTL hotspot 2H_02

The 2H_02 region was associated with SE and Z49, and is located between JHI-Hv50k-2016-80847 and JHI-Hv50k-2016-101390 with a length of 16.8 cM (47.78-64.59 cM). The PVE for hotspot 2H_02 ranged from 7.7% to 10.79%. The QTL with the highest PVE was detected in EEMAC17C (LSD environment) with effects over SE. This region was associated to Z49 in high grain yield potential environments (EEMAC15, EEMAC16, EELE16), while in LSD this trait was influenced by the *Ppd-H1* region (hotspot 2H_01). Our candidate gene for this QTL is *eps2S* (earliness per se) since SNP JHI-Hv50k-2016-92911 (58.64 cM), included in the present study, is mapped close to 12_30265 (58.7 cM) reported by (Comadran *et al.* 2012) to be

within *HvCEN*, the barley homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS*. Furthermore, Alqudah *et al.* (2014) reported 11_10358, which is 0.2 cM apart from JHI-Hv50k-2016-92911, to be significant associated to *HvCEN*. This gene has contributed with the expansion of barley to diverse environments through modifications in time to flowering (Comadran *et al.* 2012; Fernández-Calleja *et al.* 2021). *HvCEN* is located in the peri-centromeric region of chromosome 2H being a region of weak genetic recombination (Comadran *et al.* 2012), with pleiotropic effects on different shoot architecture traits, including the number of leaves, leaf length, number of tillers per plants and number of seeds per spike (Bi *et al.* 2019). Previous studies have reported QTLs underpinning phenological traits as stem elongation, flowering, heading, maturity and grain filling phase length (Castro *et al.* 2008, 2017b; Locatelli *et al.* 2013; Pham *et al.* 2020). In contradiction with earlier reports (Sharma *et al.* 2018; Pham *et al.* 2019, 2020), we found *HvCEN* effects exclusively on phenological traits. When the length of the SE phase was measured, it was positively correlated with YLD and GN, a result in agreement with previous reports that suggest that a variation in SE period may affects grain traits as grain number, which has relevant effects over yield potential (Miralles *et al.* 2000; Maurer *et al.* 2016; Castro *et al.* 2017b).

2.6.1.5. QTL hotspot 3H_01

On chromosome 3H we detected a single hotspot. 3H_01 is located between JHI-Hv50k-2016-183513 and JHI-Hv50k-2016-193139, comprising 13.6 cM (54.53-68.2). This region has significant effects on Z49 and grain yield related traits that are highly correlated (GN, TGW, PML, YLD, and PIY). The PVE for this hotspot ranged from 9.46% to 20.05%. The QTL with the highest PVE was associated to YLD in EEMAC18B (LSD environment). This region may harbor *HvFT2* since marker JHI-Hv50k-2016-183834 (53.7 cM) used in the present study is in close proximity to 11_20325 (52.01 cM), a SNP marker significant associated to *HvFT2* by (Alqudah *et al.* 2014). The fact that correlated traits (Supplementary Table S2) have coincident QTLs effects (Supplementary Table S5) suggests that pleiotropic is the reason for the correlation. The discussion between linkage vs. pleiotropy as the

ultimate cause for correlation between traits cannot be completely ruled out with the resolution provided by our analysis. For instance, Z49 was negatively correlated with YLD and PML in EEMAC15. In this environment temperature during spring increased rapidly and a larger period between sowing date and Z49 was associated with shorter GF (not measured in this specific environment but known as negative correlated with Z49), lower YLD, PML and TGW. In this case, the favorable allele for shorter Z49 and higher PML comes from CLE 267 and CLE 268. It has been shown that the gene *HvFT2* is involved in flowering induction (Kikuchi *et al.* 2009; Shaw *et al.* 2019). Our findings are in concordance with previous reports (Wang *et al.* 2010), where *HvFT2* was associated with heading time, but additionally with other agronomic traits as SPM, PH, harvest index, and YLD.

2.6.1.6. QTL hotspot 5H_01

Hotspot 5H_01 was located in the interval between markers JHI-Hv50k-2016-312319 and JHI-Hv50k-2016-313840 (75.56-76.04 cM). This region had effects on GN, YLD and TL traits. Yield related traits were found only in NSD environments. The PVE for this hotspot ranged from 6.59% to 11.46%. The QTL with the highest PVE was found in EEMAC17B (LSD environment) with effect on TL. Previous studies in the barley NAM population HEB-25 found a QTL conferring resistance to stripe rust in this region (Vatter *et al.* 2018), and more recently a novel QTL for tiller number (Pham *et al.* 2019), both traits were not measured in our study. Nevertheless, the QTL we found can be related with TL in the sense that an increase in its duration correlates with an increase in tiller number. The allele (AA) for longer TL was contributed by Livia. This same parental line carries the favorable allele (BB) for GN and YLD.

2.6.1.7. QTL hotspot 6H_01

On chromosome 6H we detected one hotspot. The region of 6H_01 is located between JHI-Hv50k-2016-377313 and JHI-Hv50k-2016-379840 markers, comprising 14.6 cM (18.57-33.22 cM). This region showed effects over Z22, Z49, YLD and PY. The PVE for hotspot 6H_01 ranged from 8.52% to 10.82%. The QTL

with the highest PVE was detected in EEMAC15 with effects on Z49. We did not find previous reports of QTLs related to barley phenology or grain yield in this region.

2.6.1.8. QTL hotspot 7H_01

We detected two QTLs hotspots on chromosome 7H. The 7H_01 region is located between JHI-Hv50k-2016-459904 and JHI-Hv50k-2016-465007 markers, comprising 15.6 cM (34.21-49.89 cM). We detected significant effects on phenological traits (SE, Z49, GF), in NSD environments (EEMAC17A and EEMAC18A). The PVE for hotspot 7H_01 ranged from 11.05% to 20.48%. The QTL with the highest PVE was associated to the GF phase in EEMAC18A environment. The SNP i_12_30895 reported by Maurer *et al.* (2015, 2016) is in the same position (34.21 cM) that JHI-Hv50k-2016-459904 used in our study and found as the most significant SNP associated to all QTLs detected in the 7_01 hotspot. In the mentioned reports, i_12_30895 is referred as a gene-specific marker for *Vrn-H3*. This gene, a floral inducer, corresponds to *HvFT1*, the homolog of Arabidopsis thaliana FLOWERING LOCUS T (*FT*) gene (Yan *et al.* 2006; Kikuchi *et al.* 2009). *Vrn-H3* affects the transition from vegetative to reproductive growth under long day conditions reducing vernalization requirements (Yan *et al.* 2006), being the principal connector between photoperiod and vernalization (Fernández-Calleja *et al.* 2021). Previous studies in barley multiparental populations have reported QTLs affecting phenology traits in this region that are likely to correspond to *Vrn-H3* (Sannemann *et al.* 2015; Pham *et al.* 2020). This gene may also show pleiotropic effects on yield and yield related traits (Wang *et al.* 2010). Our results are consistent with the mentioned reports and *Vrn-H3* is a possible candidate for 7H-01 QTL hotspot.

2.6.1.9. QTL hotspot 7H_02

7H_02 hotspot is between JHI-Hv50k-2016-495997 and JHI-Hv50k-2016-500494 markers. This region has a length of 8.5 cM (98.16-106.66 cM), and is associated to agronomic traits as YLD, PML and PIY, and showed significant effects only in NSD environments. The PVE for this hotspot ranged from 9.09% to 14.88%. The QTL

with the highest PVE was associated to PIY in MUSA16. Previous association studies found three QTLs associated to shooting, maturity and ripening phase in this region (Pham *et al.* 2020). The SNP we used (JHI-Hv50k-2016-495997) is almost in the same position that those used by Pham *et al.* 2020 (e.g., BOPA2_12_10362 and SCRI_RS_149645).

2.6.2. QTL by environment interaction

Plant breeder's duty consists in identifying superior genotypes through their evaluation across multiple environments. The phenotypic response, affected by GEI frequently is a hassle to breeder's objective (Malosetti *et al.* 2004). Numerous strategies have been used to study GEI at the phenotypic level (Des Marais *et al.* 2013). Quantify and separate environmental and genetic variability is important to determine how GEI impacts over these variances, and knowing how genotypes response to environment changes (Xavier *et al.* 2018).

Our multi-environment analysis enabled us to identify 12 significant QTL peaks (Figure 1). Phenological associations were detected on chromosomes 2H, 3H, 5H and 7H. While yield related traits associations were identified on chromosomes 1H and 5H. Phenological traits with SNPs with significant GEI were Z49, MF and SE. Additionally; we found photoperiod response in Z30, Z49 and Z90. We did not detect SNPs with significant GEI across environments in any yield related trait, except for TGW and PML

Significant effects for Z49, SE and PPR_Z49 and PPR_Z90 were coincident with the results from single environment analysis. In this case, the genomic regions associated were those potentially related with genes *Ppd-H1*, *HvCEN* and *Vrn-H3*. Our results suggest that genomic regions underlying photoperiod response and phenological traits as Z49 and SE are highly sensitive to environmental signals, which is in agreement with previous studies reporting *Ppd-H1*, *HvCEN* and *Vrn-H3* as the genes driving genotype by environment interactions (Turner *et al.* 2005; Yan *et al.* 2006; Bi *et al.* 2019). The consistency between single and multi-environment analysis strongly suggests that in our population there are few genomic regions associated to phenology and responsive across environments. Meanwhile, marker traits association

detected through individual environment analysis for Z90 scarcely match multi environment results.

We detected few QTLs related to yield, perhaps related with its nature as a complex trait influenced by the environment, and composed by a potentially intricate network of multiple interacting traits. TGW and PML were the only two yield related traits's QTL detected in multi environment analysis. Peaks were located on chromosomes 1H and 5H. Although peak on 5H is not coincident for TGW and PML, the association detected through single environment GWAS is coincident with single analysis for other highly correlated traits as GN, PIY and YLD.

We could not detect any significant association for Z30, YLD, TL, SM, PIY, GN and GF, but these seven traits showed a peak below the significance threshold (not shown) in the same position localized on chromosome 1H (1_01 hotspot). The high genetic correlation that embraces those seven traits indicates us that it is a region of pleiotropic effects across environments, and until a certain extent we can speculate about the presence of a region conferring agronomic plasticity.

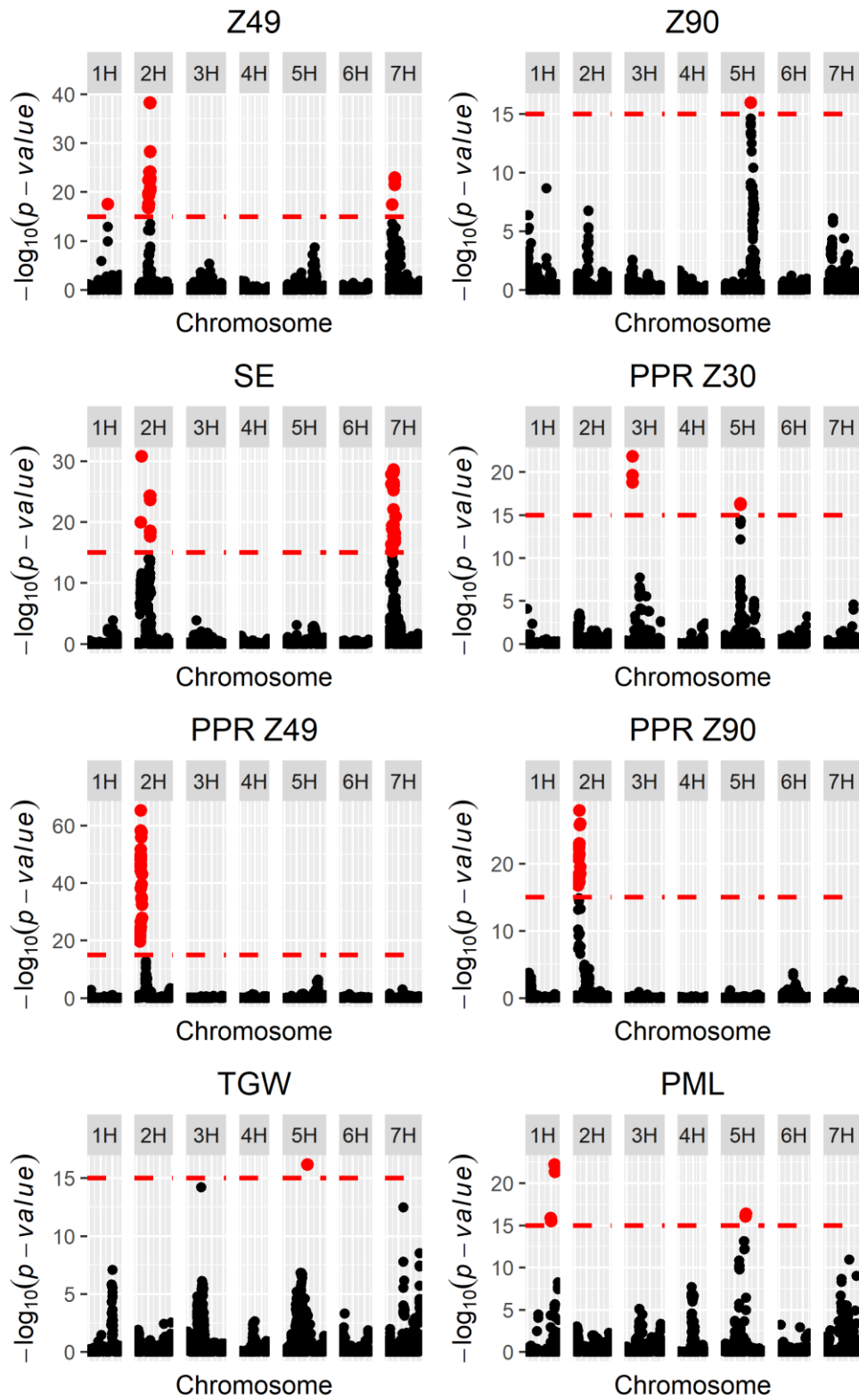


Figure 1. Manhattan plots for meta-analysis across barley chromosomes (1H to 7H) for eight variables with significant p-values (QTL discovery).

The performance of genotypes with different environmental inputs is a principal concern in breeding since a complex trait like grain yield is determined by a large number of alleles of minor effects highly susceptible to changes in the environment (Slafer 2003; Des Marais *et al.* 2013; Sharma *et al.* 2018). With the increases of global temperatures and changes in the farming scheme barley have been exposed frequently to abiotic stresses such as a warm temperature during the entire cycle and heat shocks affecting yields, mainly in temperate regions. Barley breeding programs must target genomic regions of high productivity able to overcome such a range of environmental stresses.

2.6.3. Usefulness of association studies with elite NAM populations

Multiparental population based on a conservative founder selection optimized around particular varieties, traits or environments might be more quickly translated into superior breeding lines and are of greater immediate value to breeders (Scott *et al.* 2020). In this regard, the use of INNO-NAM for GWAS has the benefit of a more direct application of the results on breeding, thus improving the efficiency in the identification of elite phenotypes and accelerating the development of new cultivars. The reason is that this population is comprised of germplasm highly representative of the local breeding programs.

In a NAM approach only those families in which the QTL segregates are relevant for mapping resolution, so the effective population size will be lower than the actual population size (Scott *et al.* 2020). We found in those cases that observed p-values for some MTA (e.g. TGW) barely exceeded the significance threshold as consequence of small effect within one of the analyzed families. We hypothesize that some alleles were fixed in our population.

It has not been analyzed in this work how malting quality traits are affected by changes in phenology. Some epistatic effects associated to malting quality traits may be affected by changes in crop phenology. Further studies analyzing malting quality parameters (beta-glucan content, malt extract, protein content and soluble nitrogen) are currently being performed using INNO-NAM population.

2.7. REFERENCES

- Alqudah AM, Sharma R, Pasam RK, et al (2014) Genetic dissection of photoperiod response based on gwas of pre-anthesis phase duration in spring barley. PLoS One 10(4): e0123748. doi: 10.1371/journal.pone.0113120
- Andrade JF, Satorre E (2015) Single and double crop systems in the Argentine Pampas: Environmental determinants of annual grain yield. F Crop Res 177:137–147. doi: 10.1016/j.fcr.2015.03.008
- Andrés F, Coupland G (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. Nat Rev Genet 13:627–639. doi: 10.1038/nrg3291
- Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, et al (2000) On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). Mol Biol Evol. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330
- Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw 67:1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
- Bayer MM, Rapazote-Flores P, Ganal M, et al (2017) Development and Evaluation of a Barley 50k iSelect SNP Array. Front Plant Sci 8:1792. doi: 10.3389/fpls.2017.01792
- Beavis W (1998) QTL Analyses: Power, Precision and Accuracy. In: Paterson AH (ed) Molecular Dissection of Complex Traits. CRC Press, Boca Raton
- Bhatta M, Gutiérrez L, Cammarota L, et al (2020) Multi-trait Genomic Prediction Model Increased the Predictive Ability for Agronomic and Malting Quality Traits in Barley (*Hordeum vulgare L.*). G3 Genes, Genomes, Genetics 10:1113–1124. doi: 10.1534/g3.119.400968
- Bi X, Esse W Van, Mulki MA, et al (2019) Centroradialis interacts with flowering locus t-like genes to control floret development and grain number. Plant Physiol 180:1013–1030. doi: 10.1104/pp.18.01454
- Bouchet S, Olatoye MO, Marla SR, et al (2017) Increased power to dissect adaptive traits in global sorghum diversity using a nested association mapping population. Genetics 206:573–585. doi: 10.1534/genetics.116.198499

- Cantalapiedra CP, Boudiar R, Casas AM, et al (2015) BARLEYMAP: physical and genetic mapping of nucleotide sequences and annotation of surrounding loci in barley. *Mol Breed* 35:13. doi: 10.1007/s11032-015-0253-1
- Castro AJ, Castro M, Germán S (2017a) Cambios en la oferta varietal de cebada: desafíos para la producción. *Agrociencia* 38:6–12
- Castro AJ, Cuesta-Marcos A, Hayes P, et al (2017b) The completely additive effects of two barley phenology-related genes (*eps2S* and *sdw1*) are explained by specific effects at different periods within the crop growth cycle. *Plant Breed.* 136(5): 663-670. doi: 10.1111/pbr.12509
- Castro AJ, Ernst OR, Hoffman E, Bentancur O (1997) Caracterización del germoplasma de cebada en Uruguay, de acuerdo a variables agronómicas y de calidad de grano. *Agrociencia* 1:80–87. doi: 10.2477/VOL1ISS1PP80-87
- Castro AJ, Hayes P, Viega L, Vales I (2008) Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breed.* 127(6):561-568. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01520.x
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang E (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142:169-196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Comadran J, Kilian B, Russell J, et al (2012) Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat Genet* 44:1388–1391. doi: 10.1038/ng.2447
- Cullis BR, Smith AB, Coombes NE (2006) On the design of early generation variety trials with correlated data. *J Agric Biol Environ Stat* 11:381–393. doi: 10.1198/108571106X154443
- de Koning DJ, McIntyre LM (2017) Back to the future: Multiparent populations provide the key to unlocking the genetic basis of complex traits. *Genetics* 206:527–529. doi: 10.1534/genetics.117.203265

- Des Marais DL, Hernandez KM, Juenger TE (2013) Genotype-by-Environment Interaction and Plasticity: Exploring Genomic Responses of Plants to the Abiotic Environment. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 44:5–29. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110512-135806
- Endelman JB (2011) Ridge Regression and Other Kernels for Genomic Selection with R Package rrBLUP. *Plant Genome* 4:250–255. doi: 10.3835/plantgenome2011.08.0024
- FAO (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Faure S, Turner AS, Gruszka D, et al (2012) Mutation at the circadian clock gene EARLY MATURITY 8 adapts domesticated barley (*Hordeum vulgare*) to short growing seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8328–8333. doi: 10.1073/pnas.1120496109
- Fernández-Calleja M, Casas AM, Igartua E (2021) Major flowering time genes of barley: allelic diversity, effects, and comparison with wheat. *Theor Appl Genet* 2021 1347 134:1867–1897. doi: 10.1007/S00122-021-03824-Z
- Gage JL, Monier B, Giri A, Buckler E (2020) Ten Years of the maize Nested Association Mapping Population: Impact, Limitations, and Future Directions. *Plant Cell* tpc.00951.2019. doi: 10.1105/tpc.19.00951
- Germán S, Arbelbide M, Abadie T, et al (2000) Characterization of photoperiod response of barley genotypes from diverse origin. In: S. Logue (ed) *Barley Genetics VIII: Vol. III*. Department of Plant Science, Adelaide University, Glen Osmond, Adelaide, pp 212–214
- Gol L, Haraldsson EB, von Korff M (2020) Ppd-H1 integrates drought stress signals to control spike development and flowering time in barley. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/eraa261
- Gutiérrez L, Quero G, Fernandez S, Brandariz S (2016) lmem.gwaser: Linear mixed effects models for genome-wide association studies. In: R Packag. version 0.1.0. <https://cran.r-project.org/web/packages/lmem.gwaser/index.html>. Accessed 7 Jan 2020

- Hayes P, Szűcs P (2006) Disequilibrium and association in barley: Thinking outside the glass. *Proc Natl Acad Sci* 103:18385–18386. doi: 10.1073/pnas.0609405103
- Hemshrot A, Poets AM, Tyagi P, et al (2019) Development of a multiparent population for genetic mapping and allele discovery in six-row barley. *Genetics* 213:595–613. doi: 10.1534/genetics.119.302046
- Herzig P, Backhaus A, Seiffert U, et al (2019) Genetic dissection of grain elements predicted by hyperspectral imaging associated with yield-related traits in a wild barley NAM population. *Plant Sci* 285:151–164. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.05.008
- Hill CB, Angessa TT, McFawn L, et al (2019) Hybridisation-based target enrichment of phenology genes to dissect the genetic basis of yield and adaptation in barley. *Plant Biotechnol J* 17:932–944. doi: 10.1111/pbi.13029
- Holland J (2007) Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:156–161
- Hu H, Ahmed I, Choudhury S, et al (2019) Wild barley shows a wider diversity in genes regulating heading date compared with cultivated barley. *Euphytica* 215:1–14. doi: 10.1007/s10681-019-2398-1
- Hu J, Guo C, Wang B, et al (2018) Genetic properties of a nested association mapping population constructed with semi-winter and spring oilseed rapes. *Front Plant Sci* 871:1740. doi: 10.3389/fpls.2018.01740
- Jordan KW, Wang S, He F, et al (2018) The genetic architecture of genome-wide recombination rate variation in allopolyploid wheat revealed by nested association mapping. *Plant J* 95:1039–1054. doi: 10.1111/tpj.14009
- Kikuchi R, Kawahigashi H, Ando T, et al (2009) Molecular and functional characterization of pebp genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering. *Plant Physiol* 149:1341–1353. doi: 10.1104/pp.108.132134
- Laurie DA, Pratchett N, Bezant JH, Snape JW (1994) Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2(2h) of *Hordeum vulgare* (barley). *Heredity (Edinb)* 72:619–627. doi: 10.1038/hdy.1994.85

- Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 25:1–18. doi: 10.18637/jss.v025.i01
- León AJ, Lee M, Andrade FH (2001) Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 102:497–503. doi: 10.1007/s001220051673
- Li J, Bus A, Spamer V, Stich B (2016) Comparison of statistical models for nested association mapping in rapeseed (*Brassica napus* L.) through computer simulations. *BMC Plant Biol* 16:26. doi: 10.1186/s12870-016-0707-6
- Locatelli A, Cuesta-Marcos A, Gutiérrez L, et al (2013) Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germplasm in Uruguay. *Mol Breed* 31:631–654. doi: 10.1007/s11032-012-9820-x
- Mackay FC, Stone EA, Ayroles JF (2009) The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. *Nat Rev Genet* 10:565–577. doi: 10.1038/nrg2612
- Mackay I, Powell W (2007) Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends Plant Sci* 12:57–63. doi: 10.1016/j.tplants.2006.12.001
- Malosetti M, Voltas J, Romagosa I, et al (2004) Mixed models including environmental covariables for studying QTL by environment interaction. *Euphytica* 137:139–145. doi: 10.1023/B:EUPH.0000040511.46388.ef
- Maurer A, Draba V, Jiang Y, et al (2015) Modelling the genetic architecture of flowering time control in barley through nested association mapping. *BMC Genomics* 16:290. doi: 10.1186/s12864-015-1459-7
- Maurer A, Draba V, Pillen K (2016) Genomic dissection of plant development and its impact on thousand grain weight in barley through nested association mapping. *J Exp Bot* 67:2507–2518. doi: 10.1093/jxb/erw070
- Maurer A, Sannemann W, León J, Pillen K (2017) Estimating parent-specific QTL effects through cumulating linked identity-by-state SNP effects in multiparental populations. *Heredity (Edinb)* 118:477–485. doi: 10.1038/hdy.2016.121
- McMullen M, Kresovich S, Villeda HS, et al (2009) Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science (80-)*. doi: 10.1126/science.1174320

- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, et al (2015) The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 66:297–327. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035923
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819–1829. doi: 10.1093/genetics/157.4.1819
- Miralles D, Richards R, Slafer GA (2000) Duration of the stem elongation period influences the number of fertile florets in wheat and barley. *Funct Plant Biol* 27:931–940
- Monir MM, Zhu J (2018) Dominance and epistasis interactions revealed as important variants for leaf traits of maize NAM population. *Front Plant Sci* 9:627. doi: 10.3389/fpls.2018.00627
- Oraguzie NC, Wilcox PL (2007) An Overview of Association Mapping. In: Oraguzie NC, Rikkerink EH, Gardiner SE, Nihal De Silva H (eds) *Association Mapping in Plants*. Springer New York, New York, NY, pp 1–9
- Paradis E, Schliep K (2019) Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35:526–528. doi: 10.1093/bioinformatics/bty633
- Pham AT, Maurer A, Pillen K, et al (2019) Genome-wide association of barley plant growth under drought stress using a nested association mapping population. *BMC Plant Biol* 19:134. doi: 10.1186/s12870-019-1723-0
- Pham AT, Maurer A, Pillen K, et al (2020) Identification of wild barley derived alleles associated with plant development in an Australian environment. *Euphytica* 216:1–15. doi: 10.1007/s10681-020-02686-8
- Poland JA, Bradbury PJ, Buckler E, Nelson RJ (2011) Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.1010894108
- Qian L, Qian W, Snowdon RJ (2014) Sub-genomic selection patterns as a signature of breeding in the allopolyploid *Brassica napus* genome. *BMC Genomics* 15:1170. doi: 10.1186/1471-2164-15-1170

- R Development Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria
- Richards RA (1991) Crop improvement for temperate Australia: Future opportunities. *F Crop Res* 26:141–169. doi: 10.1016/0378-4290(91)90033-R
- Rizzo G, Pablo J, Ernst OR (2021) Field Crops Research Cropping system-imposed yield gap : Proof of concept on soybean cropping systems in Uruguay. *F Crop Res* 260:107944. doi: 10.1016/j.fcr.2020.107944
- Sannemann W, Huang BE, Mathew B, León 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* 35:1–16. doi: 10.1007/s11032-015-0284-7
- Savin R, Slafer GA (1991) Shading effects on the yield of an Argentinian wheat cultivar. *J Agric Sci* 116:1–7
- Scott MF, Ladejobi O, Amer S, et al (2020) Multi-parent populations in crops: a toolbox integrating genomics and genetic mapping with breeding. *Heredity* (Edinb). 125:396–416
- Sharma R, Draicchio F, Bull H, et al (2018) Genome-wide association of yield traits in a nested association mapping population of barley reveals new gene diversity for future breeding. *J Exp Bot* 69:3811–3822. doi: 10.1093/jxb/ery178
- Sharma R, Shaaf S, Neumann K, et al (2020) On the origin of photoperiod non-responsiveness in barley. *bioRxiv* 2020.07.02.185488. doi: 10.1101/2020.07.02.185488
- Shaw LM, Lyu B, Turner R, et al (2019) FLOWERING LOCUS T2 regulates spike development and fertility in temperate cereals. *J Exp Bot* 70:193–204. doi: 10.1093/jxb/ery350
- Slafer GA (2003) Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142:117–128
- Song Q, Yan L, Quigley C, et al (2017) Genetic Characterization of the Soybean Nested Association Mapping Population. *Plant Genome*. doi: 10.3835/plantgenome2016.10.0109

- Stich B, Möhring J, Piepho HP, et al (2008) Comparison of mixed-model approaches for association mapping. *Genetics* 178:1745–1754. doi: 10.1534/genetics.107.079707
- Turner A, Beales J, Faure S, et al (2005) Botany: The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* (80-) 310:1031–1034. doi: 10.1126/science.1117619
- Ulukan H (2008) Agronomic adaptation of some field crops: A general approach. *J Agron Crop Sci* 194:169–179. doi: 10.1111/j.1439-037X.2008.00306.x
- Vatter T, Maurer A, Kopahnke D, et al (2017) A nested association mapping population identifies multiple small effect QTL conferring resistance against net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) in wild barley. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0186803
- Vatter T, Maurer A, Perovic D, et al (2018) Identification of QTL conferring resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis f. sp. hordei*) and leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley using nested association mapping (NAM). *PLoS One* 13:e0191666. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0191666
- Von Zitzewitz J, Szűcs P, Dubcovsky J, et al (2005) Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol Biol* 59:449–467. doi: 10.1007/s11103-005-0351-2
- Wang G, Schmalenbach I, von Korff M, et al (2010) Association of barley photoperiod and vernalization genes with QTLs for flowering time and agronomic traits in a BC2DH population and a set of wild barley introgression lines. *Theor Appl Genet* 120:1559–1574. doi: 10.1007/s00122-010-1276-y
- Wiegmann M, Maurer A, Pham AT, et al (2019) Barley yield formation under abiotic stress depends on the interplay between flowering time genes and environmental cues. *Sci Rep* 9:1–16. doi: 10.1038/s41598-019-42673-1
- Wingeyer A, Amado T, Pérez-Bidegain M, et al (2015) Soil Quality Impacts of Current South American Agricultural Practices. *Sustainability* 7:2213–2242. doi: 10.3390/su7022213

- Xavier A, Jarquín D, Howard R, et al (2018) Genome-wide analysis of grain yield stability and environmental interactions in a multiparental soybean population. *G3 Genes, Genomes, Genetics*. 8:519–529. doi: 10.1534/g3.117.300300
- Xavier A, Xu S, Muir W, Rainey K (2015) NAM: association studies in multiple populations. *Bioinformatics* 31:3862–3864. doi: 10.1093/bioinformatics/btv448
- Yan L, Fu D, Li C, et al (2006) The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19581–19586. doi: 10.1073/pnas.0607142103
- Yu J, Buckler E (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:155-160. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.003>
- Yu J, Holland J, McMullen M, Buckler E (2008) Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics*. 178:539-551. doi: 10.1534/genetics.107.074245
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14:415–421. doi: 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x
- Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457–1468
- Ziyatdinov A, Vázquez-Santiago M, Brunel H, et al (2018) lme4qtl: Linear mixed models with flexible covariance structure for genetic studies of related individuals. *BMC Bioinformatics* 19:68. doi: 10.1186/s12859-018-2057-x
- Zohary D, Hopf M, Weiss E (2012) *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press

2.8. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material Table 1. Trait's description, locations and years where these were measured.

Trait	Trait names	Unit	Description	EEMAC 2015	EEMAC 2016	EEMAC 2017A	EEMAC 2017B	EEMAC 2017C	EEMAC 2018A	EEMAC 2018B	EELE 2015	EELE 2016	MUSA 2015	MUSA 2016	MOSA 2015	MOSA 2016
TGW	Thousand Grain Weighth	Grams	Corrected to 12% moisture content	+	+	+	+		+	+	+	+	+			+
YLD	Yield	Kg ha ⁻¹	Corrected to 12% moisture content	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
PML	Plumpness	%	Grains > 2.5mm	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
GN	Grains/m ²	Number	Number of grains per square metre	+	+	+	+		+	+	+	+	+			+
PIY	Plump Yield	Kg ha ⁻¹	Yield of grains > 2.5 mm	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
SPM	Spikes per square	Number							+	+						
GS	Grains per spike	Number	Average of grains per spike in 1 lineal meter						+	+						
PH	Plant height	Centimeter	Centimeters from the soil surface to the base of the spike	+	+				+	+			+			
Z20	Tillering beginning	GDD	4 leaves unfolded - Main stem only			+	+	+	+	+						
Z22	Tillering	GDD	Main stem and two tillers			+	+	+	+	+						
Z30	Steam elongation	GDD	First node palpable at soil surface		+	+	+	+	+	+						
Z49	Flowering	GDD	First awns visible	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Z90	Maturity	GDD	Maturity		+	+	+	+	+	+						
PPR	Photoperiod response	Ratio	Ratio of the GDD required by a genotype to flower at early sowing date and late sowing date			+	+	+	+	+						

Supplementary material Table 2. Basic summary statistics of individual experiments.

Experiment	Trait	Mean	Sd	CV (%)	Min	Max
EEMAC 2015	Z49	1303.5	42.3	3.2	1222.4	1482.4
	YLD	5410.0	726.4	13.4	2969.7	6995.2
	PML	88.5	3.8	4.3	75.7	94.8
	TGW	44.1	2.4	5.5	37.9	49.3
	GN	12311.0	1739.8	14.1	6428.1	17401.0
	PIY	4793.7	757.5	15.8	2626.0	6386.5
EEMAC2016	Z30	702.2	22.8	3.3	638.1	780.3
	Z49	1078.8	41.7	3.9	996.6	1179.9
	Z58	1327.0	68.7	5.2	1027.8	1425.4
	Z90	1778.6	77.1	4.3	1345.1	1911.1
	SE	376.6	32.3	8.6	297.0	449.8
	GF	699.8	69.2	9.9	302.7	862.2
	YLD	4920.6	685.8	13.9	1872.9	6632.9
	PML	97.1	1.0	1.0	92.8	98.8
	TGW	47.4	2.5	5.2	41.5	54.0
	GN	10442.0	1645.6	15.8	3598.7	14534.3
PIY	4785.1	654.4	13.7	1877.1	6357.8	
EEMAC2017A	Z20	259.6	15.7	6.0	227.8	309.1
	Z22	358.2	4.9	1.4	351.0	368.9
	Z30	683.6	28.4	4.2	612.5	825.5
	Z49	1303.3	67.3	5.2	1106.4	1453.6
	Z90	2087.3	62.0	3.0	1800.2	2271.3
	Z22_Z20	98.6	14.8	15.0	47.2	130.4
	Z30_Z22	325.5	27.6	8.5	249.6	470.6
	SE	619.7	62.4	10.1	439.2	772.0
	GF	784.1	73.7	9.4	575.6	1000.6
	YLD	5062.7	1490.7	29.4	1741.5	10368.2
	PML	65.4	14.7	22.5	29.8	94.5
	TGW	37.2	5.9	16.0	20.8	49.0
	GN	21257.6	1974.3	9.3	16671.3	27848.5
	PIY	3418.1	1446.6	42.3	545.1	6805.0

Continue supplementary material Table 2...

Experiment	Trait	Mean	Sd	CV (%)	Min	Max
EEMAC2017B	Z20	238.0	14.5	6.1	200.2	281.0
	Z22	350.4	25.1	7.2	306.7	419.1
	Z30	676.2	40.5	6.0	576.7	824.1
	Z49	997.4	65.1	6.5	836.5	1138.3
	Z90	1801.8	93.7	5.2	1520.7	1971.0
	Z22_Z20	112.5	16.5	14.7	76.5	162.9
	Z30_Z22	325.7	31.8	9.8	256.4	463.0
	SE	321.3	55.8	17.4	160.1	436.6
	GF	804.4	74.4	9.3	414.7	977.1
	YLD	3877.2	963.8	24.9	1334.0	6550.6
	PML	88.2	4.8	5.4	73.7	96.2
	TGW	43.6	2.4	5.6	37.8	49.1
	GN	8849.2	2461.4	27.8	1535.4	14757.2
	PIY	3443.3	924.0	26.8	623.7	5842.3
EEMAC2017C	Z20	438.0	20.8	4.8	369.1	509.7
	Z22	542.7	23.7	4.4	492.1	620.1
	Z30	706.6	34.6	4.9	620.3	766.2
	Z49	1073.7	107.1	10.0	837.1	1284.3
	Z90	1738.9	90.8	5.2	1550.2	1908.0
	Z22_Z20	104.7	19.2	18.3	62.1	159.3
	Z30_Z22	195.9	41.9	21.4	82.9	312.6
	SE	335.0	70.1	20.9	181.0	470.2
	GF	665.3	54.3	8.2	532.9	842.9
EEMAC2018A	Z20	302.2	13.0	4.3	262.8	332.4
	Z22	342.0	18.2	5.3	306.8	395.7
	Z30	765.6	29.4	3.8	656.8	839.9
	Z49	1062.1	41.5	3.9	968.4	1164.1
	Z90	1827.5	37.3	2.0	1727.8	1931.0
	Z22_Z20	39.9	13.3	33.4	15.4	75.7
	Z30_Z22	423.6	31.1	7.4	339.6	492.3
	SE	296.5	37.0	12.5	215.3	400.8
	GF	765.4	31.4	4.1	665.4	849.7
	YLD	5142.5	1149.1	22.3	2294.0	8087.0
	PML	96.4	3.8	4.0	60.7	98.8
	TGW	48.5	2.8	5.8	39.9	56.8
	GN	12728.3	1552.8	12.2	9028.7	16886.2
	PIY	5901.3	701.1	11.9	4189.4	7612.0
	SPM ²	777.4	112.5	14.5	491.8	1174.2
GPS	21.7	3.5	15.9	12.0	29.5	

Continue supplementary material Table 2...

Experiment	Trait	Mean	Sd	CV (%)	Min	Max
EEMAC2018B	Z22	347.9	21.1	6.1	310.4	393.9
	Z30	727.0	22.8	3.1	646.0	787.7
	Z49	1038.3	57.1	5.5	912.0	1153.6
	Z90	1712.4	84.0	4.9	1556.7	1866.8
	Z30_Z22	379.1	26.5	7.0	299.7	440.3
	SE	311.2	50.9	16.4	199.5	419.1
	GF	674.1	64.3	9.5	501.5	814.6
	YLD	3550.5	828.2	23.3	952.0	5141.0
	PML	69.2	13.7	19.8	22.5	90.8
	TGW	38.3	3.7	9.7	28.4	45.9
	GN	9229.4	1937.8	21.0	2870.3	14679.6
	PIY	2529.6	888.6	35.1	442.8	4324.6
	SPM ²	723.5	107.5	14.9	487.0	1090.0
	GPS	12.9	2.6	20.1	4.6	20.8
INIA2015	Z49	1234.7	38.9	3.2	1138.5	1333.4
	YLD	9112.4	863.8	9.5	6601.7	11439.6
	PML	97.8	0.4	0.4	96.0	98.3
	TGW	50.4	2.1	4.2	44.4	56.4
	GN	18108.0	1929.3	10.7	13427.8	24370.3
	PIY	8909.1	854.3	9.6	6245.7	11079.0
INIA2016	Z49	1211.3	34.9	2.9	1094.6	1259.1
	YLD	5536.8	844.9	15.3	3226.1	7514.1
	PML	94.7	1.3	1.3	86.9	96.9
	TGW	45.2	1.9	4.3	40.5	53.2
	GN	12307.0	2085.4	16.9	6449.3	17801.6
	PIY	5251.6	822.3	15.7	2741.2	7026.7
MOSA2015	YLD	7132.9	1034.8	14.5	4595.7	9057.3
	PML	81.8	9.5	11.6	37.3	95.7
	PIY	5877.7	1225.9	20.9	2485.4	8227.0
MOSA2016	YLD	8169.3	779.7	9.5	5007.5	9611.9
	PML	96.8	1.4	1.5	90.8	99.4
	TGW	50.4	3.4	6.7	39.0	57.4
	GN	16315.0	1973.5	12.1	9983.3	22063.2
	PIY	7899.4	771.2	9.8	4870.2	9369.6
MUSA2015	YLD	3839.3	881.2	23.0	1653.1	6074.1
	PML	87.0	5.7	6.6	57.9	94.9
	TGW	40.4	3.4	8.4	30.4	50.5
	GN	9563.8	2150.1	22.5	4499.5	15111.4
	PIY	3358.0	859.2	25.6	1383.9	5559.0

Continue supplementary material Table 2...

Experiment	Trait	Mean	Sd	CV (%)	Min	Max
MUSA2016	YLD	3920.1	1061.9	27.1	592.2	6260.0
	PML	94.4	1.3	1.3	86.8	96.5
	PIY	3715.9	1025.6	27.6	542.9	5924.7
	DZ58	96.5	2.3	2.4	91.0	102.4

Supplementary Table 3. Range of phenotypic correlation of studied traits in the population. Minimums are shown in the lower diagonal and maximums in the upper diagonal.

	YLD	PML	TGW	GN	PIY	Z30	Z49	Z90	SE	GF
YLD	1	0.63	-0.25	0.97	0.99	-0.01	0.11	0.44	0.26	0.42
PML	-0.21	1	0.72	0.4	0.87	0.10	0.03	0.24	-0.05	0.49
TGW	-0.25	-0.02	1	0.16	0.68	0.02	-0.05	0.16	0.02	0.5
GN	0.78	-0.39	-0.6	1	0.91	0	0.29	0.36	0.26	0.37
PIY	0.90	-0.11	-0.21	0.61	1	-0.02	0.11	0.37	0.25	0.47
Z30	-0.51	-0.22	-0.26	-0.32	-0.3	1	0.82	0.85	0.51	0.12
Z49	-0.53	-0.3	-0.30	-0.38	-0.56	0.38	1	0.86	0.92	0.03
Z90	-0.31	-0.22	-0.05	-0.25	-0.32	0.05	0.35	1	0.45	0.84
SE	-0.36	-0.19	-0.22	-0.31	-0.29	-0.12	0.72	0.26	1	-0.01
GF	-0.16	-0.01	0	-0.11	-0.12	-0.39	-0.62	-0.02	-0.54	1

Supplementary material Table 4. Maker distribution and coverage across chromosomes

Chromosome	Chromosome length^a	Number of markers	Marker coverage^b	Max spacing
1H	132.9	535	4.0	7.9
2H	149.2	1093	7.3	12.7
3H	154.9	1039	6.7	7.5
4H	117.3	644	5.5	13.5
5H	169.4	1148	6.8	9
6H	126.5	817	6.5	7.3
7H	141.4	1064	7.5	4.4
Overall	991.5	6340	6.4	
	Average	905.7		

^a Chromosome length in cM

^b Numbers of markers per cM

Supplementary material Table 5. Genetic relationship between parental lines.

	Conchita	Kalena	Livia	CLE267	CLE268
Conchita	1	0.69	0.59	0.46	0.41
Kalena	0.69	1	0.66	0.38	0.36
Livia	0.59	0.66	1	0.44	0.42
CLE267	0.46	0.38	0.44	1	0.74
CLE268	0.41	0.36	0.42	0.74	1

Supplementary material Table 6. Number of QTLs, proportion of the phenotypic variance explained (PVE) by QTLs identified from GWAS for studied traits with the SNP name, location and phenotypic variation explained by it.

Trait id	QTLs ^a	SNP ^b	Chromosome ^c	Phenotypic variation explained (%) ^d	Environment
Z22	4	016-222317	3H (148.37)	13.79	EEMAC17A
		016-415610	6H (78.12)	3.22	EEMAC17C
		016-412243	6H (69.05)	2.54	
		016-379573	6H (31.94)	10.05	
Z30	4	016-58046	1H (132.86)	12.04	EEMAC16
		016-160096	3H (25.5)	14.87	EEMAC17B
		016-73422	2H (19.9)	26.12	EEMAC17C
		016-519430	7H (141.08)	10.05	
Z49	12	016-37949	1H (82.12)	10.96	EELE16
		016-92911	2H (58.64)	7.7	
		016-101709	2H (63.63)	9.24	EEMAC15
		016-184722	3H (55.52)	16.92	
		016-202816	3H (98.65)	11.46	
		016-379057	6H (28.54)	10.82	
		016-96611	2H (58.64)	8.52	EEMAC16
		016-459904	7H (34.21)	11.5	EEMAC17A
		016-74351	2H (23.16)	15.72	EEMAC17B
		016-73422	2H (19.9)	38.06	EEMAC17C
		016-459904	7H (34.21)	11.05	EEMAC18A
Z90	4	016-156344	3H	8.09	EEMAC17A
		016-73422	2H (19.9)	28.45	EEMAC17C
		016-97	1H (0.11)	17.83	EEMAC18B
		016-405730	6H (60.69)	7.78	
TL	4	016-160096	3H (25.5)	14.41	EEMAC17B
		016-308961	5H (59.45)	11.29	
		016-312319	5H (75.56)	11.46	
		016-73422	2H (19.9)	21.31	

Continue Supplementary material Table 6...

Trait id	QTLs ^a	SNP ^b	Chromosome ^c	Phenotypic variation explained (%) ^d	Environment
SE	5	016-459904	7H (34.21)	13.3	EEMAC17A
		016-73422	2H (19.9)	19.34	EEMAC17B
		016-71617	2H (14.38)	36.66	EEMAC17C
		016-80847	2H (47.78)	10.79	
		016-73422	2H (19.9)	16.61	EEMAC18B
GF	4	016-73755	2H (22.17)	17.37	EEMAC17C
		016-462186	7H (43.84)	20.48	EEMAC18A
		016-7974	1H (8.43)	10.17	EEMAC18B
		016-11221	1H (16.43)	10.82	
PPR_SE	2	016-73422	2H (19.9)	33.37	EEMAC17
		016-73422	2H (19.9)	12.03	EEMAC18
PPR_Z49	2	016-73438	2H (19.9)	34.17	EEMAC17
		016-71922	2H (16.78)	23.6	EEMAC18
PPR_Z90	3	016-4906	1H (4.96)	12.22	EEMAC18
		016-10363	1H (15.08)	13.75	
		016-74094	2H (23.16)	10.54	
PPR_GF	2	016-5675	1H (4.96)	18.81	EEMAC18
		016-11221	1H (16.43)	24.49	
GN	3	016-425704	6H (105.59)	6	EEMAC16
		016-313840	5H (76.04)	7.1	EEMAC18A
		016-183513	3H (54.53)	10.2	EEMAC18B
TGW	1	016-184503	3H (55.1)	13.3	EELE16
PML	6	016-493193	7H (91.78)	12.38	MOSA15
		016-497745	7H (103.25)	9.09	EELE15
		016-184720	3H (55.52)	11.09	EEMAC16
		016-451629	7H (13.95)	13.97	EEMAC17A
		016-185325	3H (55.24)	9.46	EEMAC18A
		016-509860	7H (126.42)	7.68	EEMAC18A

Continue Supplementary material Table 6...

Trait id	QTLs ^a	SNP ^b	Chromosome ^c	Phenotypic variation explained (%) ^d	Environment
PIY	10	016-377313	6H (18.57)	9.15	EELE16
		016-7452	1H (8.43)	12.69	MOSA15
		016-270	1H (0.11)	10.19	MUSA15
		016-127741	2H (122.86)	13.35	MUSA16
		016-498211	7H (104.82)	14.88	MUSA16
		016-112145	2H (94.69)	11.06	EEMAC16
		016-7793	1H (8.43)	17.19	EEMAC17A
		016-344169	5H (137.92)	7.5	EEMAC18A
		016-270	1H (0.11)	12.4	EEMAC18B
		016-193139	3H (68.2)	11.2	EEMAC18B
YLD	10	016-377313	6H (18.57)	8.52	EELE16
		016-112145	2H (94.69)	10.37	EEMAC16
		016-426104	6H (105.59)	6.92	
		016-6448	1H (4.96)	21.18	EEMAC17A
		016-10391	1H (16.36)	12.02	
		016-313840	5H (76.04)	6.59	EEMAC18A
		016-193139	3H (68.2)	20.05	EEMAC18B
		016-7452	1H (8.43)	20.47	MOSA15
		016-211	1H (0.11)	8.88	MUSA15
		016-498211	7H (104.82)	13.5	MUSA16
PH	1	016-51096	1H (116.78)	10.46	EEMAC15

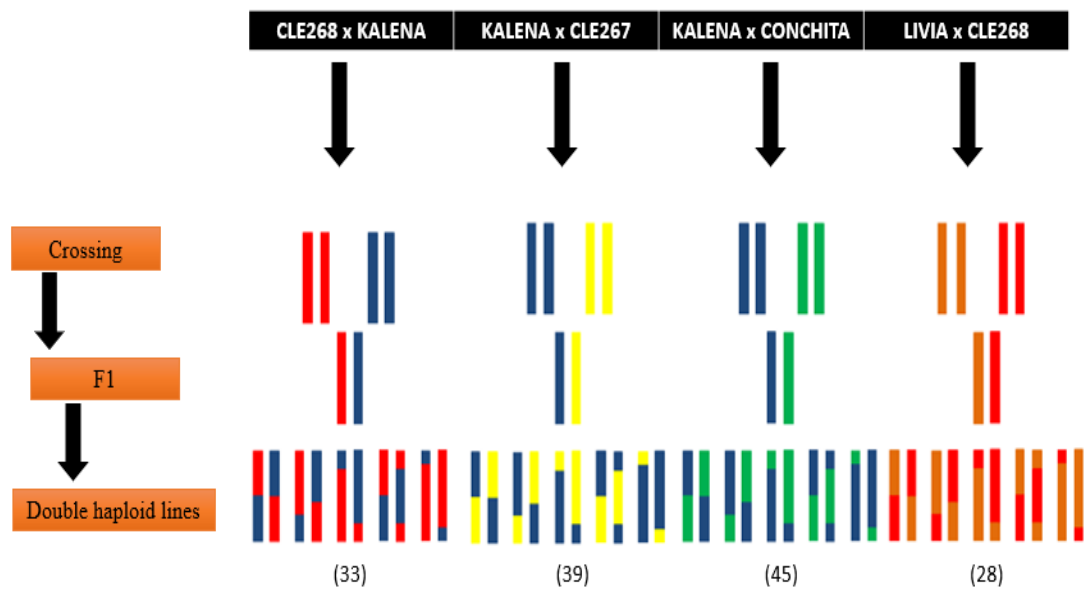
^a Number of QTL by trait

^b Most significant SNP of the QTL

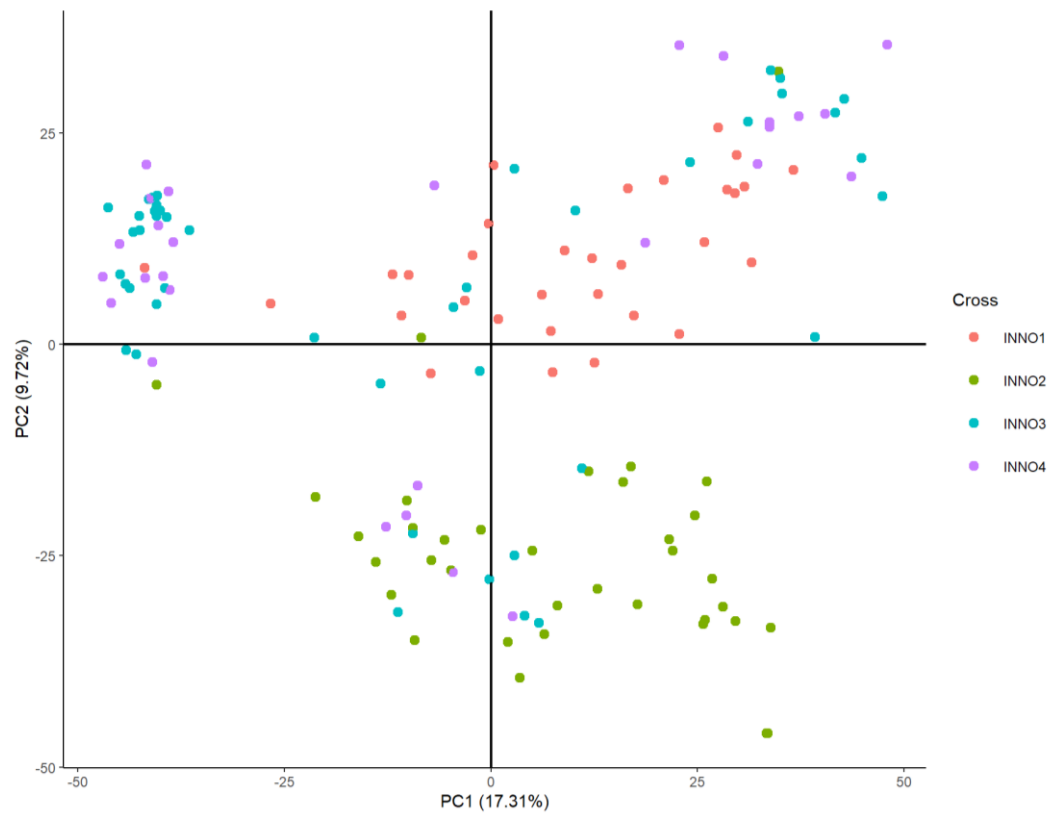
^c Chromosome and position of the most significant SNP based on Barleymap

^d Phenotypic variance explained by the QTL.

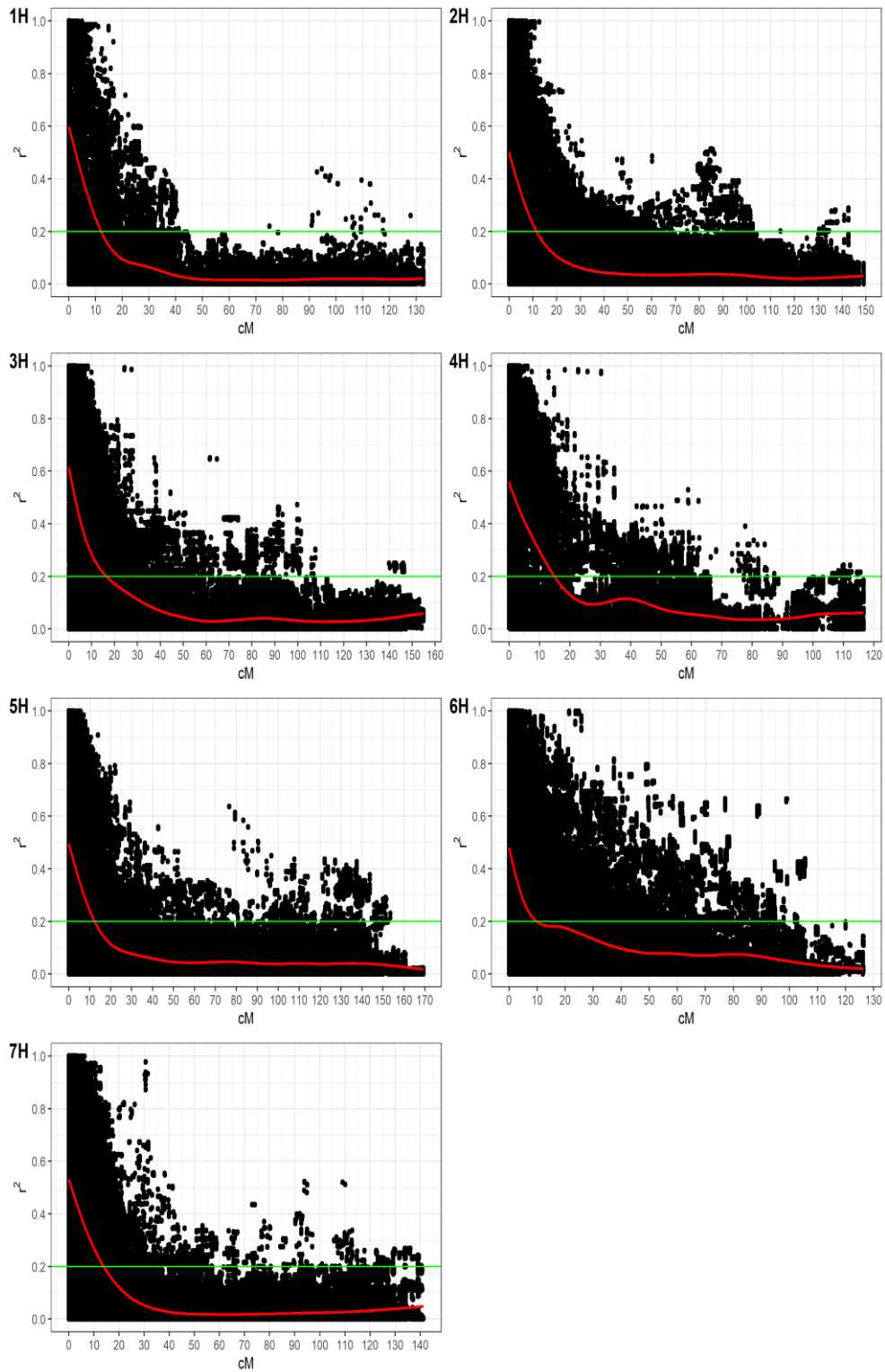
^e Environments where QTLs were detected.



Supplementary material Figure 1. Crossing scheme used for population development.



Supplementary material Figure 2. Principal component analysis assessed with genotypic data of 145 double haploid lines of the INNO-NAM population. The crosses were INNO1, CLE268 x Kalena; INNO2, Kalena x CLE267; INNO3, Kalena x Conchita; and INNO4, Livia x CLE268.



Supplementary material Figure S3. Scatter plot showing the linkage disequilibrium (LD) decay across the seven chromosomes. The genetic distance in cM is plotted against the LD estimate (r^2) for pairs of markers.

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

En cebada, al igual que en muchos otros cultivos, los genes responsables de la fenología son los principales determinantes de la adaptación del cultivo a los diferentes ambientes (Andrés y Coupland, 2012). La adaptación de un cultivo, frecuentemente medida a través de la productividad, depende de variables complejas que son afectadas por muchos genes e influenciadas de forma importante por el ambiente (Slafer, 2003). En el caso de cebada, esto es aún más importante ya que no solo se necesita ajustar el tiempo a floración para maximizar rendimiento (Hill *et al.*, 2019) para hacer coincidir el momento de llenado de grano con las mejores condiciones ambientales (Castro *et al.*, 1997), sino que también es necesario alcanzar ciertos parámetros de calidad que son requeridos por la industria maltera para poder comercializar el grano producido. Se han publicado muchos estudios acerca de los mecanismos que controlan la floración en cebada, pero pocos han estudiado variables y germoplasma representativo para las condiciones locales (Locatelli *et al.*, 2013).

Con el objetivo de: i) identificar regiones cromosómicas y genes candidatos relacionados a variables agronómicas de interés como rendimiento y duración del ciclo en las condiciones ambientales de Uruguay, ii) estudiar el efecto de la fenología sobre variables de interés económico, y iii) analizar la estabilidad de los QTLs detectados a través de los distintos ambientes, se instalaron experimentos en siembras contrastantes en cuatro localidades de la zona agrícola del litoral oeste. La población utilizada estuvo conformada por individuos doble haploides originados a partir de cruzamientos entre cultivares europeos de alto rendimiento y alta calidad maltera, y cultivares adaptados a las condiciones ambientales locales. Los cultivares utilizados como parentales son representativos del esquema de cruzamientos del programa de mejoramiento genético nacional. El presente reporte es el primer estudio de asociación realizado en una población de mapeo anidada generada a partir de cruzamientos entre cultivares modernos elite.

La serie de experimentos que incluyó el presente estudio (13 ensayos en total) permitió exponer a los genotipos a condiciones ambientales contrastantes abarcando la región agrícola de nuestro país, tanto en siembras tempranas como en siembras tardías (posteriores al 1 de agosto), así como también años con temperaturas cálidas

al inicio de primavera. Además, disponer de más de una fecha de siembra por año en los experimentos sembrados en la “Estación Experimental Mario A. Cassinoni” (EEMAC, Paysandú) nos permitió incluir a la respuesta al fotoperiodo dentro de nuestro análisis.

La población mostró una importante respuesta al fotoperiodo, llegándose a acortar como máximo 500 °GD la duración del periodo siembra-floración. Sin embargo, en los ensayos sembrados en el 2017 en la EEMAC se detectó la particularidad de que al sembrar en fechas tardías extremas (setiembre) el largo del ciclo a floración se alargó. Esta fecha de siembra (no previsible en términos productivos ya que expone al cultivo a condiciones sumamente estresantes por altas temperaturas durante todo su ciclo) podría exponer al cultivo en un ambiente de fotoperiodo máximo en el cual ya no es posible acortar su ciclo por mayores aumentos en las horas de luz. Otra hipótesis es que las altas temperaturas pueden haber afectado el normal desarrollo de los materiales tal como reportan algunos autores (García *et al.*, 2015; Jacott y Boden, 2020). En este sentido puede mencionarse que, en el mes de noviembre, momento en el cual los materiales se encontraban en plena etapa de encañado, se dieron picos de temperatura durante el día que superaron los 36 °C al tiempo que la temperatura nocturna promedio fue de 22 °C. Los individuos que forman parte de la familia INNO 3 originada a partir del cruzamiento entre 2 materiales europeos de ciclo largo (Kalena x Conchita) fueron los que más alargaron (200 °GD) su ciclo en comparación a las restantes familias.

Las correlaciones observadas del periodo siembra-floración con la subfase de encañado fueron positivas y altas (0,7-0,9), mientras que se correlacionó de forma moderada-alta con la duración del periodo siembra-inicio de encañado (0,4-0,8), por lo que para nuestro estudio la duración del periodo de encañado parece ser la de mayor importancia en determinar el tiempo a floración. La duración del periodo siembra-floración se correlacionó negativamente con la duración del periodo de llenado de grano, y dicha correlación fue más significativa cuanto más se retrasó la siembra.

Las correlaciones entre rendimiento y sus componentes fueron las esperadas. Rendimiento y número de granos por superficie mostraron una correlación positiva y

significativa, mientras que número de granos por superficie y peso de grano se correlacionaron negativamente. Por lo tanto, el rendimiento en las condiciones estudiadas se explicó principalmente por el número de granos por superficie. Entre peso y tamaño de grano se observaron bajas correlaciones.

En condiciones ambientales óptimas (siembras tempranas y años con bajas temperaturas) el rendimiento mostró una baja correlación con variables fenológicas, lo que implica que los genotipos concretaron su rendimiento sin ser afectados por la duración de las distintas fases fenológicas. Sin embargo, bajo condiciones ambientales potencialmente más estresantes (siembras tardías con altas temperaturas a final de ciclo), el largo de ciclo se correlacionó negativamente con rendimiento. En estos casos las altas temperaturas durante el llenado de grano no permitieron concretar el rendimiento generado durante las primeras etapas del ciclo del cultivo. Por otra parte, una mayor duración del periodo de llenado de grano se asoció de forma positiva y significativa con un mayor tamaño y peso de grano en todos los ambientes.

La estructura genética de la población reflejó el diseño de cruzamientos. La separación de grupos no fue tan clara como en otros casos en los que se contaba con una población conformada por individuos con distintos orígenes, hábitos de crecimiento o número de hileras en la espiga (Locatelli *et al.*, 2013). En nuestro caso es esperable una menor diferencia genética entre los individuos ya que se trata de una población generada a partir de cruza de materiales modernos de alta performance con una similitud genética que osciló entre 36 y 74%, en la que además es presumible que gran parte de los alelos favorables ya se encuentren fijados.

La caída de desequilibrio de ligamiento estimada en la población es baja, debido a que se trata de una población de dobles haploides generada a partir de una F1 en la que ocurrió solo un evento de recombinación. Adicionalmente, los cultivares adaptados localmente que se utilizaron como parentales tienen una similitud genética del 74% como consecuencia de que ambas líneas son hijas del cultivar INIA Arrayán (CLE267: INIA Arrayán/ND17380, CLE268: INIA Arrayán/Norteña Carumbé), mientras que la menor similitud genética se observó entre los materiales CLE268 y Kalena con un 36%. La caída de desequilibrio de ligamiento ($r^2=0,20$) promedio para

todos los cromosomas fue de 13,3 cM, con un mínimo de 9,9 cM en el cromosoma 6H, y un máximo de 16,4 cM en el cromosoma 3H.

Incorporar la estructura genética de la población (incluyendo a los dos componentes principales del PCA) resultó ser el método más eficiente para el mapeo asociativo. Se detectaron 77 QTLs considerando todas las combinaciones variable/ambiente. Los cromosomas 1H y 2H fueron en los que se ubicó el mayor número de QTLs, con 18 y 22 QTLs respectivamente. No se detectaron asociaciones para todas las variables estudiadas, ni se detectaron QTLs en todos los experimentos. Varios de los QTLs que reportamos fueron detectados en más de un ambiente y compartidos por diferentes variables. Además, varios de los QTLs identificados coinciden en su ubicación en el genoma lo cual nos permitió identificar 9 regiones hotspot. Declaramos una región “hotspot” cuando detectamos al menos 3 asociaciones marcador-carácter en un intervalo de ≤ 10 cM, tal como fue reportado en Herzig *et al.* (2019). Una región hotspot es considerada una región pleiotrópica capaz de afectar varias variables de forma simultánea (Fernández-Calleja *et al.*, 2021).

En la inmensa mayoría de los QTLs detectados (a excepción de un QTL para rendimiento en el ambiente EEMAC18A) fue posible identificar varios SNPs significativos con un alto nivel de desequilibrio de ligamiento entre ellos. La baja caída de desequilibrio de ligamiento presente en la población limitó la resolución del análisis, determinando la presencia de grandes bloques de ligamiento y por lo tanto que los QTL detectados fueran de gran longitud. La detección de bloques de ligamiento tan importantes se debe al tipo de población utilizada, ya que se dio lugar a un solo evento de recombinación. Además, es esperable que poblaciones o individuos que han pasado por sucesivos procesos de selección artificial tengan grandes regiones conservadas que están asociadas a variables seleccionadas tales como tiempo a floración, resistencia a enfermedades y parámetros de calidad (Qian *et al.*, 2014). Si bien la forma en que fue construida la población limitaría el efecto de dicho fenómeno, la alta similitud entre las líneas parentales lo favorece. Todo lo mencionado anteriormente implica que sea complejo determinar la ubicación precisa de un determinado gen, aunque debido al importante número de marcadores moleculares utilizados en nuestro trabajo, y su buena distribución (presencia de solo

dos intervalos sin marcadores) es probable que un marcador detectado como significativo en nuestro análisis haya sido previamente asociado a un gen. A su vez, las desventajas ya mencionadas en cuanto a la resolución de mapeo como consecuencia de la baja caída de ligamiento no imposibilitan la detección de regiones cromosómicas responsables de variables de interés ni la aplicabilidad de los resultados por el programa de mejoramiento nacional, siempre y cuando los alelos favorables no se encuentren en estado de repulsión.

No se observaron valores muy elevados de significancia en las asociaciones marcador-carácter detectadas, ya que al tratarse de una población generada a partir de cruzamientos entre materiales modernos elite es esperable que no existan alelos demasiado raros como en el caso de poblaciones generadas a partir de genotipos salvajes y cultivares modernos (Pham *et al.*, 2020).

Para el caso de variables asociadas a rendimiento, las cuales son muy complejas y construidas a su vez por otras variables (GN, TGW, SPM) se detectaron mayormente en los ambientes de NSD (siembras tempranas, mayor potencial de rendimiento), ya que este tipo de variables es frecuentemente afectado por el ambiente provocando una importante caída de la heredabilidad en ambientes restrictivos (Ceccarelli *et al.*, 1992; van Eeuwijk *et al.*, 2010). Por otra parte las variables fenológicas fueron detectadas mayormente en ambientes estresantes (siembras tardías, menor potencial de rendimiento). Esto coincide en parte con lo reportado por Locatelli *et al.* (2013), que logró detectar una mayor cantidad de QTLs en ambientes de alto potencial.

Los cultivares utilizados como parentales poseen un diferente largo de ciclo a floración, lo que permitió detectar varios QTLs asociados a la duración emergencia-floración, así como también QTLs asociados a la duración de las subfases emergencia-inicio de encañado y duración de encañado. Los parentales también difieren en su sensibilidad al fotoperiodo: las líneas CLE267 y CLE268 poseen una alta respuesta al fotoperiodo por ser materiales desarrollados por el programa de mejoramiento nacional, siendo la respuesta al fotoperiodo una característica que siempre se ha intentado incorporar en los materiales elite desarrollados localmente (Germán *et al.*, 2000).

Pudimos detectar 4 QTLs ubicados en regiones que contienen genes conocidos por modificar la duración del tiempo a floración; *Ppd-H1* y *HvCEN* ubicados en el cromosoma 2H (19,9 cM y 54 cM, respectivamente), *HvFT2* en el cromosoma 3H (54 cM) y *Vrn-H3* en el 7H (34 cM). En una revisión realizada por Hemshrot *et al.* (2019) se reporta que se han identificado hasta el momento 14 genes asociados a duración del tiempo a floración en poblaciones multiparentales de cebada. De los mencionados en esa revisión, el gen *HvFT2* que propusimos como gen candidato en el presente estudio nunca había sido reportado en poblaciones multiparentales. Si bien puede parecer llamativo que hayamos reportado tan solo cuatro genes y que incluso uno de ellos sea una novedad, es presumible que esto se deba a que en las demás poblaciones un genotipo salvaje fue utilizado como parental en todas las cruces generando una población de gran diversidad genética, y que además los materiales elite utilizados como parentales poseen genes que le confieren adaptación a zonas agroecológicas bien diferentes a las de Uruguay (diferente hemisferio y al menos 10 grados de latitud de diferencia) (Maurer *et al.*, 2015; Sannemann *et al.*, 2015; Pham *et al.*, 2020).

El número de familias y el número de individuos fenotipados por familia puede haber influido negativamente en la capacidad de detectar asociaciones. Previamente se ha demostrado mediante estudios de asociación en muestras de diferente tamaño utilizando una población con una diversidad genética mayor a la presente en la INNO-NAM, que las asociaciones detectadas disminuían de forma importante al muestrear cinco familias de un total de 50 (Hemshrot *et al.*, 2019). Esto es particularmente relevante si el objetivo es detectar QTLs de efecto menor, lo cual cobra importancia en nuestro estudio ya que como se mencionó anteriormente, se trata de una población con una diversidad genética acotada en la que probablemente la mayoría de los QTLs de efecto mayor ya han sido fijados por sucesivos ciclos de selección en los programas de mejoramiento.

Una estrategia para aumentar la capacidad de detección puede ser utilizar un gen o una región cromosómica como covariable. Esta estrategia ya ha sido implementada en estudios genéticos realizados tanto en cebada como en otros cultivos de importancia (Alqudah *et al.*, 2014; Hemshrot *et al.*, 2019; Xavier y Rainey, 2020),

teniendo como resultado la detección de regiones cromosómicas que se encontraban “enmascaradas” por el efecto de un gen relevante. En nuestro caso, sería una buena estrategia utilizar al gen *Ppd-H1* como covariable para poder detectar genes con una influencia menor sobre la duración del ciclo. Es sabido que la duración del ciclo afecta a otras variables agronómicamente importantes, y por lo tanto una diferente duración del tiempo a floración puede afectar la capacidad de detectar QTLs asociados a rendimiento y sus componentes, y en los casos de que sea posible identificar algún QTL es presumible que no se trate de un QTL de rendimiento “puro”, sino que sea el de una variable altamente correlacionada. El incluir en el análisis a aquellas regiones conocidas por tener efectos sobre fenología podría ayudar a identificar QTL que correspondan únicamente a rendimiento y sus componentes.

Por otra parte, la población aquí estudiada corresponde a la población de entrenamiento de un proyecto de selección genómica en la que los individuos fueron seleccionados al azar para desarrollar un algoritmo con el objetivo de predecir el mérito genético de los restantes miembros. En lugar de ser seleccionados al azar, otra estrategia podría haber sido seleccionar el mayor número de recombinantes posibles. Además, para ciertas características como potencial de rendimiento en ambientes óptimos, la cruce Kalena x Conchita podría estar disminuyendo la capacidad de detección de QTLs ya que ambos parentales corresponden a materiales de origen europeo de alto potencial de rendimiento en ambientes no estresantes.

La regulación de la fenología puede aportar grandes ventajas para la adaptación de los cultivos ya que permite hacer un uso más eficiente de los recursos aportados por el ambiente, y por lo tanto maximizar el rendimiento en grano (Richards, 1991; Alqudah *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2019). Un adecuado ajuste de la duración de las subfases del ciclo es una buena estrategia para incrementar el rendimiento en grano en ambientes en donde los cultivos sufren estreses abióticos como temperaturas elevadas. En este sentido, nuestro análisis utilizando una población NAM con una diversidad genética acotada y representativa a la utilizada por el mejoramiento nacional aporta información relevante para la región sur de Sudamérica y aquellos QTLs implicados en la adaptación a ambientes específicos.

Una mayor duración del periodo encañado sin modificar la duración del periodo siembra-floración ha sido señalado como una posibilidad para incrementar el rendimiento (Alqudah y Schnurbusch, 2014). En nuestro caso, y contrario a lo reportado por Borràs-Gelonch *et al.* (2010) y Castro *et al.* (2017b), nuestros resultados no nos permiten afirmar que ambas etapas (siembra-inicio de encañado, inicio de encañado-floración) tengan un control genético independiente, y que por lo tanto sea posible modificar la duración de las subfases previas a floración, sin modificar la fase siembra-floración. Se detectó un QTLs con efecto mayor en el cromosoma 2H (región del gen *Ppd-H1*) afectando la duración siembra-Z30 (detectado en el ambiente EEMAC17C) y la duración Z30-floración (detectado en los ambientes EEMAC17B, EEMAC17C y EEMAC18B). Adicionalmente, otro QTL localizado en el cromosoma 7H (región del gen *Vrn-H3*) mostró efectos sobre Z49 en ambientes de siembras normales (EEMAC17A y EEMAC18A), al mismo tiempo que afectó la duración de encañado (EEMAC17A) y la duración del llenado de grano (EEMAC18A). Sin embargo, fue posible identificar 2 QTLs con efectos exclusivamente sobre el periodo de macollaje en el experimento EEMAC17B (ambiente de siembra tardía), por lo que la acumulación de alelos favorables podría ser una opción para mejorar el ajuste fenológico del cultivo reduciendo así el tiempo a floración sin modificar el periodo crítico de mortalidad de primordios florales (Kirby, 1988).

Una mayor duración del periodo de llenado de grano está asociado con un mayor rendimiento en grano (Castro *et al.*, 1997). Nuestro estudio detectó 4 QTLs para duración de llenado de grano, uno de los cuales se ubica en la región del gen *Ppd-H1*. Los alelos favorables para incrementar la duración del llenado de grano de este QTL también fueron identificados como los negativos para reducir el periodo siembra-Z30. Por lo tanto, otros genes deben considerarse con el objetivo de incrementar la duración del llenado de grano. Un QTL ubicado en el cromosoma 1H con efectos pleiotrópicos sobre llenado de grano, rendimiento y número de granos, y que además presentó cierta estabilidad al detectarse en ambientes de fechas normales (EEMAC17A, EEMAC18A, EELE15, MOSA15, MOSA16) y en un ambiente de fechas tardía (EEMAC18B) debe ser tenido en cuenta a la hora de incorporar alelos

que permitan mejorar la adaptación a nuestros ambientes de producción. Esta región cromosómica es de gran importancia ya que parece estar relacionada a la estabilidad de rendimiento en ambientes más restrictivos.

La incorporación de genes de respuesta a fotoperiodo ha sido uno de los objetivos del programa de mejoramiento genético nacional desde sus inicios (Germán *et al.*, 2000). Por lo tanto, la incorporación de alelos que permitan incrementar el potencial de rendimiento, así como su estabilidad a través de los diferentes ambientes en el sistema de producción nacional, el cual incluye siembras tardías y en la región norte exponiendo al cultivo a mayores temperaturas durante el periodo de llenado de grano debe llevarse a cabo, siempre, partiendo de genotipos que sean portadores del alelo de sensibilidad del fotoperiodo.

Poblaciones multiparentales con reducida diversidad genética, producto de haber sido creadas mediante cruzamientos de genotipos elite, en los cuales se espera que la gran mayoría de los alelos favorables ya hayan sido fijados debido a las sucesivas selecciones a las cuales los genotipos fueron sometidos en los programas de mejoramiento, permiten volcar rápidamente los conocimientos generados en los programas de mejoramiento (Scott *et al.*, 2020). El diseño de cruzamientos utilizado en nuestro caso es contrario al objetivo planteado hasta ahora en anteriores diseños NAM, en los que se buscaba descubrir alelos novedosos para capturar una mayor diversidad genética a la presente en la cebada domesticada (Hemshrot *et al.*, 2019). La realización de un mapeo asociativo utilizando la población INNO-NAM tiene como principal ventaja la rápida utilización de los resultados que se generen, y así mejorar la eficiencia y acelerar el desarrollo de nuevos cultivares, ya que los materiales utilizados como parentales para generar la población son altamente representativos de los utilizados en cruzamientos a nivel nacional. Este último punto, tal vez sea un poco contradictorio con el paradigma que afirma que el éxito en el mejoramiento genético vegetal depende de la disponibilidad de una amplia variación genética a la cual se pueda recurrir para solucionar problemas (Jung *et al.*, 2018). Por otra parte, los paneles NAM pueden ser diseñados con el objetivo de seleccionar una nueva variedad (Hernandez *et al.*, 2020).

La información aquí generada permitirá avanzar en el conocimiento de los factores genéticos responsables de variables de importancia agronómica en germoplasma representativo del presente en el mejoramiento genético nacional. Los resultados son prometedores para aumentar la eficiencia en el desarrollo de nuevos cultivares. Puede mencionarse que a pesar de que la selección asistida por marcadores no ha tenido el éxito que se esperaba inicialmente en su implementación con caracteres cuantitativos (Collard y Mackill, 2007; Ashraf y Foolad, 2013), podría ser una metodología a implementar en conjunto con las nuevas estrategias de selección genómica, permitiendo identificar aquellos genotipos con el haplotipo “ideal” para una determinada característica dentro de aquellos identificados con mayor mérito genético mediante selección genómica. Con la implementación de ambos enfoques estaríamos contrarrestando aquellas pérdidas que podrían surgir por romper las interacciones epistáticas que sean favorables, particularmente en características de calidad maltera (de difícil medición y definitorias al momento de liberar cultivares) y en las cuales la selección genómica aporta grandes ventajas por disminuir los costos asociados a su medición.

Aún no ha sido estudiado, al menos en este tipo de poblaciones, como es afectada la calidad maltera por cambios en la fenología. Es probable que existan efectos epistáticos responsable de la calidad maltera que sean afectados si se realizan cambios en la fenología del cultivo. En este sentido, parece necesario realizar estudios genómicos que analicen parámetros de calidad como contenido de beta-glucanos, extracto de malta, contenido de proteína y nitrógeno soluble.

Si bien se han realizado previamente algunos estudios de asociación en cebada en nuestro país, ninguno ha utilizado un germoplasma tan representativo del mejoramiento, ni ha combinado un fenotipado amplio con un conjunto de ambientes con condiciones agroecológicas contrastantes como en nuestro caso, por lo que creemos que este trabajo hace un aporte importante para potenciar el programa de mejoramiento genético nacional.

4. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abeledo CR. 2006. Programas de investigación orientados a la resolución de problemas: el caso de la Mesa de la Cebada de Uruguay. *Redes*. 12(23): 129-150. doi: 20.500.11807/609
- Alqudah AM, Schnurbusch T. 2014. Awn primordium to tipping is the most decisive developmental phase for spikelet survival in barley. *Functional Plant Biology*, 41(4), 424. doi: 10.1071/FP13248
- Alqudah AM, Sharma R, Pasam RK, Graner A, Kilian B, Schnurbusch T. 2014. Genetic dissection of photoperiod response based on gwas of pre-anthesis phase duration in spring barley. *PLoS ONE*, 9(11), e113120. doi: 10.1371/journal.pone.0113120
- Andrade JF, Satorre E. 2015. Single and double crop systems in the Argentine Pampas: Environmental determinants of annual grain yield. *Field Crops Research*, 177(0), 137–147. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2015.03.008>
- Andrés F, Coupland G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrg3291
- Arias GN. 1995. Mejoramiento genético y producción de cebada cervecera en América del Sur. Santiago de Chile: FAO. (F014. 006). 157pp.
- Ashraf M, Foolad MR. 2013. Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. *Plant Breeding*, 132(1), 10–20. doi: 10.1111/PBR.12000
- Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Salamini F. 2000. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330
- Bennett M, Smith J. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 274(933), 227–274. doi: 10.1098/RSTB.1976.0044

- Bernardo R. 2010. Plant breeding and population genetics. En: Breeding for quantitative traits in plants. Woodbury, Minnesota. Stemma Press. 1–14.
- Bernardo R. 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: Learning from the last 20 years. Crop Science. doi: 10.2135/cropsci2008.03.0131
- Bianco M. 2005. Públicos y privados en la investigación, el caso de la Mesa nacional de Entidades de Cebada Cervecera. En: Dinacyt. Montevideo: Dinacyt.
- Blattner F. 2018. Taxonomy of the Genus *Hordeum* and Barley (*Hordeum vulgare*). En: Muehlbauer NS (Eds.). The Barley Genome (pp. 11–23). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-92528-8
- Borràs-Gelonch G, Slafer GA, Casas AM, van Eeuwijk F, Romagosa I. 2010. Genetic control of pre-heading phases and other traits related to development in a double-haploid barley (*Hordeum vulgare* L.) population. Field Crops Research, 119(1), 36–47. doi: 10.1016/j.fcr.2010.06.013
- Boyer, JS. 1982. Plant productivity and environment. Science. doi: 10.1126/science.218.4571.443
- Buckler E., Holland J, Bradbury PJ, Acharya CB, Brown PJ, Browne C, McMullen M. 2009. The genetic architecture of maize flowering time. Science. doi: 10.1126/science.1174276
- Castro, AJ, Castro M, Germán S. 2017a. Cambios en la oferta varietal de cebada: desafíos para la producción. Agrociencia, 38(2), 6–12. Disponible en: http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue_38/Cangue38.pdf
- Castro AJ, Cuesta-Marcos A, Hayes P, Locatelli A, Macaulay M, Mastandrea N, Silveira M, Thomas W, Viega L. 2017b. The completely additive effects of two barley phenology-related genes (*eps2S* and *sdw1*) are explained by specific effects at different periods within the crop growth cycle. Plant Breeding. doi: 10.1111/pbr.12509
- Castro, AJ. 2017c. Mesa Nacional de Entidades de Cebada Cervecera: 25 años de investigación para la agricultura nacional. Revista Cangüe, 38, 4–5.

- Castro AJ, Hayes P, Viega L, Vales I. 2008. Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breeding*. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01520.x
- Castro AJ, Ernst OR, Hoffman E, Bentancur O. 1997. Caracterización del germoplasma de cebada en Uruguay, de acuerdo a variables agronómicas y de calidad de grano. *Agrociencia*, 1(1), 80–87. doi: 10.2477/VOL1ISS1PP80-87
- Ceccarelli S, Grando S, Hamblin J. 1992. Relationship between barley grain yield measured in low- and high-yielding environments. *Euphytica* 1992 64:1, 64(1), 49–58. doi: 10.1007/BF00023537
- Collard BCY, Mackill DJ. 2007. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 557–572. doi: 10.1098/RSTB.2007.2170
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang E. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, . doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Cook JP, McMullen M, Holland J, Tian F, Bradbury P., Ross-Ibarra J, Buckler E, Flint-Garcia S. 2012. Genetic architecture of maize kernel composition in the nested association mapping and inbred association panels. *Plant Physiology*, 158(2), 824–834. doi: 10.1104/pp.111.185033
- Cooper M, Byth D. 1996. Understanding Plant Adaptation to Achieve Systematic Applied Crop Improvement - A Fundamental Challenge. En: M. Cooper G. Hammer (Eds.). *Plant adaptation and crop improvement*. Wallingford. CAB International Rice Institute and the International Crops Research Institute for the Semi-arid Crops. 5-25
- Crossa J, Pérez-Rodríguez P, Cuevas J, Montesinos-López O, Jarquín D, de los Campos, G., Burgueño J, González-Camacho JM, Pérez-Elizalde S, Beyene Y, Dreisigacker S, Singh R, Zhang X, Gowda M, Roorkiwal M, Rutkoski J, Varshney, RK. 2017. *Genomic Selection in Plant Breeding: Methods*,

- Models, and Perspectives. Trends in Plant Science. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tplants.2017.08.011
- Darvasi, A, Shifman S. 2005. The beauty of admixture. *Nature Genetics*, 37(2), 118–119. doi: 10.1038/ng0205-118
- Dawson I, Russell J, Powell W, Steffenson B, Thomas W, Waugh R. (2015). Barley: a translational model for adaptation to climate change. *The New Phytologist*, 206(3), 913–931. doi: 10.1111/NPH.13266
- de Koning DJ, McIntyre LM. 2017. Back to the future: Multiparent populations provide the key to unlocking the genetic basis of complex traits. *Genetics*, 206(2), 527–529. doi: 10.1534/genetics.117.203265
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. FAOSTAT. [En línea]. Consultado 20 Julio 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fernández-Calleja M, Casas AM, Igartua E. 2021. Major flowering time genes of barley: allelic diversity, effects, and comparison with wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 2021 134:7, 134(7), 1867–1897. doi: 10.1007/S00122-021-03824-Z
- Gage JL, Monier, B, Giri A, Buckler E. 2020. Ten Years of the maize Nested Association Mapping Population: Impact, Limitations, and Future Directions. *The Plant Cell*, tpc.00951.2019. doi: 10.1105/tpc.19.00951
- García G, Dreccer MF, Miralles D, Serrago, R. 2015. High night temperatures during grain number determination reduce wheat and barley grain yield: a field study. *Global Change Biology*, 21(11), 4153–4164. doi: 10.1111/GCB.13009
- García Pintos, M. 2021. Cámara Mercantil de Productos del País. Boletín Semanal. [En línea]. Consultado 19 de agosto de 2021. Disponible en: <http://www.camaramercantil.com.uy/docs/boletines/4baedc67505d1ba74f0e374893545f38.pdf>
- Germán S, Arbelbide M, Abadie, T, Romero R, Peculio A. 2000. Characterization of photoperiod response of barley genotypes from diverse origin. In S. Logue (Ed.), *Barley Genetics VIII: Vol. III* (pp. 212–214). Adelaide: Department of Plant Science, Adelaide University, Glen Osmond.

- Gutiérrez L, Germán S, Pereyra S, Hayes P, Pérez CA, Capettini F, Locatelli A, Berberian NM, Falconi EE, Estrada R, Fros D, Gonza V, Altamirano H, Huerta-Espino J, Neyra E, Orjeda G, Sandoval-Islas S, Singh R, Turkington K, Castro AJ. 2015. Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(3), 501–516. doi: 10.1007/s00122-014-2448-y
- Hallauer AR. 2011. Evolution of plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11, 197–206.
- Hayes P, Szűcs P. 2006. Disequilibrium and association in barley: Thinking outside the glass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18385–18386. doi: 10.1073/pnas.0609405103
- Hemshrot A, Poets AM, Tyagi P, Lei L, Carter CK, Hirsch CN., Li L, Brown-Guedira G, Morrell P, Muehlbauer GJ, Smith K. P. 2019. Development of a multiparent population for genetic mapping and allele discovery in six-row barley. *Genetics*, 213(2), 595–613. doi: 10.1534/genetics.119.302046
- Hernandez J, Meints B, Hayes P. 2020. Introgression Breeding in Barley: Perspectives and Case Studies. *Frontiers in Plant Science*, 0, 761. doi: 10.3389/FPLS.2020.00761
- Herzig, P, Backhaus A, Seiffert U, von Wirén N, Pillen K, Maurer, A. 2019. Genetic dissection of grain elements predicted by hyperspectral imaging associated with yield-related traits in a wild barley NAM population. *Plant Science*, 285, 151–164. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.05.008
- Hill CB, Angessa TT, McFawn L, Wong D, Tibbits J, Zhang X, Forrest, Kerrie, Moody D, Telfer P, Westcott S, Diepeveen D, Xu Y, Tan C, Hayden M, Li, C. 2019. Hybridisation-based target enrichment of phenology genes to dissect the genetic basis of yield and adaptation in barley. *Plant Biotechnology Journal*, 17(5), 932–944. doi: 10.1111/pbi.13029
- Holland J. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends. doi: 10.1016/j.pbi.2007.01.003

- Jacott CN, Boden SA. 2020. Feeling the heat: developmental and molecular responses of wheat and barley to high ambient temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 71(19), 5740. doi: 10.1093/JXB/ERAA326
- Jung, C, Capistrano-Gossmann G, Braatz J, Sashidhar N, Melzer S. 2018. Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breeding*, 137(1), 1–9. doi: 10.1111/PBR.12526
- King EG, Merkes CM, McNeil CL, Hooper SR, Sen S, Broman KW, Long AD, Macdonald SJ. 2012. Genetic dissection of a model complex trait using the *Drosophila* Synthetic Population Resource. *Genome Research*. doi: 10.1101/gr.134031.111
- Kirby, EJM. 1988. Analysis of leaf, stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage to anthesis. *Field Crops Research*, 18(2–3), 127–140. doi: 10.1016/0378-4290(88)90004-4
- Kirby EJM. 1969. The effects of daylength upon the development and growth of wheat, barley and oats. *Field Crop Abstr* (Vol. 22, No. 1, pp. 1–7).
- Kraakman ATW, Niks RE, Van Den Berg PMM, Stam P, Van Eeuwijk F. 2004. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics*. doi: 10.1534/genetics.104.026831
- Langridge P. 2018. Economic and Academic Importance of Barley. En: Muehlbauer NS (Eds.). *The Barley Genome*. Cham, Switzerland: Springer Nature. 1–10.
- Li H, Bradbury P, Ersoz E, Buckler E, Wang, J. 2011. Joint QTL linkage mapping for multiple-cross mating design sharing one common parent. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0017573
- Li J, Bus A, Spamer V, Stich B. 2016. Comparison of statistical models for nested association mapping in rapeseed (*Brassica napus L.*) through computer simulations. *BMC Plant Biology*, 16(1), 26. doi: 10.1186/s12870-016-0707-6
- Locatelli A, Cuesta-Marcos A, Gutiérrez L, Hayes P, Smith KP, Castro AJ. 2013. Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germplasm in Uruguay. *Molecular Breeding*, 31(3), 631–654. doi: 10.1007/s11032-012-9820-x

- Mackay FC, Stone EA, Ayroles JF. 2009. The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 565–577. doi: 10.1038/nrg2612
- Maurer A, Draba V, Jiang Y, Schnaithmann F, Sharma R, Schumann E, Kilian B, Reif JC, Pillen K. 2015. Modelling the genetic architecture of flowering time control in barley through nested association mapping. *BMC Genomics*, 16(1), 290. doi: 10.1186/s12864-015-1459-7
- Mayer KFX, Waugh R, Langridge P, Close TJ, Wise RP, Graner A., Matsumoto T, Sato K, Schulman A, Ariyadasa R, Schulte D, Poursarebani N, Zhou R, Steuernagel B, Mascher M, Scholz U, Shi B, Madishetty K, Svensson J, Bhat P, Moscou M, Resnik J, Muehlbauer G, Hedley P, Liu H, Morris J, Frenkel Z, Korol A, Bergès H, Taudien S, Felder M, Groth M, Platzer M, Himmelbach A, Lonardi S, Duma D, Alpert M, Cordero F, Beccuti M, Ciardo G, Ma Y, Wanamaker S, Cattonaro F, Vendramin V, Scalabrin S, Radovic S, Wing R, Morgante M, Nussbaumer T, Gundlach H, Martis M, Poland J, Pfeifer M, Moisy C, Tanskanen J, Zuccolo A, Spannagl M, Russell J, Druka A, Marshall D, Bayer M, Swarbreck D, Sampath D, Ayling S, Febrer M, Caccamo M, Tanaka T, Wannamaker S, Schmutzer T, Brown JWS, Fincher, GB, Stein, N. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. doi: 10.1038/nature11543
- McMullen M, Kresovich S, Villeda HS, Bradbury P, Li H, Sun Q, Flint-Garcia, S, Thornsberry J, Acharya C, Bottoms C, Brown P, Browne C, Eller M, Guill K, Harjes C, Kroon D, Lepak N, Mitchell SE, Peterson B, Pressoir G, Romero S, Rosas, MO, Salvo S, Yates H, Hanson M, Jones E, Smith S, Glaubitz JC, Goodman, M, Ware D, Holland J, Buckler E. 2009. Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science*. doi: 10.1126/science.1174320
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2020. [En línea]. Consultado 8 junio 2021. Anuario Estadístico Agropecuario 2020. Disponible en:

<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/anuario-estadistico-agropecuario-2020>

- Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz E, Zhang Z, Costich DE, Buckler E. 2009. Association Mapping: Critical Considerations Shift from Genotyping to Experimental Design. *The Plant Cell Online*. doi: 10.1105/tpc.109.068437
- Nice LM, Steffenson BJ, Brown-Guedira GL, Akhunov ED, Liu C, Kono TJY, Morrell PL, Blake TK, Horsley RD, Smith KP, Muehlbauer GJ. 2016. Development and genetic characterization of an advanced backcross-nested association mapping (AB-NAM) population of wild × cultivated barley. *Genetics*. doi: 10.1534/genetics.116.190736
- Oakey H, Verbyla A, Pitchford W, Cullis B, Kuchel H. 2006. Joint modeling of additive and non-additive genetic line effects in single field trials. *Theoretical and Applied Genetics* 2006 113:5, 113(5), 809–819. doi: 10.1007/S00122-006-0333-Z
- Oraguzie NC, Wilcox PL. 2007. An Overview of Association Mapping. En: Oraguzie NC, Rikkerink EH, Gardiner SE, Nihal De Silva H (Eds.). *Association Mapping in Plants*. New York, NY, USA. Springer. 1–9.
- Oreper D, Cai Y, Tarantino LM, de Villena FPM, Valdar W. 2017. Inbred Strain Variant Database (ISVdb): A repository for probabilistically informed sequence differences among the collaborative cross strains and their founders. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. doi: 10.1534/g3.117.041491
- Paterson AH. 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. *Genetica* 2005 123:1, 123(1), 191–196. doi: 10.1007/S10709-003-2742-0
- Pham AT, Maurer A, Pillen K, Taylor J, Coventry S, Eglinton JK, March TJ. 2020. Identification of wild barley derived alleles associated with plant development in an Australian environment. *Euphytica*, 216(9), 1–15. doi: 10.1007/s10681-020-02686-8
- Poland JA, Bradbury PJ, Buckler E, Nelson RJ. 2011. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.1010894108

- Qian L, Qian W, Snowdon RJ. 2014. Sub-genomic selection patterns as a signature of breeding in the allopolyploid *Brassica napus* genome. *BMC Genomics*, 15(1), 1170. doi: 10.1186/1471-2164-15-1170
- Richards, R. A. 1991. Crop improvement for temperate Australia: Future opportunities. *Field Crops Research*, 26(2), 141–169. doi: 10.1016/0378-4290(91)90033-R
- Rizzo G, Pablo J, Ernst OR. 2021. Field Crops Research Cropping system-imposed yield gap: Proof of concept on soybean cropping systems in Uruguay. *Field Crops Research*, 260(December 2019), 107944. doi: 10.1016/j.fcr.2020.107944
- Roberts EH, Summerfield RJ, Cooper JP, Ellis RH. 1988. Environmental Control of Flowering in Barley (*Hordeum vulgare* L.). I. Photoperiod Limits to Long-day Responses, Photoperiod-insensitive Phases and Effects of Low-temperature and Short-day Vernalization. *Annals of Botany*, 62(2), 127–144. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087644
- Sannemann, W, Huang BE, 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. *Molecular Breeding*, 35(3), 1–16. doi: 10.1007/s11032-015-0284-7
- Scott MF, Ladejobi O, Amer S, Bentley AR, Biernaskie J, Boden SA, Clark M, Dell’Acqua M, Dixon LE, Filippi CV, Fradgley N, Gardner KA, Mackay I, O’Sullivan D, Percival-Alwyn L, Roorkiwal M, Singh RK, Thudi M, Varshney RK, Venturini L, Whan A, Cockram J, Mott R. 2020. Multi-parent populations in crops: a toolbox integrating genomics and genetic mapping with breeding. *Heredity*. Springer Nature. doi: 10.1038/s41437-020-0336-6
- Slafer GA. 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist’s perspective. *Annals of Applied Biology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). doi: 10.1111/j.1744-7348.2003.tb00237.x
- Song Q, Yan L, Quigley, C, Jordan BD, Fickus E, Schroeder S, Song B, Charles An Y, Hyten D, Nelson R, Rainey K, Beavis WD, Specht J, Diers B, Cregan P.

2017. Genetic Characterization of the Soybean Nested Association Mapping Population. *The Plant Genome*. doi: 10.3835/plantgenome2016.10.0109
- Thornsberry J, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler E. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*. doi: 10.1038/90135
- Ulukan H. 2008. Agronomic adaptation of some field crops: A general approach. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(3), 169–179. doi: 10.1111/j.1439-037X.2008.00306.x
- van Eeuwijk F, Bink M, Chenu K, Chapman S. 2010. Detection and use of QTL for complex traits in multiple environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 193–205. doi: 10.1016/J.PBI.2010.01.001
- Vatter T, Maurer A, Kopahnke D, Perovic D, Ordon F, Pillen K. 2017. A nested association mapping population identifies multiple small effect QTL conferring resistance against net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) in wild barley. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0186803
- Viega L, Hoffman E, González S, Olivo N. 2006. Potencial de producción de cebada cervecera en Uruguay. Definición del número de granos por espiga. Facultad de Agronomía, Montevideo. *Notas Técnicas*, 52, 20 p.
- von Bothmer R, Sato K, Komatsuda T, Yasuda S. 2003. The domestication of cultivated barley. En: Sato K, von Bothmer R, Hintum H, Knüpfker K (Eds.). *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*. Amsterdam: Elsevier. 9–27.
- Von Zitzewitz J, Szűcs P, Dubcovsky J, Yan L, Francia E, Pecchioni N, Casas A, Chen THH, Hayes P, Skinner JS. 2005. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Molecular Biology*, 59(3), 449–467. doi: 10.1007/s11103-005-0351-2
- Waugh R, Thomas B, Flavell A, Ramsay L, Comadran J, Russell J. (2014). Genome-wide association scans (GWAS). En: Widholm J, Kumlchn J, Nagata T. (Eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry (Vol. 69, pp. 345–365)*. Springer. doi: 10.1007/978-3-662-44406-1_18

- Wingeyer A, Amado T, Pérez-Bidegain M, Studdert G, Varela C, Garcia F, Karlen D. 2015. Soil Quality Impacts of Current South American Agricultural Practices. *Sustainability*, 7(2), 2213–2242. doi: 10.3390/su7022213
- Xavier A, Rainey K. 2020. Quantitative Genomic Dissection of Soybean Yield Components. *G3 Genes, Genomes, Genetics*, 10(2): 665–675. doi: 10.1534/G3.119.400896
- Yu J, Holland J, McMullen M, Buckler E. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics*, 178(1): 539-551. doi: 10.1534/genetics.107.074245
- Yu J, Buckler E. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2): 155-160. doi: 10.1016/j.copbio.2006.02.003
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M, Doebley J, McMullen M, Gaut BS, Nielsen D, Holland J, Kresovich S, Buckler E. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2), 203–208. doi: 10.1038/ng1702
- Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136(4), 1457–1468.
- Zohary D, Hopf M, Weiss, E. 2012. Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Domesticated Plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press. doi: 10.1093/acprof:osobl/9780199549061.001.0001