

CAPÍTULO 21

Cebada: mejoramiento

Silvina Inés Golik

Mejoramiento de la cebada a nivel mundial

La cebada cultivada (*Hordeum vulgare* L.) es el cuarto cultivo anual importante de los cereales de la familia de las Poaceae después del trigo, el arroz, el maíz y se consume como forraje para el ganado, como alimento humano (Gujral & Gaur, 2005) y, lo que es más importante, también se utiliza para elaborar maltas. La cebada es una de las primeras plantas de cultivo domesticadas y más importantes del mundo (Shewry, 1992). Es un diploide autopolinizante con $2X=14$ cromosomas. Además, tiene tipos de dos y seis hileras, según la morfología de las espigas (von Bothmer, 1992). La facilidad de crecimiento en condiciones de laboratorio y los cultivos de tejidos facilitan el desarrollo de tecnologías de transferencia y edición de genes, aunque la investigación sobre el genoma de la cebada y la biología del sistema aún se encuentra en progreso.

La cebada se cultiva desde hace más de 10.000 años (Salamini *et al.*, 2002). En tiempos pasados, las culturas sumeria y babilónica utilizaban granos de cebada como moneda. Es un grano de maduración temprana con un alto potencial de rendimiento y se puede encontrar en entornos muy variados, desde las márgenes de desiertos y estepas a elevadas alturas en los trópicos, recibiendo una cantidad modesta o nula de insumos (Harlan, 1976). La amplia variación genética de la cebada ha generado cultivares que son tolerantes a ambientes con estreses como el frío, la salinidad, la sequía y el suelo alcalino (Poehlman, 1985). Esta diversidad genética adaptativa contra el estrés abiótico y también contra el estrés biótico indica el potencial de la cebada para desarrollar cultivares resistentes a los mismos (Zhang *et al.*, 2001). El principal objetivo de los programas de mejoramiento de la cebada es incrementar el rendimiento y la calidad del grano, como asimismo seguir incrementando su resistencia al estrés biótico (patógenos, hongos, virus y otros organismos) y abiótico como los citados precedentemente (Dunwell, 1986).

La cebada es una planta de cultivo de importancia económica, el cuarto cereal en el mundo en términos de área de siembra, utilizado casi el 60% como alimento para animales, alrededor del 30% para la producción de malta, el 7% para la producción de semillas y solo el 3% para la alimentación humana (Baik & Ullrich, 2008; Dawson *et al.*, 2015). En los últimos años, la malta derivada de la cebada germinada es el material clave para el malteado de la cerveza (Bond *et al.*, 2015). El mejoramiento de los cultivares de cebada para el malteado puede ser el enfoque

más económico para mejorar la calidad de la malta. Como resultado, identificar y comprender la base genética de la cebada resulta fundamental para desarrollar nuevas variedades con mejores propiedades (Lan *et al.*, 2016). También en la actualidad, la cebada tiene numerosas ventajas en la industria alimentaria debido a su alto contenido en compuestos bioactivos como β -d-glucano, tocoferoles, tocotrienoles y fenólicos como derivados del ácido benzoico y cinámico, proantocianidinas, quinonas, flavonoles, calconas y flavonas (Holtekjolen *et al.*, 2008; Baba *et al.*, 2014). Los estudios demostraron que el β -d-glucano presenta una función importante en la prevención de diversas enfermedades como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y otras (Ahmad *et al.*, 2016).

La cebada es uno de los cereales con mayor diversidad genética que se clasifica como tipos de primavera o invierno, de dos hileras o de seis hileras, con o sin cáscara por la presencia o ausencia de cáscara adherida firmemente al grano, y para el malteado o como alimento por su uso. Por lo tanto, los programas de mejoramiento cuentan con un alto nivel de diversidad genética, lo que brinda una oportunidad significativa para lograr importantes avances. Se pueden introducir rasgos específicos en estudios de **retrocruzamiento mediante hibridaciones** entre cultivares de alto rendimiento y cebada silvestre en programas de mejoramiento convencionales (Nevo, 1992). Sin embargo, el mejoramiento por **mutación** también es importante para ampliar la variación y desarrollar nuevos cultivares. Tanto la **radiación** como la mutagénesis química se han utilizado por separado para aumentar el número de cultivares de cebada con características deseables. La cebada maltera más popular, fue producida por mutagénesis por radiación (Technical Brochure, 1970).

La mejora de la cebada se ha ido realizando a través de diferentes mecanismos, entre ellos: mutaciones, marcadores moleculares, cultivo de tejidos, transferencias de genes, estudios genómicos, edición de genes, transposones, estudios epigenéticos y biología de sistemas (Gozukirmizi & Karlik, 2017).

Marcadores moleculares de cebada

Los planes de mejoramiento han venido usando características fenotípicas para la selección de rasgos deseables de hábitos, resistencia a enfermedades, rendimiento o calidad en el desarrollo de nuevos cultivares. Se han utilizado dos estrategias principales para seleccionar rasgos deseables que son el mejoramiento clásico y el mejoramiento molecular. El desarrollo y uso de marcadores moleculares para la detección y explotación del polimorfismo han jugado un papel importante en los estudios de fitomejoramiento. El fitomejoramiento molecular utiliza dos enfoques principales, la **selección asistida por marcadores (MAS)** y la **transformación genética**, para producir nuevas variedades con características deseables (Moose, 2008; Rajib *et al.*, 2013). MAS es un proceso que utiliza marcadores moleculares **para aumentar el rendimiento, la calidad y la tolerancia de los cultivos al estrés biótico o abiótico** (Foolad & Sharma, 2005). En las últimas dos décadas, marcadores moleculares como el polimorfismo de longitud de fragmento restringido (*RFLP*), ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (*RAPD*), polimor-

fismos de longitud de fragmento amplificado (*AFLP*), repeticiones de secuencia simple (*SSR*), repeticiones de secuencia interempresarial (*ISSR*), etiquetas de secuencia expresada (*EST*) y polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*), los marcadores basados en transposones (*IRAP*, *iPBS*) se han utilizado como marcadores genéticos para medir las diferencias genéticas existentes en los genomas (Heun *et al.*, 1997; Gozukirmizi *et al.*, 2016). El desarrollo de tecnologías de secuenciación de próxima generación abrió nuevas oportunidades para el desarrollo de marcadores basados en secuencias. Hoy en día, tenemos nuevos marcadores que no se basan en fragmentos, sino en secuencias. Hay disponibles matrices de densidad media y alta para la cebada. La elección de los métodos de marcadores utilizados se ha desplazado de los marcadores de primera y segunda generación, como *RFLP*, *RAPD*, microsatélites y *AFLP*, a marcadores de tercera y cuarta generación, incluidos *DArT*, *TAM*, *RAD* y *CNV / PAV* (Gupta *et al.*, 2008; Belo *et al.*, 2010). El sistema de marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP*) se ha utilizado como una medida de la diversidad genética para estudios de mapeo en cebada (Graner *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 2007).

Cultivos de tejido de cebada y sistemas de transferencia de genes

El cultivo de tejidos vegetales, que proporciona comodidad para la propagación y manipulación de las plantas, se basa en el cultivo de células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre, en medios artificiales (George, 2008). Se requiere para regenerar *in vitro* plantas transgénicas completas mediante el uso de células, tejidos o una sola célula cultivada en un medio nutritivo en un ambiente estéril (Cardoza, 2008). La capacidad de regeneración de la cebada depende del material vegetal donante, el genotipo, el medio y el medio ambiente (Dahleén, 1999; Sharma *et al.*, 2005). Una limitación importante de la transformación de la cebada sigue siendo el escaso potencial de regeneración de los cultivares modernos. Sin embargo, se han realizado varios estudios para mejorar las técnicas de cultivo de tejidos y aumentar las tasas de regeneración (Temel & Gözükirmizi, 2011). Desde el pasado hasta la actualidad, se han desarrollado varios protocolos de cultivo de tejidos utilizando embriones inmaduros (Breiman, 1985; Rikiishi, 2008), embriones maduros (Gozukirmizi *et al.*; 1990; Temel *et al.*, 2008), meristemas apicales (Cheng & Smith, 1975; Weigel, 1985; Ganeshan *et al.*, 2003), anteras (Huang & Sunderland, 1982; Bednarek & Orlowska, 2007), microesporas (Kohler & Wenzel, 1985; Obert, 2008), ovarios (Castillo & Cistue, 1993; Holme, 2008), suspensiones celulares (Kott & Kasha, 1984; Luhrs & Nielsen, 1992), protoplastos (Lazzeri, 1991), tejido coleóptilo (Sahrawat & Chand, 2004) y segmentos de la base de la hoja (Li *et al.*, 2009).

El uso de embriones maduros tiene una gran ventaja en comparación con otros sistemas como protoplastos y suspensiones celulares. Para el cultivo de tejido de cebada, los embriones maduros representan el sistema ideal debido a las mayores tasas de germinación y regeneración por embriogénesis somática de embriones maduros cultivados de cebada (Gozukirmizi, 1990). Las fitohormonas también son cruciales para establecer las condiciones óptimas de cultivo de tejidos para producir tejido de callo indiferenciado a partir de tejidos diferenciados,

como un embrión (Jiang *et al.*, 1998). La formación de callos, que es una desdiferenciación de células individuales o explantes de tejido, ofrece gran oportunidad para la investigación de *in vitro* producción de selección de variaciones genéticas (Espinasse & Lay, 1989; Nasircilara *et al.*, 2006). La regeneración de plantas a partir de callos de cebada tiene un gran potencial para producir nuevas líneas en el mejoramiento de cultivares de cebada mejorados (Ward & Jordan, 2001; Fahmy & El-Shihy, 2006). El tipo de auxina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es el regulador de crecimiento más utilizado para la inducción de callos (Ozawa & Komamine, 1989; Denchev; Conger, 1994). Sin embargo, la calidad del callo depende de los genotipos de la cebada (Ward & Jordan, 2001; Hanzel *et al.*, 1985).

Los embriones inmaduros tienen un gran potencial para producir embriones somáticos a través de callos embriogénicos (von Arnold *et al.*, 2002). La embriogénesis somática, que se define como un proceso por el cual las células somáticas haploides o diploides se desarrollan en una estructura que se asemeja al embrión cigótico, es una herramienta importante para la propagación vegetativa a gran escala. Los embriones somáticos son estructuras bipolares sin ninguna conexión vascular con el tejido parental y estas estructuras pueden diferenciarse directamente de los explantes sin una fase de callo intermedio o indirectamente después de una fase de callo.

Desde la década de 1990, la ingeniería genética de plantas es una poderosa herramienta de investigación para el descubrimiento de genes con el objetivo de introducir rasgos agrónomicamente útiles. El primer informe sobre la transformación estable de cebada mediante métodos de **transferencia directa de ADN** ha sido elaborado por Lazzeri *et al.* (1991). Desde entonces, se han desarrollado numerosos protocolos para la transformación de la cebada con el aporte de mejoras técnicas basadas en embriones inmaduros o cultivos de polen androgenético u óvulos aislados como dianas de transferencia génica (Matthews *et al.*, 2001; Kumlehn *et al.*, 2006; Holme *et al.*, 2008).

Estudios genómicos sobre cebada

La revolución genética de la última década ha mejorado enormemente la comprensión de las relaciones entre la diversidad genética y fenotípica con una detallada resolución. El desarrollo de tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) ha aumentado la precisión y reducido los costos. La secuenciación o re-secuenciación de genomas de referencia y también nuevas variedades permiten la identificación de numerosos marcadores, diversidades alélicas y han cambiado la percepción de la organización y evolución del genoma. La secuenciación de los genomas de los cultivos proporcionó evidencias del origen y la evolución de las plantas, duplicaciones, reordenamientos del genoma, adaptaciones y modulaciones funcionales (Barabaschi *et al.*, 2011). La secuencia completa del genoma es esencial para proporcionar conocimientos para comprender las variaciones genéticas naturales y el desarrollo de los programas de reproducción.

Recientemente, nuevas estrategias de **secuenciación de alto rendimiento** han revelado la estructura del genoma de la cebada (Mayer *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2012). La existencia de 26159 genes de cebada fue confirmada por un análisis de sintenia sistemática con especies modelo de la familia Poaceae (arroz, maíz, sorgo) que ya han tenido anotación de sus genomas. Además, hasta el 80% del genoma de 5,1 Gb de la cebada contiene ADN repetitivo, lo que complica la secuenciación completa (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). El genoma mitocondrial de la cebada consta de 33 genes que codifican proteínas, tres ARN ribosomales, 16 ARN de transferencia, 188 nuevos ORF, seis secuencias repetidas principales y varios tipos de elementos transponibles. Se ha descubierto que los genomas mitocondriales de estas líneas de cebada silvestre y cultivada son casi idénticos en términos de secuencia de nucleótidos y estructura del genoma, sólo se han detectado tres SNP entre los haplotipos (Hisano *et al.*, 2016).

Varias técnicas, incluido el **mapeo de ligamiento (o mapeo QTL)**, **mapeo de asociación (GWAS)** y **técnicas ómicas de alto rendimiento, como transcriptómica, ionómica, proteómica y análisis metabolómico**, se han utilizado para identificar un solo gen o múltiples genes correspondientes al gen redes de regulación del desarrollo, floración, vernalización y condiciones de estrés biótico y abiótico (Urano *et al.*, 2010). Los enfoques de secuenciación de próxima generación (por ejemplo, RNA-Seq) se llevaron a cabo en cinco años y ampliaron el conocimiento sobre las redes de regulación genética de las condiciones de estrés. Durante los últimos años, se ha caracterizado un número creciente de estos genes y su función en condiciones de sequía se ha demostrado mediante el análisis de mutantes con pérdida de función o líneas de sobreexpresión.

El **perfil del transcriptoma** de la cebada en condiciones de bajo contenido de nitrógeno (LN) se ha determinado mediante el método RNA-seq. Se identificaron 1469 genes expresados diferencialmente entre variedades de cebada tolerante y sensible bajo LN. Las diferencias entre genotipos tolerantes y sensibles involucraban transportadores, factores de transcripción, quinasas, estrés antioxidante y genes relacionados con la señalización hormonal. Sin embargo, los DEG se clasificaron en metabolismo de aminoácidos, metabolismo de almidón y sacarosa, metabolismo secundario (Quan *et al.*, 2016). Se han realizado numerosos estudios para comprender los mecanismos de tolerancia al estrés biótico y abiótico. Además, **los análisis fisiológicos y bioquímicos** han proporcionado información valiosa sobre un mecanismo molecular integrado novedoso de los mecanismos de tolerancia al estrés en la cebada. Se realizó un análisis del transcriptoma de todo el genoma para identificar los mecanismos de tolerancia al cadmio (Cd) en dos genotipos de cebada con distinta tolerancia al Cd mediante el uso de un enfoque de **microarrays**. El perfil de expresión de microarrays reveló que los genes nuevos pueden desempeñar funciones importantes en la tolerancia al Cd. Otro estudio para comprender el estrés abiótico fue la secuenciación de ARN de hojas jóvenes de cebada silvestre tratadas con sal (NaCl 500 mM) en cuatro intervalos de tiempo diferentes. La cebada sin cáscara, también llamada cebada desnuda, a menudo sufría estrés por sequía durante el crecimiento y desarrollo. Por tanto, Zeng *et al.* (2016) han investigado los patrones de expresión de ARNm coregulados bajo agua de pozo temprano, luego bajo déficit de agua y finalmente los tratamientos

de recuperación de agua, y para identificar ARNm específicos para las condiciones limitantes del agua. Los resultados mostraron que se determinaron 853 DEG y se categorizaron en nueve grupos. Sin embargo, el análisis del transcriptoma reveló que los genes más afectados estaban relacionados con la unión de tetrapirrol, el fotosistema y la membrana fotosintética en condiciones de estrés por sequía.

El enfoque **proteómico** también juega un papel importante para comprender las alteraciones en el contexto de las respuestas fisiológicas y morfológicas al estrés biótico y abiótico en la cebada. Rollins *et al.* (2013) han investigado las proteínas reguladas diferencialmente en respuesta a la sequía, las altas temperaturas o una combinación de ambos tratamientos mediante el uso de **electroforesis diferencial en gel y espectrometría de masas**. El estudio mostró que el tratamiento de sequía indujo fuertes reducciones de biomasa y rendimiento, pero no provocó alteraciones significativas en el rendimiento fotosintético y el proteoma. Por el contrario, el tratamiento térmico y la combinación de calor y sequía provocaron la reducción del rendimiento fotosintético y cambios del proteoma de la hoja. Se identificaron 14 proteínas entre 99 manchas de proteína como una forma específica de genotipo en respuesta al tratamiento térmico. El análisis indicó que las proteínas reguladas diferencialmente estaban relacionadas con la fotosíntesis, la desintoxicación, el metabolismo energético y la biosíntesis de proteínas.

Edición del genoma

La edición del genoma ha surgido recientemente como un nuevo método transgénico para mejorar las plantas de cultivo que tiene grandes oportunidades sobre las técnicas convencionales dirigidas a genes. La ventaja más importante de la edición de genes es la modificación de los genes específicos dirigidos en el lugar. La edición del genoma utiliza nucleasas programables como las nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de TAL (TALEN) o endonucleasas asociadas con repetición palindrómica corta espaciadas regularmente (CRISPR) agrupadas, también se puede utilizar para introducir inserciones de genes, reemplazos de genes (Sprink *et al.*, 2015). La edición del genoma es una herramienta clave para avanzar en el conocimiento de la función de los genes, así como para permitir la mutagénesis dirigida con alta eficiencia en plantas, incluida la cebada (Wendt *et al.*, 2013; Gurushidze *et al.*, 2014).

Transposones, estudios epigenéticos

Los transposones, son segmentos de ADN que se mueven a una nueva ubicación en un cromosoma o a otro cromosoma o célula. Fueron identificados por primera vez en el maíz por McClintock (1984). Varios estudios han revelado que los transposones afectan la estructura genética, las regulaciones epigenéticas y la dinámica del genoma de casi todos los organismos vivos (Gozukirmizi *et al.*, 2016). Los transposones alteran la estructura del genoma existente

que puede conducir a cambios significativos como pérdidas y/o inserciones. Los porcentajes y tipos de transposones pueden variar entre las especies (Feschotte & Pritham, 2007). Los genomas procarióticos contienen entre un 1% y un 3% de transposones, en cambio, su porcentaje puede alcanzar el 85% o más en genomas eucariotas, especialmente en plantas (Feschotte & Pritham, 2009). La cebada, debido a que tiene un genoma grande, tiene un mayor contenido de ADN derivado de hasta un 85% de transposones (Wicker *et al.*, 2015).

La modificación epigenética de la cromatina se define como cambios hereditarios en la expresión génica que no se producen por alteraciones en las secuencias de nucleótidos del ADN. La metilación del ADN y las modificaciones de la cola N-terminal de la histona covalente se consideran principalmente modificaciones de la cromatina que pueden cambiarse en las plantas durante el ciclo celular (Jasencakova *et al.*, 2001; Jasencakova *et al.*, 2003), el desarrollo de la planta (Santamaría *et al.*, 2009; Meijón *et al.*, 2010) o en la respuesta al estrés (Luo *et al.*, 2012). Los mecanismos epigenéticos mantienen un gen o genes activos o en estados represivos (Finnegan *et al.*, 1998; Cheung & Lau, 2005). Braszewska-Zalewska & Hasterok (2013) investigaron las diferencias de modificación epigenética entre los tejidos meristemáticos de la raíz de la cebada. El estudio indicó que los niveles de modificaciones epigenéticas variaban entre los tejidos RAM. Los estudios sobre el estrés ambiental mostraron que tanto la metilación del ADN como las modificaciones de histonas están involucradas en la respuesta al daño del ADN.

Mejoramiento de la cebada en Argentina

Del total de cebada que se cosecha en la Argentina, a excepción de las variedades forrajeras que tienen como objetivo la exportación, el principal destino lo constituye la industria cervecera. En cambio, a nivel mundial solo el 25% tiene como destino la fabricación de cerveza, siendo el principal destino del grano de cebada, el forrajero y en un lugar secundario la industria alimenticia. La producción en nuestro país alcanzada durante la campaña 2018/2019 fue superior a los 5 millones de t., siendo el segundo mejor volumen en lo que va de este siglo, además de ser un 35% superior si se lo compara con los valores del año precedente. No cabe duda, que, a nivel local, el aumento de la demanda de malta fue lo que impulsó la producción de cebada cervecera en los últimos años, estimulando a los productores para que los cultivares evolucionen (De Bernardi, 2019). Independientemente de las nuevas semillas inscriptas, tanto las variedades Andreia como Shakira son las que predominan actualmente en Argentina. Anteriormente fue la variedad Scarlett, cultivar que llegó a cubrir más del 90% de la superficie del país.

En base a la sostenida demanda, la cebada ha ido evolucionando, ganando zonas de mayor aptitud agrícola. Y tanto los avances de la ciencia como de la tecnología están contribuyendo a dicha expansión. El incremento de los rendimientos del cultivo de cebada cervecera se debe a las mejoras en las ganancias genéticas de los cultivares desarrollados, a las mejoras en las técnicas de manejo y a la mayor aplicación de insumos como fertilizantes y agroquímicos, que

permiten un control relativamente eficiente de malezas, plagas y enfermedades (Slafer *et al.*, 1994). Conocer el efecto del mejoramiento genético sobre la sanidad, el rendimiento y sus principales componentes y la calidad comercial e industrial del grano permitirá valorar y aumentar la eficiencia de los programas de desarrollo de cultivares. La obtención de nuevos cultivares con alta calidad maltera, con parámetros estables de calidad comercial (tamaño de granos y porcentaje de proteínas) y rendimientos altos y estables aseguran la competitividad y la sustentabilidad de la cadena agroindustrial.

Desde el punto de vista forrajero, la cebada forrajera presenta algunas ventajas respecto al resto de los cereales invernales, como el de tener un mayor nivel de energía, utilizándose habitualmente como verdeo invernal y ensilajes de planta entera. Como verdeo de invierno, presenta un destacado volumen de pasto de calidad superior que alcanza aproximadamente un 15% más de forraje, en comparación con la mayoría de los cultivares cerveceros.

A pesar de que los beneficios para la salud son numerosos, su uso en Argentina está primeramente focalizado en la elaboración de cerveza. Esto lo demuestra el hecho de que en la campaña 2018/19 se destinaron al mercado interno 1.050.000 t que terminan representando 840.000 t/malta, unas 400.000 t. para alimentos y aproximadamente 120.000 t se reservaron para semillas. Del total de lo que Argentina produce aproximadamente entre el 50% al 60% es destinado a la exportación. El volumen de exportaciones alcanzó los 2,7 millones de t., de ello el total exportado como cebada forrajera alcanzó unas 1.534.100 toneladas, el resto fue como grano para cerveza y malta. Argentina es el principal proveedor de malta de América del Sur, siendo Brasil el principal lugar de destino (De Bernardi, 2019). Durante el año 2018 se exportaron 469 mil t. La demanda de malta está en aumento por un mayor consumo mundial de cerveza, impulsando el crecimiento de la superficie sembrada en Argentina, aún a áreas donde no se dispone de información del comportamiento de este cultivo. En este contexto, el desafío de los programas de mejoramiento es desarrollar cebadas cerveceras con buena sanidad, de alto y estable rendimiento, con calidad diferenciada, que mejoren la competitividad y contribuyan a la diversificación y sustentabilidad de los sistemas productivos, generando asimismo información de los materiales existentes y novedosos con el fin de que las nuevas tecnologías se difundan correctamente. Para ello, es fundamental obtener líneas experimentales de cebada cervecera tratando de acortar al máximo los tiempos necesarios para su generación. El INTA, con sede en la EEA Bordenave (Pcia. de Buenos Aires, Argentina), es el único ente estatal que lleva adelante programas de mejoramiento genético de cebada cervecera. La metodología tradicional de mejoramiento llevada a cabo por el INTA Bordenave comienza con la generación de variabilidad genética a través de cruzamientos dirigidos entre padres selectos, que dan origen a plantas F1, las cuales continúan su ciclo como material de cría F2 a F6 mediante los métodos: masal modificado, genealógico y SSD, según las características y objetivo de la población. Posteriormente a la evaluación y selección de las líneas puras obtenidas en F6, se inicia una etapa de ensayos comparativos de rendimiento, en parcelas experimentales comparadas con testigos comerciales, paralelamente se procede con la multiplicación de la semilla a diferentes escalas, para ir incrementando la cantidad de semilla disponible de cada material selecto. Estos ensayos se inician con una repetición en un ambiente y van aumentando el número de repeti-

ciones y ambientes progresivamente de generación en generación. La presión de selección aplicada durante todo el proceso depende de los caracteres de interés evaluados en cada etapa (Conti *et al.*, 2012). Todo programa de mejoramiento tiene tres objetivos fundamentales: **mejora de la calidad, sanidad y rendimiento.**

La selección en las filiales tempranas se basa en caracteres cuali y cuantitativos de fácil observación y rasgos de aptitud agronómica, por ejemplo: producción de forraje, rendimiento en granos, altura, porte, respuesta al vuelco, ciclo de crecimiento y comportamiento sanitario en general. A medida que se va avanzando en las generaciones el número de materiales selectos se va reduciendo y la cantidad de semilla de cada uno se va incrementando, con lo cual es posible realizar otras evaluaciones, como caracteres de calidad comercial e industrial del grano y calidad de forraje. Además, se continúa con las mediciones de las características antes mencionadas para filiales tempranas, pero se aumenta el grado de precisión de las observaciones y el número de repeticiones y tamaño de las muestras. En las etapas finales de los ensayos comparativos se realizan análisis de adaptabilidad y estabilidad mediante el estudio de la interacción genotipo-ambiente. Las líneas que superan todas las instancias de selección y poseen un comportamiento destacado son inscriptas como cultivares, debiéndose realizar los incrementos de semilla pura y mantenimiento de núcleos de pureza de la nueva variedad. Tanto los ensayos como las multiplicaciones donde participan las líneas avanzadas del programa son declarados ante el INASE, cumpliendo con los requisitos necesarios para la confección del legajo de inscripción y posterior resguardo de la propiedad intelectual del material genético. Todo este proceso completo implica aproximadamente 10 años, lo que resulta excesivamente prolongado. Por esto, en la actualidad la biotecnología constituye una herramienta fundamental para complementar las metodologías convencionales, acortando los tiempos requeridos para la obtención de las variedades y maximizando la eficiencia de uso de los recursos (Conti *et al.*, 2012). En el INTA se ha logrado, a través de sus programas de mejoramiento:

a) el **adelanto de generaciones de autofecundación**: como ya se dijo, el tiempo requerido para estabilizar el material segregante es una de las limitantes más importantes, previo a su inclusión en ensayos comparativos. Y si bien con cultivos a campo en contraestación en ambientes que lo permiten, o en invernáculo, este período puede acortarse, la capacidad de este tipo de técnicas es limitada y sólo permite ahorrar una generación por año. El adelanto de generaciones mediante **rescate de embriones inmaduros y su posterior cultivo in vitro** posibilita realizar tres generaciones en el año. Esta técnica se aplica sobre poblaciones segregantes F2 selectas y priorizadas por su performance y su perfil molecular. Se inicia con la obtención de plantas donantes de embriones en macetas en condiciones de invernáculo. Cuando los embriones llegan a un determinado estado (1,5 a 2 mm, embriones inmaduros), se realiza su extracción para ser cultivados in vitro. Las plántulas regeneradas son posteriormente rusticadas y mantenidas en condiciones de invernáculo hasta la cosecha. Las semillas obtenidas continúan sus procesos de selección, evaluación y multiplicación.

b) debido a la falta de información de las enfermedades más comunes de la cebada en nuestro país, se planteó la **identificación, aislamiento y estudio de la variabilidad** del agente causal de mancha en red (*Drechslera teres*) y escaldadura (*Rynchosporium secalis*).

Las muestras de patógenos recolectadas en diferentes ambientes del país son identificadas en laboratorio. Una vez identificados se procede a realizar cultivos monospóricos, con el propósito de separar las distintas razas, si es que existen con el objetivo de contar con cultivos puros del patógeno, que podrán ser utilizados para la inoculación de materiales y posterior evaluación de la enfermedad. También se prueban diferentes protocolos de inoculación a campo e invernáculo para determinar el más adecuado a ser utilizado en cada caso. También es posible **realizar una evaluación molecular del patógeno aplicando marcadores moleculares tipo SSR o AFLP**,

c) en los últimos años se han liberado nuevas variedades que intentan abastecer nuevos mercados en el ámbito nacional e internacional, lo que trajo aparejado la necesidad de un **sistema de identificación varietal** que permita discriminarlas y así asegurar la identidad del grano cosechado, imprescindible para la industria maltera y las exportaciones de cebada cervecera (Conti *et al.*, 2012). En el INTA Bordenave la identificación varietal en cebada se realizaba usando isoenzimas y el patrón de expresión de proteínas de reserva del grano (hordeínas). Sin embargo, estos marcadores bioquímicos no son ideales, ya que suelen presentar patrones de difícil interpretación y la presencia de mezclas no sólo puede pasar desapercibida, sino que es casi imposible cuantificar el porcentaje de pureza genética. Para intentar resolver este problema se desarrolló un sistema de identificación varietal utilizando marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs). De esta manera se analizaron las variedades comerciales más difundidas de cebada de origen certificado y se seleccionaron los marcadores *Bmag120*, *HvM54*, *HvM03* y *Bmag223* por tener patrones claros de amplificación y alto polimorfismo entre las variedades. Con este procedimiento se pudo obtener el perfil genético de las variedades comerciales en Argentina y también podría usarse para la identificación varietal de muestras incógnitas. Esta técnica, además de ser fundamental en el mantenimiento de la pureza varietal en toda la cadena agroindustrial de la cebada, constituye un mecanismo muy importante en el seguimiento de la genealogía de las poblaciones, principalmente para identificar falsos cruzamientos por autofecundación (Conti *et al.*, 2012),

d) **selección asistida por marcadores moleculares**. La selección de nuevas líneas mejoradas, en los programas tradicionales de mejoramiento, se basa en evaluaciones y mediciones directas de las características agronómicas de interés. Estas mediciones pueden ser simples en algunos caracteres, como la altura, por ejemplo, pero en la mayoría de los caracteres asociados a la calidad y sanidad la selección requiere de análisis de laboratorio y ensayos que demoran y encarecen el lanzamiento de nuevas variedades. La selección asistida por marcadores moleculares es una herramienta de gran utilidad puesto que la selección se independiza del ambiente, las determinaciones se llevan a cabo en etapas muy tempranas del cultivo y las técnicas utilizadas son fáciles de aplicar, con resultados rápidos y objetivos. No obstante, en cultivos que no han sido objeto de una minuciosa investigación al respecto, existen pocos marcadores disponibles para aplicarlos directamente y, por lo tanto, en la mayoría de los casos es necesario validar los marcadores moleculares existentes en la bibliografía para poder usarlos en un programa de mejoramiento. Una herramienta de gran valor para esta etapa son los recursos genéticos conservados en los bancos de germoplasma (Conti *et al.*, 2012).

Los caracteres de interés en los que se vienen trabajando en el INTA Bordenave son:

- **Resistencia a roya de la hoja** (*Puccinia hordei*) en cebada: que es una enfermedad de gran relevancia en el mundo entero y también en Argentina. En la literatura se han descrito por lo menos 16 genes mayores de resistencia a esta enfermedad (*Rph*), no obstante, sólo unos pocos han sido mapeados correctamente. El Gen *Rph7* fue uno de los primeros caracterizados a partir del cultivar “Cebada Capa” y provee efectiva resistencia a esta enfermedad tanto en Europa como en Sud-América. Asociado al gen *Rph7* existe un marcador codominante CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence), que permite identificar los alelos de resistencia o susceptibilidad en diferentes variedades de Cebada (Conti *et al.*, 2012). En el laboratorio de Biotecnología de INTA Bordenave, se emplea este marcador para la caracterización de distintos cultivares en cuanto a la presencia o ausencia de alelos de resistencia para el gen *Rph7*. Hasta el momento, se realizó una caracterización molecular de las variedades comerciales en Argentina, donde se utilizaron como control 10 materiales de la colección de cebada de la EEA Bordenave del INTA, que poseían alelos favorables para los genes de interés. Las variedades comerciales analizadas no presentaron alelos favorables para los genes *Rph7*. Pero si presentaron alelos de resistencia a roya de la hoja los materiales Hendly, Heris, Henrike y Delta de la colección. En este marco, se realizaron cruzamientos entre materiales dadores de dicho gen y genotipos elite, obteniéndose poblaciones segregantes para este carácter que son seleccionadas mediante esta herramienta.

- **Resistencia a mancha en red** (*Dreschlera teres*) en cebada: tanto la mancha en red como la escaldadura son dos de las enfermedades más importantes en el cultivo de cebada en nuestro país y en otras partes del mundo. En los últimos años estas enfermedades se han expandido debido a varios motivos, entre ellos la amplia distribución del cultivo, la incorrecta rotación dentro de los lotes de producción y la inclusión de nuevos cultivares susceptibles. La mancha en red presenta dos tipos de síntomas asociados: la forma en red (net-form) provocada por *P. teres* f. *teres* y la forma de mancha (spot-form) causada por *P. teres* f. *maculata* K (Khan & Tekauz, 1982). Se ha desarrollado un QTL para la resistencia a mancha en red (*QRpt6*), este fragmento tiene asociado un marcador molecular microsatélite (*HvM74*). Asimismo, existe un QTL para la resistencia a la forma de mancha de esta enfermedad (*QRpts4*) y el microsatélite asociado (*HvM03*). Estos marcadores fueron validados en diferentes poblaciones de cebada generadas sobre genotipos elite en Canadá. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que estos marcadores pueden utilizarse en la selección asistida para el carácter resistencia a mancha en red en sus dos formas (Tajinder *et al.*, 2010), aunque estos marcadores no fueron validados en los materiales argentinos. Teniendo en cuenta la dependencia del ambiente de los QTLs, se propuso validar los marcadores *HvM74* y *HvM03* en materiales argentinos de alto potencial agronómico como las variedades Andreia y Shakira. Para tal fin se comenzó a desarrollar una población de 200 individuos RILs en la Estación Experimental Agropecuaria Bordenave, que será caracterizada fenotípicamente en al menos tres ambientes y genotípicamente con estos microsatélites. De esta manera se busca la asociación entre la enfermedad y la presencia de los alelos específicos. Además de validar estos marcadores en genotipos adaptados a las condiciones de cultivo de Argentina, estos resultados servirán para utilizarlos en

selección asistida dentro del programa de mejoramiento de INTA Bordenave, con el fin de introgresar estos QTLs en nuevos fondos genéticos de alto potencial agrícola/industrial.

- **Resistencia a escaldadura** (*Rinchosporium secalis*) en cebada: existen varios genes de resistencia para esta enfermedad (*Rrs*) y también, existen marcadores tipo CAPS asociados a los genes de resistencia *Rrs2* y *Rrs15*. En una primera instancia se caracterizaron molecularmente las variedades comerciales en Argentina, de este modo las variedades Shakira y Traveler presentaron alelos de resistencia para el gen *Rrs2*. Con estos materiales se generaron poblaciones segregantes, las cuales son seleccionadas mediante este marcador (Conti *et al.*, 2012).

Calidad

El primer objetivo de calidad de la malta es una adecuada disolución enzimática de la estructura física de los granos a la cual se denomina modificación del endosperma. Se produce por la acción conjunta de enzimas citolíticas (que disuelven las paredes celulares) y proteolíticas (que disuelven fundamentalmente la matriz proteica). Para cuantificar el grado de degradación del endosperma se usa el parámetro denominado **friabilidad**. La friabilidad es la medida de la intensidad de desagregación, expresada en porcentaje (Gimenez, 2017). Se determina por la acción física de molienda con rodillos de goma y la posterior separación de la fracción friable (harina) de la no friable (partículas del endosperma que permanecen cohesionadas). Se considera que los granos de cebada tienen una buena friabilidad cuando presentan valores mayores del 80%. La mayoría de las determinaciones para determinar la calidad industrial de la malta relacionada con su comportamiento en las cervecerías, se realizan sobre el mosto. Se denomina mosto cervecero a la suspensión obtenida de malta molida en agua, a través de una maceración con tiempos y temperaturas controladas, durante la cual las enzimas degradan los polímeros formados en el grano a compuestos más simples y solubles (Gimenez, 2017). **El extracto y el índice de Hartong (VZ 45)** son dos parámetros importantes que se miden a partir del mosto. El extracto es el principal carácter de tipo económico, puesto que está íntimamente relacionado con la cantidad de cerveza que es posible elaborar a partir de una malta. Se expresa en porcentaje y se determina a partir de una maceración en un tiempo y temperatura determinados. El extracto está formado por hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, vitaminas y sales, que fueron solubilizados durante la maceración y se encuentra inversamente relacionado con el contenido proteínas de los granos (Cattivelli *et al.*, 1994). El índice de Hartong (Vz 45°C) es un parámetro que indica la intensidad potencial de acción de las enzimas proteolíticas desarrolladas durante el proceso de malteo. Se realiza una maceración a 45°C, que es la temperatura óptima para las enzimas proteolíticas, durante 1 hora (mosto Hartong). El extracto generado en tales condiciones (en porcentaje) está compuesto fundamentalmente por sustancias nitrogenadas como producto de la disolución de proteínas complejas (Gimenez, 2017). En el INTA Bordenave se analiza la **Termoestabilidad de β -Amilasa** (enzima de degradación del almidón durante el macerado de la malta) en cebada: La β -amilasa es una enzima esencial en el proceso de malteado, ya que está involucrada en la degradación del almidón.

En cebada existen cuatro formas alélicas distintas para esta enzima, cada una de las cuales presenta diferente tasa de inactivación térmica o termoestabilidad. El nivel de termoestabilidad influye en la degradación del almidón, el cuál determina el rendimiento de los azúcares fermentables para la producción de alcohol durante el macerado. De estos cuatro alelos, dos codifican para enzimas de baja termoestabilidad mientras que los otros dos codifican para enzimas de alta termoestabilidad (alelos favorables) (Conti *et al.*, 2012). Paris *et al.* (2002) identificaron un SNP (single nucleotide polymorphism) entre los alelos de alta y baja termoestabilidad de la β -amilasa. Además, desarrollaron un marcador tipo CAPS que permite diferenciar los alelos favorables (alta termoestabilidad) de los no favorables. Este tipo de marcadores tiene la ventaja de ser codominantes y relativamente fáciles de aplicar en selección asistida. Esta técnica ha permitido, en el laboratorio de Biotecnología de la EEA Bordenave, seleccionar materiales portando alelos favorables para la β -amilasa. Estos materiales se seleccionaron sobre poblaciones segregantes F2 provenientes de cruzamientos entre materiales que portan alelos termoestables (como las variedades: Ayuna Nijo, Delta y Rika) y materiales que portan características agronómicas de interés y alto potencial de producción (Scarlett, Shakira y Andreia). Con los materiales identificados se realizaron retrocruzas y nuevos cruzamientos con el fin de incorporar los alelos termoestables de la β -amilasa en fondos genéticos de alto potencial, tratando de mejorar la calidad industrial de estas variedades (Conti *et al.*, 2012).

Ganancia Genética para el rendimiento: es posible separar la contribución relativa del mejoramiento genético y del manejo (tecnologías de manejo, aplicación de insumos y mejora en la maquinaria) a la mejora de un cultivo a través del tiempo (Slafer *et al.*, 1994; Duvick & Cassman, 1999). La ganancia genética puede ser estimada comparando un conjunto de cultivares liberados en diferentes años en condiciones y manejo homogéneo o bien a través de la comparación de datos de redes de evaluación de cultivares o datos de los mismos programas de mejoramiento (Bell *et al.*, 1995). La primera opción puede tener como inconveniente que las prácticas agronómicas y la incidencia de plagas y enfermedades a través del tiempo incidan en el rendimiento de los cultivares más antiguos, ya que las actuales condiciones son diferentes a las condiciones en que estos cultivares tuvieron su máximo uso. Otro inconveniente es que en Argentina no se tienen documentados los datos de ensayos de las viejas redes de evaluación en el cultivo de cebada cervecera. La evaluación del impacto del mejoramiento genético sobre los caracteres que determinan el rendimiento en granos de cebada puede ayudar a identificar características, ya sea potenciales o limitantes, para el futuro mejoramiento genético de este cultivo (Abeledo, *et al.*, 2003a; Sadras & Lawson, 2011). La tasa de la ganancia genética del rendimiento depende de los cultivares, del ambiente y del intervalo de tiempo bajo estudio, y usualmente es baja en ambientes de menor potencial (Austin *et al.* 1989; Slafer *et al.* 1994). Específicamente, en la cebada, los estudios relacionados con la ganancia genética son pocos y en su mayoría se han realizado en América del Norte y Europa (Riggs, *et al.*, 1981; Wych & Rasmusson, 1983; Martiniello *et al.*, 1987; Boukerrou & Rasmusson, 1990; Bulman *et al.*, 1993; Jedel & Helm, 1994; Muñoz *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 2002; Pstota, *et al.*, 2009). La mayoría de dichos autores coinciden en que el mejoramiento genético aumentó el rendimiento a través de un incremento en el número de granos.unidad de superficie⁻¹ y en el índice de cosecha. En

trigo el mejoramiento genético ha elevado los rendimientos en ambientes de alto y bajo potencial de rendimiento (Reynolds & Borlaug, 2006), con y sin la aplicación de fungicidas en cultivos de diferentes ciclos (Bainotti *et al.*, 2005). Similarmente, en cebada cervecera, el mejoramiento genético aumentó el rendimiento de los cultivares modernos a través de un amplio rango de dosis de fertilización nitrogenada (Albeledo *et al.*, 2003b). En Argentina, se dispone de un sólo trabajo que estudió la ganancia genética para el rendimiento en el cultivo de cebada cervecera. En dicho trabajo, Albeledo *et al.* (2003a) evaluaron el rendimiento potencial de ocho cultivares liberados entre 1944 y 1998 en un solo ambiente, concluyendo que el rendimiento potencial de la cebada se mantuvo constante hasta el año 1970 y luego creció a una tasa de 41 kg ha⁻¹ año⁻¹ hasta el año 1998. Además, encontraron que el período de crecimiento de la espiga se incrementó con el año de inscripción del cultivar, sin embargo, la duración total del ciclo del cultivo no fue modificada. La biomasa total y la biomasa vegetativa a madurez también aumentaron con el año de liberación del cultivar a una tasa de 45 y 19 kg ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente. El índice de cosecha y la altura de los tallos no fueron modificados. Por otro lado, determinaron que un tercio del aumento logrado por los agricultores en ese período es por el aporte del mejoramiento genético al rendimiento potencial. Si bien, la información generada en este trabajo resulta importante, es incompleta, debido a que se estudió un escaso número de cultivares en un solo ambiente ubicado fuera de las regiones de producción. A su vez, debe tenerse en cuenta que después del año 1998 hubo un fuerte recambio de cultivares que continúa aún en el presente. Por lo que resulta necesario generar más información acerca de la ganancia genética de cultivares de cebada cervecera en Argentina, evaluados en varios ambientes en las regiones de producción de cebada.

Respecto a la ganancia genética de la **calidad maltera y cervecera** en cebada existen muy pocos estudios a nivel mundial debido a que han sido consideradas variables secundarias respecto del rendimiento (Bulman *et al.*, 1993). El contenido de proteínas (o nitrógeno) de los granos de cebada fue uno de los caracteres de calidad del grano más evaluados en estudios de ganancia genética (Wych & Rasmusson, 1983; Bulman *et al.*, 1993; Passarella *et al.*, 2003; Albeledo *et al.*, 2008). Wych & Rasmusson (1983) en Estados Unidos y Bulman *et al.* (1993) en Canadá indicaron que los cultivares modernos de cebada muestran mayor cantidad de nitrógeno en los granos que sus predecesores, sin variar el índice de cosecha de nitrógeno. A su vez, Albeledo *et al.* (2008), en Argentina, hallaron que los cultivares modernos tienen mayor cantidad de nitrógeno en grano por hectárea, mayor respuesta a la fertilización nitrogenada y un mayor índice de cosecha del nitrógeno. Hay pocos estudios a nivel mundial que evalúen el efecto del mejoramiento genético sobre estos caracteres de calidad en el grano de cebada y en la malta. Pstota *et al.* (2009) determinaron el progreso de la calidad maltera de cebadas cultivadas en la República Checa, el aumento del rendimiento en 53 kg ha⁻¹ año⁻¹, y del peso de los granos, en 0,177 gramos año⁻¹, una disminución en el contenido de proteínas y un aumento del 4% en el contenido de extracto comparando las variedades liberadas a principio del siglo 21 con las liberadas a mediados de la década de 1950. También detectaron un incremento en los valores de VZ 45 de 0,0645 % para el periodo analizado.

En Argentina, Passarella *et al.* (2003) determinaron la ganancia genética en parámetros de **calidad** para cultivares liberados entre los años 1944 y 1988, sembrados durante dos años en una sola localidad, hallando que la concentración de proteínas decreció en los cultivares más modernos, debido a la disminución de la fracción C de hordeínas y el aumento de la fracción B y un incremento en el nivel de extracto de 0,054% año⁻¹. A su vez, no hallaron relación entre el peso de los granos, el tamaño de los granos y la friabilidad con el año de liberación de los cultivares. Desde el año 2000 hubo un importante recambio de cultivares, donde el cultivar introducido Scarlett, llegó a ocupar más del 80% de la superficie del cultivo, debido a su alto potencial de rendimiento como a su excelente calidad, reconocida a nivel internacional. Esto provocó que los cultivares de origen nacional se dejaran de lado, por lo que actualmente la mayor parte de la superficie sembrada corresponde a cultivares introducidos.

Gimenez (2017) evaluó en 25 cultivares de cebada, en la región de producción de Argentina entre los años 1931 y 2007, la ganancia genética del carácter rendimiento y calidad de los granos, y sus respectivos componentes. Gimenez (2017) concluyó que el mejoramiento genético aumentó el rendimiento en grano del cultivo de cebada cervecera en Argentina con una ganancia de 27,5 kilogramos de grano ha⁻¹ año⁻¹. Esta ganancia no fue constante a través del tiempo, puesto que en los primeros 35 años fue similar al promedio de la serie total de años, en los siguientes 19 años no hubo ganancia genética significativa y si aumentó considerablemente en los últimos 17 años. Los cultivares de ciclo largo presentaron mayor ganancia genética para el rendimiento en grano que los cultivares de ciclo corto. Comprobó además que el mejoramiento genético aumentó el rendimiento a través de un incremento en el número de granos, mientras que el peso de los granos se mantuvo constante. Este incremento se debió principalmente a una mejora en el número de espigas por unidad de superficie. No obstante, debido a la variabilidad genética en todos los componentes del rendimiento analizados, se puede decir que el mejoramiento genético en cebada tiene margen para seguir aumentando el rendimiento en grano (Gimenez, 2017). Hasta el presente, es importante considerar que el mejoramiento genético ha sido capaz de incrementar el rendimiento en grano en el cultivo de cebada cervecera sin perjuicios sobre la calidad y además ha logrado aumentar simultáneamente ambas variables en los cultivares de ciclo largo. En trigo pan en cambio el mejoramiento genético aumentó el número de granos, pero bajó el peso de los mismos y en general disminuyó la calidad de los granos. La calidad industrial de la malta de cebada cervecera en Argentina fue aumentada a través del tiempo. El mejoramiento genético ha incrementado el contenido de extracto de malta lo que produjo una mejora en la competitividad de la malta generada, aumentando la eficiencia de los procesos de industrialización, ya que este carácter se encuentra relacionado directamente con la cantidad de cerveza que produce una malta. También ha aumentado la actividad enzimática de la malta (índice de Hartong) y la friabilidad de la misma. De igual manera que para el rendimiento Gimenez (2017), halló una amplia variabilidad en los caracteres de la calidad industrial de la malta evaluada, por lo cual el mejoramiento genético también presenta una beta en este sentido para avanzar en la obtención de mejores combinaciones de estos parámetros (Gimenez, 2017).

A futuro se espera que las herramientas biotecnológicas logren una piramidalización de los genes de interés agronómico, aportando por un lado resistencia a las principales enfermedades presentes en la cebada, además de contribuir a aumentar la durabilidad de la misma y por otro la inclusión de genes que aporten una mejora en la calidad. Desde el punto de vista ambiental, la inclusión de resistencia genética en los nuevos cultivares resulta en un gran aporte a la sustentabilidad del sistema, por la reducción del uso de agroquímicos utilizados para controlar enfermedades, además de reducir los costos para el productor.

Referencias

- Abeledo, G., Calderini, D. F. & Slafer, G. A. (2003a). Genetic improvement of barley yield potential and its physiological determinants in Argentina (1944 – 1998). *Euphytica*, 130, 325-334.
- Abeledo, G., Calderini, D. F. & Slafer, G. A. (2003b). Genetic improvement of barley responsiveness to nitrogen fertilization and its physiological determinants in barley. *Euphytica*, 133, 291-298.
- Abeledo, G., Calderini, D. F. & Slafer, G. A. 2008. Nitrogen economy in old and modern malting barleys. *Field Crops Research*, 106, 171-178.
- Ahmad, M., Gani, A., Shah, A., Gani, A. & Masoodi, F.A. (2016). Germination and microwave processing of barley (*Hordeum vulgare* L.) changes the structural and physicochemical properties of β -d-glucan & enhances its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymers*, 153, 696-702.
- Alter, S., Bader, C., Spannagl, M., Wang, Y., Bauer, E., Schön, C.C. & Mayer, K.F. (2015). DroughtDB: An expert-curated compilation of plant drought stress genes and their homologs in nine species. Database (Oxford). 2015: bav046.
- Austin, R.B., Ford, M.A. & Morgan, C.L. (1989) Genetic improvement of Winter wheat: a further evaluation. *The Journal of Agricultural Science*, 112, 295 – 301.
- Baba WN, Rashid I, Shah A, Ahmad M, Gani A, & Masoodi FA. (2014). Effect of microwave roasting on antioxidant and anti-cancerous activities of barley flour. *Journal Saudi Society of Agricultural Sciences*, 27, 143-154.
- Baik, B.K. & Ullrich, S.E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48, 233-242.
- Bainotti, C., Frascina, J., Salines, J., Masiero, B., Formica, M., Nisi, J., Alberione, E. & Gómez, D. (2005). Yield increase of argentine wheat cultivars released from 1930 to 2000. 7th International Wheat Conference, Nov 27 – Dec 2, 2005, Mar del Plata – Argentina. Abstracts pp 285.
- Barabaschi, D., Guerra, D., Lacrima, K., Laino, P., Michelotti, V., Urso, S., Valè, G. & Cattivelli, L. (2011). Emerging Knowledge from genome sequencing of crop species. *Molecular Biotechnology*, 50, 50-266.
- Bednarek, P.T., Orłowska, R., Koebner, R.M.D. & Zimny, J. (2007). Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology*, 7,10.

- Bell, M.A., Fischer, R. A., Byerlee, D. & Sayre, K. (1995). Genetic and agronomic contributions to yield gains: a case study for wheat. *Field Crops Research*, 44, 55- 65.
- Belo, A., Beatty, M.K., Hondred, D., Fengler, K.A., Li, B. & Rafalski, A. (2010). Allelic genome structural variations in maize detected by array comparative genome hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 355-367
- Bond, J., Capehart, T., Allen, E. & Kim, G. (2015). Boutique brews, barley, and the balance sheet: Changes in malt barley industrial use require an updated forecasting approach. *Economic Research Division, United States Department of Agriculture*, 8-23
- Boukerrou, L. & Rasmusson, D.D. (1990). Breeding for high biomass yield in spring barley. *Crop Science* 30, 31-35.
- Braszewska-Zalewska, A. & Hasterok, R. (2013). Epigenetic modifications of nuclei differ between root meristematic tissues of *Hordeum vulgare*. *Plant Signal Behavior*, 8, e26711.
- Breiman, A. (1985). Plant regeneration from *Hordeum spontaneum* and *Hordeum bulbosum* immature embryo derived calli. *Plant Cell Reports*, 4, 70-73.
- Bulman, P., Mather, D.E. & Smith, D.L. (1993). Genetic improvement of spring barley cultivars grown in eastern Canada from 1910 to 1998. *Euphytica*, 71, 35-48.
- Cardoza, V. (2008). Tissue culture: The manipulation of plant development. En Jr C.N. Stewart (Ed.), *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications* (112-134). 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.
- Castillo, A.M. & Cistue, L. (1993). Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Reports*, 12, 139-143.
- Cattivelli, L., Delogu, G., Terzi, V. & Stanca A. M. (1994). Progress in barley breeder. En G.A. Slafer (Ed.), *Genetic Improvement of Field Crops* (95-161). New York.: Marcel Dekker Press.
- Cheng, T.Y. & Smith, H.H. (1975). Organogenesis from callus culture of *Hordeum vulgare*. *Planta*, 123, 307-310.
- Cheung, P. & Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Molecular Endocrinology*, 19, 563-573.
- Conti, V., Moreyra, F., González, G., Vallati, A. & Giménez, F. (2012). Biotecnología aplicada al mejoramiento de cereales menores en Argentina, Área de Mejoramiento y Calidad Vegetal – EEA Bordenave- INTA, Argentina. Recuperado de [file:///D:/libro%20cereales%20inv2021/script-tmp-inta-biotecnologia_aplicada_al_mejoramiento_cereales_%20\(1\).pdf](file:///D:/libro%20cereales%20inv2021/script-tmp-inta-biotecnologia_aplicada_al_mejoramiento_cereales_%20(1).pdf)
- Dahleen, L.S. (1999). Donor-plant environment effects on regeneration from barley embryo-derived callus. *Crop Science*, 39, 682-685.
- Dawson, I.K., Russell, J., Powell, W., Steffenson, B., Thomas, W.T. & Waugh, R. (2015). Barley: a translational model for adaptation to climate change. *New Phytologist*, 206, 913-31
- De Bernardi, L.A. (2019). Perfil de la cebada. MAGyP. Recuperado de <file:///D:/libro%20cereales%20inv2021/perfil-de-cebada-2019.pdf>
- Denchev, P.O. & Conger, B.V. (1994). Plant regeneration from callus cultures of switchgrass. *Crop Science*, 34, 1623-1627.

- Dunwell, J.M. (1986). Barley. En D.A. Evans, R. Sharp, P.V. Ammirato (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 4.* (339-369), 1st ed. London: MacMillan and Co.
- Duvich, D. N. & Cassman, K.G. (1999). Post-green revolution trends in yield potential of temperate maize in the north-central United States. *Crop Science*, 39, 1622-1630.
- Espinasse, A. & Lay, C. (1989). Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes. *Crop Science*, 29, 201-205.
- Fahmy, A.H. & El-Shihy, O. (2006). Improvement of plant regeneration from long term callus cultures of two Egyptian wheat cultivars. *Arabian Journal of Biotechnology*, 8, 177-188.
- Feschotte, C. & Pritham, E.J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review Genetics*, 41, 331-368.
- Feschotte, C. & Pritham, M.A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Review Genetics*, 10, 691-703.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. (1998). DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 223-247.
- Foolad, M.R. & Sharma, A. (2005). Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *Acta Horticulturae*, 95, 225-240.
- Ganeshan, S., Baga, M., Harwey, B.L., Rosnagel, B.G., Scoles, G.J., Chibbar, R.N. (2003). Production of multiple shoots from thiadiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 73, 57-64.
- George, E.F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background, En E.F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (1-28). 3rd ed. Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- Gimenez, F.J. (2017). “Ganancia Genética en Cebada Cervecera (*Hordeum vulgare* L.) en Argentina durante el período 1931-2007”. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Recuperada de <file:///D:/libro%20cereales%20inv2021/Tesis%20doctorado%20Fernando%20Gimenez.PDF>
- Gozukirmizi, N. & Karlik, E. (2017). Barley (*Hordeum vulgare* L.) Improvement Past, Present and Future. In: *Brewing Technology*. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/brewing-technology/barley-hordeum-vulgare-l-improvement-past-present-and-future>
- Gozukirmizi, N., Ari, S., Oraler, G., Okatan, Y. & Palavan, N. (1990). Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley. *Acta Botanica Neerlandica*, 39, 379-387.
- Gozukirmizi, N., Temel, A., Marakli, S. & Yilmaz, S. (2016). Transposon activity in plant genomes. En K.R. Hakeem, H. Tombuloglu (Eds.), *Plant Omics: Trends and Applications* (83-108). London/Berlin, Switzerland: Springer.
- Graner, A., Jahoor, A. Schondelmaier, J., Siedler, H., Pillen, K., Fischbeck, G., Wenzel, G. & Herrmann, R.G. (1991). Construction of an RFLP map of barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 83, 250-256.
- Gujral, H.S. & Gaur, S. (2005). Instrumental texture of chapati as affected by barley flour, glycerol monostearate and sodium chloride. *International Journal of Food Properties*, 8, 377-385

- Gupta, P.K., Rustgi S. & Mir, R.R. (2008). Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity (Edinb)*, 101, 5-18.
- Gurushidze, M., Hensel, G., Hiekel, S., Schedel, S., Valkov, V. & Kumlehn, J. (2014). True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS ONE*, 9, e92046.
- Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkman, M.A. & Fendos, E. (1985). Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Science*, 25, 27-31.
- Harlan, J.R. (1976). Barley, *Hordeum vulgare* (Gramineae--Triticinae). En N.W. Simmonds (Ed.), *Evolution in Crop Plants* (93-98). London: Longman.
- Heun, M., SchäFer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B. & Salamini, F. (1997). Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278, 1312-1314.
- Hisano, H., Matsuura, T., Mori, I.C., Yamane, M. & Sato, K. (2016). Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 66-72.
- Holme, I.B., Brinch-Pedersen, H., Lange, M. & Holm, P.B. (2008). Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Reports*, 27, 1833-1840.
- Holtkjolen, A.K., Baevere, A.B., Rodbotten, M., Berg, H. & Knutsen, S.H. (2008). Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour. *Food Chemistry*, 110, 414-421.
- Huang, B. & Sunderland, N. (1982). Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. *Annals of Botany*, 49, 77-88.
- Jasencakova, Z., Meister, A. & Schubert, I. (2001). Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma*, 110, 83-92.
- Jasencakova, Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M. & Schubert, I. (2003). Histone modifications in Arabidopsis—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant Journal*, 33, 471-480.
- Jedel, P. & Helm, J.H. (1994). Assessment of western Canadian barleys of historical interest: I. Yield and agronomic traits. *Crop Science*, 34, 922-927.
- Jiang, W., Cho M.J. & Lemaux, P.G. (1998). Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Biotechnology*, 15, 63-69.
- Kohler, F. & Wenzel, G. (1985). Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsible factor. *Journal of Plant Physiology*, 121, 181-191.
- Kott, L.S. & Kasha, K.J. (1984). Initiation and morphological development of somatic embryoids from barley cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 62, 1245-1249.
- Kumlehn, J. & Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. & Loerz, H. (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal*, 4, 251-261.

- Lan, W., Wang, W., Yu, Z., Qin, Y., Luan, J. & Li, X. (2016). Enhanced germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) using chitooligosaccharide as an elicitor in seed priming to improve malt quality. *Biotechnology Letters*, 38, 1935-1940.
- Lazzeri, P.A., Brettschneider, R., Luhrs, R. & Lorz, H. (1991). Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 437-444.
- Li, H.P., Huang, T., Wang, C.X., Liao & Y.C. (2009). An efficient regeneration system of barley cultivars from leaf base segments. *Biology Plantarum*, 53, 733-736.
- Luhrs, R. & Nielsen, K. (1992). Microspore cultures as donor tissue for the initiation of embryogenic cell suspensions in barley. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 169-178.
- Luo, M., Liu, X., Singh, P., Cui, Y., Zimmerli, L. & Wu, K. (2012). Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. *Biochimistry and Biophysics Acta*, 1819, 129-136.
- Martiniello, P.G., Deloug, G., Oboard, M., Boggini, G. & Stanca, A.M. (1987). Breeding progress in grain yield and selected agronomic characters of winter barley (*Hordeum vulgare* L.) over the last quarter of the century. *Plant Breeder*, 99, 289-294.
- Matthews, P.R., Wang, M.B., Waterhouse, P.M., Thornton, S., Fieg, S.J., Gubler, F. & Jacobsen, J.V. (2001). Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding*, 7, 195-202.
- Mayer, K.F.X., Martis, M., Hedley, P.E., Simkova, H., Liu, H. & Morris, J.A. (2011). Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell*, 23, 1249.
- Mayer, K.F.X., Waugh, R., Langridge, P., Close, T.J., Wise, R.P. & Graner, A. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491, 711.
- McClintock, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 4, 792-801.
- Meijón, M., Feito, I., Valledor, L., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. (2010). Dynamics of DNA methylation and Histone H4 acetylation during floral bud differentiation in azalea. *Plant Biology*, 10, 10.
- Moose, S.P. & Mumm, R.H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21 century crop improvement. *Plant Physiology*, 147, 969-977.
- Muñoz, P., Voltas, J., Arauz J.L., Igartua, E. & Romagosa, I. (1998). Changes over time in the adaptation of barley release in north-eastern Spain. *Plant Breeder*, 117, 531-535.
- Nasircilara, G., Kenan, T. & Callan, F. (2006). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany*, 38, 637-645.
- Nevo, E. (1992). Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. En P. Shewry (Ed.), *Barley: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology* (19-43). U.K: C.A.B. International; Wallingford.
- Obert, B., Middlefell-Williams, J. & Millam, S. (2008). Genetic transformation of barley microspores using anther bombardment. *Biotechnology Letters*, 30, 945-949.

- Ortiz, R., Mohamed, S.F., Madsen, S., Weibull, J. & Christianse, J.L. (2002). Assessment of phenotypic variation in winter barley in Scandinavia. *Soil and Plant Science*, 51, 6-13.
- Ozawa, K. & Komamine, A. (1989). Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetic*, 77, 205-211.
- Passarella, V.S., Savin, R., Abeledo G.L. & Slafer G. (2003). Malting quality as affected by barley breeding (1944-1988) in Argentina. *Euphitica*, 134, 161-167.
- Poehlman, J.M. (1985). Adaptation and distribution. En D.C. Rasmusson (Ed.), *Barley* (1-17). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc.
- Psota, V., Hartmann, J., Sejkorova, S., Loucková T. & Vejrazka K. (2009). 50 years of Progress in Quality of Malting Barley Grown in the Czech Republic. Publication N° G-2009-1112-1017. The Institute of Brewing & Distilling.
- Quan, X., Zeng, J., Ye, L., Chen, G., Han, Z., Shah, J.M. & Zhang, G. (2016). Transcriptome profiling analysis for two Tibetan wild barley genotypes in responses to low nitrogen. *Plant Biology*, 16.
- Rajib, R., Abdelmoumen, T., Hakeem, K.R., Mohamed, R.A.G. & Tah, J. (2013). Molecular marker-assisted technologies for crop improvement. En R. Roychowdhury (Ed.), *Crop improvement in the era of climate change*. (241-258). Delhi, India: I.K. International Publication House Pvt. Ltd.
- Reynolds, M.P. & Borlaug, N.E. (2006) International Collaborative Wheat Improvement: Impacts and Future Prospects. *Journal of Agricultural Science*, 144, 3-17.
- Riggs, T.J., Hanson, P.R., Start, N.D., Miles, D.M., Morgan, C.L. & Ford, M.A. (1981). Comparison of spring barley varieties grown in England and Wales between 1880 and 1980. *Journal Agricultural Science*, 97, 599-610.
- Rikiishi, K., Matsuura, T., Maekawa, M. & Takeda, K. (2008). Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. *Breeding Science*, 58, 129-135.
- Rollins, J.A., Habte, E., Templer, S.E., Colby, T., Schmidt, J. & von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 64, 3201-3212.
- Sadras, V.O. & Lawson, Ch. (2011). Genetic gain in yield and associated changes in phenotype, trait plasticity and competitive ability of South Australian Wheat varieties released between 1958 and 2007. *Crop & Pasture Science*, 62, 533 – 549.
- Sahrawat, A.K. & Chand, S. (2004). High frequency plant regeneration from coleoptile tissue of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, 167, 27-34.
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R. & Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3, 429-441.
- Santamaría, M.E., Hasbún, R., Valera, M.J., Meijón, M., Valledor, L., Rodríguez, J.L., Toorop, P.E., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. (2009). Acetylated H4 histone and genomic DNA methyla-

- tion patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1360-1369.
- Sharma, V.K., Hansch, R., Mendel, R.R. & Schulze, J. (2005.) Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 56, 1913-1922.
- Shewry, P.R. (1992) *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. Wallingford: C.A.B International.
- Slafer, G.A., Satorre, H.H., & Andrade, F.H. (1994). Increases in grain yield in bread wheat from breeding and associated physiological changes. En G.A. Slafer (Ed.), *Genetic improvement of field crops* (1 -68). New York: Marcel Dekker.
- Sprink, T., Metje, J. & Hartung, F. (2015). Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 47-53.
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, R.K., Perovic, D., Grosse, I. & Graner, A. (2007). A 1,000-loci transcript map of the barley genome: New anchoring points for integrative grass genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 823-839.
- Technical Brochure (1970). Milne Marsters Company.
- Temel, A. & Gözükmızı, N. (2011). Advances in barley biotechnology: Tissue culture and molecular markers. En S.B. Elfson (Ed.), *Barley: Production, Cultivation and Uses* (129-159). Ottawa: Nova Science Publishers.
- Temel, A., Kartal, G. & Gozukirmizi, N. (2008). Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22, 911-914.
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491, 711-716.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. & Shinozaki, K. (2010). Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion of Plant Biology*, 13, 132-138.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok J. & Filonova, L. 2002. Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 69, 233-249.
- von Bothmer, R. (1992). The wild species of *Hordeum*: Relationships and potential use for improvement of cultivated barley. In: P.R. Swewry (Ed.), *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology* (3-18). Wallingford, Oxon: C.A.B International.
- Ward, K.A. & Jordan, M.C. (2001). Callus formation and plant regeneration from immature and mature embryos of rye (*Secale cereale* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 37, 361-268.
- Weigel, R.C. & Hughes KW. (1985). Long term regeneration by somatic embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue cultures derived from apical meristem explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 151-162.
- Wendt, T., Holm, P.B., Starker, C.G., Christian, M., Voytas, D.F., Brinch-Pedersen, H. & Holme, I.B. (2013). TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology*, 83, 279-285.
- Wicker, T., Zimmermann, W., Perovic, D., Paterson, A.H., Ganal, M., Graner, A. & Stein, N. (2015). A detailed look at 7 million years of genome evolution in a 439-kb contiguous se-

- quence at the barley Hv-eIF4E locus: recombination, rearrangements and repeats. *Plant Journal*, *41*, 184-194.
- Wych, R.D., & Rasmusson, D.C. (1983). Genetic improvement in malting barley cultivars since 1920. *Crop Science*, *23*, 1037–1040.
- Zeng, X., Bai, L., Wei, Z., Hongjun, Y., Wang, Y., Xu, Q., Tang, Y. & Nyima, T. (2016). Transcriptome analysis revealed the drought-responsive genes in Tibetan hulless barley. *BMC Genomics*, *17*, 386.
- Zhang, J., Zheng, H.G., Aarti, A., Pantuwan, G., Nguyen, T.T., Tripathy, J.N., Sarial, A.K., Robin, S., Babu, R.C., Nguyen, B.D., Sarkarung, S., Blum, A. & Nguyen, H.T. (2001). Location genomic regions associated with components of drought resistance in rice: Comparative mapping within and across species. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*, 19-29.