Regulación del desarrollo en trigo por los genes de sensibilidad a fotoperiodo *Ppd-1*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Thomas Ignacio Pérez Gianmarco

Ingeniero Agrónomo

Universidad Nacional de Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

2014

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (CITNOBA, CONICET-UNNOBA).

FAUBA Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis
Fernanda Gabriela González
Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Co-director
Gustavo Ariel Slafer
Ingeniero Agrónomo (Universidad de La Plata, Argentina)
Ph.D. (University of Melbourne, Australia)

JURADO DE TESIS

JURADO
Santiago Alvarez Prado
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Doctor en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Rosario, Argentina)

JURADO
Gabriela E. Tranquilli
Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

JURADO
Ingrid Garbus
Bioquímica (Universidad Nacional del Sur, Argentina)
Doctora en Bioquímica (Universidad Nacional del Sur, Argentina)

Fecha de defensa de la tesis: 10 de marzo de 2020

"If I have seen further, it is by standing in the shoulders of giants"

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comité consejero de tesis, mi directora, Fernanda González y mi co-director, Gusatvo Slafer. A Gustavo, por su aporte tanto en la escritura de la tesis como de las publicaciones asociadas a la misma, pero particularmente por haberme abierto las puertas del laboratorio de ecofisiología de la UdL y por haberse ocupado de que tuviera todo para hacer de mi estancia allí una excelente experiencia. Y muy especialmente a Fernanda, quien durante estos últimos seis años no sólo cumplió de forma impecable con su rol de directora, sino que además me inspiró, guió y apoyó en cada paso de este proyecto más allá de sus responsabilidades. Gracias por permitirme con generosidad participar de la ciencia y disfrutar al hacerlo.

Agradezco al sistema educativo argentino en todos sus niveles por haberme facilitado el acceso al conocimiento, y al sistema de ciencia y técnica argentino por haberme otorgado la posibilidad de seguir formándome.

Agradezco a mis compañeros de trabajo y de cursos en Buenos Aires y Lleida, y muy especialmente al Galpón de Ecofisiología, en Pergamino. Gracias a todos ellos por compartir conmigo esfuerzos, discusiones interesantes, momentos de trabajo y descanso por igual. Su aporte a este proyecto es tanto incalculable como indiscutible. En especial, agradezco a todos aquellos compañeros que con su trabajo, a veces con el hombro y otras con la cabeza, me ayudaron con los experimentos y análisis de esta tesis. Gracias porque con su apoyo no solamente lo hicieron posible, sino que además lo hicieron agradable.

Agradezco a mi familia por ser mi soporte en todos los aspectos, profesionales y humanos, mientras duró este proyecto. Especialmente a mis padres, quienes con esfuerzo me dieron más herramientas de las que puedo contar para llevarlo adelante. Gracias a ellos, a mis hermanos y a Flor, por compartir conmigo todos los matices de la tesis, por acompañarme en disfrutarlos o por ayudarme a soportarlos, por su paciencia y compañía, siempre.

Agradezco a mis amigos. A algunos de ellos porque me ayudaron más allá de la amistad, directamente, con los experimentos. A otros, porque se convirtieron en mi familia lejos de casa. A todos, porque me acompañaron durante este camino en forma colectiva. A cada uno de ellos, porque cada uno tuvo una manera especial de acercarse y permanecer al lado mío durante este tiempo.

Agradezco a aquellas personas que influyeron a través de su trabajo la forma en la que pienso y escribo. En particular, a Richard McElreath y William Zinsser.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Thomas I. Pérez Gianmarco

Publicaciones derivadas de la tesis

Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2018. Wheat pre-anthesis development as affected by photoperiod sensitivity genes (*Ppd-1*) under contrasting photoperiods. Functional Plant Biology **45**, 645–657.

Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2019. Photoperiod-sensitivity genes shape floret development in wheat. Journal of Experimental Botany **70**, 1339–1348.

Pérez-Gianmarco TI, Severini AD, González FG. 2020. Photoperiod-sensitivity genes (*Ppd-1*): Quantifying their effect on the photoperiod response model in wheat. Journal of Experimental Botany **71**, 1185-1198.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS xiv
ÍNDICE DE FIGURAS xvi
Abreviaturas xx
Resumen xxii
Abstract xxiv
Capítulo 1: Introducción General 27
1.1 Planteo del problema y revisión de antecedentes 28
1.1.1 Importancia del cultivo de trigo 28
1.1.2 Desarrollo del cultivo a antesis y definición de las etapas que lo componen 28
1.1.3 Importancia del desarrollo en la adaptación y la generación de rendimiento 31
1.1.4 Factores ambientales que controlan el desarrollo a antesis 32
1.1.5 Control genético de la respuesta al fotoperíodo 34
1.1.6 Impacto de los genes *Ppd-1* sobre el desarrollo a antesis: Estudios previos 35
1.2 Objetivos 37
1.3 Hipótesis 38
1.4 Síntesis de la estructura de la tesis 38
Capítulo 2: Desarrollo fásico y morfológico según la combinación alélica para *Ppd-1* bajo fotoperíodos contrastantes 41
2.1 Introducción 42
2.2 Materiales y métodos 43
2.2.1 Diseño experimental, tratamientos y condiciones experimentales 43
2.2.2 Mediciones, variables respuestas y análisis 44
2.3 Resultados 45
2.3.1 Tiempo a antesis, número final y tasa de aparición de hojas 46
2.3.2 Duración de las etapas vegetativa, y reproductivas temprana y tardía 49
2.3.3 Número de hojas y de espiguillas 50
2.3.4 Dinámica de diferenciación de primordios 52
2.4 Discusión 53
2.4.1 Tiempo a antesis y duración de las etapas pre-antesis. 53
2.4.2 Dinámica de diferenciación y número final de primordios en el ápice 55
2.5 Conclusión 56
Capítulo 3: Dinámica del desarrollo floral y número de flores fértiles en antesis según la combinación alélica para *Ppd-1* bajo fotoperíodos contrastantes 59
3.1 Introducción 60
3.2 Materiales y métodos 61
3.2.1 Diseño experimental, tratamientos y condiciones experimentales 61
3.2.2 Mediciones, variables respuestas y análisis 61
3.3 Resultados 62
3.3.1 Número de flores fértiles por espiga 62
3.3.2 Iniciación y superviviencia de flores bajo fotoperíodo corto 64
3.3.3 Desarrollo floral bajo fotoperíodo corto 66
3.4 Discusión 68
3.5 Conclusión 72

Capítulo 4: Cuantificación del efecto de los genes *Ppd-1* sobre modelos novedosos de respuesta a fotoperíodo 73
4.1 Introducción 74
4.2 Materiales y métodos 76
4.2.1 Material vegetal y experimentos 76
4.2.2 Modelo de respuesta a fotoperíodo afectado por los genes *Ppd-1* 78
4.3 Resultados 84
4.3.1 Tiempo a antesis 84
4.3.2 Duración de las etapas pre-antesis 87
4.3.3 Efecto de los *Ppd-1* en el número final de hojas y la dinámica de aparición de hojas 92
4.4 Discusión 93
4.5 Conclusión 94
Capítulo 5: Respuesta directa a cambios en el fotoperíodo durante la encañazón según la combinación alélica en *Ppd-1* y su impacto sobre el rendimiento potencial a campo 97
5.1 Introducción 98
5.2 Materiales y Métodos 99
5.2.1 Material vegetal 99
5.2.2 Condiciones experimentales y tratamientos 100
5.2.3 Mediciones realizadas 100
5.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico 101
5.3 Resultados 102
5.3.1 Efecto de los genes sobre la fenología bajo fotoperíodo natural 102
5.3.2 Efecto de los genes sobre la respuesta directa a extensiones de fotoperíodo durante la ERTA 105
5.4 Discusión 111
5.4.1 Respuesta a fotoperíodo de la duración de la etapa reproductiva tardía .. 111
5.4.2 Respuesta al fotoperíodo del número de flores fértiles en antesis y sus determinantes fisiológicos 112
5.5 Conclusión 113
Capítulo 6: Balance entre respuesta directa y memoria al fotoperíodo en el desarrollo a antesis según la composición alélica en *Ppd-1* 115
6.1 Introducción 116
6.2 Materiales y métodos 117
6.2.1 Diseño experimental, condiciones experimentales y tratamientos 117
6.2.2 Mediciones, variables respuesta y análisis estadístico 118
6.3 Resultados 120
6.3.1 Duraciones de la EVE y la ERTE y sus respuestas directa y memoria.... 120
6.3.2 La respuesta del número de estructuras a cambios en el fotoperíodo entre emergencia y espiguilla terminal 124
6.3.3 Respuesta directa y memoria de la ERTA a extensiones de fotoperiodo. 129
6.4 Discusión 130
6.5 Conclusión 133
Capítulo 7: Discusión general 135
7.1 Integración de los resultados a través de los capítulos 138
7.1.1 Integrando los resultados fisiológicos a los conocimientos sobre ruta metabólica de la floración 138
7.1.2 Integrando los resultados al modelo de respuesta a fotoperíodo en trigo 139

7.1.3 ¿Es posible modificar la sensibilidad a fotoperíodo de las etapas de forma independiente sólo a través de *Ppd-1*? 140
7.2 Evaluación de las hipótesis..... 142
7.3 Principales contribuciones al conocimiento 143
7.4 Interrogantes aún por ser respondidos..... 144
Capítulo 8: Bibliografía 145

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 2.2.1: GENOTIPO DE CADA LÍNEA ISOGÉNICA (NIL) PARA PPD-1 EN LOS GENOMAS A, B Y D. LOS ALELOS PPD-1A ESTÁN ASOCIADOS A FENOTIPOS INSENSIBLES A FOTOPERÍODO. 44
CUADRO 2.3.1: CUADRADOS MEDIO PARA LOS EFECTOS PRINCIPALES EXPERIMENTO (EXP), FOTOPERÍODO (FOT) Y GENOTIPO (GEN) Y LAS INTERACCIONES GEN X FOT Y GEN X FOT X EXP PARA LOS ANOVA PARA LA DURACIÓN DESDE EMERGENCIA (EM) A ESPIGUILLA TERMINAL (ET) Y A ANTESIS (AN), ADEMÁS DE LAS ETAPAS VEGETATIVA (EVE), REPRODUCTIVA TEMPRANA (ERTE) Y TARDÍA (ERTA), Y PARA EL NÚMERO FINAL DE HOJAS EN EL VÁSTAGO PRIPNCIPAL (NFH), EL NÚMERO DE ESPIGUILLAS POR ESPIGA (ESPILLAS ESPIGA $^{-1}$) Y EL NÚMERO DE PRIMORDIOS TOTALES (NPT). A LA DERECHA DE CADA VALOR SE INDICA SU NIVEL DE SIGNIFICANCIA (NS, NO SIGNIFICATIVO, *, P < 0,05, **, P < 0,01, ***, P < 0,001). 46
CUADRO 2.3.2: NÚMERO FINAL DE HOJAS (NFH), NÚMERO DE ESPIGUILLAS POR ESPIGA (ESPILLAS ESPIGA^{-1}) Y NÚMERO DE PRIMORDIOS TOTALES DIFERENCIADOS EN EL ÁPICE (NPT) PARA CADA GENOTIPO EN FOTOPERÍODO LARGO (16 H) Y CORTO (12 H). LETRAS DIFERENTES EN LA MISMA COLUMNA INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE FILAS (TUKEY, A = 0,05). 51
CUADRO 2.3.3: TASA DE DIFERENCIACIÓN DE PRIMORDIOS DE HOJAS (TDP-H) Y ESPIGUILLAS (TDP-E), Y TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA AL CAMBIO DE TASA (TCT) PARA CADA GENOTIPO EN FOTOPERÍODO LARGO (16 H) Y CORTO (12 H). LETRAS DIFERENTES EN LA MISMA COLUMNA INDICAN QUE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA DE 95 % DE ESAS FILAS NO SE SOLAPAN. 53
CUADRO 3.3.1: CUADRADOS MEDIO PARA LOS EFECTOS PRINCIPALES E INTERACCIONES SEGÚN LOS ANOVA SOBRE EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGA (NFF ESP^{-1}) Y POR ESPIGUILLA FÉRTIL (NFF EPILLA$_F$ $^{-1}$), EL NÚMERO DE ESPIGUILLAS FÉRTILES POR ESPIGA (EPILLA$_F$ ESP^{-1}), Y EL PESO SECO DE LAS ESPIGAS EN ANTESIS (PSE). LOS ASTERISCOS INDICAN EL NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE CADA EFECTO SOBRE LAS VARIABLES RESPUESTA SEGÚN EL CÓDIGO: *: P <0,05, **: P <0,01, ***: P <0.001, N.S.: NO SIGNIFICATIVO. 62
CUADRO 3.3.2: COMPONENTES DEL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGA, EL NÚMERO DE ESPIGUILLAS FÉRTILES POR ESPIGA (EPILLA$_F$ ESP^{-1}) Y EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGUILLA FÉRITIL (NFF EPILLA$_{F-}$^{1}) POR GENOTIPOS BAJO DISTINTOS TRATAMIENTOS DE FOTOPERÍODO. LETRAS DISTINTAS EN LA MISMA COLUMNA INDICAN DIFERENCIAS SIGNITICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA DE TUKEY (A = 0,05)..... 64
CUADRO 3.3.3: PARÁMETROS DE LA DINÁMICA DE INICIACIÓN DE PRIMORDIOS FLORALES EN LA ESPIGUILLA CENTRAL DE LOS CINCO GENOTIPOS BAJO FOTOPERÍODO CORTO Y SU SUPERVIVENCIA (SF$_C$). SE DETALLAN EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES (NFF$_C$), EL NÚMERO MÁXIMO DE FLORES INICIADAS EN LA ESPIGUILLA CENTRAL (NIF$_C$), LA TASA Y LA DURACIÓN DE INICIACIÓN DE PRIMORDIOS FLORALES (TIF$_C$ Y DIF$_C$, RESPECTIVAMENTE). 65
CUADRO 3.3.4: TASA DE DESARROLLO DE LA PRIMERA (F1) Y SEGUNDA (F2) FLOR DESDE EL RAQUIS EN LA ESPIGUILLA CENTRAL DE CADA UNO DE LOS CINCO GENOTIPOS CULTIVADOS BAJO FOTOPERÍODO CORTO. LA TASA DE DESARROLLO SE CALCULÓ COMO LA INVERSA DEL TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO ENTRE LOS ESTADÍOS W4 Y W10 (WADDINGTON ET AL. 1983). 67
CUADRO 4.2.1: GENOTIPO DE CADA LÍNEA ISOGÉNICA (NIL) EN LOS GENOMAS A, B Y D. 77
CUADRO 4.2.2: DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS PROPUESTOS DE RESPUESTA DEL TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO DESDE EMERGENCIA HASTA ANTESIS AL FOTOPERÍODO PROMEDIO DURANTE ESA ETAPA, Y DE LOS EFECTOS DE PPD-1 SOBRE LOS PARÁMETROS DE LOS MISMOS. N/A INDICA CUANDO NO APLICA MODELAR EL EFECTO DE LOS GENES SOBRE EL PARÁMETRO DADO QUE NO EXISTE EN ESE MODELO. EL MODELO ELEGIDO (E) ESTÁ RESALTADO EN LA TABLA Y DESCRIPTO EN DETALLE POR LA ECUACIÓN 4.1. 80
CUADRO 4.2.3: DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS DE RESPUESTA A FOTOPERÍODO PROPUESTOS CONSIDERANDO CADA ETAPA PRE-ANTESIS. N/A INDICA CUANDO NO APLICA MODELAR EL EFECTO DE LOS GENES SOBRE EL PARÁMETRO DADO QUE NO EXISTE EN ESE MODELO. EN NEGRITA, EL MODELO ELEGIDO (T) ESTÁ RESALTADO EN LA TABLA Y DESCRIPTO EN DETALLE POR LA ECUACIÓN 4.2..... 82
CUADRO 4.3.1: EVALUACIÓN DE LOS MODELOS DEL PRIMER GRUPO SEGÚN DIFERENCIAS EN SU HABILIDAD PREDICTIVA ESPERADA SEGÚN VALIDACIÓN CRUZADA (ΔHPE-CV) Y SU ERROR ESTÁNDAR, EN RELACIÓN AL MEJOR MODELO CON ESE CRITERIO. TAMBIÉN SE DETALLA LA BONDAD DE AJUSTE (R^2) DE CADA MODELO Y SU RMSE PARA VALORES OBSERVADOS VS. AJUSTADOS DE TIEMPO TÉRMICO A ANTESIS..... 85
CUADRO 4.3.2: VALORES DE LOS PARÁMETROS DE LOS MODELOS E Y T PARA CADA LÍNEA ISOGÉNICA (NIL), REPRESENTADOS POR SU MEDIA E INTERVALO DE CREDIBILIDAD DE 90% DE LA MUESTRA OBTENIDA DE LA DISTRIBUCIÓN POSTERIOR DE CADA MODELO..... 87

CUADRO 4.3.3: EVALUACIÓN DE MODELOS DEL SEGUNDO GRUPO SEGÚN DIFERENCIAS EN SU HABILIDAD PREDICTIVA ESPERADA SEGÚN VALIDACIÓN CRUZADA (ΔHPE-CV) Y SU ERROR ESTÁNDAR, EN RELACIÓN AL MEJOR MODELO CON ESE CRITERIO. EL FACTOR K RESUME LA COMPARACIÓN DEL MODELO T CONTRA LOS OTROS MODELOS DE ALTA HPE SEGÚN FACTOR BAYES. TAMBIÉN SE DETALLA LA BONDAD DE AJUSTE (R^2) DE CADA MODELO Y SU RMSE PARA VALORES OBSERVADOS VS. AJUSTADOS DE TIEMPO TÉRMICO A ANTESIS. 91
CUADRO 4.3.4: NÚMERO FINAL DE HOJAS PROMEDIO (± SU ERROR ESTÁNDAR) A TRAVÉS DE AÑOS PARA CADA GENOTIPO BAJO CADA TRATAMIENTO DE EXTENSIÓN DE FOTOPERÍODO DURANTE LA ETAPA DESDE EMERGENCIA (EM) HASTA COMIENZO DE ENCAÑAZÓN. 92
CUADRO 5.2.1: GENOTIPO DE CADA LÍNEA ISOGÉNICA (NIL) PARA LOS GENOMAS A, B Y D. LOS ALELOS PPD-1A ESTÁN ASOCIADOS A FENOTIPOS INSENSIBLES A FOTOPERÍODO. 99
CUADRO 5.2.2: DETALLE DE CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA CADA CAMPAÑA EN LA QUE SE REALIZÓ EL EXPERIMENTO, INCLUYENDO FECHA DE SIEMBRA (FDS), DENSIDAD DE SIEMBRA EN SEMILAS POR METRO CUADRADO (DDS) Y LA SUPERFICIE OCUPADA POR CADA UNIDAD EXPERIMENTAL, EN METROS CUADRADOS (SUP). 100
CUADRO 6.2.1: GENOTIPO DE CADA LÍNEA ISOGÉNICA (NIL) PARA PPD-1 EN LOS GENOMAS A, B Y D. LOS ALELOS PPD-1A ESTÁN ASOCIADOS A FENOTIPOS INSENSIBLES A FOTOPERÍODO. 117
CUADRO 6.2.2: MODELOS DE RESPUESTA A FOTOPERÍODO Y DEL EFECTO DE PPD-1 SOBRE ESAS RESPUESTAS. EN NEGRITA, EL MODELO ELEGIDO EN CADA CASO."-" INDICA A) QUE LA RESPUESTA A FOTOPERÍODO NO APLICABA, Y B) QUE NO CORRESPONDÍA CONSIDERAR EFECTO DE PPD-1 SOBRE ESA RESPUESTA. 119
CUADRO 6.3.1: EVALUACIÓN DE MODELOS SEGÚN DIFERENCIAS EN SU HABILIDAD PREDICTIVA ESPERADA (ΔHPE) CON EL MODELO DE MAYOR HPE ± EL ERROR ESTÁNDAR DE ESA DIFERENCIA. TAMBIÉN SE DETALLA LA BONDAD DE AJUSTE (R^2) DE CADA MODELO. 120
CUADRO 6.3.2: EVALUACIÓN DE MODELOS QUE RELACIONAN EL NÚMERO DE ESTRUCTURAS A LOS TRATAMIENTOS DE FOTOPÉRIODO DURANTE LA EVE Y LA ERTE SEGÚN DIFERENCIAS EN SU HABILIDAD PREDICTIVA ESPERADA (ΔHPE) Y SU ERROR ESTÁNDAR, EN RELACIÓN AL MEJOR MODELO CON ESE CRITERIO. TAMBIÉN SE DETALLA LA BONDAD DE AJUSTE (R^2) DE CADA MODELO. 126
CUADRO 6.3.3: EVALUACIÓN DE MODELOS QUE RELACIONAN LA DURACIÓN DE LA ERTA A LOS TRATAMIENTOS ANTES Y DURANTE LA MISMA, SEGÚN DIFERENCIAS EN SU HABILIDAD PREDICTIVA ESPERADA (ΔHPE) Y SU ERROR ESTÁNDAR, EN RELACIÓN AL MEJOR MODELO CON ESE CRITERIO. TAMBIÉN SE DETALLA LA BONDAD DE AJUSTE (R^2) DE CADA MODELO. 129

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CICLO DEL TRIGO DESDE SIEMBRA HASTA MADUREZ FISIOLÓGICA, CON DETALLE DE ESTRUCTURAS FORMADAS, CAMBIOS MORFOLÓGICOS EXTERNOS Y DEFINICIÓN DE COMPONENTES DEL RENDIMIENTO, SEGÚN ETAPAS DEL DESARROLLO. SM: SIEMBRA, EM: EMERGENCIA, IF: INICIACIÓN FLORAL, DL: DOBLE LOMO, ET: ESPIGUILLA TERMINAL, HB: HOJA BANDERA, AN: ANTESIS, MF: MADUREZ FISIOLÓGICA. PCE: PERÍODO DE CRECIMIENTO DE LA ESPIGA, EVE: ETAPA VEGETATIVA, ERTE: ETAPA REPRODUCTIVA TEMPRANA, ERTA: ETAPA REPRODUCTIVA TARDÍA, ELLG: ETAPA DE LLENADO DE GRANOS. LAS LÍNEAS VERTICALES INDICAN EL MOMENTO EN EL CUAL QUEDA DEFINIDO EL NÚMERO FINAL DE CADA ESTRUCTURA. 29

FIGURA 1.2: DINÁMICA DE INICIACIÓN DE PRIMORDIOS EN EL ÁPICE DEL VÁSTAGO PRINCIPAL (VP) SEGÚN TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA. IF: INICIACIÓN FLORAL. EL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LOS PARÁMETROS ES: "A": NÚMERO DE PRIMORDIOS DIFERENCIADOS EN EL ÁPICE AL MOMENTO DE LA EMERGENCIA, "B": TASA DE INICIACIÓN ("LENTA") DE LOS PRIMEROS PRIMORDIOS, "C": PUNTO DE INFLEXIÓN EN LA TASA DE GENERACIÓN DE PRIMORDIOS, "D": TASA DE INICIACIÓN ("RÁPIDA") DE LOS ÚLTIMOS PRIMORDIOS. 30

FIGURA 1.3: RESPUESTA EN LA DURACIÓN DE LAS FASES DE DESARROLLO A VARIACIÓN EN EL FOTOPERÍODO. ADAPTACIÓN DEL MODELO DE MAJOR (1980) MODIFICADO POR SLAFER Y RAWSON (1996). PARÁMETROS DE RESPUESTA: PI: PRECOCIDAD INTRÍNSECA, FP_C: FOTOPERÍODO CRÍTICO, FP_U: FOTOPERÍODO UMBRAL, S_{FP}: SENSIBILIDAD A FOTOPERÍODO. 33

FIGURA 2.1: DURACIÓN DEL CICLO COMPLETO EMERGENCIA (EM) - ANTESIS (AN) EN TIEMPO TÉRMICO (C D) PARA CADA GENOTIPO BAJO AMBAS CONDICIONES DE FOTOPERÍODO. LETRAS DISTINTAS AL FINAL DE LAS BARRAS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE DOS COMBINACIONES DE GENOTIPO Y FOTOPERÍODO (TUKEY, A = 0,05). CADA DATO ES EL PROMEDIO DE LOS DOS EXPERIMENTOS..... 47

FIGURA 2.2: DINÁMICA DE APARICIÓN DE HOJAS. RELACIÓN ENTRE LAS HOJAS APARECIDAS EN EL VÁSTAGO PRINCIPAL EN LOS EXPERIMENTOS 1 Y 2 (SÍMBOLOS LLENOS Y VACOS, RESPECTIVAMENTE) Y EL TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO DESDE EMERGENCIA (EM). LAS BARRAS EN CADA PUNTO MUESTRAN EL ERROR ESTÁNDAR. LAS PENDIENTES, EN LOS INSERTOS ABAJO A LA DERECHA EN CADA PANEL DE LA FIGURA, INDICAN LA TASA DE APARICIÓN DE HOJAS (TAH, HOJAS (102 C D) $^{-1}$). LOS AJUSTES LINEALES O BI-LINEALES TUVIERON EN TODOS LOS CASOS $R^2 > 0,97$ Y $P < 0,01$. LETRAS COMPARTIDAS ENTRE DOS VALORES CUALESQUIERA DE TAH INDICAN QUE SUS INTERVALOS DE CREDIBILIDAD DE 95% SE SOLAPAN. LA FLECHA CON LÍNEA PUNTEADA INDICA EL NÚMERO DE HOJAS (ORDENADA) APARECIDAS Y EL TIEMPO (ABSCISA) A LOS QUE SE DI EL CAMBIO EN LA TAH EN PARAGON BAJO FOTOPERÍODO CORTO. LA RELACIÓN ENTRE LOS RESIDUALES DEL AJUSTE LINEAL DE PARAGON EN FOTOPERÍODO CORTO Y EL TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA (INSERTO SUPERIOR IZQUIERDO) JUSTIFICA EL USO DE UN AJUSTE BI-LINEAL EN ESE CASO. 48

FIGURA 2.3: RELACIÓN ENTRE LA TASA DE APARICIÓN DE HOJAS (TAH) Y EL NÚMERO FINAL DE HOJAS (NFH) BAJO FOTOPERÍODO LARGO (FL) Y CORTO (FC). LA TAH PARA PARAGON EN FOTOPERÍODO CORTO FUE CALCULADA COMO LA MEDIA PONDERADA DE LA TAH DE LAS HOJAS APARECIDAS ANTES Y DESPUÉS DEL CAMBIO EN LA TAH REAL (VER FIG. 2.2). 49

FIGURA 2.4: DURACIÓN DE LAS ETAPAS VEGETATIVA (EVE, PANEL IZQUIERDO), REPRODUCTIVA TEMPRANA (ERTE, PANEL CENTRAL) Y REPRODUCTIVA TARDA (ERTA, PANEL DERECHO), EN TIEMPO TÉRMICO Y BAJO FOTOPERÍODO LARGO (PANEL SUPERIOR) O CORTO (PANEL INFERIOR). BARRAS CON LETRAS COMPARTIDAS DENTRO DE UNA MISMA FASE NO MOSTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (TUKEY, A = 0,05). CADA BARRA MUESTRA EL PROMEDIO DE DOS EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. 50

FIGURA 2.5: RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE ESTRUCTURAS DIFERENCIADAS Y LA DURACIÓN DE LA ETAPA DURANTE LA CUAL SE DIFERENCIAN. EN EL PANEL A SE MUESTRAN NÚMERO FINAL DE HOJAS (NFH) Y DURACIÓN DE LA EVE ($R^2 = 0,95$, VALOR $P < 0,01$) Y EN EL B, NÚMERO DE ESPIGUILLAS POR ESPIGA Y DURACIÓN DE LA ERTE (CON PARAGON, $R^2 = 0,83$, VALOR $P < 0,01$, SIN PARAGON, $R^2 = 0,25$, VALOR $P = 0,18$)..... 52

FIGURA 2.6: DINÁMICA DE DIFERENCIACIÓN DE PRIMORDIOS. RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE PRIMORDIOS TOTALES EN EL ÁPICE Y EL TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA (EM) BAJO TANTO FOTOPERÍODO CORTO (PANEL IZQUIERDO) COMO LARGO (PANEL DERECHO). CADA PUNTO REPRESENTA AL PROMEDIO DENTRO DEL EXPERIMENTO 1 (PUNTOS LLENOS) Y 2 (PUNTOS VACOS) Y SUS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR. LOS DATOS DE CADA GENOTIPO EN CADA TRATAMIENTO DE FOTOPERÍODO Y EXPERIMENTO FUERON AJUSTADOS MEDIANTE UNA REGRESAN BI-LINEAL ($R^2 > 0,98$ Y $P < 0,01$ EN TODOS LOS CASOS). LAS FLECHAS INDICAN EL TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO AL MOMENTO DEL CAMBIO DE TASA. 53

FIGURA 3.1: DIAGRAMA DE CAJA Y BIGOTES PARA EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGA EN CADA GENOTIPO BAJO FOTOPERÍODO LARGO Y CORTO. LAS CAJAS SE EXTIENDEN DESDE EL PRIMER AL TERCER CUARTIL Y LOS BIGOTES, DESDE EL MÍNIMO AL MÁXIMO VALOR OBSERVADO. EL SÍMBOLO + EN LA CAJA COINCIDE CON LA MEDIA DE LA MUESTRA. 63
FIGURA 3.2: PERFIL DE FERTILIDAD DE LAS ESPIGAS MÁS Y MENOS FÉRTILES DE PARAGON Y DEL GENOTIPO TRIPLE INSENSIBLE BAJO FOTOPERÍODO LARGO Y CORTO. CADA GRÁFICO MUESTRA EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGUILLA EN ANTESIS, DESCRIBIENDO LA POSICIÓN DE ESA ESPIGUILLA EN MANERA RELATIVA AL CENTRO DE LA ESPIGA (EL CERO EN EL EJE VERTICAL INDICA LA POSICIÓN DE LA ESPIGUILLA CENTRAL). 64
FIGURA 3.3: RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGA Y EL PESO SECO DE LA ESPIGA EN ANTESIS. SÍMBOLOS ABIERTOS Y CERRADOS MUESTRAN DATOS DE FOTOPEPERÍODO LARGO Y CORTO, RESPECTIVAMENTE. LOS SEGMENTOS HORIZONTALES MUESTRAN LA DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA SEGÚN LA PRUEBA DE TUKEY, USANDO A = 0,05. 65
FIGURA 3.4 DINÁMICA DEL NÚMERO DE FLORES VIVAS EN LA ESPIGUILLA CENTRAL DE GENOTIPOS CULTIVADOS BAJO FOTOPERÍODO CORTO. LOS SEGMENTOS EQUIVALEN AL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA QUE CADA PUNTO REPRESENTA. EL ÚLTIMO PUNTO DE CADA SERIE CORRESPONDE CON EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES EN ANTESIS PARA LA ESPIGUILLA CENTRAL. 66
FIGURA 3.5 FLORES FÉRTILES EN LA ESPIGUILLA CENTRAL Y SU RELACIÓN CON (A) EL NÚMERO DE FLORES INICIADAS POR ESPIGUILLA Y (B) LA SUPERVIVENCIA FLORAL. 66
FIGURA 3.6: ESTADÍOS DEL DESARROLLO FLORAL EN LAS ESPIGUILLAS CENTRALES DEL GENOTIPO TRIPLE INSENSIBLE (MITAD IZQUIERDA) Y DE PARAGON (MITAD DERECHA) CULTIVADOS BAJO FOTOPERÍODO CORTO. LA ESCALA DE TIEMPO MUESTRA PARA CADA CASO, EL TIEMPO TÉRMICO (°C D) DESDE ESPIGUILLA TERMINAL HASTA QUE ESA SERIE DE FOTOS FUE TOMADA (NOTESÉ LA DIFERENCIA EN LA DURACIÓN DESDE ESPIGUILLA TERMINAL HASTA ANTESIS PARA CADA GENOTIPO). PARA CADA MOMENTO, LAS FLORES FUERON ACOMODADAS EN UNA ESPIGUILLA VIRTUAL, PARA LA QUE EL CENTRO DE LA FIGURA (O EJE DE TIEMPO) REPRESENTA LA POSICIÓN DEL RÁQUIS, Y A PARTIR DEL CUAL LAS FLORES SE UBICAN DE LA MÁS PROXIMAL (F1) A LA MÁS DISTAL (F5) EN LOS EXTREMOS DE LA FIGURA. LAS BARRAS DE ESCALA EN LOS BORDES EXTERNOS DE LA FIGURA MUESTRAN LA ESCALA A LA QUE APARECEN LAS FLORES DE CADA ESPIGUILLA VIRTUAL EN CADA MOMENTO. 69
FIGURA 3.7: PROGRESO DEL ESTADÍO DE DESARROLLO EN LA ESCALA DE WADDINGTON A PARTIR DE ESPIGUILLA TERMINAL PARA LA TERCERA, CUARTA Y QUINTA FLOR DE LA ESPIGUILLA CENTRAL, CONTADAS DESDE EL RÁQUIS, DE CADA GENOTIPO BAJO FOTOPERÍODO CORTO. CADA FLOR FUE GRAFICADA DESDE EL MOMENTO EN QUE SE VOLVIÓ DISTINGUIBLE HASTA QUE ALCANZÓ ANTESIS. LA LÍNEA PUNTEADA INDICA EL ESTADÍO DE DESARROLLO A PARTIR DEL CUÁL UNA FLOR FUE CONSIDERADA FÉRTIL EN ANTESIS DE LA ESPIGA. 70
FIGURA 3.8: ESTADÍO MÁXIMO DE DESARROLLO ALCANZADO POR LAS FLORES DESDE F1 HASTA F5 EN RELACIÓN A (A) EL TIEMPO TÉRMICO QUE DURÓ EL DESARROLLO DE CADA UNA Y (B) LA POSICIÓN DE CADA FLOR RESPECTO AL RÁQUIS, PARA CADA GENOTIPO. 71
FIGURA 4.1: MARCHA DEL FOTOPERÍODO (LÍNEAS PUNTEADAS) Y DE LA TEMPERATURA MEDIA DIARIA (CÍRCULOS Y LÍNEAS SÓLIDAS) EN LA ESTACIÓN DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO PARA LAS DISTINTAS CAMPAÑAS. LOS NÚMEROS AL LADO DE LAS LÍNEAS PUNTEADAS INDICAN EL NÚMERO DE HORAS QUE EL FOTOPERÍODO FUE EXTENDIDO POR SOBRE EL NATURAL PARA RESULTAR EN ESOS VALORES. LAS FLECHAS SÓLIDAS INDICAN EL MOMENTO DE LA EMERGENCIA Y LAS VACÍAS EL DE LA ÚLTIMA ANTESIS EN CADA EXPERIMENTO PARTICULAR. EL PRIMER PAR DE FLECHAS EN 2018 CORRESPONDE AL EXPERIMENTO SEMBRADO EN FECHAS CONVENCIONALES, MIENTRAS QUE EL SEGUNDO CORRESPONDE A AQUEL EN CONTRAESTACIÓN. 76
FIGURA 4.2: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS TRATAMIENTOS DE FOTOPERÍODO. EL ANCHO DE CADA FLUJO REPRESENTA EL NÚMERO DE CAMPAÑAS EN LAS QUE SE LLEVÓ A CABO UN TRATAMIENTO Y SU COLOR HACE REFERENCIA A LA EXTENSIÓN DE FOTOPERÍODO QUE RECIBIÓ ESE TRATAMIENTO DESDE EMERGENCIA (EM) HASTA COMIENZO DE ENCAÑAZÓN (CE). EL PUNTO FINAL DEL FLUJO (HACIA LA DERECHA DE LA FIGURA) INDICA LA EXTENSIÓN DE FOTOPERÍODO EN ESE TRATAMIENTO ENTRE CE Y ANTESIS (AN). 78
FIGURA 4.3: TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA HASTA ANTESIS EN RELACIÓN AL FOTOPERÍODO PROMEDIO Y A LA COMBINACIÓN ALÉLICA EN PPD-1 SEGÚN DESCRIPTO POR EL MODELO E (EC. 1). CADA LÍNEA MUESTRA EL VALOR PROMEDIO DE UNA MUESTRA DE LA DISTRIBUCIÓN POSTERIOR DEL MODELO PARA CADA GENOTIPO (I.E. EL AJUSTE), MIENTRAS QUE LA SOMBRA SE EXTIENDE DESDE EL LÍMITE INFERIOR AL SUPERIOR DEL INTERVALO DE CREDIBILIDAD DEL 90% DE ESTA DISTRIBUCIÓN. LOS DATOS USADOS PARA AJUSTAR EL MODELO SE MUESTRAN COMO PUNTOS QUE VARÍAN EN SU FORMA Y COLOR PARA LAS DISTINTAS LÍNEAS (SOLO 5 DE LOS 14 GENOTIPOS USADOS SE MUESTRAN

EN LA FIGURA, VER TABLA 5 PARA LOS VALORES DE LOS PARÁMETROS PARA LOS 9 GENOTIPOS RESTANTES). 85
FIGURA 4.4: SENSIBILIDAD AL FOTOPERÍODO DESDE EMERGENCIA A ANTESIS EN RELACIÓN AL NÚMERO DE ALELOS PPD-1A DE CADA LÍNEA ISOGÉNICA. 86
FIGURA 4.5: DURACIÓN DE LAS ETAPAS PRE-ANTESIS EN RELACIÓN AL FOTOPERÍODO PROMEDIO EXPERIMENTADO DURANTE LA MISMA U OTRA PREVIA Y A LA COMBINACIÓN ALÉLICA PARA PPD-1, SEGÚN EL MODELO T (EC. 2). LAS ETAPAS MOSTRADAS SON EM-CE, DESDE EMERGENCIA HASTA COMIENZO DE ENCAÑAZÓN, CE-HB, DESDE COMIENZO DE ENCAÑAZÓN HASTA HOJA BANDERA, Y HB-AN, DESDE HOJA BANDERA HASTA ANTESIS. CADA LÍNEA MUESTRA EL VALOR PROMEDIO DE UNA MUESTRA DE LA DISTRIBUCIÓN POSTERIOR DEL MODELO PARA CADA GENOTIPO (I.E. EL AJUSTE), MIENTRAS QUE LA SOMBRA SE EXTIENDE DESDE EL LÍMITE INFERIOR AL SUPERIOR DEL INTERVALO DE CREDIBILIDAD DEL 90% DE ESTA DISTRIBUCIÓN. LOS DATOS USADOS PARA AJUSTAR EL MODELO SE MUESTRAN COMO PUNTOS QUE VARÍAN EN SU FORMA Y COLOR PARA LAS DISTINTAS LÍNEAS (SOLO 5 DE LOS 14 GENOTIPOS USADOS SE MUESTRAN EN LA FIGURA, VER TABLA 5 PARA LOS VALORES DE LOS PARÁMETROS PARA LOS 9 GENOTIPOS RESTANTES). 89
FIGURA 4.6: RELACIÓN ENTRE VALORES AJUSTADOS Y OBSERVADOS PARA EL TIEMPO TÉRMICO ENTRE EMERGENCIA Y ANTESIS SEGÚN LOS MODELOS E (PRIMER GRUPO) Y T (SEGUNDO GRUPO), Y EL RMSE DE LA RELACIÓN. LOS DATOS DE DISTINTAS CAMPAÑAS FUERON REPRESENTADOS CON SÍMBOLOS DE DISTINTO COLOR Y TAMAÑO. 94
FIGURA 5.1: RESUMEN DE FOTOPERÍODO PROMEDIO EXPLORADO POR LOS DISTINTOS GENOTIPOS EN LAS DISTINTAS CAMPAÑAS DURANTE LAS FASES EM-ET Y ET-AN 101
FIGURA 5.2 TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO DESDE EMERGENCIA (EM) A ANTESIS (AN) BAJO FOTOPERÍODO NATURAL. LAS BARRAS DE ERROR DE EXTIENDEN DESDE LA MEDIA +/- EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA. LETRAS COMPARTIDAS ENTRE GENOTIPOS PARA LA MISMA CAMPAÑA INDICAN QUE LA DIFERENCIA ENTRE LOS MISMOS NO ES SIGNIFICATIVA SEGÚN LA PRUEBA DE TUKEY (A = 0,05)..... 103
FIGURA 5.3: NÚMERO FINAL DE HOJAS EN EL VÁSTAGO PRINCIPAL BAJO FOTOPERÍODO NATURAL PARA CADA GENÓTIPO EM CADA UMA DE LAS TRES CAMPAÑAS. LAS BARRAS DE ERROR DE EXTIENDEN DESDE LA MEDIA +/- EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA. 104
FIGURA 5.4: FILOCRONO PROMEDIO OBTENIDO DE LA DINÁMICA DE APARICIÓN DE HOJAS PARA GENOTIPOS CRECIENDO BAJO FOTOPERÍODO NATURAL. EL PUNTO REPRESENTA EL VALOR MEDIO DEL AJUSTE Y LAS BARRAS DE ERROR SE EXTIENDEN DESDE EL MISMO HASTA MÁS Y MENOS EL VALOR DEL ERROR ESTÁNDAR DEL AJUSTE. 104
FIGURA 5.5: TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO DESDE EMERGENCIA (EM) A ESPIGUILLA TERMINAL (ET) BAJO FOTOPERÍODO NATURAL. LAS BARRAS DE ERROR SE EXTIENDEN DESDE LA MEDIA +/- EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA. LETRAS COMPARTIDAS ENTRE GENOTIPOS PARA LA MISMA CAMPAÑA INDICAN QUE LA DIFERENCIA ENTRE LOS MISMOS NO ES SIGNIFICATIVA SEGÚN LA PRUEBA DE TUKEY (A = 0,05). 105
FIGURA 5.6: DURACIÓN DE LA ERTA SEGÚN EL TRATAMIENTO DE EXTENSIÓN DE FOTOPERÍODO PARA CADA GENOTIPO EN TRES CAMPAÑAS (2013, 2014 Y 2015). LOS PUNTOS MUESTRAN LA MEDIA OBTENIDA DE TRES REPETICIONES Y LAS BARRAS DE ERROR SE EXTIENDEN DESDE LA MEDIA +/- SU ERROR ESTÁNDAR. LOS ASTERISCOS INDICAN SIGNIFICANCIA DE LA RESPUESTA PARA ESE GENOTIPO EN ESA CAMPAÑA SEGÚN CONTRASTE ENTRE TRATAMIENTOS (A = 0,05). 106
FIGURA 5.7: RESPUESTA DEL PESO SECO DE LA ESPIGA EN ANTESIS POR METRO CUADRADO PARA CADA GENOTIPO EN LAS TRES CAMPAÑAS. LOS SÍMBOLOS MUESTRAN LA MEDIA DE TRES UNIDADES EXPERIMENTALES Y LAS BARRAS DE ERROR SE EXTIENDEN HASTA +/- SU ERROR ESTÁNDAR. LOS ASTERISCOS INDICAN SIGNIFICANCIA DE LA RESPUESTA PARA ESE GENOTIPO EN ESA CAMPAÑA SEGÚN CONTRASTE ENTRE TRATAMIENTOS (A = 0,05). 107
FIGURA 5.8: PESO SECO DE ESPIGAS EN ANTESIS POR UNIDAD DE ÁREA (PSE) EN RELACIÓN A LA DURACIÓN DE LA ETAPA REPRODUCTIVA TARDÍA (ERTA) EN TIEMPO TÉRMICO (ºC D). EL GRADIENTE DE COLOR INDICA LA PARTICIÓN DE BIOMASA A LA ESPIGA. 109
FIGURA 5.9: NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR METRO CUADRADO (NFF M^{-2}) EN RELACIÓN AL PESO SECO DE LA ESPIGA EN ANTESIS EN LA MISMA SUPERFICIE (PSE M^{-2}). SIMBOLOS VACÍOS Y LLENOS REPRESENTAN MEDIAS DE PARCELAS BAJO FOTOPERÍODO EXTENDIDO Y NATURAL, RESPECTIVAMENTE. 109
FIGURA 5.10: PERFIL DE FERTILIDAD DE UNA ESPIGA PROMEDIO DEL VÁSTAGO PRINCIPAL CENTRADAS POR SU ESPIGUILLA CENTRAL. CADA GRÁFICO MUESTRA EL NÚMERO DE FLORES FÉRTILES POR ESPIGUILLA EN ANTESIS EN UNA MITAD DE LA ESPIGA Y EN LA ESPIGUILLA TERMINAL. SÍMBOLOS VACÍOS MUESTRAN DATOS CORRESPONDIENTES A FOTOPERÍODO EXTENDIDO (0/6) Y LOS LLENOS, A FOTOPERÍODO NATURAL (0/0). LAS BARRAS DE ERROR SE EXTIENDEN HAS +/- EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA. 110

FIGURA 6.1: DURACIÓN DE LA ETAPA VEGETATIVA (EVE), DESDE EMERGENCIA HASTA DOBLE LOMO, BAJO FOTOPERÍODO NATURAL Y EXTENDIDO PARA DISTINTOS GENOTIPOS (VER COMBINACIONES ALÉLICAS EN PPD-1 CORRESPONDIENTES A CADA UNO EN CUADRO 6.2.1). 121
FIGURA 6.2: TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA HASTA DOBLE LOMO (EVE, AZUL) Y DESDE DOBLE LOMO HASTA ESPIGUILLA TERMINAL (ERTE, ROJO) BAJO CUATRO TRATAMIENTOS DE FOTOPERÍODO, EN LOS DOS AÑOS EXPERIMENTALES Y PARA CADA GENOTIPO. 123
FIGURA 6.3: RESPUESTA DIRECTA Y MEMORIA DE LA ETAPA REPRODUCTIVA TEMPRANA (ERTE) A LA EXTENSIÓN DEL FOTOPERÍODO PARA DISTINTOS GENOTIPOS. LOS SÍMBOLOS REPRESENTAN LA MEDIA AJUSTADA MIENTRAS QUE LOS SEGMENTOS A LOS COSTADOS DE CADA UNO SE EXTIENDEN HASTA LOS LÍMITES INFERIOR Y SUPERIOR DEL INTERVALO DE CREDIBILIDAD DEL 95%. POR LO TANTO, EL SOLAPAMIENTO DE ESOS INTERVALOS ENTRE LOS VALORES DE DOS TRATAMIENTOS O GENOTIPOS INDICA QUE NO HABRÍA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE ELLOS..... 124
FIGURA 6.4: NÚMERO DE ESTRUCTURAS (I.E. HOJAS, EN AZUL Y ESPIGUILLAS, EN ROJO) PRODUCIDAS POR CADA GENOTIPO EN CADA AÑO EXPERIMENTAL Y BAJO CADA UNO DE LAS COMBINACIONES POSIBLES DE TRATAMIENTOS DE FOTOPERÍODO ENTRE EMERGENCIA Y ESPIGUILLA TERMINAL. CADA BARRA REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO DEL NÚMERO DE ESTRUCTURAS EN ESA MUESTRA, MIENTRAS QUE EL SEGMENTO MUESTRA EL DESVÍO ESTÁNDAR DE ESA MUESTRA. 125
FIGURA 6.5: RESPUESTA DEL NÚMERO DE ESTRUCTURAS AL TRATAMIENTO DE EXTENSIÓN DE FOTOPERÍODO DURANTE LA EVE (N.N – E.N), LA ERTE (N.N – N.E) O AMBAS (EVE + ERTE, N.N – E.E) SEGÚN LA COMBINACIÓN ALÉLICA PARA PPD-1. LOS SÍMBOLOS REPRESENTAN LA MEDIA AJUSTADA MIENTRAS QUE LOS SEGMENTOS A LOS COSTADOS DE CADA UNO SE EXTIENDEN HASTA LOS LÍMITES INFERIOR Y SUPERIOR DEL INTERVALO DE CREDIBILIDAD DEL 95%. POR LO TANTO, EL SOLAPAMIENTO DE ESOS INTERVALOS ENTRE LOS VALORES DE DOS TRATAMIENTOS O GENOTIPOS INDICA QUE NO HABRÍA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE ELLOS. 127
FIGURA 6.6: RESPUESTA DIRECTA (N.N – N.E) Y MEMORIA (N.N.- E.N) DE LOS DISTINTOS GENOTIPOS DURANTE CADA AÑO EXPERIMENTAL COMO MAGNITUD DEL CAMBIO EN EL TIEMPO TÉRMICO ACUMULADO ENTRE ESPIGUILLA TERMINAL Y ANTESIS ANTE LA EXTENSIÓN DEL FOTOPERIODO DURANTE EL MISMO PERÍODO O DURANTE LA ETAPA ANTERIOR (ENTRE EMERGENCIA Y ESPIGUILLA TERMINAL), RESPECTIVAMENTE. LOS SÍMBOLOS REPRESENTAN LA MEDIA AJUSTADA MIENTRAS QUE LOS SEGMENTOS A LOS COSTADOS DE CADA UNO SE EXTIENDEN HASTA LOS LÍMITES INFERIOR Y SUPERIOR DEL INTERVALO DE CREDIBILIDAD DEL 95%. POR LO TANTO, EL SOLAPAMIENTO DE ESOS INTERVALOS ENTRE LOS VALORES DE DOS TRATAMIENTOS O GENOTIPOS INDICA QUE NO HABRÍA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE ELLOS. 130
FIGURA 6.7: FOTOPERIODO PROMEDIO EXPLORADO ENTRE ESPIGUILLA TERMINAL Y ANTESIS POR LOS DISTINTOS GENOTIPOS CUNDO ESTUVIERON BAJO FOTOPERIODO NATURAL DURANTE TODO EL CICLO, EN DISTINTOS AÑOS..... 132
FIGURA 7.1: ESQUEMA DE LAS FUENTES DE VARIABILIDAD UTILIZADAS, TANTO GENÉTICAS (DISTINTAS COMBINACIONES ALÉLICAS EN PPD-1 EN FORMA DE LAS LÍNEAS ISOGÉNICAS, NILS) COMO AMBIENTALES(LOS TRATAMIENTOS DE FOTOPERIODO) PARA CARACTERIZAR EL EFECTO DE PPD-1 SOBRE LA RESPUESTA A FOTOPERÍODO DEL DESARROLLO FÁSICO (FENOLOGÍA EXTERNA E INTERNA) Y MORFOLÓGICO (APARICIÓN DE HOJAS, DIFERENCIACIÓN DE PRIMORDIOS, Y DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA FLORALES)..... 137
FIGURA 7.2: DURACIÓN DE LAS ETAPAS VEGETATIVA (EVE), REPRODUCTIVA TEMPRANA (ERTE) Y TARDÍA (ERTA) RELATIVA AL TIEMPO TÉRMICO DESDE EMERGENCIA A ANTESIS PARA CINCO LÍNEAS ISOGÉNICAS PORTADORAS DE TRES (TRIPLE INSENSIBLE), UNO (P(CS-2B), P(GS-100-2A), P(S64-2D)) O NINGÚN (PARAGON) ALELO PPD-1A, BAJO FOTOPERÍODO CORTO Y LARGO. DATOS DEL CAPÍTULO 2. 141

Abreviaturas

Utilizadas en el texto a través de la tesis. Ordenadas por orden alfabético.

°C: Grados centígrados
AN: Antesis
ANOVA: Análisis de la varianza
CE: Comienzo de encañazón
DIFc: Duración de la inciación floral en la espiguilla central
DL: Doble lomo
e.e.: Error estándar
ELLG: Etapa de llenado de granos
EM: Emergencia
$EPILLA_f$ ESP^{-1}: Número de espiguillas fértiles por espiga
ERTA: Etapa reproductiva tardía
ERTE: Etapa reproductiva temprana
ESPILLAS $ESPIGA^{-1}$: Espiguillas por espiga
ET: Espiguilla terminal
EVE: Etapa vegetativa
Exp: Experimento
F.V.: Fuente de variación
FC: Fotoperíodo corto
FL: Fotoperíodo largo
Fot: Fotoperiodo
Fp_c: Fotoperíodo crítico
Fp_u: Fotoperíodo umbral
Gen: Genotipo
HB: Hoja bandera
HPE-CV: Habilidad predictiva esperada según validación cruzada
HPE: Habilidad predictiva esperada
IF: Iniciación floral
LRM: líneas recombinantes monocromosómicas
LSC: Líneas de sustitución cromosómica
MF: Madurez fisiológica
MJ m^{-2}: Mega joules por metro cuadrado
mL: mililitro
NFF $EPILLA_f^{-1}$: Número de flores fértiles por espiguilla fértil
NFF ESP^{-1}: Número de flores fértiles por espiga
NFF m^{-2}: Número de flores fértiles por metro cuadrado
NFF pl^{-1}: Número de flores fértiles por planta
NFF: Número de flores fértiles
NFFc: Número de flores fértiles en la espiguilla central

NFH: Número final de hojas
NG: Número de granos
NIFc: Número máximo de primordios florales iniciados en la espiguilla central
NILs: líneas isogénicas
NPT: Número de primordios totales
NPT: Número de primordios totales
ns: No significativo
pb.: pares de bases
PBE: Partición de biomasa hacia la espiga
PCE: Período de crecimiento de la espiga
PG: Peso de granos
PI: Precocidad intrínseca
PRR: Pseudo-response regulator
PSE: Peso seco de espigas en antesis
R: Rendimiento en grano
RFAin: Radiación fotosintéticamente activa incidente
RMSE: Raíz cuadrada del error
SFc: Supervivencia floral en la espiguilla central
S_{Fp}: Sensibilidad a fotoperíodo
SM: Siembra
TAH: Tasa de aparición de hojas
Tbase: Temperatura base
TCC: Tasa de crecimiento del cultivo
TCT: Tiempo térmico desde emergencia al cambio de tasa
TDP-E: Tasa de diferenciación de primordios de espiguillas
TDP-H: Tasa de diferenciación de primordios de hojas
TIFc: Tasa de iniciación floral en la espiguilla central
VP: Vástago principal

Resumen

Regulación del desarrollo en trigo por los genes de sensibilidad a fotoperiodo *Ppd-1*

En el desarrollo del cultivo de trigo se suceden etapas (vegetativa, reproductiva temprana, y tardía) y procesos (diferenciación y aparición de órganos) que determinan la ocurrencia de antesis y así, el rendimiento potencial. Incrementar la duración de la etapa reproductiva tardía través de su sensibilidad al fotoperíodo a expensas de las etapas previas para no modificar la fecha de antesis, sería una alternativa para mejorar el rendimiento potencial. Los genes *Ppd-1* controlan la respuesta a fotoperíodo del tiempo a antesis, pero su efecto sobre los demás procesos, incluyendo la duración de las etapas, es aún poco comprendido. Líneas isogénicas con distintas combinaciones en *Ppd-1* fueron expuestas a un amplio rango de fotoperíodos para evaluar el efecto de los alelos individualmente y en combinaciones dobles y triples. *Ppd-1* afectó el tiempo a antesis a través de la sensibilidad a fotoperíodo (°C d h^{-1}), modificando principalmente el número de hojas diferenciadas, sin afectar el fotoperíodo umbral ni la precocidad intrínseca. La duración de todas las etapas y sus respuestas al fotoperíodo explorado durante las mismas (directo) y al explorado durante etapas previas (memoria) fueron alteradas por *Ppd-1*. No se halló evidencia de que alguna combinación alélica afectara más una etapa que otra. Manipular estas combinaciones alélicas en *Ppd-1* solamente no parece una alternativa para modificar la duración de las etapas pre-antesis independientemente para aumentar el rendimiento potencial. No hubo un efecto aditivo de apilar alelos insensibles *Ppd-1a*, pero su efecto fue levemente superior al de *Ppd-D1a* en todos los procesos. La cuantificación del efecto de *Ppd-1* realizada es útil para diseñar el desarrollo del cultivo a antesis y para mejorar las predicciones de modelos de simulación de base genética.

Palabras clave: Filocrono, plastocrono, etapas pre-antesis, desarrollo y mortandad de flores.

Abstract

Wheat development as affected by *Ppd-1* photoperiod sensitivity genes

Wheat development can be devided into phases (vegetative, early reproductive and late reproductive) marked by processes (primordia differentiation and appearance) that determine the timing of anthesis, and thus, yield potential. Lenghtening the late reproductive phase, while shortening previous phases so that timing to anthesis is not modified has been proposed for raising the rate yield increase in wheat. *Ppd-1* genes modulate anthesis date in response to photoperiod, but their effects on the duration of pre-anthesis phases and processes in response to photoperiod are widely unknown. Near isogenic lines varying in *Ppd-1* were exposed to a range of photoperiod treatments to better understand the effect of individual alleles and that of their stacking on such processes. *Ppd-1* genes effect on time to anthesis was due to their effect on photoperiod sensitivity (°C d h^{-1}), while they did not affect either intrinsic earliness or the threshold photoperiod. *Ppd-1a* alleles hastened anthesis by reducing the final leaf number and, sometimes, by raising the rate of leaf appearance. *Ppd-1* genes altered the duration of each pre-anthesis phase and their response to both current and previous photoperiod. However, no evidence could be found of them altering the relative duration of pre-anthesis phases. Hence, manipulating the allelic combination at *Ppd-1* alone would not allow manipulating the duration of pre-anthesis phases independently to increase yield potential. There was no evidence of additive effect from *Ppd-1a* alleles, but their stacking provided more insensitivity than that of *Ppd-D1a* alone. Quantification of *Ppd-1* effects as provided here would allow tailoring pre-anthesis development, as well as helping gene-based simulation models to more accurately predict time to anthesis.

Keywords: Phyllochron, plastochron, pre-anthesis phases, floret development and death.

Capítulo 1: Introducción General

1.1 Planteo del problema y revisión de antecedentes

1.1.1 Importancia del cultivo de trigo

El cultivo de trigo (*Triticum aestivum L.*) provee, junto con el arroz, el 50% de las calorías de la dieta humana (Tweeten y Thompson 2008), previéndose que para 2020, el 68% de la producción se utilizará como alimento directo por el hombre (OCDE/FAO 2011). En las próximas décadas su producción deberá incrementarse un 50% respecto a los actuales volúmenes para cubrir la demanda de alimentos (Hall y Richards 2013). Dado que es poco probable que el área sembrada se expanda, dicho aumento deberá sustentarse en incrementos del rendimiento, los cuales se encuentran asociados a (i) el grado de adaptación dado por la relación entre las condiciones ambientales y el patrón de desarrollo, particularmente la fecha de antesis que permita exponer al cultivo a menores niveles de estrés en sus etapas más críticas para la generación del rendimiento (Loomis y Connor 2002), y (ii) los rendimientos potenciales de los cultivares utilizados (Fischer y Edmeades 2010, Hall y Richards 2013), los cuales dependerán en parte de la optimización de la duración relativa de las etapas vegetativas y reproductivas (Slafer *et al*. 2001, Miralles y Slafer 2007).

A continuación, se describe brevemente el ciclo del cultivo y su asociación con la generación el rendimiento y luego los factores ambientales y genéticos que regulan el desarrollo del mismo.

1.1.2 Desarrollo del cultivo a antesis y definición de las etapas que lo componen

El ciclo ontogénico de trigo está marcado por cambios morfológicos y fisiológicos tanto externos como internos, estos últimos asociados a variaciones en la actividad del ápice meristemático. Basándose en dichos cambios, se ha dividido el ciclo en cuatro etapas: vegetativa (EVE), reproductiva temprana (ERTE), reproductiva tardía (ERTA) y llenado de grano (ELLG) (desarrollo fásico) (Fig. 1.1) (Kirby 1974, Rawson 1970, Slafer y Rawson 1994, González *et al.* 2002).

Posterior a la siembra, una vez imbibida la semilla, el ápice retoma la diferenciación de primordios foliares que se suman a los previamente formados durante el desarrollo del embrión en la planta madre (en general, entre 3 y 4). Por lo tanto, cuando ocurre la emergencia de las plántulas (EM), el ápice del vástago principal cuenta ya con por lo menos *c.* 6-7 primordios de hojas diferenciados (Kirby y Appleyard 1987). El ápice meristemático diferencia hojas hasta la inducción floral (IF), i.e. el comienzo de la diferenciación de primordios de espiguillas, definiéndose así el número final de hojas (desarrollo morfológico) y la duración de la etapa vegetativa (EVE) (desarrollo fásico).

El primer cambio de estado vegetativo a reproductivo visible (aunque microscópicamente) en la morfología del ápice es la formación de dobles lomos (DL), correspondientes a primordios de espiguillas, axilares al primordio vestigial de hoja correspondiente, cuando están indefectiblemente definidos como tales (Gardner *et al.* 1985, Kirby y Appleyard 1987). Sin embargo, se sabe que la IF tiene lugar previo a la identificación de DL (Kirby 1974, Rawson 1970). Los primordios de espiguillas continúan diferenciándose hasta la aparición de la espiguilla terminal (ET), evento que pone fin a este proceso y define el número de espiguillas de la espiga (desarrollo morfológico) y la duración de la etapa reproductiva temprana (ERTE) (desarrollo fásico) (Gardner *et al.* 1985, Kirby y Appleyard 1987).

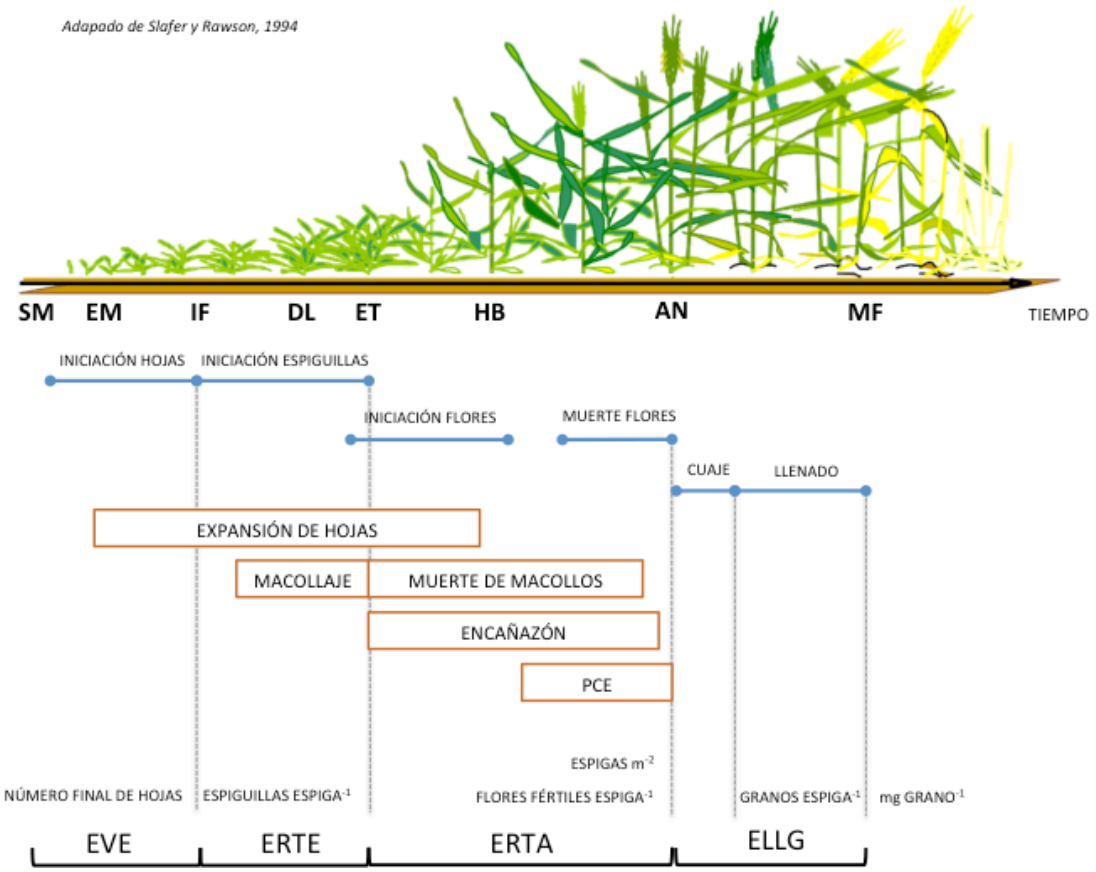

Figura 1.1: Representación esquemática del ciclo del trigo desde siembra hasta madurez fisiológica, con detalle de estructuras formadas, cambios morfológicos externos y definición de componentes del rendimiento, según etapas del desarrollo. SM: Siembra, EM: Emergencia, IF: Iniciación Floral, DL: Doble Lomo, ET: Espiguilla Terminal, HB: Hoja Bandera, AN: Antesis, MF: Madurez Fisiológica. PCE: Período de Crecimiento de la Espiga, EVE: Etapa Vegetativa, ERTE: Etapa reproductiva temprana, ERTA: Etapa reproductiva tardía, ELLG: Etapa de llenado de granos. Las líneas verticales indican el momento en el cual queda definido el número final de cada estructura.

Si se graficara el número de primordios totales diferenciados por el ápice meristemático hasta este momento en función del tiempo se podría establecer la relación descripta por la ecuación 1.1 (Delécolle *et al.* 1989), distinguiéndose dos fases según la tasa a la que se diferencian las estructuras. La primera ("*b*"), corresponde a la de iniciación de primordios foliares con tasa constante (o plastocrono, i.e. tiempo necesario para diferenciar un primordio de hoja) de menor magnitud y la segunda ("*d*") representa la diferenciación de primordios de espiguillas con tasa de mayor magnitud que la primera (Delécolle *et al.* 1989, Kirby 1990). Aunque se ha especulado que el momento en el cual cambia la tasa de diferenciación ("*c*") pudiera indicar el momento de iniciación del "*collar*", i.e. el momento de formación del primer primordio reproductivo (Kirby 1974), estos eventos no siempre coinciden, dado que en algunos casos, las primeras espiguillas se diferencian a la misma tasa que los primordios foliares (Delécolle *et al.* 1989, Hay y Kirby 1991) (Fig. 1.2).

(1.1) $y = a + b*x\ (x \leq c) + b*c\ (x>c) + d*(x-c)\ (x>c)$

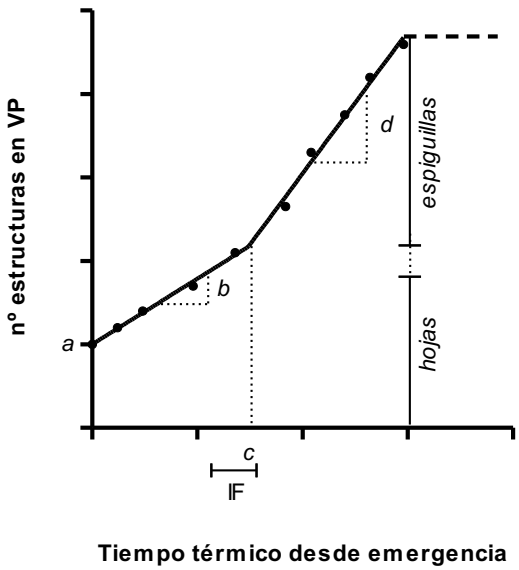

Figura 1.2: Dinámica de iniciación de primordios en el ápice del vástago principal (VP) según tiempo térmico desde emergencia. IF: Iniciación floral. El significado biológico de los parámetros es: "a": número de primordios diferenciados en el ápice al momento de la emergencia, "b": tasa de iniciación ("lenta") de los primeros primordios, "c": punto de inflexión en la tasa de generación de primordios, "d": tasa de iniciación ("rápida") de los últimos primordios.

En el momento de la diferenciación de la espiguilla terminal ya se pueden distinguir algunos primordios florales en las espiguillas centrales, cuya diferenciación prosigue hacia los extremos superior e inferior de la espiga (Kirby 1974, Sibony y Pinthus 1988). Dentro de cada espiguilla, la diferenciación de flores es en sentido acrópeto e indeterminada, alcanzando un número máximo de primordios florales por espiguilla que puede variar según la posición de la espiguilla en la espiga y las condiciones de crecimiento entre 6 y 12 primordios (Kirby 1974, Langer y Hanif 1973, Siddique *et al.* 1989, Stockman *et al.* 1983, González *et al.* 2005a). Alrededor del 60% de estos primordios florales no completan su desarrollo debido a restricciones en la disponibilidad de asimilados (Kirby 1988, Ghiglione *et al.* 2008, González *et al.* 2011a) y normalmente solo entre 2 y 5 (menos de la mitad de los primordios diferenciados) alcanzan el estado de flor fértil en antesis (AN), siendo menor ese número hacia los extremos de la espiga (Kirby 1974, Kirby 1988, Stockman *et al.* 1983, González *et al.* 2011a, González-Navarro *et al.* 2015). El momento en el cual las flores alcanzan la AN determina el número de flores fértiles (desarrollo morfológico) y la duración de la etapa reproductiva tardía (ERTA) (desarrollo fásico).

Externamente, a partir de la emergencia la expansión de las hojas continúa a intervalos regulares (filocrono) (Hay 1986) que duran aproximadamente el doble de lo que tarda la diferenciación de un primordio foliar (Kirby 1990, Hay y Kirby 1991, Evans y Blundell 1994). Esto determina que a lo largo del período vegetativo se acumulen primordios de hojas y consecuentemente la aparición de hojas prosiga aún cuando el ápice meristemático se encuentre en estado reproductivo (Kirby y Appleyard 1987). Junto con la emergencia de la cuarta hoja, suele comenzar el macollaje, al aparecer el primer macollo en la axila de la primera hoja (Baker y Gallagher 1983). Posteriormente, aparecerá aproximadamente un macollo por cada filocrono en las axilas de las hojas subsiguientes (Hay y Kirby 1991), en un proceso que está fuertemente regulado por el ambiente (i.e. fecha de siembra, densidad de plantas, disponibilidad de

recursos, etc.) (Hooker *et al.* 1983, Longnecker *et al.* 1993, Wilhelm *et al.* 1993). El proceso de expansión de hojas finaliza cuando la hoja bandera se ha elongado completamente, previo al estado de vaina engrosada, y su duración está dada por el número final de hojas que se hayan diferenciado y el filocrono (Amir y Sinclair 1991).

En algún momento durante la expansión de las hojas comienza la elongación de los tallos, o encañazón, que suele coincidir en condiciones normales de campo con el momento en que se diferencia la espiguilla terminal. La encañazón se prolonga hasta la elongación del último entrenudo, el correspondiente al pedúnculo de la espiga, y finaliza con la espigazón (emergencia de la espiga desde dentro de la vaina de la hoja bandera). El inicio de la encañazón representa una fuerte demanda de recursos que determina, en densidades de siembra normales y en condiciones agronómicas, la detención en la aparición de macollos seguida de la muerte de aquellos más jóvenes (Baker y Gallagher 1983, Hay 1986). Hacia el último tercio de la encañazón comienza el crecimiento de la espiga a tasa máxima estableciéndose una fuerte competencia entre tallo y espiga por la disponibilidad de asimilados. Esa disponibilidad determina el porcentaje de primordios florales que completan su desarrollo normal y alcanzan a ser flores fértiles en AN (Hay y Kirby 1991, Kirby 1988, Siddique *et al.* 1989, González *et al.* 2005a, González *et al.* 2011a).

A partir de la AN ocurre la polinización y fertilización de las flores fértiles, determinándose luego del cuaje el número de granos por unidad de área (NG). Luego del cuaje comienza el llenado de los granos hasta la madurez fisiológica, momento en el cual los granos alcanzan su máximo peso seco y queda determinada la etapa de llenado de grano (ELLG).

1.1.3 Importancia del desarrollo en la adaptación y la generación de rendimiento

El rendimiento en grano (R) de los cultivos suele dividirse para su estudio en sus componentes numéricos: peso de los granos (PG) y número de granos por unidad de superficie (NG, ecuación 1.2). Este último está estrechamente relacionado con el número de flores fértiles en AN (NFF), dada la alta proporción de cuaje característica del cultivo (Fischer 1983, Siddique *et al.* 1989, González *et al.* 2003a).

El NFF es definido principalmente en el período de crecimiento de la espiga (PCE), durante la última etapa de la encañazón (entre espiguilla terminal y AN) (Fischer 1985). Durante esta etapa, las espigas y tallos están creciendo activamente y la competencia que se generaría entre ellos por asimilados determinaría que muchas de las flores que han comenzado a diferenciarse no lleguen al estado de flores fértiles en antesis (Kirby 1988, Siddique *et al.* 1989, González *et al.* 2011a). Esto explicaría la relación positiva frecuentemente encontrada entre el peso seco de la espiga en AN (PSE) y NFF (Fischer y Stockman 1980, Slafer y Andrade 1993). Por ello, el NG puede comprenderse también como el producto del PSE y el coeficiente de fertilidad de la misma (CFE, numero de granos por unidad de PSE) (Ecuación 1.3). A su vez, el PSE es el resultado del producto entre la duración del período de crecimiento de las espigas (PCE, d), el cual se relaciona con la duración de la ERTA, la tasa de crecimiento del cultivo durante ese período (TCC, g m^{-2} d^{-1}) y la partición de biomasa hacia la espiga (PBE) (Ecuación 1.4).

(1.2) R = NG x PG
(1.3) NG = PSE x CFE
(1.4) PSE = PCE x TCC x PBE

Adecuar el tiempo a antesis posicionando la ERTA bajo las mejores condiciones ambientales para un sitio determinado, i.e. adaptación, define el potencial ambiental que explorará el cultivo. Una vez lograda la adaptación, se ha propuesto que la manipulación de la duración relativa de las sub-etapas previas a antesis podría tener un impacto en el rendimiento potencial. Específicamente se ha planteado que si se extiende el PCE, el cual se encuadra dentro de la ERTA, sin modificar el tiempo a AN (para no alterar la adaptación) a expensas de las etapas previas (EVE, ERTE), entonces el NFF y por lo tanto, el NG, aumentarían y con ellos, el rendimiento potencial de los cultivares (Slafer *et al.* 1996, 2001). Para manipular el desarrollo del cultivo de trigo a AN, los controles ambientales y genéticos de cada una de las etapas que componen el tiempo a AN deberían ser conocidos.

1.1.4 Factores ambientales que controlan el desarrollo a antesis

Dos factores ambientales controlan el desarrollo del trigo a AN: el fotoperíodo (horas de luz diarias) y la temperatura. Esta última, lo hace a través de dos mecanismos: su efecto *per se* sobre la tasa de desarrollo y sobre la satisfacción del requerimiento de bajas temperaturas en materiales con respuesta a la vernalización (Allison y Daynard 1976, Fischer 1983, Griffiths *et al.* 1985, Hay y Kirby 1991, Slafer y Rawson 1994). La respuesta a estos factores ambientales (o su ausencia) está condicionada por el genotipo, en particular, por tres sistemas genéticos que determinan: a) los requerimientos de vernalización, genes *Vrn,* b) la sensibilidad a fotoperíodo, genes *Ppd* y c) la precocidad intrínseca, i. e. la tasa de desarrollo cuando los requerimientos de vernalización han sido satisfechos y la respuesta a fotoperíodo, saturada, genes *Eps* (Snape *et al.* 2001, Kamran *et al.* 2014).

Expresar la duración del ciclo o las etapas en las que puede dividirse en tiempo térmico (Monteith 1977) permite independizarse del efecto *per se* de la temperatura, cuando la misma no es constante (experimentos a campo o sin control de temperatura), y así poder evaluar la respuesta a la vernalización y/o fotoperíodo.

En relación al fotoperíodo el trigo es una planta de día largo (Vince Prue 1975), i.e. su tasa de desarrollo aumenta (y la duración de sus etapas disminuye) a medida que el fotoperíodo es mayor. Según el modelo propuesto por Major (1980) y modificado posteriormente por Slafer y Rawson (1996), la respuesta a fotoperíodo en trigo se puede caracterizar mediante la ecuación 1.5 que considera que la duración de una etapa particular (días o ºC d, "y") disminuye a medida que el fotoperíodo explorado durante la misma ("x") se incrementa hasta alcanzar un valor denominado "fotoperíodo umbral" (Fp_u, "c") por encima del cual la duración de la etapa no disminuye alcanzando su mínima duración ("d") (Fig. 1.3). Si el cultivar fue completamente vernalizado o si es primaveral (sin respuesta a la vernalización) esa duración mínima corresponde a la "precocidad intrínseca" para la fase en cuestión (PI) (Slafer 1996). El grado de reducción en la duración de la etapa por hora de incremento del fotoperiodo se denomina "sensibilidad al fotoperíodo" (S_{Fp}, "b") (días h^{-1} o ºC d h^{-1}). Para algunos cultivares, se puede encontrar también un "fotoperíodo crítico" (Fp_c), definido como aquel fotoperíodo por debajo del cual la duración de la etapa no sigue aumentando. No todos los cultivares de trigo responden con igual magnitud a este factor, existiendo un amplio rango de variación genotípica en la respuesta al fotoperíodo (Slafer y Rawson 1994).

(1.5) $Y = a + b*x$ (si $x \leq c$)
$Y = d$ (si $x > c$)

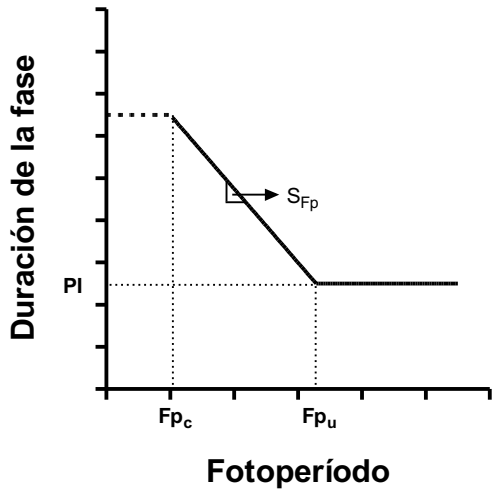

Figura 1.3: Respuesta en la duración de las fases de desarrollo a variación en el fotoperíodo. Adaptación del modelo de Major (1980) modificado por Slafer y Rawson (1996). Parámetros de respuesta: PI: Precocidad intrínseca, Fp_c: Fotoperíodo Crítico, Fp_u: Fotoperíodo Umbral, S_{Fp}: Sensibilidad a fotoperíodo.

Reportes previos (Halse y Weir 1970, Allison y Daynard 1976, Rahman y Wilson 1977, Davidson *et al.* 1985, González *et al.* 2002) indican que la tasa de desarrollo del cultivo a AN se acelera a medida que el fotoperíodo explorado es mayor debido a un aumento en la tasa de desarrollo en cada una de las etapas que componen el ciclo (i.e. EVE, ERTE y ERTA), existiendo variabilidad en la respuesta a este factor en cada una de ellas. La tasa de desarrollo durante la EVE se acelera con mayor duración del día, anticipando la IF, pero la tasa a la que se diferencian los primordios foliares no es afectada, resultando en una disminución en el número final de hojas diferenciadas (Rawson 1970, Rawson 1971, Rahman y Wilson 1977, Miglietta 1989, Evans y Blundell 1994). La respuesta de las etapas reproductivas puede ser mayor que la de la vegetativa, llegando en algunos genotipos a ser de tipo cualitativa, es decir, no se da el cambio a la siguiente etapa en fotoperíodos lo suficientemente cortos (Slafer y Rawson 1996, González *et al.* 2002). El impacto del fotoperíodo en la tasa de desarrollo durante la ERTE no se traduce directamente al número de espiguillas diferenciadas puesto que éste puede ser compensado por la tasa de diferenciación de primordios (Rawson 1971, Allison y Daynard 1976, Rahman 1980, Pinthus y Nerson 1984, Evans y Blundell 1994). Una menor duración de la ERTA debida a extensiones del fotoperíodo explorado en dicha etapa (Slafer y Rawson 1996, Miralles y Richards 2000, González *et al*. 2002) se han asociado a disminución en el número de flores fértiles que alcanzan AN (González *et al.* 2011a).

El hecho de que la magnitud de respuesta al fotoperíodo de las etapas particulares que componen el ciclo a AN pueda diferir entre etapas (Slafer y Rawson 1994, Slafer y Rawson 1996, González *et al.* 2002) sugirió que su control podría ser independiente, al menos parcialmente (Halloran y Pennell 1982, Slafer y Rawson 1994). Ello permitiría manipular la respuesta al fotoperíodo de una etapa (y así, su duración) sin afectar en forma importante la respuesta en las otras etapas. Así surgió la idea que el rendimiento potencial del cultivo de trigo podría aumentar si la duración de la ERTA (y así, la del PCE) fuera mayor, a expensas de una reducción en la duración de las etapas previas, de forma de no modificar el tiempo a AN (Slafer y Rawson 1996, Slafer *et al.* 2001). La manipulación de la sensibilidad al fotoperíodo en sub-etapas del desarrollo a

antesis podría ser una herramienta entonces para manipular el rendimiento potencial de los cultivares (Slafer y Rawson 1996, Slafer *et al.* 2001).

Sin embargo, la tasa de desarrollo del cultivo en un momento dado es el resultado de la respuesta directa a los factores ambientales (i.e. aquella inducida por el nivel actual del factor) y de memoria (i.e. del ambiente explorado durante etapas previas). Experimentos con transferencias entre distintos ambientes fotoperiódicos en distintas etapas permiten distinguir la magnitud de estas respuestas (Slafer y Rawson 1994). Los pocos trabajos realizados (Miralles y Richards 2000) señalan que si bien durante la ERTA hay respuesta de memoria al fotoperíodo explorado en etapas previas, ésta es de menor magnitud que la respuesta directa. Entonces, en relación a la ERTA se pudo observar: i) la existencia de variabilidad entre cultivares comerciales de trigo con tiempo similar a AN (Whitechurch *et al*. 2007, González *et al.* 2011b), ii) que la sensibilidad fotoperiódica de dicha etapa es parcialmente independiente de la respuesta en etapas previas del desarrollo, tanto en estudios bajo condiciones controladas (Miralles y Richards 2000) como a campo (González *et al.* 2003b, González *et al.* 2005a, González *et al.* 2005b, Serrago *et al.* 2008) y iii) que las modificaciones en la duración de dicha etapa, por alteraciones del ambiente fotoperiódico modificaron el NFF en una proporción similar al PSE (Miralles *et al*. 2000, González *et al.* 2003a, Serrago *et al.* 2008).

Todos estos resultados sustentan la idea de que la ERTA podría ser manipulada en forma relativamente independiente, pero (i) el balance entre efectos directo vs. memoria ha sido pocas veces explorado durante dicha etapa (Miralles y Richards 2000), y no ha sido estudiado previamente durante la ERTE, y (ii) las bases genéticas de la sensibilidad al fotoperíodo en etapas particulares del desarrollo pre-antesis (EVE, ERTE y ERTA) son aún poco comprendidas (González *et al.* 2005c).

1.1.5 Control genético de la respuesta al fotoperíodo

El control genético de la sensibilidad a fotoperíodo se atribuye principalmente a los genes *Ppd-1*, una serie homeoalélica de *loci* ubicados en los brazos cortos de los cromosomas 2, en los genomas D, B y A (*Ppd-D1*, *Ppd-B1* y *Ppd-A1*, de acuerdo a la nomenclatura sugerida por McIntosh *et al.* 2003) (Law *et al.* 1978, Scarth y Law 1983, Worland 1996). Se ha identificado a estos genes como parte de la familia de los "Pseudo-Response Regulators" (PRR), por co-linearidad con su ortólogo *Ppd-H1* en cebada (Turner *et al.* 2005, Beales *et al.* 2007) y se asocian a fenotipos insensibles a fotoperíodo para el tiempo a floración en su estado semi-dominante (*Ppd-1a*, según McIntosh *et al.* 2003), en contraste a lo que sucede con alelos de tipo salvaje (*Ppd-1b*) que retrasan dicho evento ante días cortos (Shaw *et al.* 2012). En general, alteraciones en la región del promotor de dicho gen o cambios en el número de copias del mismo, se asocian al fenotipo insensible al promover la desregulación de la expresión del gen *Ppd-1*, el cual induce niveles elevados del regulador de la floración *TaFT1* (ortólogo en trigo de *FLOWERING LOCUS T*) aún bajo condiciones poco inductivas, i.e. días cortos (Beales *et al.* 2007, Wilhelm *et al.* 2009, Shaw *et al.* 2012).

En el caso de *Ppd-D1*, se han descubierto varios polimorfismos, asociándose solo uno de ellos al fenotipo insensible a fotoperíodo. El mismo consiste en una deleción de 2089 pares de bases (pb.) en sentido 5' a la región codificante, que se piensa puede afectar al promotor del gen, alterando así su expresión normal (Beales *et al.* 2007, Nishida *et al.* 2013).

Para *Ppd-A1*, los polimorfismos asociados a fenotipos insensibles a fotoperíodo fueron descubiertos en primera instancia en especies tretraploides (AABB) del género

Triticum (Wilhelm *et al.* 2009). Dichos polimorfismos consisten en deleciones de 1027 y 1127 pb. en dirección 5' al gen, comprendidas en la región equivalente a aquella abarcada por a deleción que caracteriza a *Ppd-D1a* en el homeólogo 2D. Introgresiones de estos alelos *Ppd-A1a* en germoplasma hexaploide generaron fenotipos con algún grado de insensibilidad al fotoperíodo (Bentley *et al.* 2011, Bentley *et al.* 2013). Estudios posteriores (Nishida *et al.* 2013) encontraron deleciones de 1085 pb. en sentido 5' a la región codificante del gen, en un cultivar japonés de *T. aestivum*, coincidente con la región faltante en los otros alelos *Ppd-A1a* y *Ppd-D1a*. Recientemente, un cuarto alelo (con una deleción en la región del promotor, Muterko *et al.* 2015), que confiere insensibilidad al fotoperíodo ha sido descubierto en otra especie de trigo hexaploide (*T. compactum*).

Por otro lado, si bien se registraron varios polimorfismos para *Ppd-B1* (Beales *et al.* 2007), no pudieron ser asociados a respuesta a fotoperíodo. La excepción es el caso descripto por Nishida *et al.* (2013), quienes descubrieron que una inserción en la región del promotor otorga insensibilidad al fotoperíodo en el cultivar japonés Winter-Abukumawase. Para el resto de los alelos insensibles al fotoperíodo conocidos para *Ppd-B1*, no se registraron diferencias en la secuencia, sino variaciones en el número de copias del gen. Alelos con mayor número de copias presentaron una expresión desregulada del gen, asociada a mayores niveles de transcripto en momentos en los que dicha variable para el alelo salvaje alcanzaba valores mínimos (Díaz *et al.* 2012). Esto concuerda con los cambios en la expresión observados para *Ppd-D1a* y *Ppd-A1a*. (Beales *et al.* 2007, Wilhelm *et al.* 2009). La confirmación de estas investigaciones recientes del multialelismo existente para estos *loci,* sobre la sugerencia ya postulada antes (Scarth y Law 1984), hacen necesario evaluar alelos provenientes de distintos "dadores" para analizar de manera más exhaustiva el efecto de los genes *Ppd-1* y sus interacciones. Por ello, en esta tesis se utilizarán líneas isogénicas obtenidas con distintos dadores de alelos *Ppd-D1a* y *Ppd-B1a* (ver más detalles en ítem 4).

1.1.6 Impacto de los genes *Ppd-1* sobre el desarrollo a antesis: Estudios previos

Dada la importancia que tiene la fecha de AN como característica adaptativa a un ambiente dado (Kamran *et al.* 2014), gran parte de los estudios realizados previamente sobre este grupo de genes se ha centrado en la investigación de su impacto sobre el tiempo a espigazón/antesis. Los primeros estudios sobre el orden de insensibilidad otorgada por los genes en el tiempo a antesis/espigazón según el genoma en el que se encuentre el alelo se realizaron sobre líneas de sustitución cromosómica (LSC) o líneas recombinantes monocromosómicas (LRM) e. g. Scarth *et al.* (1985), Stelmakh (1997). Estos estudios indicaban ordenes de insensibilidad de los genes diferentes a los propuestos actualmente, lo cual podría ser consecuencia del material genético utilizado. Los trabajos más recientes, trabajando ya con líneas isogénicas, han mostrado que en general, *Ppd-D1a* ejerce mayor efecto que *Ppd-B1a*, mientras que *Ppd-A1a* tiene un impacto intermedio, pudiendo acercarse al primero en algunos casos (Bentley *et al.* 2011, Díaz *et al.* 2012, Shaw *et al.* 2012, Bentley *et al.* 2013). Sin embargo, siguen existiendo reportes de casos en los que el efecto de *Ppd-B1a* fue mayor que el de *Ppd-D1a*, tanto en experimentos a campo como bajo condiciones controladas, a pesar de la utilización de líneas isogénicas (Matsuyama *et al.* 2015, Tanio y Kato 2007). Esta controversia puede estar ocasionada porque en este último estudio las líneas usadas como dadores del alelo *Ppd-B1a* portan el único polimorfismo funcional para *Ppd-B1* descripto hasta el momento (Nishida *et al.* 2013), mientras que en los *Ppd-B1a* evaluados en experimentos previos (González *et al.* 2005c, Díaz *et al.* 2012, Bentley *et*

al. 2013), su efecto viene dado por el número de copias presentes (Díaz *et al.* 2012). Existen reportes que sugieren también que el efecto de los distintos alelos sobre la fenología está condicionado por su interacción con el trasfondo genético del material (Kiss *et al.* 2014), que si bien es constante dentro de experimentos (que trabajan con NILs), varía entre los mismos (según el padre recurrente usado para obtenerlas).

Muy pocos trabajos han tenido por objetivo estudiar qué mecanismo fisiológico es afectado por estos genes en las distintas etapas pre-antesis del ciclo de trigo (i.e. tasa de desarrollo durante la etapa, tasa de iniciación de primordios, número de primordios diferenciados) y cómo éstos afectan a los componentes del rendimiento (ver revisión en Tablas 1 y 2 en González *et al.* 2005b). Scarth *et al.* (1985) trabajando con LSC, encontraron que el principal efecto de los alelos *Ppd-D1a* y *Ppd-B1a* en días a espigazón estaba dado por distinta duración de la ERTE y en menor magnitud por la duración de la ERTA. Estos resultados coinciden solo parcialmente con otros posteriores. Por ejemplo, Whitechurch y Slafer (2002), trabajando también con LSC, encontraron que *Ppd-B1a* estaba asociado con la EVE y la ERTA pero no influenciaba la ERTE. Foulkes *et al.* (2004), usando líneas isogénicas sobre los cultivares Mercia y Cappelle-Desprez, reportaron que el adelanto de la AN en *Ppd-D1a* era consecuencia de una menor duración de la etapa previa a ET (EVE + ERTE), sin influencia sobre la ERTA. Por su parte, González *et al.* (2005b), cuando evaluaron el efecto de los genes en las mismas líneas que Foulkes *et al.* (2004), observaron que el impacto de *Ppd-D1a* en tiempo a AN estaba mediado por su impacto en cada una de las tres etapas previas, mientras que *Ppd-B1a* modificaba el tiempo a AN en menor medida y principalmente a través de la ERTE. Con ese mismo material, Vázquez (2010) también observó que *Ppd-D1a* modificaba el tiempo a AN en mayor medida que *Ppd-B1a*, pero ninguno de los dos con efecto diferencial en las etapas que conforman el tiempo a AN. Estudios con materiales japoneses, sin embargo, contradicen estos resultados: mientras que *Ppd-B1a* tuvo mayor efecto sobre la etapa previa a ET (EVE+ERTE), su impacto sobre la etapa posterior (ERTA) fue menos importante (Matsuyama *et al.* 2015). En el caso de *Ppd-A1a*, solo existen reportes que mencionan que su efecto sobre el adelantamiento de la aparición de hoja bandera es mayor que el que tienen sus homeólogos en los genomas D y B, mientras que para la fecha de espigazón, es intermedio entre ambos (Bentley *et al.* 2013). Estos resultados contradictorios si bien pueden estar explicados en algunos casos por la utilización de diferentes alelos o dadores del gen, se han observado incluso en trabajos utilizando las mismas líneas isogénicas (Foulkes *et al.* 2004, González *et al.* 2005b, Vázquez 2010). En este último caso podrían deberse a diferente grado de saturación de la respuesta a vernalización en las líneas invernales de Mercia, resaltando la necesidad de trabajar con líneas isogénicas sobre fondo primaveral, tal como se realizó en esta tesis.

Menos estudios aún (Tanio y Kato 2007, Shaw *et al.* 2012, Matsuyama *et al.* 2015) han hecho foco en la interacción entre genes *Ppd-1* y su impacto sobre el tiempo a floración, con poca información sobre etapas intermedias del desarrollo y su efecto sobre el número de estructuras generadas y componentes asociados al rendimiento. En el trabajo de Shaw *et al.* (2012), se puede observar que al aumentar el número de alelos *Ppd-1a* se reduce el tiempo a espigazón, salvo para aquellas líneas *Ppd-D1a*, a las que aportarle más alelos insensibles reduce muy poco o nada (dependiendo del experimento) el tiempo. Tanio y Kato (2007) encontraron que la combinación de alelos *Ppd-D1a* y *Ppd-B1a* provocó un mayor adelantamiento de la floración, por poseer mayor efecto sobre EVE y ERTA que el solo efecto de *Ppd-B1a*, coincidiendo con Matsuyama *et al.* (2015) que a su vez describieron reducciones en la longitud del vástago, rendimiento en grano, y número de granos en el mismo sentido. Esta tesis explora las interacciones

entre genes *Ppd-1* y su impacto en el desarrollo a antesis utilizando líneas isogénicas que combinan dos o tres alelos *Ppd-1a*.

La mayoría de los experimentos a los que se hizo referencia previamente evaluaron el impacto de los genes bajo pocos ambientes fotoperiódicos. Existen pocos reportes de la respuesta cuantitativa a fotoperiodo de los genes *Ppd-1* de acuerdo a la Figura 1.3 presentada previamente (ver ítem 1.1.3), y menos aún sobre el impacto de los genes *Ppd-1* y sus combinaciones dobles y triples (dos y tres alelos en estado dominante) sobre los parámetros de dichas curvas y sobre la tasa de diferenciación de primordios y evolución del ápice meristemático. Whitechurch y Slafer (2002) obtuvieron resultados a campo de sensibilidad al fotoperíodo para las etapas aquí definidas, usando, sin embargo, líneas de sustitución cromosómica, con variabilidad en los genes *Ppd-D1* y *Ppd-B1*, solamente. Vázquez (2010), en cambio, realizó experimentos bajo condiciones controladas con el mismo fin, con líneas isogénicas sobre el cultivar invernal "Mercia", con alelos insensibles para *Ppd-D1* y *Ppd-B1*. Sus resultados indican que los genes modificarían solo la sensibilidad a fotoperíodo, sin afectar al fotoperíodo umbral o a la precocidad intrínseca. Conocer el efecto de los diferentes alelos *Ppd-1* y sus interacciones sobre dichos parámetros puede ayudar a comprender las controversias reportadas en diferentes experimentos que exploraron solo dos condiciones fotoperiódicas contrastantes. También serán de utilidad para ser incorporados en modelos de simulación agronómica, ayudando a los mejoradores a elegir la combinación de alelos *Ppd-1* que mejor ajuste y optimice el ciclo del cultivo para maximizar el rendimiento potencial en un ambiente en particular (asociado a fecha de siembra y latitud).

Pocos autores han analizado el impacto de los alelos sobre la respuesta a cambios en el ambiente fotoperíodico y cómo ello afecta a la generación de componentes asociados al rendimiento, haciéndolo frecuentemente desde los componentes numéricos del mismo (Whitechurch y Slafer 2002, Matsuyama *et al.* 2015). Esta aproximación presenta complicaciones para comprender los mecanismos subyacentes que determinan el rendimiento, dadas las correlaciones negativas que suelen vincular a sus componentes (Slafer 2003), sobre todo cuando la variación de ellos es pequeña (Sadras y Slafer 2012, Slafer *et al.* 2014). Una mejor comprensión del impacto de los genes sobre esta característica compleja puede lograrse a través de un enfoque ecofisiológico, principalmente el PSE en antesis y su relación con el NFF según lo sugerido por Fischer (1983), y aplicado por González *et al.* (2005b) en el caso de los genes *Ppd-D1* y *Ppd-B1*. La presente tesis sigue esta misma línea de trabajo para caracterizar el impacto de los genes *Ppd-1* y sus interacciones en combinaciones dobles y triples sobre la respuesta a cambios en el ambiente fotoperiódico en líneas isogénicas sobre un cultivar primaveral, y cómo ello repercute en la partición de biomasa a la espiga y la evolución de las flores durante la ERTA y finalmente en el NFF en AN.

1.2 Objetivos

El objetivo general del proyecto es determinar el efecto de las distintas combinaciones alélicas para los genes de sensibilidad al fotoperiodo *Ppd-1* sobre el desarrollo fásico y morfológico del cultivo de trigo a antesis bajo diferentes ambientes fotoperiódicos.

Los objetivos específicos consisten en determinar el impacto de diferentes alelos de los genes *Ppd-1* y combinaciones de ellos sobre:

1) (a) el tiempo a antesis y la duración de las etapas de desarrollo EVE, ERTE y ERTA, y (b) el número de estructuras diferenciadas en cada una de las etapas debido al efecto sobre la duración y la tasa de diferenciación y/o expansión de dichas estructuras, cuando el fotoperíodo es contrastante desde la emergencia del cultivo,
2) los parámetros de las curvas de respuesta a fotoperíodo, i.e. sensibilidad al fotoperíodo, fotoperíodo umbral y precocidad intrínseca, del ciclo a antesis y de las etapas intermedias.
3) la respuesta directa de la ERTA a cambios en el fotoperíodo solo durante esta etapa y cómo esto afecta el peso seco de la espiga y la dinámica de mortandad floral, que es *a posteriori* responsable del número de flores fértiles en antesis,
4) el balance entre efecto directo vs. memoria durante la ERTE y ERTA, i.e. cuánto del efecto observado en una etapa particular corresponde a una respuesta directa al fotoperíodo promedio explorado durante dicha etapa y cuánto al fotoperíodo explorado durante etapas previas.

1.3 Hipótesis

1) Diferentes combinaciones alélicas para los genes *Ppd-1* afectan tanto al tiempo a antesis como a la duración de las etapas particulares que lo componen, i.e. EVE, ERTE y ERTA, en forma distinta. Dicho efecto sobre la duración de las etapas repercute sobre el número de estructuras formadas en cada una de ellas, ya que el efecto de los genes sobre la duración es mayor que el que tienen sobre la tasa de diferenciación de primordios/expansión de hojas.
2) Los genes *Ppd-1* afectan en mayor medida la sensibilidad al fotoperíodo con poco o ningún impacto en el fotoperíodo umbral. La duración mínima de la fase o precocidad intrínseca es independiente de los genes *Ppd-1* en cualquiera de sus combinaciones.
3) Existe una respuesta diferencial de las combinaciones alélicas para los genes *Ppd-1* a alteraciones en el ambiente fotoperiódico exclusivamente durante la ERTA, modificando la duración de dicha etapa, lo que a su vez genera diferencias en el número de flores fértiles en antesis, asociado con alteraciones en el peso de las espigas en antesis.
4) La duración de cada etapa del desarrollo responde de manera directa al fotoperíodo explorado durante la misma, aunque dicha respuesta se encuentra condicionada por el fotoperíodo explorado en etapas previas.

1.4 Síntesis de la estructura de la tesis

La presente tesis consta de 5 Capítulos de resultados que responden a los objetivos planteados. Los Capítulos 2 y 3 se encuentran publicados en *Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2018. Wheat pre-anthesis development as affected by photoperiod sensitivity genes (Ppd-1) under contrasting photoperiods. Functional Plant Biology 45, 645–657,* y *Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2019, y Photoperiod-sensitivity genes shape floret development in wheat. Journal of Experimental Botany 70, 1339–1348*, dando así cumplimiento al objetivo 1. Un tercer trabajo correspondiente al Capítulo 4, ha sido publicado como *Pérez-Gianmarco TI, Severini AD, González FG. 2020. Photoperiod-sensitivity genes (Ppd-1): Quantifying their effect on the photoperiod response model in wheat. Journal of Experimental*

Botany 71, 1185-1198, y da cumplimiento al objetivo 2 planteado arriba. El Capítulo 5 muestra cómo la respuesta de la ERTA a cambios en el fotoperíodo solo durante dicha etapa es modificada por los genes *Ppd-1* y su impacto en la generación del rendimiento bajo condiciones de campo, cumpliendo el objetivo 3. Finalmente, el Capítulo 6 analiza las respuestas memoria y directa de las ERTE y ERTA, cumpliendo el objetivo 4. La tesis finaliza con un capitulo de Discusión General (7) que permite valorar el aporte novedoso de los resultados al estado del arte previo a la realización de la tesis.

Capítulo 2: Desarrollo fásico y morfológico según la combinación alélica para *Ppd-1* bajo fotoperíodos contrastantes[1]

[1] Los principales resultados de este capítulo están incluidos en *Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2018. Wheat pre-anthesis development as affected by photoperiod sensitivity genes (Ppd-1) under contrasting photoperiods. Functional Plant Biology 45, 645–657.*

2.1 Introducción

Como se mencionó previamente, el desarrollo del trigo (*Triticum aestivum* L.), que define en última instancia la fecha de antesis, juega un rol crucial en la adaptación del cultivo (Worland 1996, Snape *et al.* 2001) y es por lo tanto una variable a optimizar en cada ambiente si se quiere maximizar el rendimiento. La fenología del cultivo define la posibilidad de capturar recursos y evitar condiciones ambientales estresantes durante las fases pre- y post- antesis del período crítico para la generación del rendimiento (Fischer 1975, Evans 1978). El aumento esperado de las temperaturas debido al cambio climático (IPCC, 2014) reducirían el rendimiento a una tasa de 6 a 7 % por grado centígrado de incremento, solamente mediante su efecto de aceleración de las tasas de desarrollo, particularmente durante pre-antesis (García *et al.* 2015, Asseng *et al.* 2015).

Como se mencionó en el Capítulo 1, en el cultivo de trigo pueden distinguirse tres etapas previo a la antesis: vegetativa (EVE, se diferencian los primordios foliares), reproductiva temprana (ERTE, se diferencian primordios de espiguillas), y reproductiva tardía (ERTA, diferenciación y muerte de primordios florales dentro de las espiguillas, crecimiento de tallos y espigas) (Slafer y Rawson 1994). La manipulación independiente de la duración de estas fases, i.e. el alargamiento relativo de la ERTA, que incluye al período crítico para la generación de rendimiento, sin modificar el tiempo a AN, ha sido propuesto como una alternativa para aumentar el rendimiento potencial de trigo (Slafer *et al.* 1996, 2001, González *et al.* 2011b). El incremento en la duración de la ERTA, a través de alguna respuesta no mediada por la temperatura, podría contribuir a mitigar o incluso revertir la pérdida de rendimiento pronosticada como resultado del calentamiento global. La manipulación de la sensibilidad al fotoperído de las etapas pre-antesis podría ser una alternativa para ello, puesto que se ha sugerido que la sensibilidad a fotoperíodo de cada fase fenológica puede estar bajo controles genéticos al menos parcialmente independientes (Halloran y Pennell 1982, Slafer y Rawson 1996, González *et al.* 2002). Esto permitiría manipular la sensibilidad a fotoperíodo de cada fase, sin afectar fuertemente a las otras, para optimizar su duración relativa (Slafer *et al.*1996, 2001). Estas sugerencias se basaron en la respuesta diferencial a fotoperíodo de las etaptas pre-antesis, pero se desconocen cuáles son los controles genéticos que modulan de manera parcialmente independiente cada etapa.

Los genes *Ppd-1* son reconocidos como la principal fuente de variación en sensibilidad a fotoperíodo en trigo (Law *et al.* 1978, Scarth y Law 1984, ver detalle en Capítulo 1, ítem 1.1.5). Pero su efecto sobre el desarrollo a antesis ha sido explorado solo recientemente y relativamente pocos trabajos usaron líneas cuasi-isogénicas para hacerlo (Foulkes *et al.* 2004, González *et al.*, 2005b, Matsuyama *et al.*, 2015, Ochagavía *et al.* 2017). Estos trabajos se centraron principalmente en el efecto de los genes sobre el desarrollo fásico, i.e. la duración de las etapas del ciclo a antesis, entre líneas con una variante alélica para *Ppd-D1* (Foulkes *et al.* 2004) o una para *Ppd-D1* y otra para *Ppd-B1* (González *et al.* 2005b, Matsuyama *et al.* 2015). Existe un único reporte conocido sobre el impacto de *Ppd-A1* solo bajo fotoperíodo natural (Ochagavía *et al.* 2017). Estos estudios han reportado resultados contrastantes para algunas variables. Se encontró que *Ppd-D1a* estaba asociado a una reducción en la duración de solo la EVE (Scarth *et al.* 1985), la EVE y la ERTE (Foulkes *et al.* 2004), o alternativamente a una reducción en la duración de las tres etapas pre-antesis (González *et al.* 2005b, Ochagavía *et al.* 2017). Por otro lado, *Ppd-B1* ha sido asociado con la duración de la ERTE (Scarth *et al.* 1985, González *et al.* 2005b) o las de la EVE y la ERTE, con ningún efecto o menor al de *Ppd-D1* sobre la ERTA (Whitechurch y Slafer 2002, Matsuyama *et al.* 2015).

Más allá del impacto de los genes *Ppd-1* sobre el desarrollo fásico, algunos de los trabajos citados reportan también efectos de *Ppd-1* sobre el número de estructuras generadas durante cada etapa particular del desarrollo, i.e. desarrollo morfológico. Scarth *et al.* (1985) encontraron que el número final de hojas no era afectado por *Ppd-D1a* ni *Ppd-B1a*, mientras que González *et al.* (2005b) vieron una reducción de esta variable ante la introgresión de cualquiera de los alelos insensibles mencionados. En cuanto al número de espiguillas por espiga, los pocos reportes disponibles coinciden en que la diferencia entre los fenotipos más extremos, siempre comparando contra el genotipo con solo *Ppd-1b*, oscila entre 2 y 3,5 espiguillas por espiga tanto en cámaras de crecimiento (Scarth *et al.* 1985, *Ppd-D1a*) como a campo (González *et al.* 2005b*, Ppd-D1a*, Matsuyama *et al.* 2015, *Ppd-B1a y Ppd-D1a*). Por otro lado, el impacto de los genes *Ppd-1* sobre la tasa de aparición de hojas parece haber sido solo excepcionalmente considerada (González *et al.* 2005b). Este es un atributo de relevancia ya que junto con el número final de hojas determinan el tiempo térmico a hoja bandera y, con ello, el tiempo a antesis. Mejorar la compresión del efecto de *Ppd-1* sobre la dinámica de primordios y de aparición de hojas permitiría entender la razón de algunas de estas discrepancias.

En este capítulo se presentan resultados del efecto individual de *Ppd-A1a*, *Ppd-B1a*, *Ppd-D1a* y de su triple interacción no solo sobre el desarrollo fásico, sino también sobre la dinámica de diferenciación de primordios y el impacto que eso tiene sobre el número de estructuras diferenciadas en cada etapa bajo dos fotoperíodos contrastantes.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Diseño experimental, tratamientos y condiciones experimentales

Se llevaron a cabo dos experimentos en la Universitat de Lleida (Cataluña, España) durante 2015, cada uno en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas independientemente. Para cada uno de estos experimentos, los tratamientos consistieron en la combinación factorial de cinco genotipos (Cuadro 2.2.1) y dos fotoperíodos contrastantes de 12 (corto) y 16 (largo) horas de luz por día contínuas desde emergencia hasta antesis. Los genotipos consistieron en 4 líneas isogénicas (NILs) desarolladas en Paragon, y éste propiamente dicho, un cultivar primaveral inglés, de genotipo triple sensible en *Ppd-1* (*Ppd-1b*). Las líneas isogénicas se obtuvieron en el John Innes Centre, y fueron provistas para la realización de los experimentos que se describen en este y el resto de los capítulos. Brevemente, consisten en líneas BC_6 que tienen a Paragon como padre recurrente en seis retrocurzas posteriores a un cruzamiento inicial de este cultivar con alguno de otros 3 cultivares, dadores de alguno de los alelos mutantes *Ppd-1a* en los genomas A, B y D utilizados (Cuadro 2.2.1). La selección de la progenie mediante marcadores moleculares alelo-específicos permitió obtener después de cada evento de retrocruza a aquellas líneas que mantenían los alelos *Ppd-1a* de los dadores. Adicionalmente, una de esas líneaa posee el apilamiento de los tres *Ppd-1a* (Cuadro 2.2.1). La metodología detallada para la obtención de las NILs puede encontrarse en Bentley *et al.* (2011).

Los tratamientos de fotoperíodo fueron impuestos de manera consecutiva, de manera que en cada cámara hubo un primer grupo de plantas que cumplió su ciclo en fotoperíodo corto, posterior al cual un nuevo grupo de plantas creció bajo fotoperíodo largo. Independientemente del tratamiento de fotoperíodo, se aseguró que la radiación incidente diaria fuera la misma (*c.* 2,36 MJ m^{-2} d^{-1}) apagando algunas de las luces de las cámaras durante el tratamiento de fotoperíodo largo. La temperatura de cada

experimento fue mantenida a 16 °C. Cada experimento tuvo un diseño completamente aleatorizado: los genotipos fueron repartidos al azar dentro de cada cámara. El número de repeticiones dependió de la variable respuesta considerada en cada caso (ver párrafos siguientes).

Cuadro 2.2.1: Genotipo de cada línea isogénica (NIL) para Ppd-1 en los genomas A, B y D. Los alelos Ppd-1a están asociados a fenotipos insensibles a fotoperíodo.

Nombre	Genoma A	Genoma B	Genoma D	Dador *Ppd-1a*
Paragon	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	
P(CS-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Chinese Spring
P(GS-100-2A)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	GS-100
P(S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Sonora 64
Triple Insensible	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	Todos los anteriores

Las plantas fueron cultivadas individualmente en macetas de 235 mL llenas de una mezcla en proporción 7:3 de turba y abono orgánico. Se sembró una semilla curada con insecticidas y fungicidas por maceta y luego de un primer riego, las macetas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta la emergencia de la plántula. Se sembró un 50 % más que las macetas necesarias para poder elegir para los experimentos aquellas plántulas con un estado de desarrollo similar. El número de macetas por genotipo por experimento varió entre 38 y 54, dependiendo de la combinación alélica para *Ppd-1* y del tratamiento de fotoperíodo. Es decir que para la etapa en fotoperíodo corto y para genotipos que se esperaba fueran más sensibles a fotoperíodo se usó un mayor número de macetas, para permitir hacer más disecciones apicales. Cada maceta fue considerada como la unidad experimental y las mismas fueron reordenadas dentro la cámara de crecimiento dos veces por semana para evitar posibles efectos de bordura. Las macetas se fertilizaron al principio de cada experimento con macro (P, K) y micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn). Para regar una cantidad fija e idéntica de agua para todas las macetas se usó una pistola dosificadora. Se aplicaron fungicidas e insecticidas para evitar el ataque de insectos y enfermedades.

2.2.2 Mediciones, variables respuestas y análisis

En cada experimento se marcaron 8 plantas por cada genotipo y tratamiento de fotoperíodo, inmediatamente después de la emergencia (EM). En estas plantas se determinaron los estados fenológicos de hoja bandera (HB) y antesis (AN) según la escala de Zadoks *et al.* (1974). También en ellas se registró el número de hojas según la escala de Haun (1973) dos a tres veces por semana, desde EM hasta HB, cuando se registró el número final de hojas (NFH). Posteriormente, en AN, se registró el número de espiguillas por espiga. Para estas variables se contó entonces con ocho réplicas en cada combinación de genotipo x ambiente.

Usando una temperatura base de 0 °C se calculó el tiempo térmico acumulado a cada estado fenológico desde EM. Para estimar la tasa de aparición de hojas, se ajustaron modelos lineales para la relación entre el número de hojas en un momento dado y el tiempo térmico acumulado desde EM hasta ese momento (Ecuación 2.1, *b*). Cuando se encontró evidencia de falta de ajuste con una regresión lineal simple, se ajustó una regresión bi-lineal (Ecuación 2.2). La regresión bi-lineal permitió reflejar el

hecho de que las primeras hojas aparecieran a una mayor tasa, *b*, que disminuyó a la tasa *d* a partir del tiempo *c*.

(2.1) $$y = a + bx$$

(2.2) $$y = a + bx(x \pm c) + bc(x > c) + d(x - c)(x > c)$$

Dos a tres veces por semana, se muestrearon y disectaron dos plantas de cada combinación de genotipo y tratamiento en cada experimento. En cada caso, se registró el número de primordios y el estado de desarrollo del ápice según la escala de Kirby y Appleyard (1987), hasta que las plantas llegaron al estado de espiguilla terminal (ET). Posterior a cada muestreo, las plantas remanentes en cada cámara fueron reordenadas para asegurar que mantuvieran una estructura similar a un canopeo y para evitar efectos de bordura. El número de primordios totales (NPT) en el ápice del vástago principal fue relacionado al tiempo térmico acumulado desde EM mediante modelos de regresión bi-lineal (ver ecuación 2.2). Esto permitió estimar la tasa de diferenciación de primordios de hojas, *b*, y de espiguillas, *d*. El parámetro *c* permitió describir el momento en el cambió la tasa de diferenciación de primordios. La dinámica de primordios así obtenida permitió estimar *a posteriori* el momento de la iniciación floral (IF), como el momento en que se inició el primer primordio reproductivo (*collar*, o equivalente al primordio que dio origen a la última hoja + 1). La duración de las etapas pre-antesis fue calculada como la diferencia en tiempo térmico acumulado en distintos estados fenológicos:

(2.3) $EVE = IF - EM$
(2.4) $ERTE = ET - IF$
(2.5) $ERTA = AN - ET$

Los efectos de los experimentos, genotipos, tratamientos y sus interacciones dobles y triples se evaluaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey, usando un $\alpha = 0{,}05$ (InfoStat, Di Rienzo *et al.* 2011). Los análisis de regresión lineal fueron realizados usando GraphPad Prism 6.00. Para determinar diferencias significativas en la tasa de aparición de hojas y la tasa de diferenciación de primordios entre genotipos y tratamientos se usó el intervalo de confianza de 95 %.

2.3 Resultados

Los efectos principales de fotoperíodo y genotipo fueron altamente significativos para todas las variables evaluadas (Cuadro 2.3.1). Su interacción, aunque de menor magnitud, fue altamente significativa (Cuadro 2.3.1), de acuerdo a lo esperado (líneas con distinta sensibilidad a fotoperíodo expuestas a distintos niveles de este factor). En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre experimentos (i.e. los resultados obtenidos de cada una de las cámaras de crecimiento) para la mayoría de las variables respuesta. En los casos en los que sí hubo diferencias, la magnitud de las mismas fue despreciable en relación a las originadas por los factores “fotoperíodo” y/o “genotipo”. Además, la triple interacción (experimento × genotipo × fotoperíodo) no fue estadísticamente significativa (Cuadro 2.3.1). Esto implica que las mínimas diferencias entre experimentos, cuando las hubo, no afectaron ni a la doble interacción genotipo × fotoperíodo ni al efecto individual de esos factores. Por lo tanto, se usaron los promedios a través de experimentos en el análisis siguiente de resultados.

*Cuadro 2.3.1: Cuadrados medio para los efectos principales experimento (Exp), fotoperíodo (Fot) y genotipo (Gen) y las interacciones Gen x Fot y Gen x Fot x Exp para los ANOVA para la duración desde emergencia (EM) a espiguilla terminal (ET) y a antesis (AN), además de las etapas vegetativa (EVE), reproductiva temprana (ERTE) y tardía (ERTA), y para el número final de hojas en el vástago pripncipal (NFH), el número de espiguillas por espiga (ESPILLAS ESPIGA $^{-1}$) y el número de primordios totales (NPT). A la derecha de cada valor se indica su nivel de significancia (ns, no significativo, *, p < 0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001).*

F.V.	Duración (10^3 °C d)				
	EM–AN	EM–ET	EVE	ERTE	ERTA
Exp	83,5 ***	3,2 *	0,2 ns	2,0 ns	10,0 *
Fot	4514,2 ***	302,8 ***	49,5 ***	107,5 ***	429,7 ***
Gen	1091,4 ***	69,7 ***	13,7 ***	24,6 ***	199,9 ***
Gen × Fot	511,2 ***	42,7 ***	8,1 ***	14,6 ***	94,4 ***
Gen × Fot × Exp	3,4 ns	0,4 ns	0,1 ns	0,5 ns	2,0 ns

F.V	Estructuras producidas (hojas y/o espiguillas)		
	NPT	NFH	ESPILLAS ESPIGA^{-1}
Exp	0,5 ns	0,2 ns	0,1 ns
Fot	334,2 ***	136,9 ***	43,2 ***
Gen	118,7 ***	22,6 ***	41,2 ***
Gen × Fot	62,4 ***	16,9 ***	15,6 ***
Gen × Fot × Exp	1,0 ns	0,2 ns	1,1 ns

Todas las plantas de las líneas con al menos un alelo *Ppd-1a* se desarrollaron normalmente hasta antesis bajo ambos tratamientos de fotoperíodo. En cambio, en el genotipo con tres alelos *Ppd-1b*, Paragon, solo algunas de las plantas alcanzaron antesis bajo fotoperíodo corto (31 % en promedio, 25 % en el experimento 1 y 38 % en el experimento 2) al finalizar el experimento, 2300 °C d después de EM. En ese momento, las plantas que no habían llegado aún a antesis se disectaron bajo microscopio y se determinó que el ápice había detenido su desarrollo en un estadío posterior a espiguilla terminal y previo a que la espiga saliera de la vaina de la hoja bandera, y se encontraba muerto. Así, fue evidente que las plantas que no habían alcanzado antesis a los 2300° C d después de EM, momento en el cual se decidió finalizar el experimento, tampoco lo hubieran hecho si el experimento continuaba. Por lo tanto, muchas de las plantas de Paragon mostraron una respuesta cualitativa al fotoperíodo durante la ERTA, mientras que su respuesta fue cuantitativa para las etapas previas ERTE y EVE. De aquí en adelante, se reportan en este capítulo diferencias cuantitativas entre tratamientos de fotoperíodo y genotipos, por lo que solo las plantas de Paragon que se desarrollaron normalmente a antesis fueron usadas para analizar el efecto de los genes *Ppd-1* y su interacción con el fotoperíodo sobre la duración de la ERTA y del ciclo completo a antesis (EM-AN).

2.3.1 Tiempo a antesis, número final y tasa de aparición de hojas

Dependiendo del tratamiento de fotoperíodo, los genotipos difirieron en la duración EM-AN. Paragon alcanzó AN más tarde que aquellos genotipos con al menos

un *Ppd-1a*, y la diferencia con el genotipo triple insensible (tres *Ppd-1a*) varió entre *c.* 1000 °C d bajo fotoperíodo corto y *c.* 200 °C d en fotoperíodo largo (Fig. 2.1). Solo se encontraron diferencias entre genotipos con al menos un alelo *Ppd-1a* bajo fotoperíodo corto. En esa condición, la magnitud del efecto de los alelos fue *Ppd-D1a* > *Ppd-A1a* > *Ppd-B1a* y solo se pudo detectar un efecto adicional de apilar los tres alelos por sobre el del *Ppd-D1a* con un $\alpha = 0{,}10$.

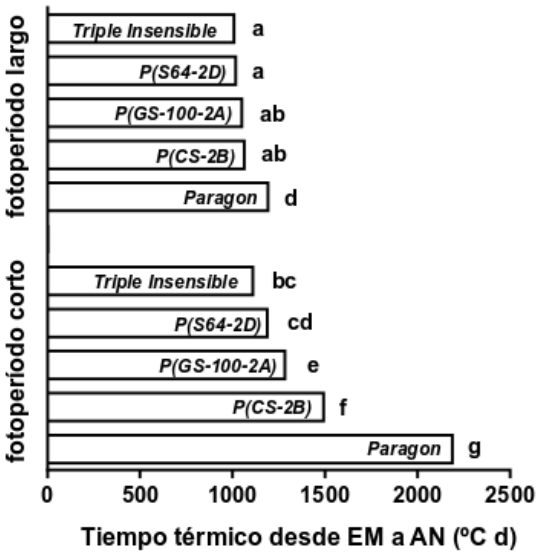

Figura 2.1: Duración del ciclo completo emergencia (EM) - antesis (AN) en tiempo térmico (C d) para cada genotipo bajo ambas condiciones de fotoperíodo. Letras distintas al final de las barras indican diferencias significativas entre dos combinaciones de genotipo y fotoperíodo (Tukey, α = 0,05). Cada dato es el promedio de los dos experimentos.

La duración EM-AN estuvo relacionada tanto a la fase de aparición de hojas (desde EM hasta HB, $R^2 = 0{,}99$, $p < 0{,}001$) como a la de elongación del pedúnculo (desde HB hasta AN, $R^2 = 0{,}43$, $p = 0{,}04$), aunque esta última relación no fue tan fuerte como la primera. La diferencia entre los genotipos para la duración HB-AN fue pequeña, variando entre *c.* 270 y 335 °C d bajo fotoperíodo corto y entre *c.* 225 y 280 °C d bajo fotoperíodo largo. En cambio, las diferencias entre genotipos para la duración EM-HB varió entre *c.* 830 y 1920 °C d bajo fotoperíodo corto *c.* 770 y 910 °C d bajo fotoperíodo largo. El NFH estuvo fuerte y positivamente asociado a la duración EM-HB ($R^2 = 0{,}93$, $p < 0{,}001$) y fue el principal determinante del momento de aparición de la hoja bandera (HB). El orden de magnitud del efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre la duración de EM-HB y HB-AN fue similar a aquel observado para la duración del ciclo completo a antesis.

La duración EM-HB depende del NFH y la tasa a la que esas hojas aparecen (tasa de aparición de hojas, TAH), o su inversa, el filocrono. En nueve de las diez combinaciones de fotoperíodos y genotipos, la TAH fue adecuadamente descripta por una regresión linear simple (Fig. 2.2). Para la combinación restante, Paragon bajo fotoperíodo corto, la regresión lineal simple mostró falta de ajuste (ver inserto en panel izquierdo de la Fig. 2.2). Las primeras *c.* 7 hojas de Paragon aparecieron a una mayor tasa que las restantes (Fig. 2.2). Cada uno de los alelos *Ppd-1a*, así como su combinación triple, aceleraron la tasa de aparición de hojas de manera significativa en ambos tratamientos de fotoperíodo. La magnitud de dicho efecto fue menor, sin embargo, bajo fotoperíodo largo, condición bajo la cual el filocrono, varió entre 122 °C d h^{-1} en el genotipo triple insensible y 132 °C d h^{-1} en Paragon (panel derecho de la

Fig. 2.2). Bajo fotoperíodo corto las diferencias fueron mucho más notables: los filocronos de los mismos genotipos variaron entre 128 °C d h $^{-1}$ para el triple insensible, y 163 y 200 °C d h $^{-1}$ para las primeras y últimas hojas de Paragon, respectivamente (Fig. 2.2).

Considerando todas las combinaciones de genotipos y fotoperíodos, el NFH estuvo negativamente relacionado a la TAH (R^2 = 0,69, p < 0,01, Fig. 2.3). Sin embargo, esta relación fue fuertemente traccionada por la respuesta individual de cada genotipo al tratamiento de fotoperíodo (puntos de igual forma, llenos y vacíos en Fig. 2.3). Dentro de cada tratamiento de fotoperíodo, las diferencias entre genotipos para la TAH fueron independientes de aquellas en NFH, excepto para Paragon en fotoperíodo corto, que mostró tanto un mayor NFH como una menor TAH que el resto de los genotipos (Fig. 2.3).

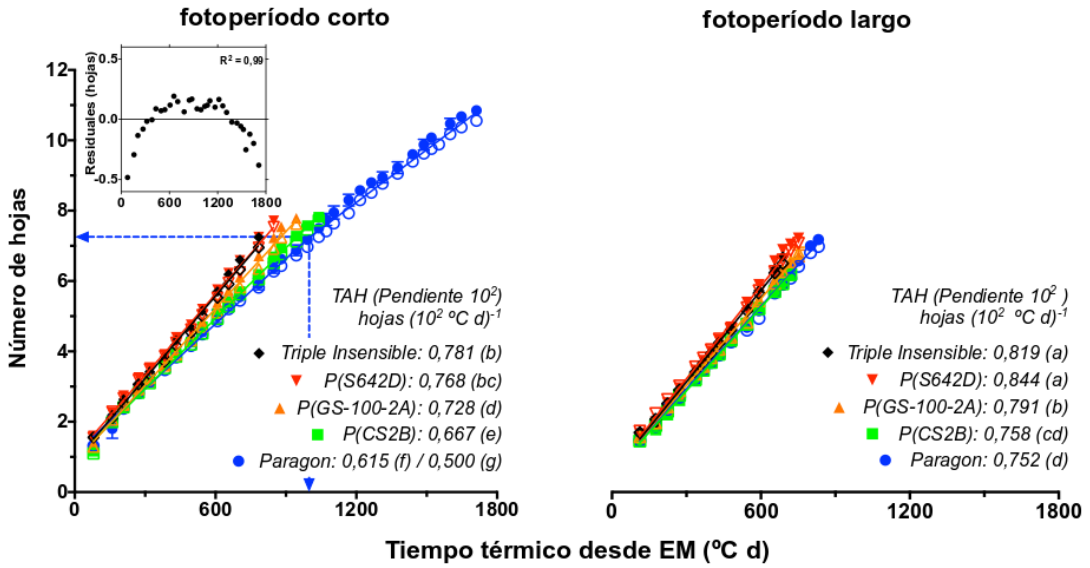

Figura 2.2: Dinámica de aparición de hojas. Relación entre las hojas aparecidas en el vástago principal en los experimentos 1 y 2 (símbolos llenos y vacos, respectivamente) y el tiempo térmico acumulado desde emergencia (EM). Las barras en cada punto muestran el error estándar. Las pendientes, en los insertos abajo a la derecha en cada panel de la figura, indican la tasa de aparición de hojas (TAH, hojas (102 C d) $^{-1}$). Los ajustes lineales o bi-lineales tuvieron en todos los casos R^2 > 0,97 y p < 0,01. Letras compartidas entre dos valores cualesquiera de TAH indican que sus intervalos de credibilidad de 95% se solapan. La flecha con línea punteada indica el número de hojas (ordenada) aparecidas y el tiempo (abscisa) a los que se di el cambio en la TAH en Paragon bajo fotoperíodo corto. La relación entre los residuales del ajuste lineal de Paragon en fotoperíodo corto y el tiempo térmico desde emergencia (inserto superior izquierdo) justifica el uso de un ajuste bi-lineal en ese caso.

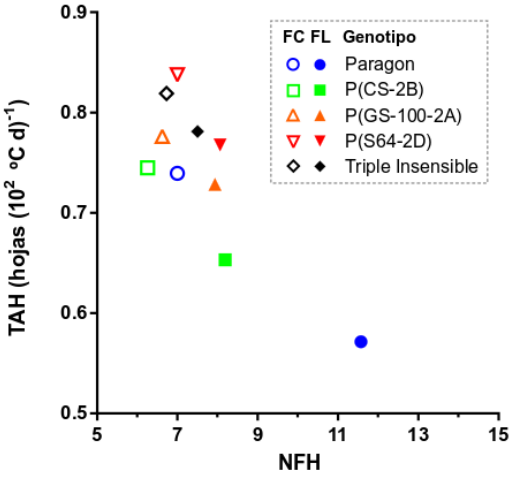

Figura 2.3: Relación entre la tasa de aparición de hojas (TAH) y el número final de hojas (NFH) bajo fotoperíodo largo (FL) y corto (FC). La TAH para Paragon en fotoperíodo corto fue calculada como la media ponderada de la TAH de las hojas aparecidas antes y después del cambio en la TAH real (ver Fig. 2.2).

2.3.2 Duración de las etapas vegetativa, y reproductivas temprana y tardía

Los alelos *Ppd-1a* acortaron la duración de todas las etapas de desarrollo, EVE, ERTE y ERTA, bajo fotoperíodo corto, tanto en combinaciones simples como triple (Cuadro 2.2.1, Fig. 2.4). En fotoperíodo largo, los efectos de los alelos *Ppd-1a* fueron menores que bajo fotoperíodo corto pero aun estadísticamente significativos, al menos cuando se compararon los casos extremos de Paragon y el genotipo triple insensible (paneles superiores de la Fig. 2.4).

Bajo fotoperíodo corto, Paragon mostró la mayor duración de EVE, seguido por P(CS-2B) y P(GS-100-2A). Este último tuvo una EVE de duración similar a la de P(S64-2D) y a la del genotipo triple insensible (paneles inferiores de la Fig. 2.4). En otras palabras, *Ppd-D1a* y *Ppd-A1a* tuvieron similar efecto sobre la duración de la EVE, mientras que el efecto de *Ppd-B1a* fue menor. En fotoperíodo largo aún se pudieron detectar efectos de la triple combinación de *Ppd-1a* y de *Ppd-A1a* sobre la duración de la EVE (panel superior izquierdo de la Fig. 2.4).

De manera similar, bajo fotoperíodo corto la ERTE alcanzó su mayor duración en Paragon (*c.* 540 °C d), mientras que ésta fue mínima en genotipos con *Ppd-A1a*, *Ppd-D1a* o la triple combinación de *Ppd-1a*. La duración de la ERTE en el genotipo con solo *Ppd-B1a* fue marginalmente mayor que en el resto de los genotipos con algún *Ppd-1a*, pero la diferencia con ellos no fue estadísticamente significativa (ver panel inferior central de la Fig. 2.4). Bajo fotoperíodo largo, las diferencias entre genotipos fueron menos evidentes. Aunque hubo un efecto significativo de *Ppd-D1a* sobre la duración de la ERTE, la diferencia real con Paragon fue pequeña (*c.* 70 °C d) y no se vio replicada por el genotipo triple insensible.

De manera similar, bajo fotoperíodo corto la ERTE alcanzó su mayor duración en Paragon (*c.* 540 °C d), mientras que ésta fue mínima en genotipos con *Ppd-A1a*, *Ppd-D1a* o la triple combinación de *Ppd-1a*. La duración de la ERTE en el genotipo con solo *Ppd-B1a* fue marginalmente mayor que en el resto de los genotipos con algún *Ppd-1a*, pero la diferencia con ellos no fue estadísticamente significativa (ver panel inferior central de la Fig. 2.4). Bajo fotoperíodo largo, las diferencias entre genotipos fueron menos evidentes. Aunque hubo un efecto significativo de *Ppd-D1a* sobre la duración de

la ERTE, la diferencia real con Paragon fue pequeña (*c.* 70 °C d) y no se vio replicada por el genotipo triple insensible.

Las combinaciones simples y la triple de *Ppd-1a* también redujeron la duración de la ERTA bajo fotoperíodo corto, con un mayor efecto sobre esta etapa que sobre las previas (paneles a la derecha de la Fig. 2.4). Aunque este efecto fue significativo para todos los genotipos con al menos un *Ppd-1a*, la magnitud del mismo siguió el orden *Ppd-D1a* ≥ *Ppd-A1a* > *Ppd-B1a,* siendo máximo en el genotipo triple insensible. En fotoperíodo largo, solo el triple insensible acortó significativamente la ERTA en *c.* 200 °C d comparada con la de Paragon.

Cada genotipo respondió a la extensión en el fotoperíodo acortando todas las etapas pre-antesis, aunque dicha respuesta fue siempre estadísticamente significativa solo en el caso de Paragon y de P(CS-2B). La magnitud de dicha respuesta a cambios en el fotoperíodo explorado fue mayor para la ERTA que para el resto de las etapas pre-antesis.

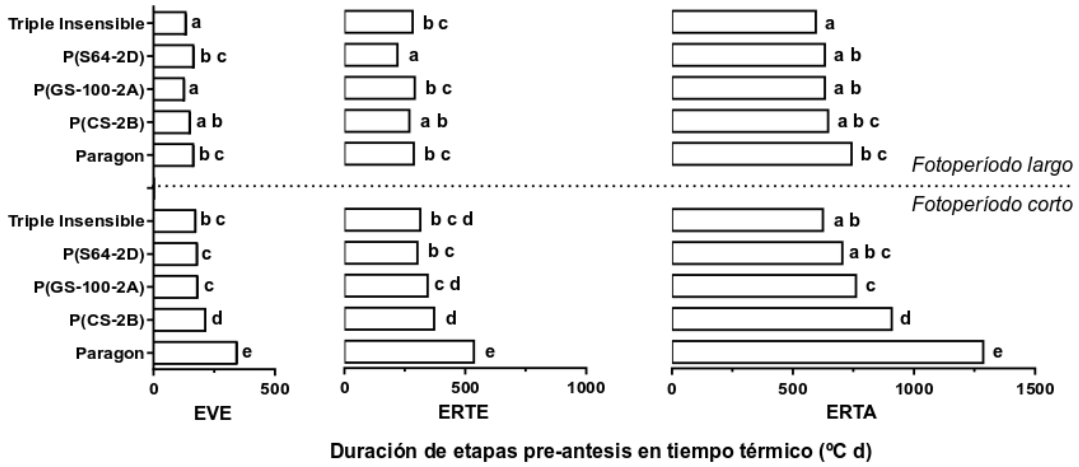

Figura 2.4: Duración de las etapas vegetativa (EVE, panel izquierdo), reproductiva temprana (ERTE, panel central) y reproductiva tarda (ERTA, panel derecho), en tiempo térmico y bajo fotoperíodo largo (panel superior) o corto (panel inferior). Barras con letras compartidas dentro de una misma fase no mostraron diferencias significativas (Tukey, α = 0,05). Cada barra muestra el promedio de dos experimentos independientes.

2.3.3 Número de hojas y de espiguillas

Todos los genotipos con algún *Ppd-1a* produjeron menos primordios totales que Paragon en fotoperíodo corto (Cuadro 2.3.2), mientras que esas diferencias fueron menos consistentes bajo fotoperíodo largo (Cuadros 2.3.1 y 2.3.2). Esta reducción en el NPT se debió a reducciones en el número de primordios tanto vegetativos como reproductivos.

El NFH entre genotipos difirió bajo fotoperíodo corto. *Ppd-B1a*, el alelo con menor efecto sobre el desarrollo fásico, redujo el NFH por debajo del alcanzado por Paragon, mientras que produjo más hojas que el triple insensible. El efecto de *Ppd-A1a* y de *Ppd-D1a*, si bien más marcado en promedio que el de *Ppd-B1a*, no pudo ser diferenciado estadísticamente de éste ni del triple insensible (Cuadro 2.3.2). Bajo fotoperíodo largo, la mayoría de estas diferencias fueron indistinguibles, variando el NFH entre solo 6 y 7 para todos los genotipos, y las pequeñas diferencias encontradas no pudieron asociarse a la composición *Ppd-1*. (Cuadro 2.3.2).

El número de espiguillas por espiga también fue reducido por los alelos *Ppd-1a* bajo fotoperíodo corto, con Paragon y el genotipo triple insensible mostrando valores extremos (Cuadro 2.3.2). Las diferencias fueron menores y no significativas estadísticamente en fotoperíodo largo, aunque sí hubo una tendencia consistente de que genotipos con algún alelo *Ppd-1a* tuvieran menor número de espiguillas por espiga que Paragon (Cuadro 2.3.2). Considerando a la respuesta a fotoperíodo como la diferencia entre el número de primordios bajo fotoperíodo corto y largo, todas las líneas respondieron a fotoperíodo para NFH, pero solo Paragon lo hizo para el número de espiguillas por espiga.

Cuadro 2.3.2: Número final de hojas (NFH), número de espiguillas por espiga (ESPILLAS ESPIGA^{-1}) y número de primordios totales diferenciados en el ápice (NPT) para cada genotipo en fotoperíodo largo (16 h) y corto (12 h). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre filas (Tukey, α = 0,05).

Fotoperiodo	Genotipo	NFH (hojas)	ESPILLAS ESPIGA^{-1} (espiguillas)	NPT (primordios)
	Triple Insensible	6,8 b	13,6 abc	20,4 ab
	P(S64-2D)	7,0 bc	13,5 ab	20,5 ab
16 h	P(GS-100-2A)	6,6 ab	13,5 ab	20,1 a
	P(CS-2B)	6,3 a	13,8 abc	20,0 a
	Paragon	7,0 bc	14,7 bc	21,7 bcd
	Triple Insensible	7,5 cd	13,3 a	20,8 ab
	P(S64-2D)	8,1 e	14,1 abc	22,2 cd
12 h	P(GS-100-2A)	7,9 d e	13,9 abc	21,9 bcd
	P(CS-2B)	8,2 e	14,9 c	23,1 d
	Paragon	11,6 f	18,3 d	29,9 e

La relación entre el número de estruturas generadas y la duración de la etapa durante la cual se generan varió según se tratara del NFH y la EVE o del número de espiguillas por espiga y la ERTE (Fig. 2.5). En general, el NFH estuvo fuertemente relacionado a la duración de la EVE (R^2 = 0,99, p < 0,01, ver Fig.2.5a). Y aunque esa relación fue muy influida por el dato correspondiente a Paragon bajo fotoperíodo corto, se mantuvo altamente significativa aun cuando este punto fue excluido del análisis (R^2 = 0,71, p < 0,01). Cuando el análisis se realizó solamente bajo fotoperíodo largo, las diferencias en el NFH no tuvieron relación con la duración de la EVE (R^2 = 0,17, p < 0,50). En cambio, bajo fotoperíodo corto, la diferencias entre genotipos en el NFH sí estuvieron relacionadas a la duración de la EVE (R^2 = 0,98, p < 0,01). La respuesta a fotoperíodo de cada genotipo en NFH también fue explicada por cambios en la duración de la EVE (Fig. 2.5a).

La relación entre el número de espiguillas por espiga y la duración de la ERTE fue más débil que la del NFH vs. EVE. No solamente se encontró un menor coeficiente de determinación para esta relación cuando se consideraron todas las combinaciones de genotipos y fotoperíodos (R^2 = 0,83, p < 0,01, ver Fig. 2.5b), sino que además esta relación estuvo fuertemente condicionada por Paragon en fotoperíodo corto. La relación no se mantuvo cuando no se consideró este dato en el análisis (R^2 = 0,25, p = 0,175). Tampoco se encontró una respuesta significativa del número de espiguillas por espiga

de cada genotipo a cambios en el fotoperíodo, excepto para Paragon (Figura 2.5b y Cuadro 2.3.2).

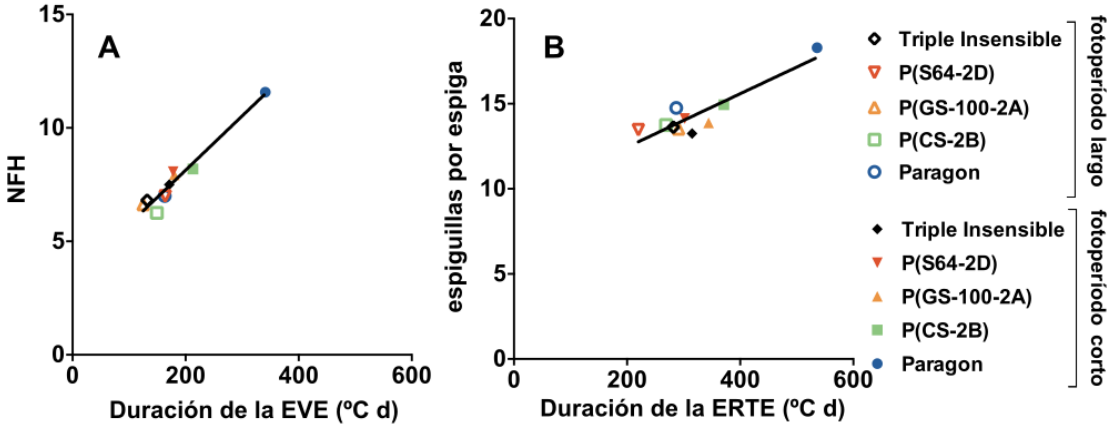

Figura 2.5: Relación entre el número de estructuras diferenciadas y la duración de la etapa durante la cual se diferencian. En el panel A se muestran número final de hojas (NFH) y duración de la EVE (R^2 = 0,95, valor p < 0,01) y en el B, número de espiguillas por espiga y duración de la ERTE (con Paragon, R^2 = 0,83, valor p < 0,01, sin Paragon, R^2 = 0,25, valor p = 0,18).

2.3.4 Dinámica de diferenciación de primordios

La relación entre el NTP diferenciados en el ápice del vástago principal y el tiempo térmico acumulado desde emergencia fue siempre bi-lineal (Fig. 2.6). Todos los primodios de hojas fueron diferenciados a la menor tasa, mientras que la mayoría de los primordios de espiguillas fueron diferenciados a mayor tasa, mientras que un pequeño número de ellos fueron diferenciados a la misma tasa que los primordios de hoja (comparar el momento de iniciación floral en Fig. 2.2 con las flechas en la Fig. 2.6).

La tasa de diferenciación de primordios de hoja fue similar para todas las combinaciones de fotoperíodo y genotipos (Fig. 2.6 y Cuadro 2.3.3), promediando un plastocrono de 51,4 ± 6,5 °C d h^{-1}. En cambio, se encontraron diferencias entre los genotipos y fotoperíodos para el momento en que se produjo el cambio en la tasa de diferenciación de primordios. Los genotipos con al menos un *Ppd-1a* adelantaron el momento de cambio bajo fotoperíodo corto, comparado con Paragon. Por otro lado, la exposición a fotoperíodo largo también adelantó la ocurrencia de este momento en Paragon y en P(CS-2B) (Cuadro 2.3.3). Para el resto de genotipos con alelos *Ppd-1a* no se detectó respuesta significativa de la dinámica de diferenciacion de primordios al fotoperíodo, pero sí una tendencia en el mismo sentido que para los genotipos de mayor sensibilidad (Fig. 2.6 y Cuadro 2.3.3).

La tasa de iniciación de espiguillas fue modificada por la interacción entre genotipos y fotoperíodos. Ésta aumentó por la exposición a fotoperíodo largo solo en el caso de Paragon y de P(CS-2B), mientras que para el resto de genotipos no mostró diferencias significativas. Bajo fotoperíodo largo, esta tasa fue similar entre los genotipos, promediando 16,3 ± 1,0 °C d el tiempo entre la iniciacion de dos primordios consecutivos. El ajuste en la tasa de diferenciación de primordios de espiguilla ante una reducción en la duración de la ERTE, debida tanto a fotoperíodo largo como a alelos *Ppd-1a*, permitió la compensación (al menos parcial) del número final de espiguillas por espiga.

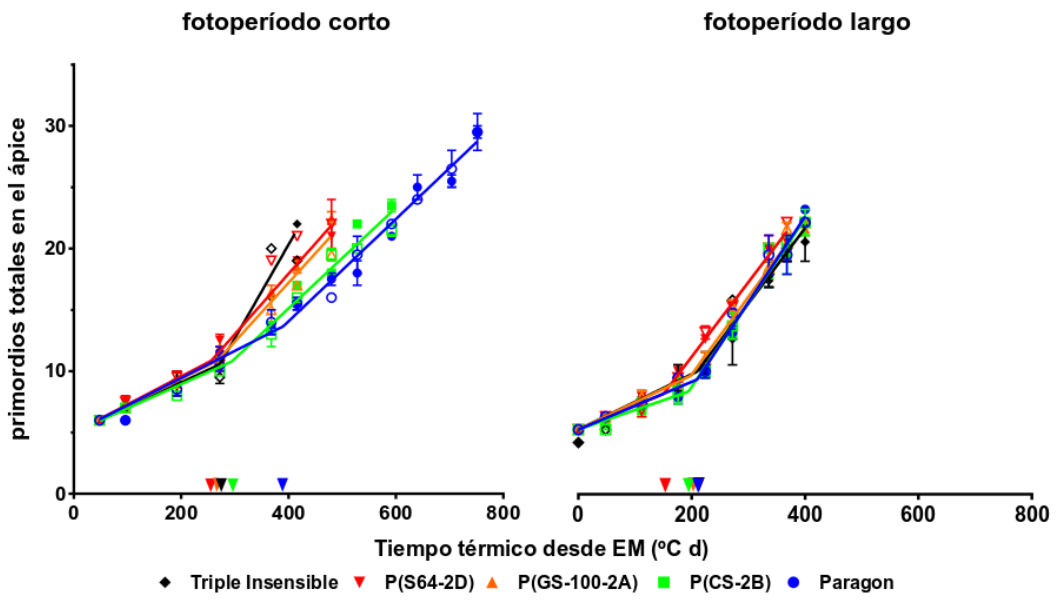

Figura 2.6: Dinámica de diferenciación de primordios. Relación entre el número de primordios totales en el ápice y el tiempo térmico desde emergencia (EM) bajo tanto fotoperíodo corto (panel izquierdo) como largo (panel derecho). Cada punto representa al promedio dentro del experimento 1 (puntos llenos) y 2 (puntos vacos) y sus barras de error representan el error estándar. Los datos de cada genotipo en cada tratamiento de fotoperíodo y experimento fueron ajustados mediante una regresan bi-lineal ($R^2 > 0,98$ y $p < 0,01$ en todos los casos). Las flechas indican el tiempo térmico acumulado al momento del cambio de tasa.

Cuadro 2.3.3: Tasa de diferenciación de primordios de hojas (TDP-H) y espiguillas (TDP-E), y tiempo térmico desde emergencia al cambio de tasa (TCT) para cada genotipo en fotoperíodo largo (16 h) y corto (12 h). Letras diferentes en la misma columna indican que los intervalos de confianza de 95 % de esas filas no se solapan.

Fotoperiodo	Genotipo	TDP-H (hojas (°C d)$^{-1}$)	TDP-E (espiguillas (°C d)$^{-1}$)	TCT (°C d desde EM)
16 h	Triple Insensible	0,021 a	0,058 a	210 abc
	P(S64-2D)	0,018 a	0,058 a	150 a
	P(GS-100-2A)	0,021 a	0,060 a	198 ab
	P(CS-2B)	0,015 a	0,065 a	195 ab
	Paragon	0,018 a	0,066 a	210 bc
12 h	Triple Insensible	0,020 a	0,076 a	272 bcd
	P(S64-2D)	0,022 a	0,049 ab	256 abcd
	P(GS-100-2A)	0,021 a	0,048 ab	267 bcd
	P(CS-2B)	0,019 a	0,041 b	294 cd
	Paragon	0,022 a	0,041 b	390 d

2.4 Discusión

2.4.1 Tiempo a antesis y duración de las etapas pre-antesis.

El efecto del fotoperíodo corto no fue solo cuantitativo sino también cualitativo. Del genotipo con mayor sensibilidad a fotoperíodo, Paragon, solo un tercio de las

plantas llegaron a antesis bajo fotoperíodo corto. El resto de las plantas estancaron su desarrollo en algún punto posterior a ET. Existen reportes previos similares en los que ninguna planta de Paragon alcanzó antesis cuando fueron expuestas a fotoperíodos constantes de 10 h durante 120 días (Bentley *et al.*, 2011). Otros autores reportaron resultados similares cuando expusieron cultivares sensibles a condiciones poco inductivas, sean fotoperíodos cortos (Pugsley 1966, Halse y Weir, 1970, Slafer y Rawson 1996) o temperaturas no vernalizantes (González *et al.* 2002). Varios autores también observaron que el desarrollo se detuvo luego de la diferenciación de la espiguilla terminal, i.e. durante la ERTA (Slafer y Rawson 1996, para fotoperíodo corto y González *et al.* 2002 para condiciones no vernalizantes). Esto parecería indicar que la sensibilidad del desarrollo a señales ambientales acumuladas crece con el avance en el desarrollo.

Cuando se considera la respuesta cuantitativa, i.e. se restringe el análisis a las plantas que sí alcanzaron antesis, se observaron diferencias en la magnitud del efecto de los distintos alelos *Ppd-1a* sobre el acortamiento del ciclo a antesis, siguiendo el orden *Ppd-D1a* > *Ppd-A1a* > *Ppd-B1a*. Este resultado concuerda con el orden propuesto por otros autores también sobre el fondo genético de Paragon (Díaz *et al.*, 2012, Shaw *et al.*, 2012, Bentley *et al.*, 2013).

Los cambios en la duración EM-AN estuvieron asociados a cambios en el NFH como a cambios en la TAH. Los alelos *Ppd-1a*, aceleraron la TAH previas a la séptima, siguiendo el orden de magnitud especificado arriba, tanto bajo fotoperíodo corto como largo. Esto a su vez, acortó la duración de la etapa EM-HB, más allá del efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre el NFH, algo que, a nuestro mejor entender, nunca había sido reportado antes. González *et al.* (2005b) también encontraron que los alelos *Ppd-1a* disminuyen el NFH, pero a diferencia de lo reportado en este capítulo, no encontraron efecto de estos alelos sobre la tasa a la que aparecen las primeras hojas.

Todos los alelos *Ppd-1a* acortaron cada una de las etapas pre-antesis, EVE, ERTE y ERTA, bajo fotoperíodo corto, siguiendo un orden de magnitud similar a su efecto la etapa EM-AN. Al momento de escribir estos resultados, no existían reportes de los efectos de *Ppd-A1a* sobre la duración de las etapas pre-antesis. En relacióna *Ppd-D1a,* González *et al.* (2005b) también encontraron efecto sobre las tres etapas pre-antesis, mientras que otros autores reportan efecto solo sobre la duración de la ERTE (Scarth *et al.* 1985) o de la etapa EVE+ERTE (Foulkes *et al.* 2004). De manera semejante, se han encontrado efectos de *Ppd-B1a* sobre la duración de EVE+ERTE (Whitechurch y Slafer 2002, Matsuyama *et al.* 2015) o solo sobre la duración de la ERTE (Scarth *et al.* 1985, González *et al.* 2005b), pero nunca se habían reportado efectos sobre la duración de la ERTA como en este capítulo. Sin embargo, no encontramos evidencia de que alguna combinación particular en *Ppd-1* estuviera más asociada que otra con la duración de alguna etapa particular.

Los resultados de esta capitulo no solo muestran que los alelos *Ppd-1a* redujeron la duración de todas las etapas pre-antesis, sino también que la ERTA fue las que más se redujo ante su introgresión sobre Paragon. Bajo fotoperíodo corto, el efecto de los alelos *Ppd-1a* aumentó con el progreso en el desarrollo hacia antesis, observandose una respuesta cualitativa en la ERTA en la mayoría de las plantas del genotipo más sensible a fotoperíodo. En cambio, todas las plantas mostraron respuesta cuantitativa bajo esta misma condición para duración de la EVE y de la ERTE. Las plantas de Paragon que alcanzaron antesis bajo fotoperíodo corto mostraron una duración mucho mayor de la ERTA que aquellas que portaban algún alelo *Ppd-1a*. Bajo fotoperíodo largo esta distinción se mantuvo, mientras que el efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre la duración de las otras etapas fue menor (EVE) o prácticamente inexistente (ERTE). Esta

progresividad de la respuesta conforme avanza el desarrollo ha sido sugerida previamente por Slafer y Rawson (1994, 1995).

El contraste que surge al comparar distintos estudios del efecto de alelos *Ppd-1a* pueden deberse a (i) el uso de líneas de sustitución cromosómica, como en el caso de Scarth y Law (1984), Scarth *et al.* (1985) y Whitechurch y Slafer (2002), en las que otros genes presentes en el cromosoma del dador pueden afectar los resultados, (ii) la posible interacción con diferentes niveles de satisfacción de los requerimientos de vernalización (Distelfeld *et al.* 2009, Kiss *et al.* 2014), cuando líneas isogénicas sobre fondo genético invernal son utilizadas (e.g. Foulkes *et al.* 2004 y González *et al.* 2005b) en lugar de líneas sobre un fondo genético primaveral como en este caso, o (iii) interacciones entre *Ppd-1* y el fondo genético en el cual el gen fue introgresado (Kiss *et al.*, 2014). Los puntos i y ii resaltan la idoneidad de utilizar líneas isogénicas sobre un fondo genético primaveral para el evaluar el efecto de los genes *Ppd-1*, minimizando la confusión dada por interacciones no contempladas. La variación para el orden de magnitud del efecto de los alelos puede deberse además a la presencia de distintos alelos en el mismo genoma, como por ejemplo el polimorfismo funcional en *Ppd-B1* (Tanio y Kato 2007, Nishida *et al.* 2013) u otra variante alélica *Ppd-B1a* con distinto número de copias (Beales *et al.* 2007, Bentley *et al.* 2011, Díaz *et al.* 2012, Shaw *et al.* 2012, Nishida *et al.*2013, Muterko *et al.*, 2015, Matsuyama *et al.* 2015).

2.4.2 Dinámica de diferenciación y número final de primordios en el ápice

Los alelos de insensibilidad a fotoperíodo *Ppd-1a* no tuvieron efecto sobre la tasa de diferenciación de hojas y, por lo tanto, su efecto sobre el número final de hojas reflejó aquel que tuvieron sobre la duración de la EVE. Este resultado coincide con los otros reportes conocido de los efectos de *Ppd-1* sobre la tasa de diferenciación de primordios, (Scarth *et al.* 1985, Ochagavía *et al.* 2018). Además, concuerda con los modelos fisiológicos de respuesta del NFH a factores ambientales. Estos modelos asumen que el plastocrono sería insensible al fotoperíodo, mientras que la duración de la etapa durante la cual se diferencian las hojas, i.e. EVE, sí respondería a ese factor ambiental, de manera que cambios en la duración de la EVE se verían reflejados proporcionalmente en cambios en el NFHs (Miglietta 1989, Slafer y Rawson 1994). Los valores de plastocrono observados (*c.* 50 °C d hoja $^{-1}$) estuvieron comprendidos dentro del rango reportado en la literatura (Evans y Blundell 1994, Miralles y Richards 2000, González *et al.* 2002). Pero además, nuestros resultados permiten expandir el conocimiento sobre el efecto de los genes *Ppd-1* sobre la respuesta a fotoperíodo de la dinámica de diferenciación de primordios foliares y de espiguillas, algo que hasta ahora no se había descripto.

Por otro lado, los alelos *Ppd-1a* además de acortar la etapa durante la cual se diferencian, i.e. ERTE, también modificaron la dinámica de diferenciación de primordios de espiguilla. No solo aceleraron la tasa a la que estos primordios eran diferenciados, sino que adelantaron también el momento en que dicha tasa se aceleraba. Esto permitió una compensación parcial en el número de espiguillas por espiga aun cuando la ERTE fue más corta en líneas con algún *Ppd-1a*. Esto coincide con lo reportado por Scarth *et al.* (1985) para *Ppd-D1a*, pero contrasta con sus resultados para *Ppd-B1a*, para el que una compensación completa del número de espiguillas por espiga fue observada. Estos resultados son de particular interés: si se pudiera aumentar la duración relativa de la ERTA a expensas de la ERTE, podría esperarse que no haya un impacto negativo de esta manipulación en el número de espiguillas por espiga, uno de los componentes numéricos del rendimiento. El intervalo entre la iniciación de dos

primordios de espiguilla consecutivos, *c.* 18,5 °C d espiguilla^{-1} también estuvo de acuerdo con reportes previos (Rahman 1980, Scarth *et al*, 1985, Evans y Blundell 1994, Miralles y Richards 2000, González *et al.* 2002). De manera similar a lo reportado en esos estudios, se detectaron cambios en esta variable en respuesta al incremento en el fotoperíodo en todos los genotipos, excepto en el triple insensible. Sin embargo, dichas respuestas fueron significativas solo en el caso de los genotipos más sensibles, Paragon y P(CS-2B), alcanzando valores de *c.* -2,5 °C d espiguilla^{-1} h^{-1}.

2.5 Conclusión

En conclusión, los alelos insensibles *Ppd-1a* adelantaron antesis tanto bajo fotoperíodo corto como largo, cada uno proveyendo distintos niveles de insensibilidad. La magnitud de la insensibilidad provista para antesis siguió el orden *Ppd-D1a* (Sonora 64) > *Ppd-A1a* (GS-100) > *Ppd-B1a* (Chinese Spring). Cada una de las etapas pre-antesis, EVE, ERTE y ERTA, respondieron a la incorporación de los alelos *Ppd-1a*, pero lo hicieron de distinta manera. Contrario a la concepción general de que las etapas más tempranas del desarrollo son las que muestran mayor sensibilidad, fue sobre la última etapa pre-antesis que estos alelos *Ppd-1a* mostraron tener mayor efecto acumulado. Este incremento en la sensibilidad conforme avanzó el desarrollo llegó a ser tan crítico que la ERTA mostró una respuesta cualitativa a la exposición a fotoperíodo corto, mientras que las etapas previas mostraron respuestas puramente cuantitativas. Los alelos de insensibilidad a fotoperíodo afectaron el tiempo a antesis no solo a través de disminuir el NFH, sino también reduciendo el filocrono. Apilar alelos *Ppd-1a* aumentó la insensibilidad, pero sus efectos distaron de ser aditivos. Ninguno de los alelos probados afectó la duración de alguna etapa pre-antesis en particular, lo cual hubiera sido ideal para manipular la participación relativa de cada una en el ciclo completo a antesis.

Capítulo 3: Dinámica del desarrollo floral y número de flores fértiles en antesis según la combinación alélica para *Ppd-1* bajo fotoperíodos contrastantes[2]

[2] Los principales resultados de este capítulo están incluidos en *Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2019. Photoperiod-sensitivity genes shape floret development in wheat. Journal of Experimental Botany 70, 1339–1348.*

3.1 Introducción

El rendimiento potencial del trigo (*Triticum aestivum* L.) está estrechamente relacionado con el número de flores fértiles en antesis (NFF), dado que la mayoría de las flores fértiles resultan en granos (Fischer 1983, Siddique *et al.* 1989, González *et al.* 2003b). En contraste con los primordios de hojas y espiguillas, no todos los primordios florales diferenciados continúan su desarrollo para alcanzar el estado de flor fértil en antesis (AN) (Kirby, 1988, Siddique *et al.*, 1989). Como se mencionó en el Capítulo 1, dependiendo de la posición de la espiguilla en la espiga, entre 6 y 12 primordios florales son diferenciados por espiguilla (Langer y Hanif, 1973, Sibony y Pinthus, 1988), pero normalmente solo entre el 30 y el 45 % de los mismos alcanzan antesis como flores fértiles (Langer y Hanif 1973, Kirby 1988, González *et al.* 2011a). La supervivencia de estos primordios está determinada principlamente por la disponibilidad de fotoasimilados para el crecimiento de la espiga cuando dichos primordios se encuentran en desarrollo (Fischer y Stockman 1980, Kirby 1988, Ghiglione *et al.* 2008, González *et al*, 2011).

Incrementar la duración de la ERTA mediante la manipulación de su sensibilidad a fotoperíodo permitiría incrementar el crecimiento de la espiga, y a través de ello, el NFF (Slafer *et al.* 2001, Miralles y Slafer 2007). Estudios llevados a cabo bajo condiciones controladas (Miralles y Richards 2000) y a campo (González *et al.* 2003a, 2005b) utilizando cultivares comerciales en los cuales se modificó el fotoperíodo exclusivamente durante la ERTA mostraron que una mayor duración de esa etapa permite un mayor crecimiento de la espiga, lo que lleva a una mayor fertilidad de la espiga, por mayor supervivencia floral. Por otro lado, también se ha sugerido la posibilidad de que el fotoperíodo ejerza un efecto directo sobre el destino de los primordios florales, i.e.no mediado por su efecto a través de la disponibilidad de fotoasimilados, sino por afectar el desarrollo de los primordios florales (González *et al.*, 2003a, 2005b). Estudios previos observaron que cuanto más corto el fotoperíodo, mayor es la duración del desarrollo floral, lo que permite que algunas flores lábiles completen su desarrollo, aumentando así la fertilidad de la espiga (Craufurd y Cartwright 1989, Miralles y Richards 2000, González *et al.* 2003a, 2005b).

Sin embargo, el efecto de los genes *Ppd-1* sobre la dinámica de desarrollo floral ha sido poco estudiado. González *et al.* (2005b) realizando ensayos a campo encontraron que el alelo de insensibilidad *Ppd-D1a* redujo el NFF en fotoperíodo corto, mientras que *Ppd-B1a* no mostró tener efecto sobre esa variable. Como el efecto de *Ppd-D1a* sobre el NFF pudo ser explicado a través de las variaciones que provocó en el peso seco de la espiga en antesis (PSE), que a su vez estuvo asociado a la duración de la ERTA, se hipotetizó que este alelo hubiera podido alterar la supervivencia floral. La duración de la ERTA también fue modificada por *Ppd-B1a* en ese estudio, pero no afectó al PSE coincidiendo con la falta de respuesta del NFF Prieto *et al.* (2018) exploraron el efecto de un mayor número de variantes alélicas para *Ppd-1a* (incluyendo a *Ppd-A1a*) en combinaciones simples, dobles y triples. Este estudio mostró que, en general, los alelos *Ppd-1a* redujeron el NFF, principalmente por su efecto sobre la supervivencia floral, aunque los resultados no fueron consistentes a través de las dos campañas en que se desarrollaron los experimentos.

En este capítulo se presentan los efectos de los genes *Ppd-1* sobre la dinámica de desarrollo floral y el número de flores fértiles en antesis bajo dos fotoperíodos contrastantes y en condiciones controladas. El objetivo fue determinar si cambios en la sensibilidad a fotoperíodo causados por distintas combinaciones alélicas en *Ppd-1* modificarían la dinámica de desarrollo floral, alterando la fertilidad de la espiga.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Diseño experimental, tratamientos y condiciones experimentales

El detalle completo de los genotipos utilizados, el diseño y las condiciones experimentales, así como los tratamientos de fotoperíodo puede ser hallado en el Capítulo 2. A modo de resumen, cinco líneas isogénicas sobre el cultivar Paragon con distinta combinación alélica para *Ppd-1* (Cuadro 2.2.1) fueron expuestas a dos tratamientos de fotoperíodo contrastantes (12 y 16 h) impuestos desde la emergencia hasta la antesis. Los dos tratamientos fueron impuestos de manera secuencial en dos cámaras de crecimiento independientes, constituyendo cada secuencia en cada cámara un experimento.

3.2.2 Mediciones, variables respuestas y análisis

En cada experimento, se determinaron los momentos de emergencia (EM), espiguilla terminal (ET) y antesis (AN) según lo descripto en el Capítulo 2 (ítem 2.3.1). A partir de ET, se coninuó con dos a tres muestreos semanales de dos plantas de cada genotipo por experimento para determinar el estado de desarrollo de todos los primordios florales en la espiguilla central de la espiga según la escala de Waddington *et al.* (1983). Los primordios de flores fueron identificados desde F1, el más cercano al ráquis, a Fn, el más lejano al ráquis, de acuerdo con González *et al.* (2003b). Las plantas remanentes de cada experimento fueron reordenadas de manera de mantener una estructura lo más similar a un canopeo posible después de cada muestreo.

Al momento de antesis, se seleccionaron 8 plantas de cada genotipo para cada tratamiento de fotoperíodo, por experimento. Se estimaron las flores fériles por espiga (NFF ESP^{-1}) en cada una de esas plantas contando el número de flores fértiles cada espiguilla de una de las mitades longitudinales de la espiga, multiplicando ese valor por dos y sumando el número de flores fértiles en la espiguilla terminal. Las flores fueron consideradas fértiles si mostraban anteras amarillas liberando polen o si habían alcanzado un estado mayor a W9.5 en la escala de Waddington *et al.* (1983). De manera similar, se determinó el número de espiguillas fértiles por espiga, como aquellas que contenían al menos una flor fértil en antesis. Por último, se calculó el número de flores fértiles por espiguilla fértil como el cociente entre el número de flores fértiles por espiga y el número de espiguillas fértiles por espiga. Posterior al conteo de flores, las espigas se secaron en estufa a 70 ºC hasta peso constante para determinar el peso seco de la espiga en antesis (PSE).

Se calculó la tasa de desarrollo floral para las flores de posiciones basales dentro de las epsiguillas, las cuales generalmente alcanzan el estado fértil en antesis, i.e. F1 y F2, como la inversa del tiempo térmico acumulado entre los estadíos W10 y W4 en la escala de Waddington *et al.* (1983). La dinámica de iniciación de flores fue estudiada a través de la relación entre el número de primordios florales vivos y el tiempo térmico desde ET, mediante la Ecuación 3.1. La tasa de iniciación floral (TIFc) fue estimada a través del parámetro b de dicha ecuación (3.1). La duración de la iniciación floral (DIFc) fue estimada como el tiempo térmico acumulado desde la iniciación del primer primordio floral hasta que se alcanzó el número máximo de primordios florales iniciados (NIFc). El momento de iniciación del primer primordio floral se estimó despejando a x cuando $y = 1$ en la Ecuación 3.1). El número de flores fértiles en la espiguilla central (NFFc) fue estimado como el promedio de flores fértiles en las espiguillas centrales de todas las espigas en antesis. La supervivencia floral (SFc) fue

calculada como el porcentaje del máximo número de flores iniciadas (NIFc) que continuó su desarrollo para llegar al estado de flor fértil a antesis (NFFc). El número de flores fértiles por espiga (NFF ESP^{-1}) fue relacionado al PSE mediante una regresión no lineal (Ecuación 3.2) usando el software TableCurve. Las correlaciones entre las variables respuesta fueron evaluadas mediante el coeficiente de Pearson. Las diferencias entre genotipos, tratamientos y experimentos y sus interacciones, se realizaron ANOVAs y, ante diferencias significativas, comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey (α = 0,05) con el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2011).

(3.1) $$y = a + bx$$

(3.2) $$y = a + bx^{-0,5}$$

3.3 Resultados

De manera similar al capítulo anterior, se obtuvieron de ambos experimentos independientes resultados similares para todas las variables respuesta analizadas, excepto para el NFF ESP^{-1} (Cuadro 3.3.1). Esta variable alcanzó valores 8,8% mayores en un experimento que en otro. Como la triple interacción entre genotipo, fotoperíodo y experimento no fue significativa para ninguna de las variables respuesta evaluadas, se presentaron sus valores promediados a través de los dos experimentos para describir el comportamiento de los distintos genotipos bajo fotoperíodos contrastantes. En el caso del genotipo con mayor sensibilidad a fotoperíodo, Paragon, solo el 31% de las plantas llegó a antesis bajo fotoperíodo corto al finalizar del experimento (ver detalle en Capítulo 2). Los resultados presentados en este capítulo, como en el capítulo previo, corresponden a los obtenidos de las plantas que sí llegaron a antesis.

*Cuadro 3.3.1: Cuadrados medio para los efectos principales e interacciones según los ANOVA sobre el número de flores fértiles por espiga (NFF ESP^{-1}) y por espiguilla fértil (NFF $EPILLA_f^{-1}$), el número de espiguillas fértiles por espiga ($EPILLA_f$ ESP^{-1}), y el peso seco de las espigas en antesis (PSE). Los asteriscos indican el nivel de significancia de cada efecto sobre las variables respuesta según el código: *: p <0,05, **: p <0,01, ***: p <0.001, n.s.: no significativo.*

Efectos	NFF ESP^{-1}	$EPILLA_f$ ESP^{-1}	NFF $EPILLA_f^{-1}$	PSE
Experimento (Exp)	108,20*	3,60 *n.s.*	0,26 *n.s.*	1034 *n.s.*
Genotipo (Gen)	452,85***	24,05 ***	0,82 ***	36810***
Fotoperíodo (Fot)	44,96 *n.s.*	2,58 *n.s.*	1,43 **	1155 *n.s.*
Gen*Fot	78,62**	4,42 **	0,20 *n.s.*	9020***
Gen*Fot*Exp	35,17 *n.s.*	1,99 *n.s.*	0,10 *n.s.*	1544 *n.s.*

3.3.1 Número de flores fértiles por espiga

Esta variable explicó en su totalidad las diferencias entre genotipos y tratamientos para el número de flores fértiles totales, ya que solo el vástago principal de cada planta produjo una espiga. El número de flores fértiles por espiga (NFF ESP^{-1}) dependió de la interacción del genotipo con el tratamiento de fotoperíodo (Cuadro 3.3.1). Bajo fotoperíodo corto, Paragon produjo *c.* 35 flores fértiles por espiga, seguido

de P(CS-2B), P(GS-100-2A), P(S64-2D) y el genotipo triple insensible, que promediaron 30, 24, 22 y 19 flores fértiles por espiga, respectivamente (Fig. 3.1).

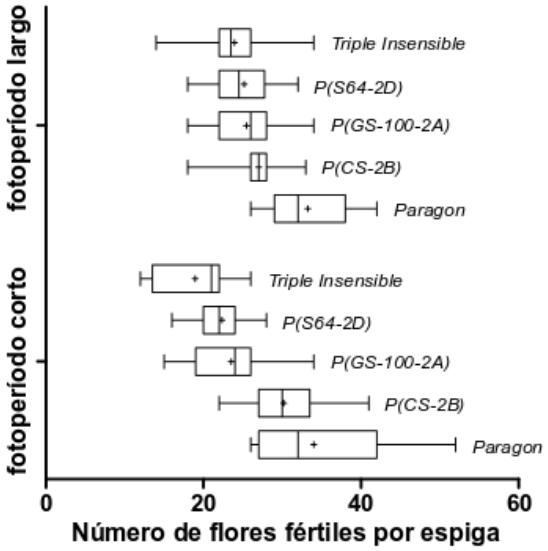

Figura 3.1: Diagrama de caja y bigotes para el número de flores fértiles por espiga en cada genotipo bajo fotoperíodo largo y corto. Las cajas se extienden desde el primer al tercer cuartil y los bigotes, desde el mínimo al máximo valor observado. El símbolo + en la caja coincide con la media de la muestra.

La variabilidad en el NFF ESP^{-1} estuvo fuertemente correlacionada al número de espiguillas por espiga ($EPILLA_f$ ESP^{-1}, r = 0,96, p < 0,01) y al número de flores fértiles por espiguilla fértil (NFF $EPILLA_f^{-1}$, r = 0,88, p < 0,01). Bajo fotoperíodo corto, Paragon tuvo más $EPILLA_f$ ESP^{-1} y mayor NFF $EPILLA_f^{-1}$ (Cuadro 3.3.2), alcanzando así un mayor NFF ESP^{-1} que el genotipo triple insensible. Las mayores diferencias entre estos dos genotipos se dieron en posiciones centrales y basales de la espiga (Fig. 3.2). Los genotipos con solo un alelo *Ppd-1a* mostraron valores intermedios de $EPILLA_f$ ESP^{-1} y NFF $EPILLA_f^{-1}$, los de P(CS-2B) fueron más cercanos a aquellos alcanzados por Paragon y los de P(GS-100-2A) y P(S64-2D), a los del triple insensible (Cuadro 3.3.1). Bajo fotoperíodo largo, se observó una tendencia similar, pero las diferencias entre genotipos fueron menores. Las diferencias en $EPILLA_f$ ESP^{-1} estuvieron altamente asociadas al número de espiguillas totales por espiga (r = 0,89, p < 0,01), mientras que la proporción de espiguillas fértiles varió entre 0,69 y 0,76, sin una tendencia clara entre genotipos en cada tratmiento de fotoperíodo.

A través de todo el set de datos, el 94,3% de la variación en NFF ESP^{-1} fue explicado por diferencias en el PSE (Fig. 3.3). Espigas más pesadas llevaron más flores fértiles, aunque la relación entre NFF ESP^{-1} y PSE fue curvilínea. Las diferencias en PSE estuvieron positivamente asociadas a la duración de la ERTA (R^2 = 75%, p < 0,01).

Cuadro 3.3.2: Componentes del número de flores fértiles por espiga, el número de espiguillas fértiles por espiga (EPILLA$_f$ ESP^{-1}) y el número de flores fértiles por espiguilla féritil (NFF EPILLA$_{f-}^{1}$) por genotipos bajo distintos tratamientos de fotoperíodo. Letras distintas en la misma columna indican diferencias signiticativas según la prueba de Tukey (α = 0,05).

Fotoperíodo	Genotipo	EPILLA$_f$ ESP^{-1}	NFF EPILLA$_f^{-1}$
Largo	Triple Insensible	9,4 a	2,5 bc
	P(S64-2D)	10,0 a	2,5 bc
	P(GS-100-2A)	9,6 a	2,7 bc
	P(CS-2B)	10,1 a	2,7 bc
	Paragon	11,6 b	2,7 bc
Corto	Triple Insensible	9,0 a	2,1 a
	P(S64-2D)	9,6 a	2,3 ab
	P(GS-100-2A)	9,7 a	2,4 ab
	P(CS-2B)	11,4 b	2,7 bc
	Paragon	12,3 b	2,8 c

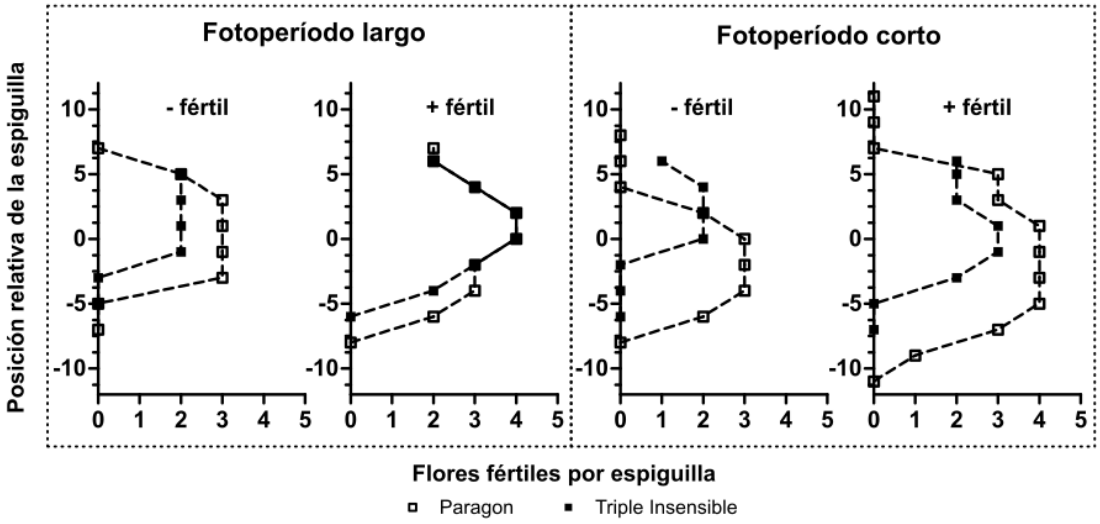

Figura 3.2: Perfil de fertilidad de las espigas más y menos fértiles de Paragon y del genotipo triple insensible bajo fotoperíodo largo y corto. Cada gráfico muestra el número de flores fértiles por espiguilla en antesis, describiendo la posición de esa espiguilla en manera relativa al centro de la espiga (el cero en el eje vertical indica la posición de la espiguilla central).

3.3.2 Iniciación y superviviencia de flores bajo fotoperíodo corto

El número de flores fértiles en espiguillas centrales (NFFc, Cuadro 3.3.3) siguió el mismo patrón general que el observado para el NFF ESPILLA$_f^{-1}$ (Cuadro 3.3.2). Paragon alcanzó un mayor NFFc que el genotipo triple insensible, mientras que los otros genotipos mostraron valores intermedios (ver último punto para cada genotipo en Fig. 3.4). El número máximo de flores iniciadas en la espiguilla central (NIFc) varió entre 7,5-8,0 en Paragon y P(CS-2B) a 6,0-6,25 en el genotipo triple insensible y P(S64-2D), con P(GS-100-2A) alcanzando un valor intermedio de 7,0 (Cuadro 3.3.3). La supervivencia floral (SFc) fue máxima en Paragon (43,3%) y mínima en el Triple Insensible (30,0%). P(CS-2B) y P(GS-100-2A) mostraron valores intermedios cercanos a 35%, mientras que P(S64-2D) alcanzó 40% (Cuadro 3.3.3). Como resultado, y de acuerdo con lo esperado, el NFFc estuvo asociado positivamente con la SFc, aunque también se observó una tendencia positiva con el NIFc (Fig. 3.5).

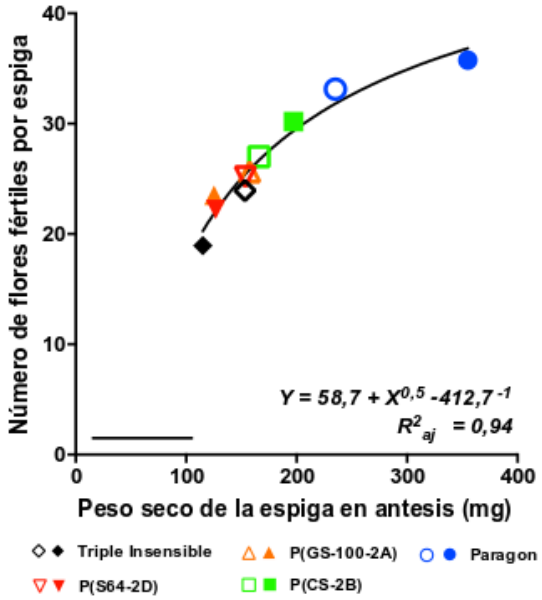

Figura 3.3: Relación entre el número de flores fértiles por espiga y el peso seco de la espiga en antesis. Símbolos abiertos y cerrados muestran datos de fotopeperíodo largo y corto, respectivamente. Los segmentos horizontales muestran la diferencia mínima significativa según la prueba de Tukey, usando α = 0,05.

Cuadro 3.3.3: Parámetros de la dinámica de iniciación de primordios florales en la espiguilla central de los cinco genotipos bajo fotoperíodo corto y su supervivencia (SF_c). Se detallan el número de flores fértiles (NFF_c), el Número máximo de flores iniciadas en la espiguilla central (NIF_c), la tasa y la duración de iniciación de primordios florales (TIF_c y DIF_c, respectivamente).

Genotipo	NFF_c	NIF_c	SF_c %	TIF_c flores (°C d)$^{-1}$	DIF_c °C d
Triple Insensible	1,83±0,25	6,00±0,29	30,5	0,0125±0,0021	378
P(S64-2D)	2,52±0,06	6,25±0,41	40,2	0,0149±0,0021	374
P(GS-100-2A)	2,54±0,11	7,00±0,00	36,3	0,0088±0,0014	683
P(CS-2B)	2,80±0,22	8,00±0,48	35,0	0,0094±0,0011	718
Paragon	3,25±0,20	7,50±0,00	43,3	0,0064±0,0005	1101

El NIFc puede considerarse como el producto de la duración de la etapa de iniciación de flores (DIFc) y la tasa a la que son iniciadas (TIFc). Paragon inició flores durante un período de *c.* 1100 °C d mientras que el genotipo Triple Insensible y P(S64-2D) lo hicieron por solo aproximadamente un tercio de ese período (Cuadro 3.3.3). Para P(CS-2B) y P(GS-100-2A) se observaron duraciones intermedias. La TIFc también varió de acuerdo con la composición alélica para *Ppd-1* (Cuadro 3.3.3): Fue mínima para Paragon y máxima para el Triple Insensible y P(S64-2D), mientras que los otros genotipos iniciaron flores a una tasa intermedia. Dada la fuerte compensación entre ambas variables, ni la duración ni la tasa de iniciación de primordios florales por sí solas fueron capaces de explicar la variación en el NIFc particularmente bien (r = 0,77, p = 0,13, r = -0,77, p = 0,13, respectivamente). Sin embargo, mientras que la TIFc en el genotipo triple insensible fue de aproximadamente el doble que en Paragon, la DIFc fue

casi tres veces mayor en Paragon, explicando así las diferencias en el NIFc entre los dos genotipos. Además, la DIFc estuvo muy positivamente asociada con la duración de la ERTA (r = 0,97, $p < 0,01$).

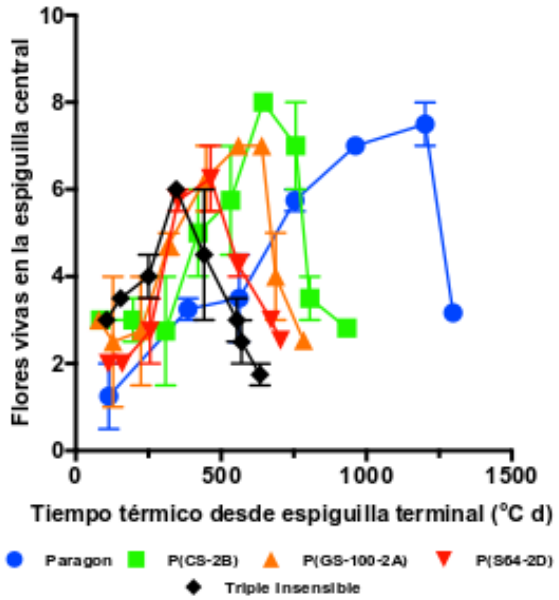

Figura 3.4 Dinámica del número de flores vivas en la espiguilla central de genotipos cultivados bajo fotoperíodo corto. Los segmentos equivalen al error estándar de la media que cada punto representa. El último punto de cada serie corresponde con el número de flores fértiles en antesis para la espiguilla central.

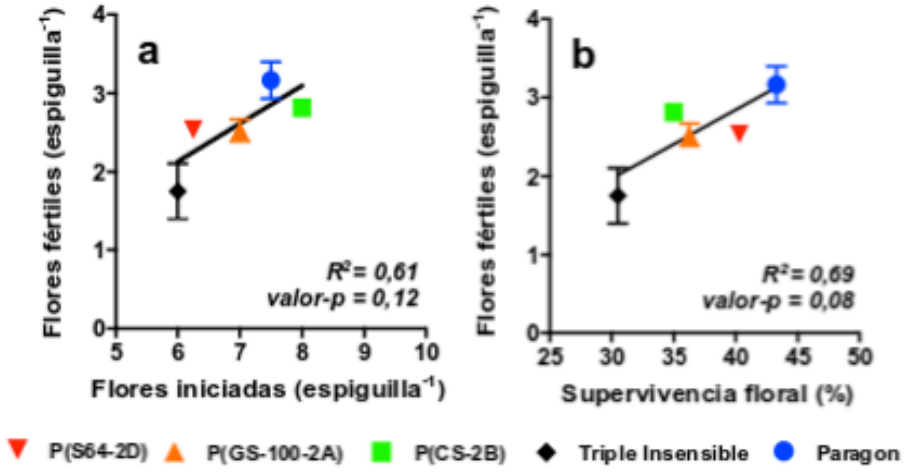

Figura 3.5 Flores fértiles en la espiguilla central y su relación con (a) el número de flores iniciadas por espiguilla y (b) la supervivencia floral.

3.3.3 Desarrollo floral bajo fotoperíodo corto

Para entender y cuantificar más precisamente el efecto de los genes *Ppd-1* en el proceso de iniciación y supervivencia de flores, se estudió la dinámica de desarrollo de las flores por su posición en la espiguilla central de espigas de plantas bajo fotoperíodo corto. No se presentan estos detalles bajo fotoperíodo largo dado que las diferencias

entre genotipos siguieron una tendencia similar a la registrada para fotoperíodo corto, aunque fueron de una magnitud mucho menor, de acuerdo a lo esperado.

La comparación entre los dos genotipos extremos en sensibilidad al fotoperíodo, Paragon y el genotipo triple insensible se presenta en la Fig. 3.6. De acuerdo con lo esperado, en cada genotipo para cada valor de tiempo desde espiguilla terminal (ET), las flores más cercanas al ráquis alcanzaron un desarrollo mayor que aquellas en posiciones más distales. Para la misma posición de una flor en el mismo momento, su estado de desarrollo fue mayor en el genotipo triple insensible que en Paragon. La degeneración de las flores (registrada como los primeros síntomas de deshidratación e indicada en la Fig. 3.6 como "W-") ocurrió antes en el genotipo Triple Insensible que en Paragon. Por ejemplo, la F3 (tercera flor desde el ráquis) en el Triple Insensible se desarrolló normalmente hasta el estadío W7.5, mientras que en Paragon, con una mayor DIFc, continuó su desarrollo normalmente hasta llegar a antesis como una flor fértil.

Las flores más próximas al ráquis (F1 y F2) alcanzaron antesis como flores fértiles en todos los genotipos (Fig. 3.6). Si bien su desarrollo no permitió explicar diferencias entre los genotipos en el NFFc éste fue afectado por los genes *Ppd-1*. Las tasas de desarrollo de tanto F1 como F2 fueron mayores en los genotipos con mayor insensibilidad, i.e. el genotipo triple insensible y P(S64-2D), que en Paragon, mientras que los demás genotipos mostraron tasas intermedias (Cuadro 3.3.4).

Las diferencias causadas por *Ppd-1* sobre la fertilidad de las flores residieron principalmente en el destino de la tercera y cuarta flor desde el ráquis (F3 y F4), cuyas tasas de desarrollo dependieron también de la composición alélica para *Ppd-1* (Fig. 3.7). La F3 alcanzó el estado de flor fértil en todos los genotipos excepto en el Triple Insensible. En cambio, la cuarta flor (F4), fue fértil sólo en algunas plantas de Paragon, mientras que en todos los otros genotipos portadores de al menos un *Ppd-1a*, detuvo su desarrollo sin alcanzar antesis como una flor fértil. El efecto de *Ppd-1* sobre el desarrollo floral también se vio en la dinámica de la quinta flor desde el ráquis (F5) que no llegó al estado de flor fértil en ningún genotipo, pero que sí se desarrolló hasta estadíos más avanzados en Paragon que en el resto.

Cuadro 3.3.4: Tasa de desarrollo de la primera (F1) y segunda (F2) flor desde el raquis en la espiguilla central de cada uno de los cinco genotipos cultivados bajo fotoperíodo corto. La tasa de desarrollo se calculó como la inversa del tiempo térmico acumulado entre los estadíos W4 y W10 (Waddington et al. 1983).

Genotipo	Tasa de Desarrollo Floral (°C d $\times 10^2)^{-1}$	
	F1	F2
Triple Insensible	0,179	0,189
P(S64-2D)	0,195	0,223
P(GS-100-2A)	0,152	0,179
P(CS-2B)	0,139	0,132
Paragon	0,101	0,110

Por lo tanto, independientemente del destino de cada flor, se distinguió una clara asociación entre la insensibilidad a fotoperíodo del genotipo y el máximo estadío de desarrollo alcanzado. A medida que la duración de la ERTA aumentó (asociada a una mayor sensibilidad a fotoperíodo, del genotipo triple insensible a Paragon), el estadío máximo de desarrollo de cada flor fue mayor (Fig. 3.8a). Este efecto fue casi despreciable para F1 y F2, comenzó a notarse para F3 y fue claramente distinguible para

F4 y F5. En consecuencia, a mayor distancia de la flor al ráquis, más notorio se hizo el efecto de *Ppd-1* sobre el estadío máximo del desarrollo alcanzado por ese primordio (Fig. 3.8b).

3.4 Discusión

Los resultados de este capítulo muestran que bajo fotoperíodo corto el número de flores fértiles por espiga estuvo asociado a la composición alélica para *Ppd-1* según el siguiente orden: triple *Ppd-1b* (Paragon) > *Ppd-B1a* (Chinese Spring) > *Ppd-A1a* (GS-100) > *Ppd-D1a* (Sonora 64) > triple *Ppd-1a* (Triple Insensible) (Fig. 3.1). Aunque el genotipo triple insensible mostró el mayor efecto, el impacto de los alelos distó de ser aditivo. El triple apilamiento de *Ppd-1a* alcanzó un efecto máximo que fue similar al de *Ppd-D1a* por sí solo. El orden de magnitud del efecto de los alelos *Ppd-1a* reportado en este capítulo coincide con aquel reportado por Prieto *et al.* (2018) durante uno de los dos años en que llevaron adelante experimentos con estas mismas líneas bajo fotoperíodo natural a campo, mientras que, en un segundo año, las diferencias entre líneas no fueron claras. Trabajando con líneas isogénicas sobre el cultivar Mercia y con líneas recombinantes mono-cromosómicas sobre Capelle Desprez, González *et al.* (2005b) también observaron que los genotipos con mayor sensibilidad a fotoperíodo (tres alelos *Ppd-1b*) alcanzaron el mayor número de flores fértiles a antesis, y que el NFF disminuyó en las líneas portadoras de *Ppd-D1a*, pero no en las de *Ppd-B1a*. González *et al.* (2005b) también reportaron que las diferencias entre genotipos fueron reducidas por los tratamientos de extensión de fotoperíodo, nuevamente sin diferencias entre las de mayor sensibilidad a fotoperíodo y las portadoras de *Ppd-B1a* (también de Chinese Spring). Sin embargo, en esos experimentos, el fotoperíodo natural fue extendido recien a partir de espiguilla terminal, i.e. durante la ERTA, lo que contrasta con nuestros experimentos en los que el fotoperíodo extendido fue de 16 h de luz por día desde emergencia a antesis.

La duración de la ERTA fue máxima cuando la combinación alélica contó con tres *Ppd-1b* (en Paragon), según lo descripto en el capítulo anterior (2) y de acuerdo con lo reportado por Ochagavía *et al.* (2017) en condiciones de campo. Esa mayor duración de la ERTA estuvo asociada a incrementos en el peso seco de la espiga en antesis (PSE, Cuadro 3.3.1), también de acuerdo con reportes previos (González *et al.*, 2005b) y esto a su vez significó un mayor NFF. González *et al.* (2005b) también encontraron una relación positiva entre el NFF y el PSE, aunque en su caso fue lineal, mientras que el reportado en este capítulo siguió una tendencia curvilínea (Fig. 3.3). La forma de esta respuesta estuvo determinada por la respuesta de Paragon a fotoperíodo excepcionalmente corto durante la ERTA, ya que esta etapa difícilmente está expuesta a 12 h de luz diarias en condiciones de crecimiento a campo en fechas de siembra usuales. Bajo estas condiciones, se observó una arquitectura de la espiga alterada, con un incremento en la longitud del ráquis entre espiguillas. Esto significó que las espigas más pesadas de Paragon en fotoperíodo corto no fueran acompañadas por un incremento lineal en el NFF dado que una mayor proporción de los asimilados disponibles fueron particionados a la estructura de la espiga (ráquis) en lugar de a sus flores.

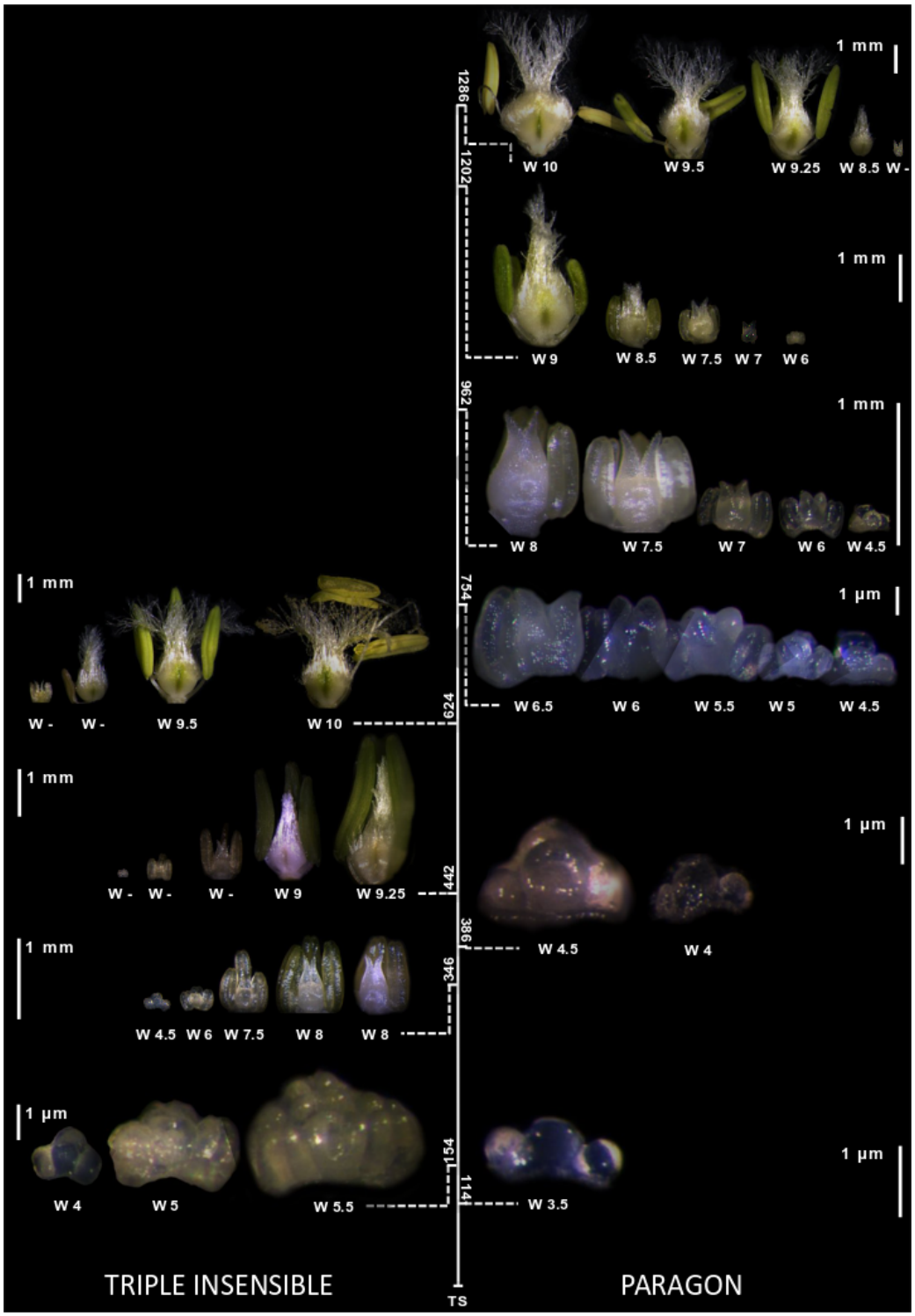

Figura 3.6: Estadíos del desarrollo floral en las espiguillas centrales del genotipo triple insensible (mitad izquierda) y de Paragon (mitad derecha) cultivados bajo fotoperíodo corto. La escala de tiempo muestra para cada caso, el tiempo térmico (°C d) desde espiguilla terminal hasta que esa serie de fotos fue tomada (notesé la diferencia en la duración desde espiguilla terminal hasta antesis para cada genotipo). Para cada momento, las flores fueron acomodadas en una espiguilla virtual, para la que el centro de la figura (o eje de tiempo) representa la posición del ráquis, y a partir del cual las flores se ubican de la más proximal (F1) a la más distal (F5) en los extremos de la figura. Las barras de escala en los bordes externos de la figura muestran la escala a la que aparecen las flores de cada espiguilla virtual en cada momento.

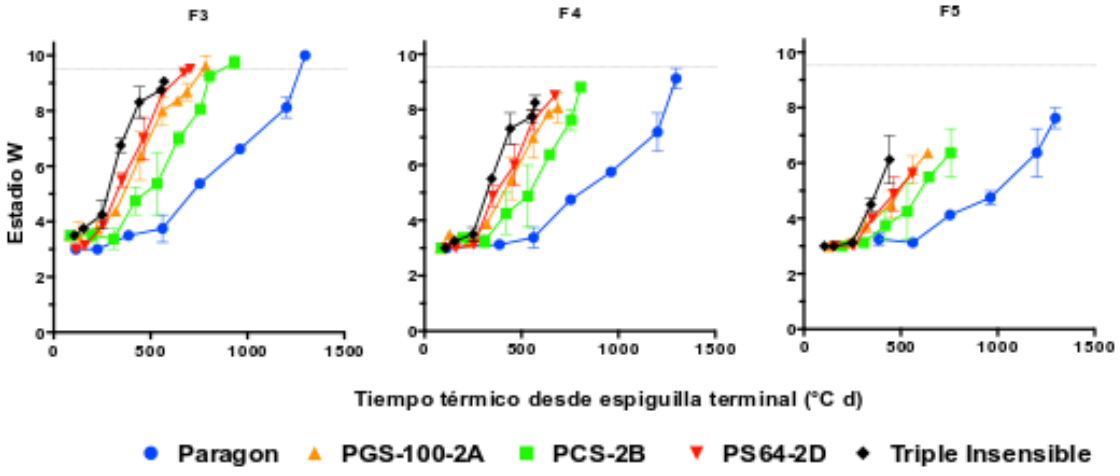

Figura 3.7: Progreso del estadío de desarrollo en la escala de Waddington a partir de espiguilla terminal para la tercera, cuarta y quinta flor de la espiguilla central, contadas desde el ráquis, de cada genotipo bajo fotoperíodo corto. Cada flor fue graficada desde el momento en que se volvió distinguible hasta que alcanzó antesis. La línea punteada indica el estadío de desarrollo a partir del cuál una flor fue considerada fértil en antesis de la espiga.

La mayoría de los estudios previos modificaron la ERTA exponiendo a las plantas a distintos fotoperíodos durante esa etapa particular, con efectos sobre el NFF mediados por la disponibilidad de asimilados y la supervivencia floral asociada al crecimiento de la espiga (González *et al.* 2011a). Una duración más larga de la iniciación de flores es usualmente compensada por una menor tasa de desarrollo de las mismas, resultando en pequeñas diferencias en el número máximo de flores iniciadas (Craufurd y Cartwright 1989, Miralles y Richards 2000, González *et al.* 2005b). En el único reporte conocido que ha estudiado la combinación alélica para *Ppd-1* y el desarrollo floral en condiciones de campo también se encontraron efectos de *Ppd-1* sobre el número de flores fértiles, atribuibles a su efecto sobre la supervivencia floral, pero sin haber afectado el número máximo de primordios florales (Prieto *et al.* 2018). Los resultados reportados en este capítulo sobre los efectos de *Ppd-1* bajo fotoperíodo corto constante (12 h de luz por día), estuvieron de acuerdo en general con estos antecedentes, dado que el efecto negativo de la insensibilidad a fotoperíodo sobre el número de flores fértiles estuvo relacionado al efecto de *Ppd-1* sobre la supervivencia floral, a través del crecimiento de la espiga (Cuadro 3.3.3 y Fig. 3.5b).

Sin embargo, también encontramos que los genes *Ppd-1* afectaron el número máximo de flores, que estuvo asociado positivamente con el número de flores fértiles (Cuadro 3.3.3 y Fig. 3.5a). Una mayor duración de la iniciación de flores permitió alcanzar un mayor número máximo de flores, al menos cuando se compararon los extremos de sensibilidad a fotoperíodo, Paragon y el genotipo triple insensible. El contraste en este aspecto entre estos resultados y los que se encuentran en la bibliografía citada en el párrafo anterior puede ser explicado por el hecho de que en estos experimentos la ERTA estuvo expuesta a un fotoperíodo inusualmente corto, considerando los fotoperíodos explorados en condiciones de campo durante esta etapa cuando el cultivo se siembra en fechas adecuadas. Esta condición causó que la duración de la iniciación de flores en Paragon durara *c.* tres veces más que en el genotipo triple insenible en estos experimentos, mientras que Prieto *et al.* (2018) encontró solo diferencias marginales entre estos genotipos para esa duración. Otros estudios en los que el fotoperíodo se manipuló solo durante la ERTA encontraron efectos directos del

fotoperíodo sobre la supervivencia de las flores más distales, sin efecto sobre el número de flores fértiles (González *et al.* 2003a, 2005b). Por lo tanto, este es el primer estudio en reportar un efecto directo de los alelos *Ppd-1* en el número máximo de flores, aunque existen otros dos que muestran una asociación entre el número máximo de flores y el número de flores fértiles en antesis, con variabilidad debida a genotipos de distintos orígenes (Guo *et al.* 2016) o con distinta duración de su ERTA (González-Navarro *et al.* 2015).

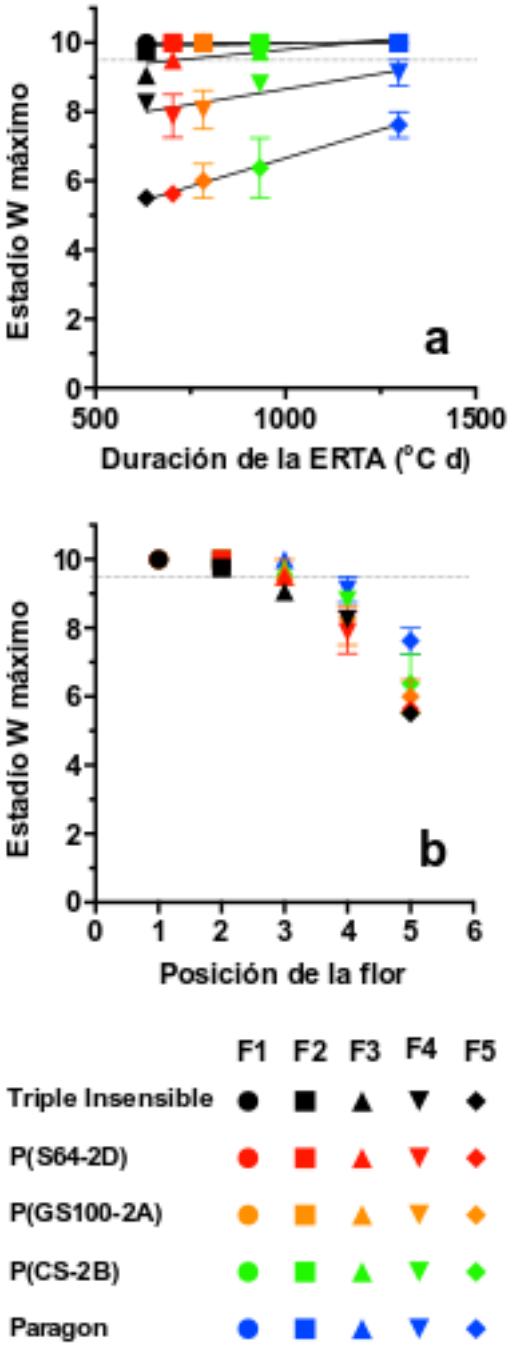

Figura 3.8: Estadío máximo de desarrollo alcanzado por las flores desde F1 hasta F5 en relación a (a) el tiempo térmico que duró el desarrollo de cada una y (b) la posición de cada flor respecto al ráquis, para cada genotipo.

3.5 Conclusión

Los alelos *Ppd-1a* redujeron el número de flores fértiles en antesis en trigo a través de una menor supervivencia floral y menor peso de la espiga, de acuerdo con lo hipotetizado. Sin embargo, los resultados de esta capitulo muestran por primera vez que los alelos *Ppd-1a* pueden afectar también el número máximo de flores iniciadas, lo cual estuvo parcialmente asociado al número de flores fértiles. En términos de diferencias entre los alelos, el número de flores fértiles sigío el orden triple *Ppd-1b* (Paragon) > *Ppd-B1a* (Chinese Spring) > *Ppd-A1a* (GS-100) > *Ppd-D1a* (Sonora 64) > triple *Ppd-1a* (Triple Insensible). Estos resultados refuerzan la idea de que incrementar la duración de la etapa reproductiva tardía podría resultar en un mayor número de flores fértiles y con ello, en un mayor rendimiento potencial.

Capítulo 4: Cuantificación del efecto de los genes *Ppd-1* sobre modelos novedosos de respuesta a fotoperíodo[3]

[3] Los principales resultados de este capítulo están incluidos en *Pérez-Gianmarco TI, Severini AD, González FG. 2020. Photoperiod-sensitivity genes (Ppd-1): Quantifying their effect on the photoperiod response model in wheat. Journal of Experimental Botany 71, 1185-1198.*

4.1 Introducción

Como se comentara en el Capítulo 1, sincronizar la fecha de antesis con el mejor ambiente disponible (aquel con el mayor coeficiente foto térmico y sin heladas, estrés hídrico o térmico) es crítico para la adaptación y para el ajuste del rendimiento potencial de trigo (Fischer 1975, 1985). El desarrollo hasta antesis es un proceso continuo, pero puede dividirse en etapas de acuerdo a las estructuras diferenciadas por el ápice. Luego de la imbibición de la semilla, los primordios foliares se generan en el ápice a *c.* el doble de la tasa a la que aparecen luego de emergencia (EM) (Hay y Kirby 1991). En algún punto después de la diferenciación de un número variable de primordios foliares, el ápice empieza a elongarse y se comienzan a distinguir los dobles lomos. Esto indica que ha ocurrido la iniciación floral y el ápice es ahora reproductivo. Sin embargo, el número final de hojas no se encuentra definido: primordios de la base del ápice no comprometidos pueden adoptar una identidad foliar o floral. Dependiendo de las condiciones ambientales y del genotipo, este evento puede ocurrir tan tarde como la diferenciación de la espiguilla terminal (ET) (Brooking *et al.* 1995). El comienzo de la elongación de tallo (CE), altamente relacionada a la ET (Borràs-Gelonch *et al.* 2011), genera la elevación del ápice, mientras las hojas continúan apareciendo hasta que la hoja bandera se expande completamente (HB, lígula de la hoja bandera visible, DC 39 Zadoks *et al.* 1974). Estos eventos fenológicos pueden ser utilizados para definir tres etapas pre-antesis: (i) de EM a CE, las hojas (y espiguillas) se diferencian y se define el número de hojas, (ii) de CE a HB, el vástago y la espiga crecen y las hojas aparecen hasta que la hoja bandera se expande por completo, y (iii) de HB a AN, etapa durante la cual el pedúnculo se elonga; hacia el final de esta etapa, son definidos el peso seco de espiga y el número de flores fértiles.

El desarrollo de trigo hasta antesis es controlado tanto por temperatura como por fotoperíodo (ver Capítulo 1, ítem 1.1.4). Dado que el trigo es una planta de día largo (Vince Prue 1975), la exposición a fotoperíodos largos acelera el desarrollo a antesis, a una tasa llamada "sensibilidad a fotoperíodo" (-días o -ºC días hora^{-1}), hasta alcanzar un fotoperíodo umbral por sobre el cual la respuesta a fotoperíodo se satura y la duración de etapas alcanza su mínimo (Major 1980) (ver Fig. 1.3 en Capítulo 1). Tal duración mínima de una etapa, lograda una vez que los requerimientos de vernalización y fotoperíodo han sido alcanzados, se conoce como "precocidad intrínseca". Estas vías fisiológicas son gobernadas por una serie génica, mencionada a veces como "genes de floración" (Worland 1996, Snape *et al.* 2001) o "sistemas génicos" (Stelmakh 1997, Kamran *et al.* 2014): *Vrn*, *Ppd*, y *Eps*. Estas vías se integran corriente abajo para inducir el desarrollo del ápice hacia un estado reproductivo (Distelfeld *et al.* 2009, Chen *et al.* 2014).

Como viene siendo discutido en esta tesis, la respuesta a fotoperíodo está ampliamente controlada por los genes mayores *Ppd-1*, una serie homeoalélica de *loci* en los brazos cortos de los cromosomas 2A, 2B y 2D. (Scarth y Law 1984): *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, y *Ppd-D1*, respectivamente (McIntosh *et al.* 2003). El efecto de estos genes sobre el tiempo a antesis ha sido caracterizado extensivamente (Scarth *et al.* 1985, González *et al.* 2005b, Bentley *et al.* 2013, Royo *et al.* 2015), siguiendo la magnitud de su efecto el orden *Ppd-D1a* > *Ppd-A1a* > *Ppd-B1a* (Díaz *et al.* 2012, Shaw *et al.* 2012, Bentley *et al.* 2013, Pérez-Gianmarco *et al.*, 2018- Capítulo 2). Sin embargo, solo en uno de estos trabajos, se intentó desentrañar el impacto de los *Ppd-1* en la duración de las etapas pre-antesis usando tres líneas de sustitución cromosómica, el cual produjo resultados no concluyentes (Whitechurch y Slafer 2002). Dado que todos los estudios previos probaron combinaciones alélicas de *Ppd-1* bajo unos pocos tratamientos de fotoperíodo,

generalmente limitado solo al fotoperíodo corto o a dos fotoperíodos extremos, corto y largo, su efecto en la curva de respuesta del tiempo a antesis a fotoperíodo, i.e. los parámetros que la definen son sensibilidad a fotoperíodo, fotoperíodo umbral y precocidad intrínseca (ver Fig. 1.3 en Capitulo 1), permanecen desconocidos.

Hay aún menos información disponible sobre el efecto de estos genes sobre la respuesta al fotoperíodo en cada etapa pre-antesis. Dado que las duraciones de las etapas de pre-antesis en cada cultivar podrían ser parcialmente independientes entre sí (Halloran y Pennell 1982), se ha propuesto que sus sensibilidades a fotoperíodo pueden también ser independientes y, por lo tanto, modificarse convenientemente para maximizar el período de crecimiento de espiga (Slafer y Rawson 1996, Slafer *et al.* 2001), y el número de granos (mas detalles en Capitulo 1, ítem 1.1.4). Sin embargo, para que ocurra la AN, todas las hojas diferenciadas deben aparecer (Jamieson *et al.* 1998), determinando una duración mínima para la etapa subsecuente, hasta la expansión de la HB. Así, la etapa entre comienzo de la elongación del tallo y hoja bandera (CE-HB) es, al menos parcialmente, dependiente de la duración de las etapas previas (i.e. "efecto memoria") (Miralles y Richards 2000), que determinan el número de hojas que restan aparecer durante CE-HB. En este Capítulo, no solamente evaluamos el impacto de los genes *Ppd-1* en tiempo a antesis y la respuesta a fotoperíodo de las etapas pre-antesis, sino que además, consideramos el efecto memoria de una etapa a la siguiente.

Múltiples intentos se han hecho para adaptar modelos agronómicos de simulación para predecir fenología a partir de información genotípica (White *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2013), de manera de evitar la siembra de cada genotipo en diferentes ambientes y fechas para caracterizar su fenología. Aunque el valor de esta labor ha sido destacado (Fischer 2011, He *et al.* 2012, Yin *et al.* 2018), la predicción de fenología ha sido poco exitosa en comparación con el modelo calibrado por ensayos fenológicos (White *et al.* 2008). Mejores resultados fueron obtenidos combinando aproximaciones tradicionales y genéticas, pero el análisis se realizó con un número reducido de alelos (*Ppd-D1a* vs. *Ppd-D1b* en Eagles *et al.* 2010 y Zheng *et al.* 2013), limitando la posible extrapolación de las inferencias. La comprensión del efecto de las variantes alélicas *Ppd-1* en la respuesta a fotoperíodo sobre el tiempo a antesis, se ha señalado como una solución a la falta de precisión de los modelos (He *et al.* 2012, Bloomfield *et al.* 2018). La posibilidad de modelar la duración de las etapas pre-antesis, dadas sus importancias relativas diferenciales en la determinación del rendimiento, también ha sido valorada (Fischer 2011, Zheng *et al.* 2013). Caracterizar y cuantificar los efectos de las distintas combinaciones alélicas de *Ppd-1* en el modelo fisiológico de duración de etapa en respuesta al fotoperíodo, permitiría una mayor precisión en la simulación de la fenología de trigo en base a información genotípica.

El objetivo de este Capítulo fue mejorar la comprensión y cuantificar el efecto que tienen los genes *Ppd-1* en la respuesta a fotoperíodo del tiempo a antesis y de la duración de las etapas previas a ella. Para esto, se estudió cómo las diferentes combinaciones de los genes *Ppd-1* afectan la tasa de respuesta a fotoperíodo, es decir, la sensibilidad a fotoperíodo, el fotoperíodo umbral y la precocidad intrínseca. Adicionalmente, se propuso un modelo fisiológico considerando la respuesta a fotoperíodo de las tres etapas pre-antesis subsecuentes (EM-CE, CE-HB y HB-AN), teniendo en cuenta el posible efecto memoria, es decir, el efecto que puede tener el fotoperíodo previo sobre la duración de la etapa siguiente. Para ello fue necesario diseñar experimentos que permitieran explorar un amplio rango de valores de fotoperíodo.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Material vegetal y experimentos

En este Capítulo se trabajó con una mayor cantidad de líneas isogénicas (NIL), utilizando todas las disponibles, que totalizaron 14 genotipos (ver Cuadro 4.2.1). Cada NIL portó uno, dos o tres alelos distintos de *Ppd-1a,* con no más de un alelo *Ppd-1a* por genoma (Cuadro 4.2.1). Para *Ppd-B1a,* se utilizaron alelos con variaciones en el número de copias (Díaz *et al.* 2012). Las líneas isogénicas fueron crecidas en macetas durante las temporadas 2012, 2013, 2014, 2017 y 2018 en Pergamino, Argentina (33º 53' S, 60º 34' O), con fechas de siembra que estuvieron siempre entre el 29 de mayo y el 19 de julio. Con el fin de exponer a las distintas combinaciones alélicas para *Ppd-1* a un rango de fotoperíodos, durante 2012 y 2013, se expusieron a un fotoperíodo natural de la temporada o a su extensión por 6 horas, mientras que tratamientos de extensión de 2 y 4 horas fueron agregados en los experimentos de 2014, 2017 y 2018 (Fig. 4.1 y 4.2). Durante 2018, una siembra tardía (26 de septiembre) y extensiones del fotoperíodo de 6 y 8 horas, proveyeron fotoperíodos excepcionalmente prolongados. Todos los valores de fotoperíodo se consideraron, incluyendo el crepúsculo civil (Fig. 4.1).

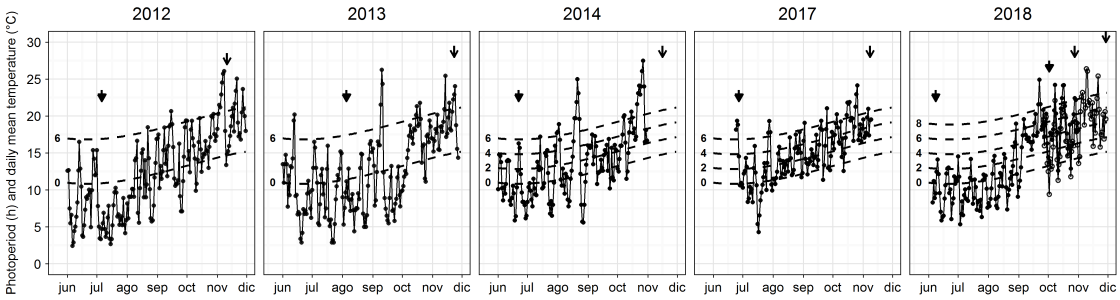

Figura 4.1: Marcha del fotoperíodo (líneas punteadas) y de la temperatura media diaria (círculos y líneas sólidas) en la estación de crecimiento del cultivo para las distintas campañas. Los números al lado de las líneas punteadas indican el número de horas que el fotoperíodo fue extendido por sobre el natural para resultar en esos valores. Las flechas sólidas indican el momento de la emergencia y las vacías el de la última antesis en cada experimento particular. El primer par de flechas en 2018 corresponde al experimento sembrado en fechas convencionales, mientras que el segundo corresponde a aquel en contraestación.

Los tratamientos consistieron en a) exposición a fotoperíodo natural desde EM a AN, b) fotoperíodo natural artificialmente extendido desde EM a AN, c) transferencias de fotoperíodos largos a cortos en CE, o d) transferencias de fotoperíodos cortos a largos en CE (ver Figuras 4.1 y 4.2 para la variación en variables ambientales a través de las temporadas y detalles de los tratamientos, respectivamente). Las extensiones del fotoperíodo fueron logradas colocando unidades experimentales, en una etapa determinada, bajo lámparas de baja radiación que se encendían al ocaso (sol debajo del horizonte) y se apagaban a las 2, 4, 6 u 8 horas luego del crepúsculo civil, tal como se describe en González *et al.* (2002). Los tratamientos se mencionan a lo largo del texto en formato de "horas de extensión del fotoperíodo desde EM a CE" / "horas de extensión del fotoperíodo de CE a AN", es decir, "0/0" para un fotoperíodo natural continuo, "0/6" para un fotoperíodo natural hasta CE y una subsecuente extensión de 6 horas sobre el fotoperíodo natural, desde CE a AN, o "6/6" para un fotoperíodo extendido 6 horas sobre el fotoperíodo natural, de manera continua entre EM y AN, etc.

La unidad experimental consistió de 5 plantas crecidas en macetas redondas de 7 litros. Excepcionalmente, durante las temporadas 2014, 2017 y 2018, los tratamientos 0/0, 0/6 y 6/6 se desarrollaron en macetas rectangulares (de dimensiones 0,6 x 0,15 x 0,2 m), cada una conteniendo *c.* 40 plantas. Tres unidades experimentales (macetas) por tratamientos fueron crecidas cada año, con excepción de los tratamientos 6/6 y 8/8 crecidos en la primavera tardía de 2018, para los cuales se utilizaron dos macetas. Durante los años 2012, 2013 y 2014, las macetas se mantuvieron a condición de campo, mientras que en 2017 y 2018, se mantuvieron en invernáculo durante todo el período de crecimiento. Las macetas fueron regadas periódicamente para evitar el estrés hídrico, enfermedades y plagas fueron tratadas de manera acorde.

Cuadro 4.2.1: Genotipo de cada línea isogénica (NIL) en los genomas A, B y D.

	Genotipo en el genoma			
NIL	A	B	D	Dador *Ppd-1a*
Paragon	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	
P(R-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Recital
P(CS-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Chinese Spring
P(S64-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Sonora 64
P(GS-100-2A)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	GS-100
P(S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Sonora 64
P(O-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Opata
P(CS-2B+S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	
P(S64-2B+S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	
P(GS-100-2A+CS-2B)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	
P(GS-100-2A+S64-2B)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	
P(GS-100-2A+S64-2D)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	
P(GS-100-2A+CS-2B+S64-2D)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	
P(GS-100-2A+S64-2B+S64-2D)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	

Las observaciones de estados fenológicos externos fueron realizadas dos o tres veces por semana (dependiendo de la temperatura del aire), incluyendo EM, CE, HB y AN o, como se menciona en Zadoks *et al.* (1974), 10, 31, 39, y 65, respectivamente. La fenología fue evaluada en el tallo principal de cada unidad experimental y la etapa fenológica se registró como alcanzada cuando al menos el 50% de los tallos principales la hubiera alcanzado. El número de hojas aparecidas (Haun 1973) fue registrado para dos plantas por maceta y su el promedio se mantuvo como el valor para la unidad experimental. Relacionando este valor con el tiempo térmico transcurrido (utilizando 0 ºC como la temperatura base) entre observaciones a través de una regresión lineal se calculó el filocrono (tasa de aparición de hojas^{-1}). La duración de las etapas fue calculada como el tiempo térmico acumulado entre dos etapas fenológicas.

La temperatura media diaria fue usada para calcular tiempo térmico acumulado desde emergencia hasta cada fecha, asumiendo una temperatura base de 0º C. La temperatura del aire fue registrada por dos sensores independientes, ubicados bajo los tratamientos de 0 y 6 horas de extensión de fotoperíodo al nivel de ápice (cuando sobresale del nivel del suelo). El promedio entre los dos sensores fue usado como temperatura diaria, ya que los mismos no mostraron efecto de calentamiento por las luces de extensión del fotoperíodo. El fotoperíodo promedio durante una etapa particular fue calculado promediando los valores de fotoperíodo para cada día de duración de la misma y, por lo tanto, considera la variación de fotoperíodo inducida por los tratamientos de extensión, ya sea total o parcial, para la etapa (como es el caso de los tratamientos que involucran transferencias entre fotoperíodos desde EM a AN).

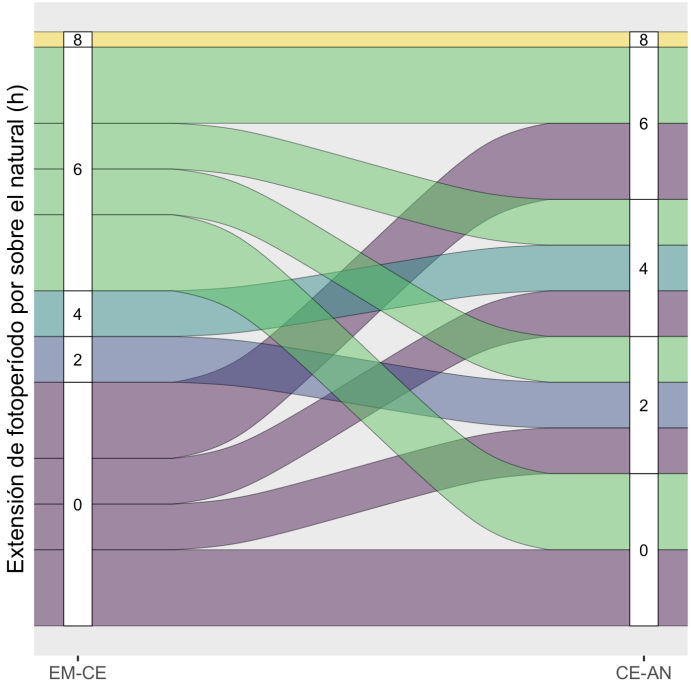

Figura 4.2: Representación esquemática de los tratamientos de fotoperíodo. El ancho de cada flujo representa el número de campañas en las que se llevó a cabo un tratamiento y su color hace referencia a la extensión de fotoperíodo que recibió ese tratamiento desde emergencia (EM) hasta comienzo de encañazón (CE). El punto final del flujo (hacia la derecha de la figura) indica la extensión de fotoperíodo en ese tratamiento entre CE y antesis (AN).

4.2.2 Modelo de respuesta a fotoperíodo afectado por los genes *Ppd-1*

Con el objetivo de caracterizar y cuantificar los efectos de los genes *Ppd-1* sobre los parámetros de respuesta a fotoperíodo de a) tiempo a antesis y b) duración de etapas pre-antesis, elegimos una aproximación mediante inferencia multi-modelo (Rosen 2016, Garibaldi *et al.* 2017). Tanto para a) como para b), un conjunto de modelos jerárquicos Bayesianos fueron ajustados para duración de etapa (como variable dependiente) y fotoperíodo promedio durante esa etapa o las previas (como variable independiente). Cada modelo representó una hipótesis de respuesta a fotoperíodo y efecto de los genes *Ppd-1* sobre los parámetros de dicha respuesta. Luego, el mejor modelo fue seleccionado en base a su parsimonia y habilidad predictiva.

Se decidió ajustar modelos Bayesianos por sobre modelos frecuentistas porque permiten una mayor flexibilidad para especificar el tipo de respuesta a fotoperíodo, el

efecto de los *Ppd-1* sobre los parámetros de esa respuesta y la correlación entre ambos efectos (Gelman *et al.* 2013, Bürkner 2017). Adicionalmente, permitieron incluir conocimiento previo sobre la posible distribución de los parámetros (Wallach *et al.* 2014): distribuciones previas levemente informativas fueron usadas para proteger al modelo de un sobre-ajuste. Sus promedios y distribuciones fueron establecidos de acuerdo a conocimiento previo de los parámetros (Major 1980, Slafer y Rawson 1996), evaluación visual de datos crudos y estadística descriptiva. Los modelos fueron ajustados por medio de Stan (Carpenter *et al.* 2017), al cual se accedió por el paquete *'brms'* (Bürkner 2017) para R (R Core Team 2018).

Los parámetros que describen la duración de la(s) etapa(s) en respuesta al fotoperíodo pueden ser únicos para todos los genotipos (nivel de población) o específico de genotipo (nivel de grupo), variando de acuerdo a las combinaciones alélicas de los *Ppd-1*: el uso de modelos jerárquicos permitió discernir si un parámetro dado debía ser modelado en base a un nivel poblacional o grupal, es decir, si un parámetro particular era afectado por los genes *Ppd-1* o descripto precisamente por el mismo valor para toda la población de NILs.

Un primer conjunto de modelos fue usado para describir tiempo térmico acumulado (T_{base} = 0 ºC) desde EM a AN como una función del fotoperíodo promedio experimentado durante la etapa. Diez modelos (Cuadro 4.2.2) fueron propuestos para probar:

a) Si la respuesta es descripta mejor por un ajuste lineal o bilineal (lineal hasta un fotoperíodo umbral, a partir del cual no hay respuesta, como propuso Major 1980), y

b) Cuál (o cuáles) de los parámetros que describen dicha respuesta eran afectados por los genes *Ppd-1*:

i. la tasa de cambio en duración con modificaciones del fotoperíodo, definido como sensibilidad a fotoperíodo (β, también llamado S_{FP} en Fig 1.3),

ii. la constante del modelo (α, igual a la precocidad intrínseca en modelos bilineales, también llamado PI en Fig. 1.3),

iii. el fotoperíodo umbral (γ, punto de cambio en la pendiente, solo en modelos bilineales, también llamado Fp_u en Fig. 1.3), o

iv. sus posibles combinaciones (ver detalles de las diferencias entre los modelos propuestos en el Cuadro 4.2.2).

El segundo conjunto de modelos estuvo compuesto por 19 modelos multivariados, cada uno relacionando la duración de las etapas pre-antesis (EM-CE, CE-HB, y HB-AN) al fotoperíodo promedio durante cada etapa (Cuadro 4.2.3). Los modelos fueron multivariados, dado que las tres variables respuesta, es decir, las duraciones de las tres etapas pre-antesis fueron ajustadas simultáneamente. Esto hizo posible modelar la correlación entre los residuos resultantes del ajuste de etapas pre-antesis adyacentes. Los modelos variaron entre sí por la manera en que los genes *Ppd-1* afectaban a los parámetros y por el ajuste de la respuesta durante la etapa EM-CE, para la cual se propusieron tanto respuestas lineales como bilineales (Cuadro 4.2.2). Por el contrario, no se propusieron modelos bilineales para la respuesta en las etapas CE-HB y HB-AN, dado que no hubo indicios de las mismas en los datos crudos. Sintéticamente, la variación entre los modelos consideró si:

a) existe un valor umbral para la respuesta a fotoperíodo en la etapa EM-CE,

b) una, dos o tres etapas respondían a fotoperíodo,

c) la respuesta a CE-HB estaba condicionada por el fotoperíodo experimentado previamente, durante la etapa EM-CE,

d) diferentes genes *Ppd-1* afectaban a los parámetros que describen la respuesta a fotoperíodo de manera diferencial para cada etapa, y

e) se incluían en el modelo correlaciones entre los efectos de los genes *Ppd-1* para la etapa actual y la siguiente.

Para una descripción detallada de cada modelo particular, ver el Cuadro 4.2.3.

Cuadro 4.2.2: Descripción de los modelos propuestos de respuesta del tiempo térmico acumulado desde emergencia hasta antesis al fotoperíodo promedio durante esa etapa, y de los efectos de Ppd-1 sobre los parámetros de los mismos. N/A indica cuando no aplica modelar el efecto de los genes sobre el parámetro dado que no existe en ese modelo. El modelo elegido (E) está resaltado en la tabla y descripto en detalle por la Ecuación 4.1.

		Considera efectos de *Ppd-1* sobre los parámetros:		
Modelo	Respuesta	Constante (α)	Sensibilidad (β)	Fotoperíodo umbral (γ)
A	lineal	SÍ	NO	N/A
B	lineal	SÍ	SÍ	N/A
C	bi-lineal	NO	NO	NO
D	bi-lineal	SÍ	SÍ	NO
E	**bi-lineal**	**NO**	**SÍ**	**NO**
F	bi-lineal	SÍ	NO	SÍ
G	bi-lineal	NO	SÍ	SÍ
H	bi-lineal	SÍ	NO	NO
I	bi-lineal	NO	NO	SÍ
J	bi-lineal	SÍ	SÍ	SÍ

Una vez que los modelos se ajustaron, los mejores de cada conjunto fueron seleccionados por su precisión predictiva esperada, calculada a partir de validaciones cruzadas de 10 iteraciones y sus comparaciones con la función 'loo-compare' del paquete 'loo' (Vehtari *et al.* 2017) en R. Además, dentro de cada conjunto de modelos, se calculó la magnitud del efecto probable de los *Ppd-1* sobre los parámetros del modelo, relativo a la media poblacional en los modelos más complejos, para evaluar el efecto de grupo en el modelo. La naturaleza multivariada del segundo conjunto de modelos, arrojó un número mayor de combinaciones posibles que, a veces, diferían entre sí en uno o pocos parámetros. Bajo estas circunstancias, la selección de un modelo guiada solo por los resultados de la validación cruzada, podría conducir a la elección de un modelo sobre-ajustado (Piironen y Vehtari 2017), en otras palabras, que los parámetros no necesariamente estén reflejando el resultado de procesos fisiológicos o vías metabólicas. Por este motivo, los mejores modelos de acuerdo a la capacidad predictiva esperada fueron comparados con el resto de los mejores modelos usando factores de Bayes (K), una medida de cuán bien, el modelo seleccionado, explica los datos en relación al resto de los modelos buenos (Lavine y Schervish 1999). Se seleccionó el modelo de mayor verosimilitud (si $K > 10^1$ Kass y Raftery 1995) y menos parámetros. Paralelamente al análisis del efecto relativo de los genes, este método

permitió evitar la selección de modelos sobre-ajustados. Estimaciones de R^2 para cada etapa y de la raíz cuadrada del error (RMSE) para la fecha de antesis fueron proporcionadas como medidas de ajuste de cada modelo, sin embargo, no fueron utilizadas para la selección de modelos, ya que no necesariamente reflejan su capacidad predictiva (Wallach *et al.* 2014, McElreath 2015).

Cuadro 4.2.3: Descripción de los modelos de respuesta a fotoperíodo propuestos considerando cada etapa pre-antesis. N/A indica cuando no aplica modelar el efecto de los genes sobre el parámetro dado que no existe en ese modelo. En negrita, El modelo elegido (T) está resaltado en la tabla y descripto en detalle por la Ecuación 4.2.

	Respuesta a fotoperíodo de			Efecto de genes *Ppd-1* sobre						
				constante	sensibilidad	umbral	constante	sensibilidad (d)	sensibilidad (p)	constante
Modelo	EM-CE	CE-HB	HB-AN	α^{EM-CE}	β^{EM-CE}	γ^{EM-CE}	α^{CE-HB}	β^{CE-HB}	δ^{EM-CE}	α^{HB-AN}
A	SÍ	NO	NO	NO	SÍ	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
B	SÍ	SÍ (d)	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	N/A	N/A
C	SÍ	SÍ (d)	NO	NO	SÍ *	NO	SÍ *	NO	N/A	N/A
D	SÍ	SÍ (d)	NO	NO	SÍ *	NO	SÍ *	NO	N/A	SÍ
E	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO	N/A	NO
F	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	N/A	NO
G	SÍ	SÍ (d)	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	NO	N/A	NO
H	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	N/A	NO
I	SÍ	SÍ (d)	SÍ	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	N/A	NO
J	SÍ	SÍ (d)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO	N/A	NO
K	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ	NO	SÍ	NO	N/A	NO
L	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ *	NO	SÍ *	NO	N/A	NO
M	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ *	NO	SÍ *	NO	N/A	SÍ
N+	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ *	NO	SÍ *	NO	N/A	SÍ

	Respuesta a fotoperíodo de			Efecto de genes *Ppd-1* sobre						
				constante	sensibilidad	umbral	constante	sensibilidad (d)	sensibilidad (p)	constante
Modelo	EM-CE	CE-HB	HB-AN	α^{EM-CE}	β^{EM-CE}	γ^{EM-CE}	α^{CE-HB}	β^{CE-HB}	δ^{EM-CE}	α^{HB-AN}
O	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	NO	SÍ *	SÍ *	NO	N/A	SÍ
P	SÍ	SÍ (d)	SÍ	SÍ *	NO	NO	SÍ *	NO	N/A	SÍ
Q	SÍ	SÍ (d)	SÍ	NO	SÍ *	SÍ *	SÍ *	NO	N/A	SÍ
R	SÍ	SÍ (d)	SÍ	SÍ *	NO	SÍ *	SÍ *	NO	N/A	SÍ
S	SÍ	SÍ (d)	SÍ	SÍ *	SÍ *	SÍ *	SÍ *	NO	N/A	SÍ
T	SÍ	SÍ (d, p)	SÍ	NO	SÍ *	NO	SÍ *	NO	SÍ *	SÍ
U	SÍ	SÍ (d, p)	SÍ	SÍ	SÍ *	SÍ	SÍ *	NO	SÍ *	SÍ
V	SÍ	SÍ (d, p)	SÍ	NO	SÍ *	NO	SÍ *	SÍ	SÍ	SÍ

+: El modelo N difiere del modelo M y demás por no considerar la correlación entre los residuales.
*
**: Se modeló la correlación del efecto de Ppd-1 sobre estos parámetros en este modelo.*

(d) y (p) se usan para indicar respuesta a fotoperíodo directo (d) o previo (p).

4.3 Resultados

4.3.1 Tiempo a antesis

A lo largo de los años y los tratamientos de fotoperíodo, un amplio rango de valores de fotoperíodo promedio, desde 11,3 a 22,4 h, fue explorado desde EM hasta AN. El tiempo térmico acumulado hasta antesis osciló entre 770 y 2140 ºC d. Una proporción variable (entre 0 y 50% dependiendo del experimento), de las unidades experimentales sembradas con Paragon y expuestas a fotoperíodo natural hasta CE (< 12,5 h) no progresaron hasta la elongación de tallo en el vástago principal y eventualmente murieron antes de finalizar el experimento. La disección de una muestra de las plantas mostrando estos síntomas mostró el desarrollo del ápice detenido brevemente después de la diferenciación de espiguilla terminal. Esto se consideró una respuesta cualitativa y, por lo tanto, no se consideró en los modelos cuantitativos aquí propuestos.

El Modelo E (Ecuación 4.1, Figura 4.3) fue seleccionado por validación cruzada como el más parsimonioso y con la mejor capacidad predictiva (Cuadro 4.3.1). Mientras que algunos modelos más complejos fueron igualmente exitosos en la validación cruzada (Cuadro 4.3.1), el efecto de los genes *Ppd-1* mostró un efecto relativamente despreciable sobre todos los parámetros del modelo, excepto en la sensibilidad a fotoperíodo, lo cual es evidencia de sobre-ajuste. Adicionalmente, el modelo E no presentó penalización relevante de bondad de ajuste al compararse contra los modelos con más parámetros: mostró valores de R^2 de 71% y RMSE de 106 ºC d (ver Cuadro 4.3.1 para la comparación completa entre modelos).

El Modelo E es descripto por la ecuación 4.1:

$$y_{ij} \sim N(\mu_{ij}, \sigma_y^2)$$

$$\mu_{ij} = \begin{cases} \alpha + \beta_j\ (x_{ij} - \gamma), & \text{if } x_{ij} < \gamma \\ \alpha, & \text{de lo contrario} \end{cases}$$

$$\beta_j \sim N(\beta, \sigma_\beta^2)$$

donde y_{ij} es la duración de etapa de EM a AN de la observación *i* del genotipo *j*, x_{ij} es el fotoperíodo promedio de EM a AN de la observación *i* del genotipo *j*, μ_{ij} es la duración ajustada de la etapa, σ_y^2 es la varianza residual, α es la precocidad intrínseca, β_j es la sensibilidad a fotoperíodo del genotipo j, γ es el fotoperíodo umbral, β es la sensibilidad (promedio) a fotoperíodo poblacional y σ_β^2 es la varianza genotípica para la sensibilidad al fotoperíodo.

Esto tiene dos implicancias, ambas ilustradas en la Figura 4.3. Primero, confirma el carácter bilineal de la respuesta a fotoperíodo para el tiempo térmico hasta antesis. El tiempo térmico acumulado hasta antesis disminuyó a medida que el fotoperíodo se extendió, a una cierta tasa (β_j, sensibilidad a fotoperíodo, la pendiente de la Figura 4.3), hasta que se alcanzó un fotoperíodo umbral (γ, abscisa del cambio de pendiente en la Figura 4.3) en el cual el tiempo térmico acumulado a antesis fue mínimo (α, precocidad intrínseca, la constante de la Figura 4.3). Más allá de este umbral, no hubo respuesta de aceleración de antesis ante un fotoperíodo extendido.

Cuadro 4.3.1: Evaluación de los modelos del primer grupo según diferencias en su habilidad predictiva esperada según validación cruzada (ΔHPE-CV) y su error estándar, en relación al mejor modelo con ese criterio. También se detalla la bondad de ajuste (R^2) de cada modelo y su RMSE para valores observados vs. ajustados de tiempo térmico a antesis.

Modelo	ΔHPE-CV (± e.e.)	R^2	RMSE
G	-	0,71	106,7
E	**-0,01 ± 0,34**	**0,71**	**106,7**
D	-0,26 ± 0,27	0,71	106,7
J	-0,32 ± 0,28	0,71	106,7
B	-77,36 ± 19,43	0,67	113,1
F	-138,40 ± 18,63	0,64	119,0
I	-138,40 ± 18,68	0,64	119,0
H	-157,10 ± 21,16	0,63	120,7
A	-195,70 ± 23,07	0,60	124,4
C	-453,90 ± 44,50	0,40	152,5

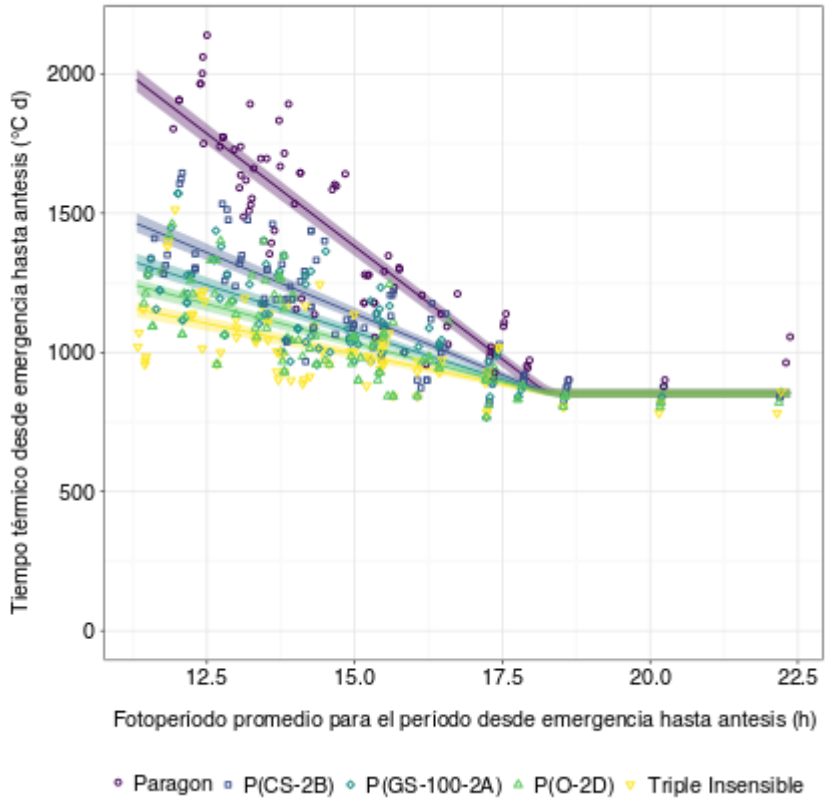

Figura 4.3: Tiempo térmico desde emergencia hasta antesis en relación al fotoperíodo promedio y a la combinación alélica en Ppd-1 según descripto por el modelo E (ec. 1). Cada línea muestra el valor promedio de una muestra de la distribución posterior del modelo para cada genotipo (i.e. el ajuste), mientras que la sombra se extiende desde el límite inferior al superior del intervalo de credibilidad del 90% de esta distribución. Los datos usados para ajustar el modelo se muestran como puntos que varían en su forma y color para las distintas líneas (solo 5 de los 14 genotipos usados se muestran en la figura, ver tabla 5 para los valores de los parámetros para los 9 genotipos restantes).

Segundo, y de gran relevancia, se caracterizó y cuantificó el efecto de los genes *Ppd-1* sobre los parámetros del modelo. La adición de alelos *Ppd-1a* a un genotipo sensible (y su apilamiento en un genotipo insensible) redujo la sensibilidad a fotoperíodo del genotipo resultante (β_j), que fue el único parámetro afectado por la variación en los genes *Ppd-1.* La sensibilidad a fotoperíodo osciló entre ~ -160 ºC d h $^{-1}$ en Paragon a ~ -45 ºC d h $^{-1}$ en el genotipo triple insensible "P(GS-100-2A+CS-2B+S64-2D)" (Figura 4.3, Cuadro 4.3.2). El fotoperíodo umbral y la precocidad intrínseca permanecieron constantes para todos los genotipos probados y alcanzaron valores de ~ 18,3 h (Intervalo de Credibilidad (IC) 90% 18,0, 18,5) y ~ 850 ºC d (IC 90% 835, 869) respectivamente (Figura 4.3).

La introgresión de cualquier alelo *Ppd-1a* en Paragon causó una disminución en la sensibilidad a fotoperíodo (Figuras 4.3 y 4.4). La magnitud de dicha reducción dependió del alelo específico que se introdujera: mientras que los alelos de menor efecto (*Ppd-B1a* de Chinese Spring o Recital) redujeron casi a la mitad la sensibilidad a fotoperíodo con respecto a Paragon, los alelos más fuertes (*Ppd-D1a* de Opata) la redujeron a menos de un tercio del valor en Paragon (Cuadro 4.3.2). En general, y promediando distintas variantes alélicas, el orden alélico de magnitud de efecto, de acuerdo al cromosoma al que pertenecen es *Ppd-D1a* > *Ppd-A1a* > *Ppd-B1a* (Cuadro 4.3.2). Esto puede observarse en la Figura 4.3, como la diferencia en la reducción de las pendientes, causada por la introgresión de distintos alelos *Ppd-1a* respecto a Paragon y el efecto marginal del apilado triple en P(GS-100-2A+CS-2B+S64-2D).

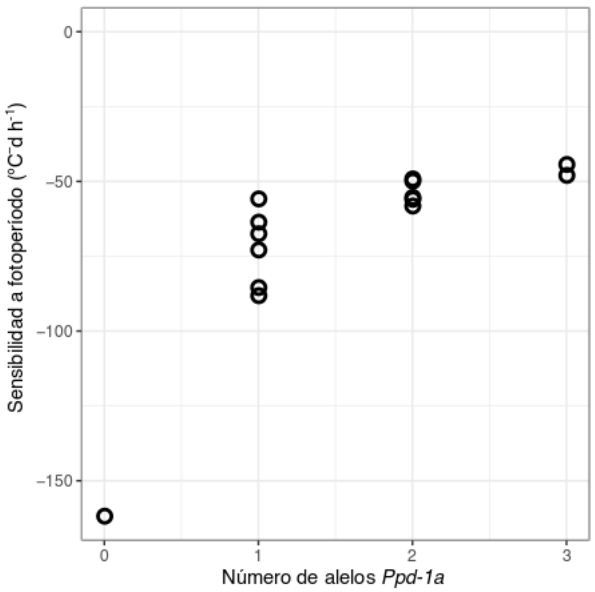

Figura 4.4: Sensibilidad al fotoperíodo desde emergencia a antesis en relación al número de alelos Ppd-1a de cada línea isogénica.

El apilamiento de alelos insensibles en números mayores a uno, también redujo la sensibilidad a fotoperíodo (Figura 4.4, Cuadro 4.3.2). Sin embargo, mientras que la magnitud de dicho efecto fue modificada respecto a la NIL simple (*Ppd-1a)*, con la cual se compara, nunca se obtuvo la misma magnitud de cambio que en la inserción del primer alelo *Ppd-1a* en un genotipo triple sensible (Figura 4.4, Cuadro 4.3.2). El efecto marginal de la adición de un alelo *Ppd-D1a* a una NIL ya insensible (con un solo *Ppd-1a*), varió de ~ 40 ºC d h $^{-1}$ si se compara con P(CS-2B), a casi la mitad de eso si se compara con P(GS-100-2A) (Cuadro 4.3.2). De hecho, las NILs doble insensibles mostraron poca, si no nula, reducción en la sensibilidad respecto a P(O-2D), cuando

portaron un alelo *Ppd-D1a,* presentando saturación en la respuesta a alelos adicionales de insensibilidad sobre un genotipo base con una fuerte insensibilidad previa (Cuadro 4.3.2, Figura 4.4). En el caso de la inserción de un tercer alelo de insensibilidad, la sensibilidad a fotoperíodo no se reduce más allá de 14 ºC d h^{-1} en ningún caso y, generalmente, muestra aún menos efecto (Figura 4.4). En resumen, el efecto de apilamiento de alelos *Ppd-1a* nunca fue aditivo y dependió fuertemente de la magnitud del efecto del alelo previamente introgresado o de la línea insensible en la cual se apiló.

4.3.2 Duración de las etapas pre-antesis

Todas las etapas pre-antesis fueron expuestas a fotoperíodos en un rango entre 10,9 y 21,9 h, 11,2 y 22,8 h, y 11,9 y 23 h para EM-CE, CE-HB y HB-AN, respectivamente. Dichas etapas variaron con duraciones mínimas de ~ 300, 70 y 115 ºC d y máximas de hasta ~ 1315, 780 y 545 ºC d, respectivamente.

Cuadro 4.3.2: Valores de los parámetros de los modelos E y T para cada línea isogénica (NIL), representados por su media e intervalo de credibilidad de 90% de la muestra obtenida de la distribución posterior de cada modelo

	Modelo E	*Modelo T*			
NIL *Genotipo*	β_j *ºC d* h^{-1}	β_j^{EM-CE} *ºC d* h^{-1}	α_j^{CE-HB} *ºC d*	δ_j^{CE-HB} *ºC d* h^{-1}	α_j^{HB-AN} *ºC d*
Paragon	*-162*	*-138*	*936*	*-25*	*415*
Ppd-A1b, Ppd-B1b, Ppd-D1b	*(-153, -171)*	*(-126, -149)*	*(877, 995)*	*(-22, -29)*	*(393, 437)*
P(CS-2B)	*-88*	*-67*	*669*	*-12*	*395*
Ppd-A1b, Ppd-B1a, Ppd-D1b	*(-83, -93)*	*(-61, -73)*	*(632, 708)*	*(-10, -14)*	*(375, 437)*
P(R-2B)	*-85*	*-64*	*658*	*-12*	*404*
Ppd-A1b, Ppd-B1a, Ppd-D1b	*(-79, -92)*	*(-57, -71)*	*(612, 707)*	*(-9, -15)*	*(384, 426)*
P(S64-2B)	*-73*	*-56*	*594*	*-9*	*398*
Ppd-A1b, Ppd-B1a, Ppd-D1b	*(-68, -78)*	*(-50, -62)*	*(553, 635)*	*(-6, -11)*	*(378, 418)*
P(GS-100-2A)	*-68*	*-49*	*570*	*-8*	*396*
Ppd-A1a, Ppd-B1b, Ppd-D1b	*(-63, -73)*	*(-43, -55)*	*(528, 610)*	*(-5, -10)*	*(376, 416)*
P(S64-2D)	*-63*	*-47*	*568*	*-8*	*388*
Ppd-A1b, Ppd-B1b, Ppd-D1a	*(-59, -69)*	*(-42, -52)*	*(530, 608)*	*(-5, -10)*	*(367, 409)*
P(O-2D)	*-56*	*-42*	*534*	*-6*	*386*
Ppd-A1b, Ppd-B1b, Ppd-D1a	*(-51, -61)*	*(-37, -47)*	*(494, 574)*	*(-3, -8)*	*(369, 409)*
P(GS-100-2A+CS-2B)	*-58*	*-36*	*543*	*-5*	*387*
Ppd-A1a, Ppd-B1a, Ppd-D1b	*(-53, -63)*	*(-31, -41)*	*(501, 582)*	*(-2, -7)*	*(368, 407)*
P(S64-2B+S64-2D)	*-56*	*-38*	*551*	*-7*	*386*
Ppd-A1b, Ppd-B1a, Ppd-D1a	*(-51, -61)*	*(-33, -44)*	*(512, 591)*	*(-4, -9)*	*(367, 406)*
P(GS-100-2A+S64-2B)	*-55*	*-37*	*553*	*-6*	*387*
Ppd-A1a, Ppd-B1a, Ppd-D1b	*(-50, -60)*	*(-32, -42)*	*(514, 593)*	*(-4, -9)*	*(367, 407)*
P(GS-100-2A+S64-2D)	*-50*	*-28*	*543*	*-6*	*383*
Ppd-A1a, Ppd-B1b, Ppd-D1a	*(-45, -55)*	*(-23, -33)*	*(501, 588)*	*(-3, -8)*	*(363, 403)*
P(CS-2B+S64-2D)	*-49*	*-31*	*537*	*-5*	*383*
Ppd-A1b, Ppd-B1a, Ppd-D1a	*(-44, -54)*	*(-26, -36)*	*(498, 581)*	*(-3, -8)*	*(363, 403)*
P(GS-100-2A+S64-2B+S64-2D)	*-48*	*-34*	*498*	*-3*	*382*
Ppd-A1a, Ppd-B1a, Ppd-D1a	*(-43, -53)*	*(-30, -40)*	*(451, 538)*	*(0, -6)*	*(363, 403)*
P(GS-100-2A+CS-2B+S64-2D)	*-44*	*-27*	*513*	*-4*	*382*
Ppd-A1a, Ppd-B1a, Ppd-D1a	*(-39, -49)*	*(-22, -32)*	*(473, 553)*	*(-2, -7)*	*(362, 402)*

β_j*: sensibilidad a fotoperíodo desde EM-AN*
β_j^{EM-CE}*: sensibilidad a fotoperíodo de la etapa EM-CE*
α_j^{CE-HB}*: constante para la duración de la etapa CE-HB*
δ_j^{CE-HB}*: sensibilidad a fotoperíodo previo durante la etapa CE-HB*
α_j^{HB-AN}*: constante para la duración de la etapa HB-AN*

Los modelos T, U y V (Cuadro 4.2.3) se desempeñaron considerablemente mejor que el resto en cuanto a su capacidad predictiva. El Modelo T, sin embargo, resultó el más apoyado por los datos de acuerdo a la comparación de factores Bayes (*K,* Cuadro 4.3.3), y con el valor agregado de utilizar considerablemente menos parámetros que los modelos U y V (ver Cuadro 4.2.3 para detalles sobre los parámetros de los modelos). A su vez, esto no se tradujo en una penalización en la bondad de ajuste del modelo T respecto a la de los modelos más complejos U y V (Cuadro 4.3.3). Así, el modelo T (Ecuación 4.2, Cuadro 4.3.2, Fig. 4.5) fue el elegido a partir de todos los propuestos, por tener la mayor verosimilitud y por balancear la capacidad predictiva y la parsimonia con la bondad de ajuste. El modelo T es descripto por la Ecuación 4.2:

$$
\begin{gathered}
y_{ij}^{\mathrm{EM-CE}} \sim N(\mu_{ij}^{\mathrm{EM-CE}}, \sigma_y^{2,\mathrm{EM-CE}}) \\
y_{ij}^{\mathrm{CE-HB}} \sim N(\mu_{ij}^{\mathrm{CE-HB}}, \sigma_y^{2,\mathrm{CE-HB}}) \\
y_{ij}^{\mathrm{HB-AN}} \sim N(\mu_{ij}^{\mathrm{HB-AN}}, \sigma_y^{2,\mathrm{HB-AN}}) \\
\mu_{ij}^{\mathrm{EM-CE}} = \begin{cases} \alpha^{\mathrm{EM-CE}} + \beta_j^{\mathrm{EM-CE}}\,(x_{ij}^{\mathrm{EM-CE}} - \gamma^{\mathrm{EM-CE}}), & \text{if } x_{ij}^{\mathrm{EM-CE}} < \gamma^{\mathrm{EM-CE}} \\ \alpha^{\mathrm{EM-CE}}, & \text{de lo contrario} \end{cases} \\
\mu_{ij}^{\mathrm{CE-HB}} = \alpha_j^{\mathrm{CE-HB}} + \beta^{\mathrm{CE-HB}}\, x_{ij}^{\mathrm{CE-HB}} + \delta_j^{\mathrm{CE-HB}}\, x_{ij}^{\mathrm{EM-CE}} \\
\mu_{ij}^{\mathrm{HB-AN}} = \alpha_j^{\mathrm{HB-AN}} + \beta^{\mathrm{HB-AN}}\, x_{ij}^{\mathrm{HB-AN}} \\
\beta_j^{\mathrm{EM-CE}} \sim N(\beta^{\mathrm{EM-CE}}, \sigma_\beta^{2,\mathrm{EM-CE}}) \\
\alpha_j^{\mathrm{CE-HB}} \sim N(\alpha^{\mathrm{CE-HB}}, \sigma_\alpha^{2,\mathrm{CE-HB}}) \\
\delta_j^{\mathrm{CE-HB}} \sim N(\delta^{\mathrm{CE-HB}}, \sigma_\delta^{2,\mathrm{CE-HB}}) \\
\alpha_j^{\mathrm{HB-AN}} \sim N(\alpha^{\mathrm{HB-AN}}, \sigma_\alpha^{2,\mathrm{HB-AN}})
\end{gathered}
\tag{4.2}
$$

donde $y_{ij}^{\mathrm{EM-CE}}$, $y_{ij}^{\mathrm{CE-HB}}$ y $y_{ij}^{\mathrm{HB-AN}}$ son, respectivamente, las duraciones de las etapas EM-CE, CE-HB y HB-AN de la observación *i* del genotipo *j*, $x_{ij}^{\mathrm{EM-CE}}$, $x_{ij}^{\mathrm{CE-HB}}$ y $x_{ij}^{\mathrm{HB-AN}}$ son, respectivamente, el fotoperíodo promedio de la etapa EM-CE, CE-HB y HB-AN de la observación *i* del genotipo *j,* $\mu_{ij}^{\mathrm{EM-CE}}$, $\mu_{ij}^{\mathrm{CE-HB}}$ y $\mu_{ij}^{\mathrm{HB-AN}}$ son las duraciones ajustadas de las etapas EM-CE, CE-HB y HB-AN, $\sigma_y^{2,\mathrm{EM-CE}}$, $\sigma_y^{2,\mathrm{CE-HB}}$ y $\sigma_y^{2,\mathrm{HB-AN}}$ son las varianzas residuales de cada etapa, $\alpha^{\mathrm{EM-CE}}$ es la precocidad intrínseca de la etapa EM-CE, $\beta_j^{\mathrm{EM-CE}}$ es la sensibilidad a fotoperíodo del genotipo *j* durante la etapa EM-CE, $\gamma^{\mathrm{EM-CE}}$ es el fotoperíodo umbral de la etapa EM-CE, $\beta^{\mathrm{EM-CE}}$ es el promedio, y $\sigma_\beta^{2,\mathrm{EM-CE}}$ es la varianza genotípica de la sensibilidad a fotoperíodo, para la etapa EM-CE, $\alpha_j^{\mathrm{CE-HB}}$ es la constante del genotipo *j*, $\delta_j^{\mathrm{CE-HB}}$ es la sensibilidad al fotoperíodo anterior (i.e. EM-CE) del genotipo *j* durante la etapa CE-HB, $\alpha^{\mathrm{CE-HB}}$es el promedio, y $\sigma_\alpha^{2,\mathrm{CE-HB}}$ es la varianza genotípica de la constante de la etapa, para la constante de la etapa CE-HB, $\delta^{\mathrm{CE-HB}}$ es el promedio, y $\sigma_\delta^{2,\mathrm{CE-HB}}$ es la variancia genotípica, de la sensibilidad de la etapa CE-HB al fotoperíodo previo. $\alpha_j^{\mathrm{HB-AN}}$ es la

constante del genotipo j, $\alpha^{\mathrm{HB-AN}}$ es el promedio, y $\sigma_{\alpha}^{2,\mathrm{HB-AN}}$ es la varianza genotípica, de la constante de la etapa HB-AN. También modeladas, están la correlación entre los parámetros $\beta_j^{\mathrm{EM-CE}}$ y $\alpha_j^{\mathrm{CE-HB}}$, y la correlación entre los residuos de cada etapa.

Según el modelo T, las tres etapas de pre-antesis fueron acortándose a medida que el fotoperíodo se extendió (Fig. 4.5), pero la forma y magnitud de la respuesta cuantitativa, y el efecto de los *Ppd-1* en tal respuesta, fueron ampliamente diferentes. Una respuesta bilineal fue hallada solamente en la etapa EM-CE, con un fotoperíodo umbral de 16 ± 0,16 h y una precocidad intrínseca que promedió ~ 430 ± 3 ºC d. La sensibilidad a fotoperíodo, en cambio, varió con los genotipos. En general, la adición de cualquier *Ppd-1a* redujo la sensibilidad a fotoperíodo al comparar con el triple sensible, Paragon (~ -140 ºC d h $^{-1}$). La magnitud de dicha reducción dependió del alelo ingresado, siguiendo la tendencia descripta para sus efectos en la sensibilidad a fotoperíodo para el proceso completo desde EM a AN. Por ejemplo, la adición de un *Ppd-B1a* de Chinese Spring sobre la base del triple sensible, redujo la sensibilidad a fotoperíodo a ~ -70 ºC d h $^{-1}$, casi la mitad de la que presenta Paragon, mientras que *Ppd-D1a* de Opata la redujo más, a ~ -40 ºC d h $^{-1}$ (Cuadro 4.3.2). Adicionalmente, el apilamiento de dos o tres alelos *Ppd-1a* aminoró la sensibilidad al fotoperíodo respecto a estos simple insensibles: el genotipo triple insensible con alelos *Ppd-1a* en los genomas A, B y D de GS-100, Chinese Spring y Sonora 64, respectivamente, alcanzaron niveles de sensibilidad tan bajos como ~ -30 ºC d h $^{-1}$. Nuevamente, la magnitud del efecto dependió de la "fuerza" del alelo que se considera primero. Sin embargo, bajo ninguna circunstancia, este efecto fue aditivo, ya que no redujo la sensibilidad a fotoperíodo del genotipo ya insensible en el mismo grado que cuando se comparó al efecto de su acción única sobre Paragon.

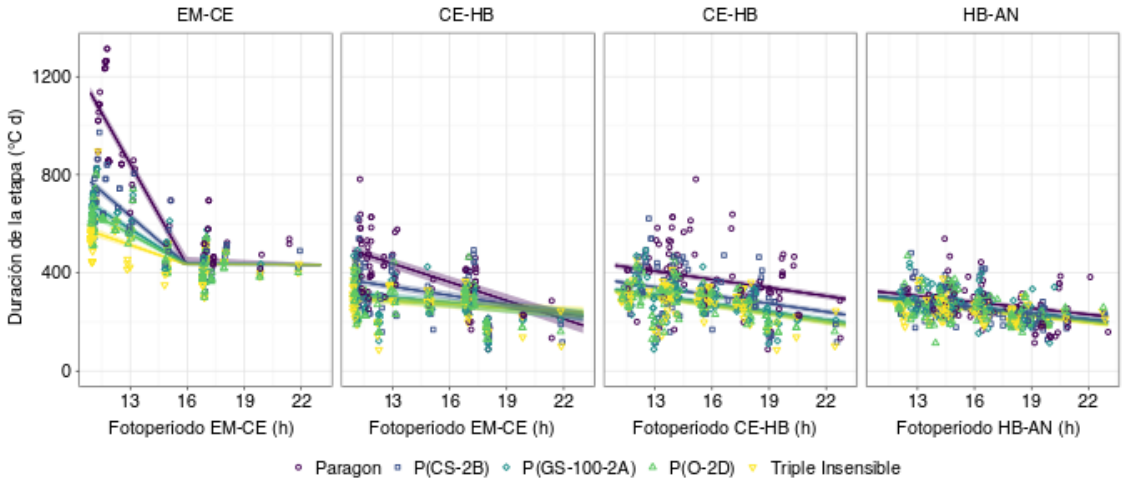

Figura 4.5: Duración de las etapas pre-antesis en relación al fotoperíodo promedio experimentado durante la misma u otra previa y a la combinación alélica para Ppd-1, según el modelo T (ec. 2). Las etapas mostradas son EM-CE, desde emergencia hasta comienzo de encañazón, CE-HB, desde comienzo de encañazón hasta hoja bandera, y HB-AN, desde hoja bandera hasta antesis. Cada línea muestra el valor promedio de una muestra de la distribución posterior del modelo para cada genotipo (i.e. el ajuste), mientras que la sombra se extiende desde el límite inferior al superior del intervalo de credibilidad del 90% de esta distribución. Los datos usados para ajustar el modelo se muestran como puntos que varían en su forma y color para las distintas líneas (solo 5 de los 14 genotipos usados se muestran en la figura, ver tabla 5 para los valores de los parámetros para los 9 genotipos restantes).

En contraste a la etapa EM-CE, tanto la etapa CE-HB como la HB-AN, mostraron respuestas lineales al fotoperíodo promedio (directo), acortándose con fotoperíodos más largos, sin un umbral observado hasta 22,8 y 23 h, respectivamente

(ver contraste entre paneles en la Fig. 4.5). La respuesta cuantitativa al fotoperíodo promedio (directo) fue única a lo largo de las NILs, promediando ~ -11 ºC d h $^{-1}$ (CI 90% 10, 12) durante CE-HB ($\beta^{\mathrm{CE-HB}}$), mientras que la menor respuesta fue durante la etapa HB-AN ($\beta^{\mathrm{HB-AN}}$, ~ -8ºC d h $^{-1}$, CI 90% 7, 10).

Para la etapa CE-HB, los alelos *Ppd-1a* redujeron su duración por medio de la reducción $\alpha_j^{\mathrm{CE-HB}}$, que cambió su valor, cuando $x_{ij}^{\mathrm{CE-HB}}$ fue igual a 0, desde ~ 940 (Paragon) a ~ 500 ºC d (triple insensibles) (Cuadro 4.3.2), y por medio de la reducción de la sensibilidad de CE-HB al fotoperíodo experimentado durante la etapa previa EM-CE ($\delta_j^{\mathrm{CE-HB}}$). Los *Ppd-1* no afectaron la sensibilidad al fotoperíodo promedio (directo), $\beta^{\mathrm{CE-HB}}$, el cual fue compartido entre genotipos (nótese la ausencia del subíndice *j* en el parámetro de sensibilidad a fotoperíodo, haciéndolo independiente del genotipo *j*). El efecto que los genes *Ppd-1* tuvieron sobre los parámetros $\alpha_j^{\mathrm{CE-HB}}$ y $\delta_j^{\mathrm{CE-HB}}$, estuvo altamente correlacionado con su efecto en la sensibilidad a fotoperíodo durante la etapa EM-CE, $\beta_j^{\mathrm{EM-CE}}$ (r = -0,87 y r = 0,85, respectivamente).

El efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre la etapa HB-AN fue considerablemente más leve y limitado exclusivamente a la constante, $\alpha_j^{\mathrm{HB-AN}}$, la cual se vio reducida por los mismos. Este efecto fue mucho menor a aquél observado para la etapa CE-HB, cuando $x_{ij}^{\mathrm{HB-AN}}$ fue equivalente a 0, el parámetro promedió ~ 415 ºC d para Paragon y ~ 380 ºC d para los triple insensibles, superponiéndose considerablemente (Cuadro 4.5). Descripto en términos de filocronos, la constante promedió 2,40 (CI 90% 2,36, 2,46). Esta relación fue afectada de manera despreciable por el fotoperíodo promedio durante HB-AN (-0,08 filocronos h $^{-1}$, CI 90% -0,07, -0,09).

Cuadro 4.3.3: Evaluación de Modelos del segundo grupo según diferencias en su habilidad predictiva esperada según validación cruzada (ΔHPE-CV) y su error estándar, en relación al mejor modelo con ese criterio. El factor K resume la comparación del modelo T contra los otros modelos de alta HPE según Factor Bayes. También se detalla la bondad de ajuste (R^2) de cada modelo y su RMSE para valores observados vs. ajustados de tiempo térmico a antesis.

Modelo	ΔHPE-CV (± e.e.)	*K*	R^2			RMSE
			EM-CE	CE-HB	HB-AN	
U	0,0 ± 0,0	$6{,}7\times10^{1}$	0,78	0,38	0,16	100,8
T	**-11,5 ± 4,5**		**0,77**	**0,39**	**0,15**	**101,1**
V	-11,6 ± 4,5	$4{,}7\times10^{6}$	0,77	0,39	0,15	101,1
S	-112,0 ± 17,6	$1{,}5\times10^{46}$	0,79	0,25	0,16	101,5
M	-117,0 ± 17,9	$2{,}9\times10^{43}$	0,79	0,26	0,15	101,2
Q	-119,3 ± 17,8	$4{,}6\times10^{46}$	0,79	0,26	0,15	101,3
L	-135,5 ± 19,5	-	0,79	0,26	0,13	102,0
K	-135,7 ± 19,5	-	0,79	0,26	0,13	102,0
N	-172,0 ± 22,1	-	0,77	0,25	0,16	102,6
D	-216,1 ± 22,1	-	0,80	0,27	0,02	103,0
J	-218,6 ± 27,9	-	0,80	0,14	0,13	106,4
C	-223,8 ± 21,5	-	0,79	0,27	0,00	103,4
O	-228,9 ± 22,1	-	0,75	0,25	0,16	108,1
R	-228,9 ± 22,2	-	0,75	0,25	0,16	108,1
E	-234,2 ± 28,4	-	0,79	0,14	0,13	108,4
H	-234,2 ± 22,7	-	0,79	0,14	0,13	106,7
B	-323,0 ± 30,1	-	0,79	0,14	0,00	109,9
F	-334,2 ± 30,3	-	0,76	0,14	0,13	113,1
I	-334,3 ± 30,3	-	0,76	0,14	0,13	113,1
P	-403,9 ± 33,8	-	0,67	0,25	0,16	120,1
A	-416,1 ± 29,7	-	0,79	0,00	0,00	120,0
G	-508,6 ± 40,1	-	0,67	0,14	0,13	125,7

**Valores mayors a 10^{1} muestran evidencia a favor del modeo T (Kass y Raftery, 1995).*

4.3.3 Efecto de los *Ppd-1* en el número final de hojas y la dinámica de aparición de hojas

Los alelos *Ppd-1a* redujeron el número final de hojas (NFH) en el vástago principal. Tal como se esperaba, este efecto fue más notable bajo fotoperíodos más cortos (tratamientos +0 y +2 en Cuadro 4.3.4). Esto se observó tanto cuando las NILs simple *Ppd-1a* fueron comparadas contra Paragon, como cuando comparando genotipos doble o triple insensibles contra genotipos *Ppd-1a* simples y dobles, respectivamente. Similar al impacto sobre la duración de etapas, el efecto de los alelos *Ppd-1a* bajo fotoperíodos cortos, varió en magnitud cuando fueron la única fuente de insensibilidad. Los portadores de *Ppd-D1a* produjeron hasta ~ 3 hojas menos que el triple sensible Paragon, mientras que algunos portadores de *Ppd-B1a* redujeron el NFH por ~ 2 (Cuadro 4.3.4). La magnitud del efecto de alelos únicos creció con la insensibilidad provista por el alelo de la etapa EM-CE. El apilamiento de dos alelos *Ppd-1a* cualquiera, resultó prácticamente en el mismo NFH que el fenotipo natural sin extender (8,2 a 8,7 hojas) y las diferencias apilando un tercer alelo, fueron siempre menores a una hoja. A medida que la longitud de los días se extendió durante la etapa de EM-CE, el efecto de los alelos *Ppd-1a* en el NFH decreció, al punto de no haber diferencias observables entre genotipos bajo la extensión de 8 h de fotoperíodo. Bajo esta condición, tanto los genotipos muy sensibles como los muy insensibles, tuvieron su número final de hojas reducido a 6-7 hojas (Cuadro 4.3.4).

El NFH se correlacionó positivamente con el tiempo térmico acumulado desde emergencia a hoja bandera (i.e. EM-CE + CE-HB), sin distinciones entre genotipos (0,73, CI 90% 0,70, 0,75). Los valores de filocrono promediaron ~108 ºC d h $^{-1}$. Mientras que el filocrono mostró una leve respuesta a fotoperíodo (~-2,2 ºC d hoja $^{-1}$ por hora), no se encontró efecto de los *Ppd-1* sobre este carácter (datos no presentados).

Cuadro 4.3.4: Número final de hojas promedio (± su error estándar) a través de años para cada genotipo bajo cada tratamiento de extensión de fotoperíodo durante la etapa desde emergencia (EM) hasta comienzo de encañazón.

Genotipo	**Horas de extensión del fotoperíodo durante EM-CE**				
	+0	+2	+4	+6	+8
Paragon	11,8 ± 1,2	9,8 ± 0,4	7,8 ± 1,3	7,5 ± 1,3	6,0 ± 0,0
P(R-2B)	9,9 ± 0,8	8,1 ± 0,9	6,9 ± 0,9	6,5 ± 0,8	6,5 ± 0,7
P(CS-2B)	9,6 ± 1,2	8,1 ± 0,9	7,1 ± 1,0	7,1 ± 1,1	6,0 ± 0,0
P(S64-2B)	9,3 ± 1,0	8,0 ± 0,7	7,1 ± 0,4	7,2 ± 1,0	6,0
P(GS-100-2A)	9,1 ± 1,0	7,9 ± 1,4	7,1 ± 0,8	7,1 ± 0,9	6,0 ± 0,0
P(S64-2D)	9,3 ± 1,0	8,3 ± 0,8	7,0 ± 0,8	7,2 ± 1,0	6,5 ± 0,7
P(O-2D)	8,9 ± 1,1	7,4 ± 0,5	6,7 ± 0,9	6,8 ± 0,8	6,0
P(CS-2B+S64-2D)	8,2 ± 1,0	7,7 ± 0,7	6,7 ± 1,1	6,7 ± 0,8	6,5 ± 0,7
P(S64-2B+S64-2D)	8,7 ± 1,2	7,8 ± 1,0	6,9 ± 1,0	6,8 ± 0,9	6,0
P(GS-100-2A+CS-2B)	8,4 ± 0,9	7,7 ± 1,0	7,5 ± 0,7	7,1 ± 0,8	7,0 ± 0,0
P(GS-100-2A+S64-2B)	8,5 ± 0,9	7,7 ± 1,3	6,8 ± 0,8	6,8 ± 0,9	6,0
P(GS-100-2A+S64-2D)	8,2 ± 1,0	7,4 ± 1,1	6,7 ± 0,8	6,7 ± 0,8	6,0 ± 0,0
P(GS-100-2A+CS-2B+S64-2D)	7,9 ± 1,1	7,4 ± 0,6	6,9 ± 0,8	6,7 ± 0,8	6,0 ± 0,0
P(GS-100-2A+S64-2B+S64-2D)	8,0 ± 1,1	6,9 ± 1,4	6,6 ± 0,9	6,7 ± 0,9	6,5 ± 0,7

4.4 Discusión

Los genes *Ppd-1* afectaron la sensibilidad a fotoperíodo de la etapa EM-AN, sin alterar el fotoperíodo umbral o la precocidad intrínseca (Fig. 4.3). Esto se condice con el único otro reporte conocido de los *Ppd-1* y la respuesta a fotoperíodo, en el cual se emplearon tres líneas de sustitución cromosómica, portando dos alelos diferentes de *Ppd-1* (Whitechurch y Slafer 2002). En el presente capítulo, no solo caracterizamos el efecto de los *Ppd-1* sobre la respuesta a fotoperíodo, sino que también, cuantificamos el efecto de cinco alelos distintos, así como sus combinaciones dobles y triples, por primera vez. Particularmente, los alelos *Ppd-1a,* redujeron la sensibilidad a fotoperíodo y la magnitud de su efecto dependió de qué alelo particular se considerara (Cuadro 4.3.2). En este estudio, demostramos que el efecto de los alelos *Ppd-1* sobre tiempo a antesis bajo fotoperíodo corto, reportado en trabajos previos (González *et al.* 2005b, Díaz *et al.* 2012, Shaw *et al.* 2012, Bentley *et al.*, 2013, Pérez-Gianmarco *et al.* 2018-Capitulo 2) es exclusivamente debido a su efecto sobre la sensibilidad a fotoperíodo, es decir, dado que reducen la sensibilidad a fotoperíodo, el ciclo a antesis se acorta. Adicionalmente, la cuantificación del efecto que tienen los distintos alelos *Ppd-1* y sus combinaciones sobre la sensibilidad a fotoperíodo (Cuadro 4.3.2) es una herramienta útil para el mejoramiento puesto que relacionando combinaciones alélicas particulares con su fenotipo esperado permitiría ajustar el tiempo a antesis de nuevos cultivares. Además, constituye un instrumento valioso para mejorar la capacidad predictiva de modelos de simulación basados en genes, tal como reconocen White *et al.* (2008) y Bloomfield *et al.* (2018).

Apilar alelos *Ppd-1a* también redujo la sensibilidad a fotoperíodo, pero la disminución generada por cualquier alelo particular dependió de: a) la insensibilidad provista por el alelo introgresado previamente y b) la magnitud del efecto del alelo que está siendo insertado. En cualquier caso, el impacto de un segundo (o tercer) alelo nunca fue aditivo; esto significa que nunca lograron la misma insensibilidad que al ingresarlos en el genotipo triple sensible (Cuadro 4.3.2).

Modelar la respuesta a fotoperíodo hasta antesis dividiendo el ciclo en etapas pre-antesis, en lugar del acercamiento de ciclo completo, nos permitió dilucidar y cuantificar los efectos de los genes *Ppd-1* en los mecanismos de dicha respuesta. Por otra parte, cambiar los tratamientos de fotoperíodo en CE, cuando el número de hojas ya está definido, nos permitió exponer a las plantas a fotoperíodos independientes antes y después de CE, sin alterar el número final de hojas. Como resultado, fuimos capaces de modelar y cuantificar un efecto "memoria" durante la etapa CE-HB como una variación en la duración de la respuesta al fotoperíodo experimentado previamente (en EM-CE), en contraposición a la variación en la duración como respuesta al fotoperíodo promedio (directo) durante la etapa CE-HB. Mientras que el efecto memoria sería trasladado por las hojas que restarían aparecer durante la encañazón, el efecto directo estaría dado por la respuesta del filocrono al fotoperíodo directo, dado que el número de hojas ya ha sido definido. Notablemente, la precisión en la predicción del tiempo a antesis no sufrió por la predicción de la duración de las etapas pre-antesis, si no que mejoró de 107 ºC d (modelo E) a 101 ºC d (modelo T) de RMSE (Cuadro 4.3.1 y 4.3.3, Fig. 4.6).

Los genes *Ppd-1* afectaron la respuesta a fotoperíodo de las etapas pre-antesis de manera diferencial (Fig. 4.6). Los alelos *Ppd-1a* redujeron la sensibilidad al fotoperíodo promedio (directo) solamente durante la etapa EM-CE en una magnitud equivalente al efecto que tienen en la sensibilidad a fotoperíodo para el ciclo completo hasta antesis. En contraste, no se pudo detectar efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre la sensibilidad al fotoperíodo promedio (directo) durante las etapas CE-HB ni HB-AN. Mientras que su

efecto sobre la duración de la etapa de elongación del pedúnculo (HB-AN) fue muy limitada, tuvieron un impacto considerable en la magnitud del efecto "memoria" durante la etapa CE-HB: la duración de la etapa CE-HB en genotipos con mayor sensibilidad a fotoperíodo durante EM-CE, fue mayor en promedio y la respuesta fue más pronunciada, es decir, fueron más sensibles al fotoperíodo previo que los genotipos más insensibles, como se muestra por la variación en $\alpha_j^{\text{CE-HB}}$ y $\delta_j^{\text{CE-HB}}$ (Cuadro 4.3.2). Esto se puede comprender como un número final de hojas más elevado en promedio y más variable, a lo largo de los tratamientos de fotoperíodo en la etapa EM-CE, para los genotipos más sensibles en comparación a los más insensibles: a las plantas Paragon que pasaron de un fotoperíodo corto (+0) a uno extendido (+8) en CE, todavía les restaban aparecer ~ 3.5 hojas más que a las NILs triple insensibles, independientemente del fotoperíodo al que se sometan durante CE-HB (Cuadro 4.3.4).

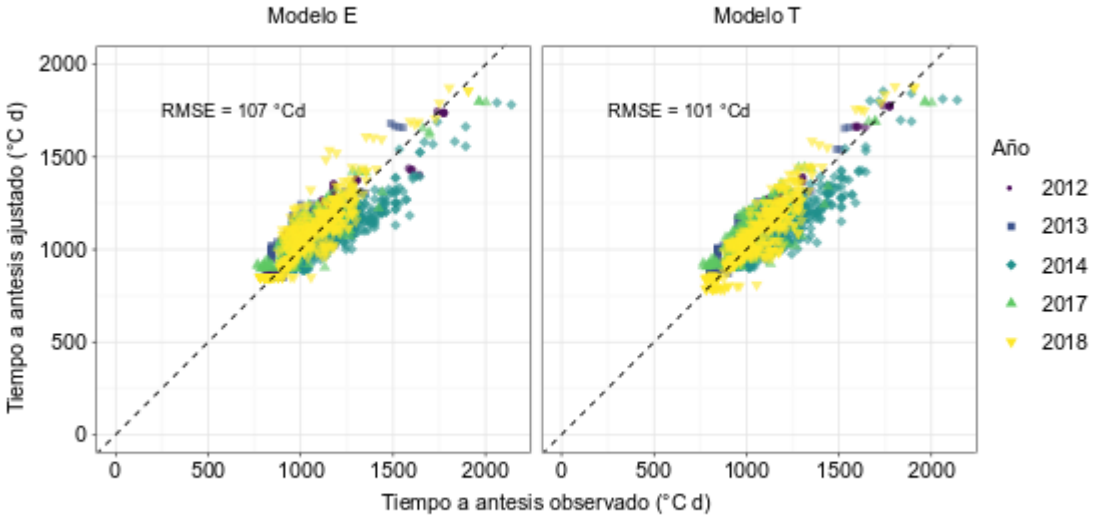

Figura 4.6: Relación entre valores ajustados y observados para el tiempo térmico entre emergencia y antesis según los modelos E (primer grupo) y T (segundo grupo), y el RMSE de la relación. Los datos de distintas campañas fueron representados con símbolos de distinto color y tamaño.

El efecto de alelos simples *Ppd-1a* sobre el desarrollo temprano (i.e. hasta CE) está parcialmente en concordancia con lo reportado por Whitechurch y Slafer (2002). Sin embargo, en contraste con nuestro estudio, ellos reportan diferentes sensibilidades a fotoperíodo para las líneas portadoras de distintas combinaciones *Ppd-1* en la etapa ET-AN (equivalente a CE-AN en este capítulo). Una posible causa de esta divergencia es el hecho de que sus tratamientos no incluyeron transferencias entre tratamientos de fotoperíodo en ET, en cambio, mantuvieron los tratamientos constantes de EM a AN. De esta forma, el fotoperíodo promedio (directo) durante la etapa ET-AN, estuvo altamente correlacionado con el fotoperíodo previo y la respuesta al fotoperíodo promedio (directo) estuvo necesariamente confundido con los efectos de memoria.

4.5 Conclusión

En este capitulo se presentó un análisis novedoso para caracterizar el efecto de los *Ppd-1,* en respuesta al fotoperíodo, sobre el tiempo a antesis y la duración de las etapas previas. Los genes *Ppd-1* afectaron solamente la sensibilidad a fotoperíodo, sin efecto sobre la precocidad intrínseca o el fotoperíodo umbral, tanto cuando se consideró al ciclo desde emergencia hasta antesis como la duración etapas que lo componen. A su vez, este análisis permitió cuantificar los efectos de 5 alelos distintos de *Ppd-1a,* así

como sus dobles y triples combinaciones, sobre la sensibilidad a fotoperíodo por primera vez. Dicha cuantificación es notablemente relevante para la planificación de tiempo a antesis al desarrollar nuevos cultivares, y una herramienta valiosa para mejorar la capacidad predictiva basada en modelos de simulación de base genética. En los próximos dos capítulos de la tesis se explorará en más detalle la repuesta “directa” y “memoria” a fotoperíodo en diferentes etapas pre-antesis.

Capítulo 5: Respuesta directa a cambios en el fotoperíodo durante la encañazón según la combinación alélica en *Ppd-1* y su impacto sobre el rendimiento potencial a campo

5.1 Introducción

El aumento del rendimiento potencial de los cultivos de granos está acompañado del incremento en los rendimientos alcanzables a campo (Fischer y Edmeades 2010, Hall y Richards 2013) y representa una estrategia sustentable para aumentar la producción y mantener bajos los precios en un escenario de demandas crecientes (Nelson 2010, Fischer *et al.* 2014, Fischer y Connor 2018). En un escenario de bajo progreso en el rendimiento potencial comparado con los incrementos relativos deseables (Slafer *et al.* 2001, Hall y Richards 2013, Fischer y Rebetzke 2018), se ha propuesto manipular procesos fisiológicos relacionados al rendimiento para mejorar la tasa de progreso del potencial de rendimiento (Slafer 2003, Reynolds *et al.* 2009, Fischer 2011, Foulkes *et al.* 2011), más allá de la selección por rendimiento *per se* como tradicionalmente se ha hecho (Foulkes *et al.* 2011). Pero para que su implementación en un programa de mejora sea factible, el control genético de estos procesos debería ser conocido e idealmente estar dado por pocos genes (Slafer 2003).

Como mencionamos en el Capítulo 1 (ítems 1.1.3 y 1.1.4), se ha propuesto que optimizar la duración de las distintas etapas ontogénicas hasta antesis permitiría incrementar el rendimiento potencial en trigo (Slafer y Rawson 1996, Slafer *et al.* 2001). A modo de repaso, la etapa reproductiva tardía (ERTA), es crítica para la definición del rendimiento (Fischer 1975, 1983), ya que es durante este período cuando se desarrollan las flores determinándose cuantas llegan a fértiles (i.e. número potencial de granos) en AN (Fischer y Stockman 1980, Stockman *et al.* 1983). Desde ET en adelante, el número de flores en la espiga crece hasta un máximo, a partir del cual muchas de ellas detienen su desarrollo y mueren, para finalmente estabilizarse en el número de flores que alcanzan AN como fértiles (Langer y Hanif 1973, Kirby 1988, Sibony y Pinthus 1988). El aborto de esas flores coincide con el crecimiento a tasa máxima de tanto las espigas como los tallos (Kirby 1988), y existe vasta evidencia de que es causado por la competencia mutua por fotoasimilados (Brooking y Kirby 1981, Kirby 1988, Ghiglione *et al.* 2008, González *et al.* 2011a), lo que explica su alta correlación con el pesco seco de la espiga en antesis (PSE) (Fischer y Stockman 1980, Stockman *et al.* 1983). Por su parte, el PSE es el resultado de la duración del período de crecimiento de la espiga, que ocurre durante (y puede estar relacionado a) la ERTA (González *et al.* 2003), la tasa de crecimiento del cultivo durante este período y la partición de biomasa hacia la espiga, según descripto por Fischer (1983). Algunos experimentos en los que se manipuló la duración de la ERTA mediante extensiones de fotoperíodo, en condiciones controladas (Miralles *et al.* 2000) o a campo (González *et al.* 2003a), o por medio de distintas combinaciones alélicas para genes de desarrollo (González *et al.* 2005b, Prieto *et al.* 2018, Pérez-Gianmarco *et al.* 2019- Capítulo 3) demostraron que una mayor duración de la etapa está asociada a un mayor número de flores fértiles, debido principalmente al menor aborto de flores (González *et al.* 2011a). También existen reportes de ensayos a campo en los que cultivares con una mayor duración relativa de la ERTA alcanzaron mayores rendimientos que aquellos con menor participación de esa etapa en el ciclo a antesis, tanto en Australia (Acuña *et al.* 2019) como en Argentina (García *et al.* 2011). Todo esto apoya la hipótesis de que si se pudiera aumentar la duración de la ERTA sin afectar el tiempo antesis (que ya es óptimo en las regiones con programas de mejoramiento bien establecidos) aumentaría el peso seco en la espiga en AN (PSE) y con ello el número de flores fértiles en antesis (NFF), incrementando el rendimiento potencial (Slafer *et al.* 1996, 2001).

Para poder optimizar la duración relativa de las etapas pre-antesis, es necesario modificar la duración de cada una de ellas de forma independiente. Se ha planteado que

una de las alternativa para hacerlo, sería manipular la respuesta a fotoperíodo, de las etapas pre-antesis (Rahman y Wilson 1977, Slafer *et al.* 1996), que se encuentra asociada a los genes *Ppd-1*, como venimos analizando y discutiendo en esta tesis. En los capítulos previos de esta tesis no se han podido encontrar alelos *Ppd-1* vinculados a la sensibilidad a fotoperíodo de alguna etapa en particular (Pérez-Gianmarco *et al*. 2018, 2020- Capítulos 2 y 4). En cambio otros autores sí han visto distintos efectos de estos alelos sobre la duración de las etapas: Sacrth *et al*. (1985) y González *et al.* (2005b) registraron efectos de *Ppd-B1a* exclusivamente sobre la etapa de diferenciación de espiguillas, previa a ET, mientras que otros estudios reportan que este acortó la duración de todas las etapas ontogénicas a antesis en una proporción similar (Whitechurch y Slafer 2002, Ochagavía *et al.* 2017, Pérez-Gianmarco *et al.* 2018- Capítulo 2). En contraste, *Ppd-D1a* siempre se asoció a menor duración de la ERTA, así como también el resto de las etapas pre-antesis (Whitechurch y Slafer 2002, Foulkes *et al.* 2004, Gonzalez *et al.* 2005b*,* Ochagavía *et al.* 2017, Pérez-Gianmarco *et al.* 2018- Capítulo 2). Gonzalez *et al.* (2005b) encontraron respuesta directa a la extensión de fotoperíodo en la ERTA sólo en ausencia de *Ppd-D1a*, y en esos casos esa respuesta estuvo asociada a menor NFF por una disminución en el PSE. Trabajando con otras líneas con variabilidad en *Ppd-1*, Whitechurch y Slafer (2002) no encontraron respuesta en la duración de la ERTA ante extensiones de fotoperíodo en líneas portadoras de *Ppd-B1a*, y para la única línea que sí mostró respuesta en la duración de la ERTA, portadora de *Ppd-1b* en los tres genomas, no encontraron respuesta de los componentes de rendimiento a cambios en el fotoperíodo.

Por la dificultad que representan los experimentos de manipulación de fotoperíodo a campo y la relativamente reciente disponibilidad de líneas isogénicas con una diversidad de alelos *Ppd-1a* en los tres genomas, aún es poco claro si distintas combinaciones alélicas para *Ppd-1* determinan diferencias en la respuesta directa a fotoperíodo en la ERTA, mientras que no existen reportes para el efecto de *Ppd-A1a* sobre esta característica. El objetivo de este trabajo fue profundizar el conocimiento del efecto de distintos alelos de *Ppd-1* sobre la respuesta directa de i) la duración y ii) de los componentes fisiológicos del rendimiento potencial, a cambios en el fotoperíodo solo durante la ERTA, en ensayos a campo en tres ambientes fotoperíodicos contrastantes.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Material vegetal

Para evaluar el efecto de distintos alelos de insensibilidad al fotoperíodo sobre la respuesta a extensiones de fotoperíodo durante la ERTA, se usaron el cultivar primaveral Paragon y cinco líneas isogénicas simples portadoras de un alelo *Ppd-1a* en *Ppd-A1*, *Ppd-B1* o *Ppd-D1* (ver detalle en Cuadro 5.1.1).

Cuadro 5.2.1: Genotipo de cada línea isogénica (NIL) para los genomas A, B y D. Los alelos Ppd-1a están asociados a fenotipos insensibles a fotoperíodo.

NIL	Genoma A	Genoma B	Genoma D	Dador del *Ppd-1a*
Paragon	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	
P(CS-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Chinese Spring
P(S64-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Sonora 64
P(GS100-2A)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	GS-100
P(S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Sonora 64
P(O-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Opata

5.2.2 Condiciones experimentales y tratamientos

Para evaluar el efecto de los genes *Ppd-1* sobre la respuesta directa a fotoperíodo durante la ERTA, se expuso a las parcelas a dos tratamientos de fotoperíodo contrastantes durante esa etapa: a) fotoperíodo natural ("0/0") o b) fotoperíodo extendido por 6 horas sobre el natural ("0/6"). Todas las parcelas fueron expuestas a fotoperíodo natural de la estación de crecimiento desde su emergencia hasta la diferenciación de la espiguilla terminal en el vástago principal. Para realizar las extensiones de fotoperíodo se usaron estructuras lumínicas portátiles de baja emisión de radiación, activadas por medio de un temporizador automático (González *et al.* 2003, ver Capítulo 4). El temporizador fue actualizado semanalmente para mantener los tratamientos de extensión de fotoperíodo desde la caída del sol por debajo de la línea del horizonte (encendido) hasta 6 h después del crepúsculo civil (apagado). Las estructuras fueron ubicadas sobre la parcela el día en que se detectó ET y permanecieron sobre la misma hasta el momento en que esa parcela llegó a AN.

Los experimentos se realizaron en parcelas a campo durante tres campañas en dos localidades de distinta latitud (y por lo tanto distinta marcha anual del fotoperíodo, ver detalle en Cuadro 5.1.2 y Fig. 5.1) bajo condiciones potenciales de crecimiento (i.e. sin restricciones nutricionales ni hídricas y con manejo de enfermedades, insectos y malezas). Por simplicidad, se refiere a los experimentos por el año en que se desarrolló mayormente cada uno (2013, 2014 o 2015). Los tres experimentos fueron realizados usando una combinación factorial de los genotipos y de los tratamientos de fotoperíodo, usando un diseño en parcelas divididas con tres bloques. Por limitaciones de espacio y disponibilidad de semilla, no se usaron P(S64-2B) ni P(O-2D) en el experimento llevado a cabo en Lleida durante 2015.

Cuadro 5.2.2: Detalle de condiciones experimentales para cada campaña en la que se realizó el experimento, incluyendo fecha de siembra (FDS), densidad de siembra en semilas por metro cuadrado (DDS) y la superficie ocupada por cada unidad experimental, en metros cuadrados (SUP).

Localidad	Campaña	FDS	DDS	SUP
Pergamino	2013	17 de julio	300	1,50
Pergamino	2014	05 de junio	250	2,25
Lleida	2015	17 de noviembre	300	3,50

5.2.3 Mediciones realizadas

Se tomaron mediciones de fenología tanto interna como externa, registrando los momentos de emergencia (EM), espiguilla terminal (ET), hoja bandera (HB) y antesis (AN). Se definió a la etapa reproductiva tardía (ERTA) como a la etapa que tuvo lugar entre ET y AN. Para determinar el momento de ET, según la escala de Gardner *et al.* (1985), se realizaron disecciones periódicas de una planta por unidad experimental. Los estados de HB y AN se registraron cuando el 50% de las plantas en la parcela llegaron a 39 y 65, respectivamente, en la escala de Zadoks *et al.* (1974). Se utilizó una temperatura base de 0º C para calcular el tiempo térmico acumulado entre estos eventos. Desde EM y hasta HB, se registró dos veces por semana el número de hojas por planta en dos plantas seleccionadas por parcela según la escala de Haun (1973), para determinar el número final de hojas y el filocrono (ºC d). Para estimar el filocrono se

calculó la inversa de la tasa obtenida de la relación entre el número de hojas y el tiempo térmico acumulado desde EM.

Cuando cada parcela alcanzó AN, se tomaron las plantas de 40 cm (2013 y 2014) o 50 cm (2015) lineales del surco central de la parcela para evaluar cambios en determinantes numéricos y fisiológicos del rendimiento. Se contó el número de espigas totales y, relacionándolo a la superficie del muestreo en cada caso, se calculó el número de espigas m^{-2}. De esta muestra se tomaron a su vez 4 plantas representativas y en todas las espigas de estas cuatro plantas se registró el número de flores fértiles por espiguilla y por espiga (NFF ESP^{-1}) de acuerdo a lo explicado en el Capítulo 3 (ítem 3.3.2). Se calculó el número de flores fértiles totales en todas las espigas de las cuatro plantas y se obtuvo el número de flores fértiles por planta (NFF pl^{-1}). Multiplicando a este último por el número de espigas m^{-2} se obutvo el número de flores fértiles por $m^{-}2$ (NFF $m^{-}2$). Las espigas de estas cuatro plantas se unieron a las del resto de la muestra y se secaron en estufa a 65-70 ºC para registrar el peso seco de las espigas en antesis (g m^{-2}, PSE). El mismo procedimiento se realizó con el resto de la biomasa no-espiga para obtener así el valor de biomasa total m^{-2}. Se obtuvo el valor de partición dividiendo el PSE por el valor de biomasa total m^{-2}.

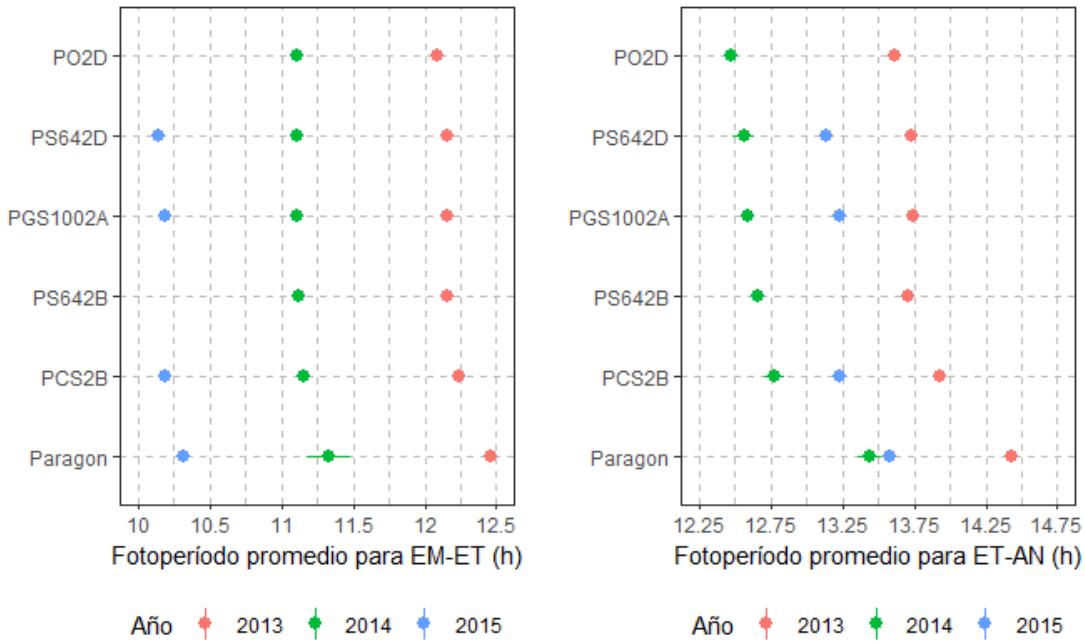

Figura 5.1: Resumen de fotoperíodo promedio explorado por los distintos genotipos en las distintas campañas durante las fases EM-ET y ET-AN

5.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

En primera instancia se realizó un ANOVA (α = 0,05) para determinar diferencias resultado de la introgresión de alelos de insensibilidad *Ppd-1a*, exclusivamente. Para ello, se tuvieron en cuenta sólo los datos provenientes de las parcelas bajo el tratamiento de fotoperíodo natural durante el ciclo completo (i.e. sin extensión de fotoperíodo) mediante un ANOVA con bloques completamente aleatorizados, según el modelo:

$$y_{ij} = \mu + \beta_j + \gamma_i + \varepsilon_{ij}$$

en el que μ es la media general; β_j, el efecto del bloque; γ_j el efecto de las líneas y ε_{ij}, el error experimental. Posteriormente, se efectuaron pruebas de comparación de medias de Tukey (α = 0,05) para determinar diferencias entre las líneas portadoras de distintos alelos *Ppd-1a*.

Para analizar el efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre la respuesta directa a la extensión de fotoperíodo en cada variable de interés, se realizó un segundo ANOVA (α = 0,05), teniendo en cuenta el efecto de los tratamientos de extensión de fotoperíodo y su interacción con el de los alelos *Ppd-1a*, según el modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \sigma_{ij} + \gamma_k + (\tau\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

en el que μ es la media general; τ_i, el efecto del tratamiento de extensión del fotoperíodo; β_j, el efecto del bloque; σ_{ij}, la interacción bloque por tratamiento de extensión de fotoperíodo, a usarse como error para el efecto del tratamiento de fotoperíodo; γ_k el efecto de las líneas; $(\tau\gamma)_{ik}$, la interacción líneas por tratamiento de extensión de fotoperíodo y ε_{ijk}, el error experimental. Se utilizó un diseño en bloques con parcelas divididas en el que los tratamientos de extensión de fotoperíodo se asignaron a las parcelas mayores, mientras que los distintos genotipos representaron a las sub-parcelas. Se usaron pruebas de contrastes (α = 0,05) para detectar respuesta a los tratamientos de extensión de fotoperíodo en cada variable de interés en cada una de las líneas portadoras de los distintos alelos. Estos análisis fueron llevados a cabo usando el software InfoStat/P (Di Rienzo *et al.* 2011). Se utilizaron regresiones lineales simples para probar la relación entre determinantes fisiológicos del rendimiento y regresión lineal múltiple para conocer el impacto de la tasa de aparición de hojas (o su inversa, el filocrono) y del número final de hojas sobre el tiempo térmico acumulado hasta la aparición de la hoja bandera, mediante la función lm() en R (R Core Team, 2018).

5.3 Resultados

5.3.1 Efecto de los genes sobre la fenología bajo fotoperíodo natural

Cada genotipo con al menos un alelo *Ppd-1a* mostró una menor suma térmica desde EM a AN comparada a aquella de Paragon bajo fotoperíodo natural (Fig. 5.2). La magnitud de esta diferencia alcanzó valores de hasta *c.* 440, 550 y 230 ºC d durante las campañas 2013, 2014 y 2015, respectivamente. En cada caso, los genotipos con la menor duración desde EM a AN fueron aquellos que portaban el alelo *Ppd-D1a*. La línea P(CS-2B), portadora de la variante alélica de Chinese Spring de *Ppd-B1a*, alcanzó una duración intermedia para la etapa EM-AN, difiriendo significativamente en todas las campañas de al menos aquellas líneas que mostraron duraciones extremas. También mostraron una mayor duración EM-AN que las líneas portadoras de *Ppd-A1a* en dos de las tres campañas.

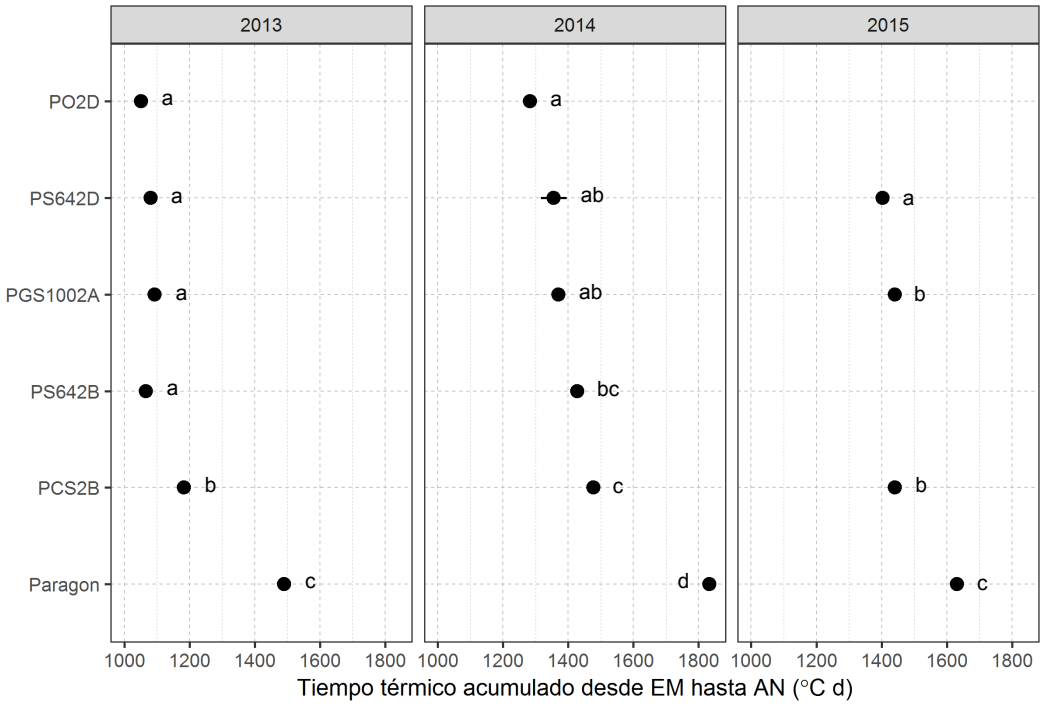

Figura 5.2 Tiempo térmico acumulado desde emergencia (EM) a antesis (AN) bajo fotoperíodo natural. Las barras de error de extienden desde la media +/- el error estándar de la media. Letras compartidas entre genotipos para la misma campaña indican que la diferencia entre los mismos no es significativa según la prueba de Tukey (α = 0,05).

La duración EM-AN estuvo alta y positivamente correlacionada a la duración desde EM hasta aparición de la hoja bandera (EM-HB, r Pearson = 0,99, $p < 0{,}01$), mientras que la correlación con la etapa de elongación del pedúnculo (HB-AN) fue menos clara (r Pearson = 0,56, $p < 0{,}01$). La aparición de la hoja bandera fue acelerada por los alelos de insensibilidad de forma semejante al efecto que tuvieron sobre la duración EM-AN, aunque no se identificó ninguna tendencia para el efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre la duración de HB-AN.

El adelantamiento de la aparición de la HB en líneas portadoras de algún alelo de insensibilidad *Ppd-1a* con respecto a Paragon resultó en la reducción en el NFH como la disminución en el filocrono. Los alelos *Ppd-1a* adelantaron la aparición de la HB durante las tres campañas por al menos *c.* 215 ºC d y hasta 531 ºC d en 2014 y 2015, respectivamente. Esto fue resultado principalmente de que las líneas con algún grado de insensibilidad diferenciaron menos hojas que Paragon, que produjo entre *c.* 1 y *c.* 3 hojas más que el resto de los genotipos bajo fotoperíodo natural (Fig. 5.3). Las diferencias en la duracion EM-HB entre líneas con algún grado de insensibilidad (i.e. con un alelo *Ppd-1a*) fueron establecidas principalmente por diferencias en el filocrono (Fig. 5.4). La duracion EM-HB estuvo relacionada entonces tanto al NFH como al filocrono, ambas variables reducidas por efecto de los alelos *Ppd-1a*: la regresión múltiple que las relaciona alcanzó un R^2 ajustado de 0,94, con un $p < 0{,}001$. Mientras que cada hoja retrasó HB en promedio 101 °C d, cada unidad de cambio en el filocrono lo hizo en *c.* 8,6 °C d.

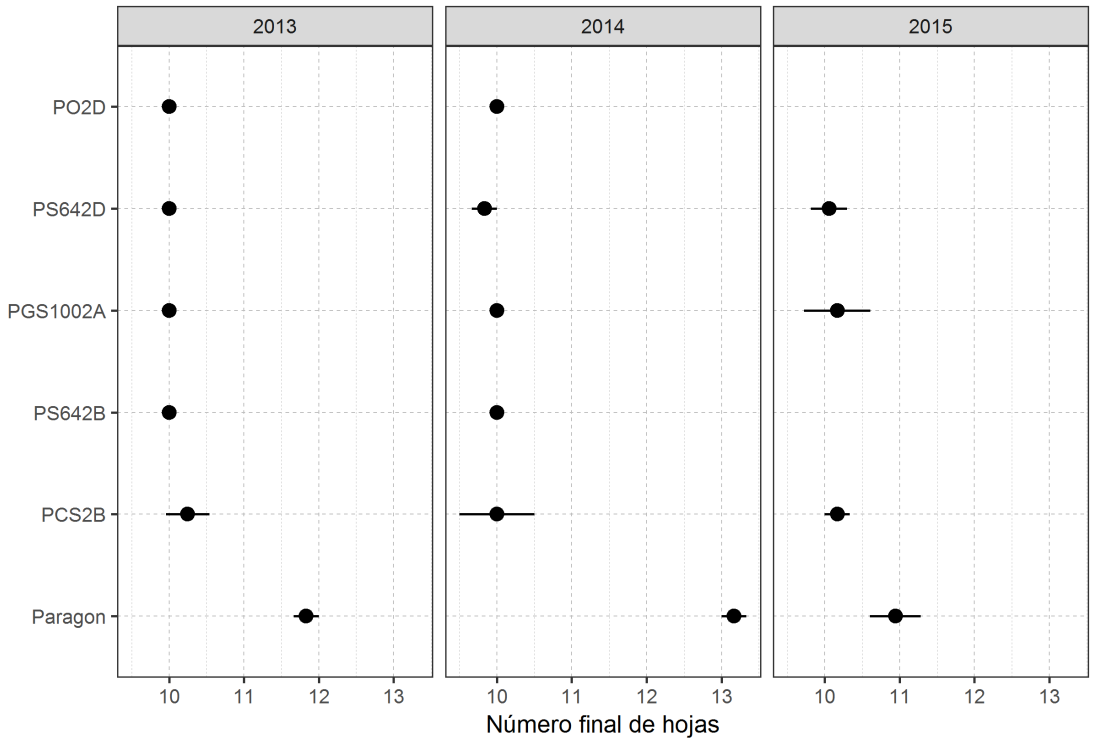

Figura 5.3: Número final de hojas en el vástago principal bajo fotoperíodo natural para cada genótipo em cada uma de las tres campañas. Las barras de error de extienden desde la media +/- el error estándar de la media.

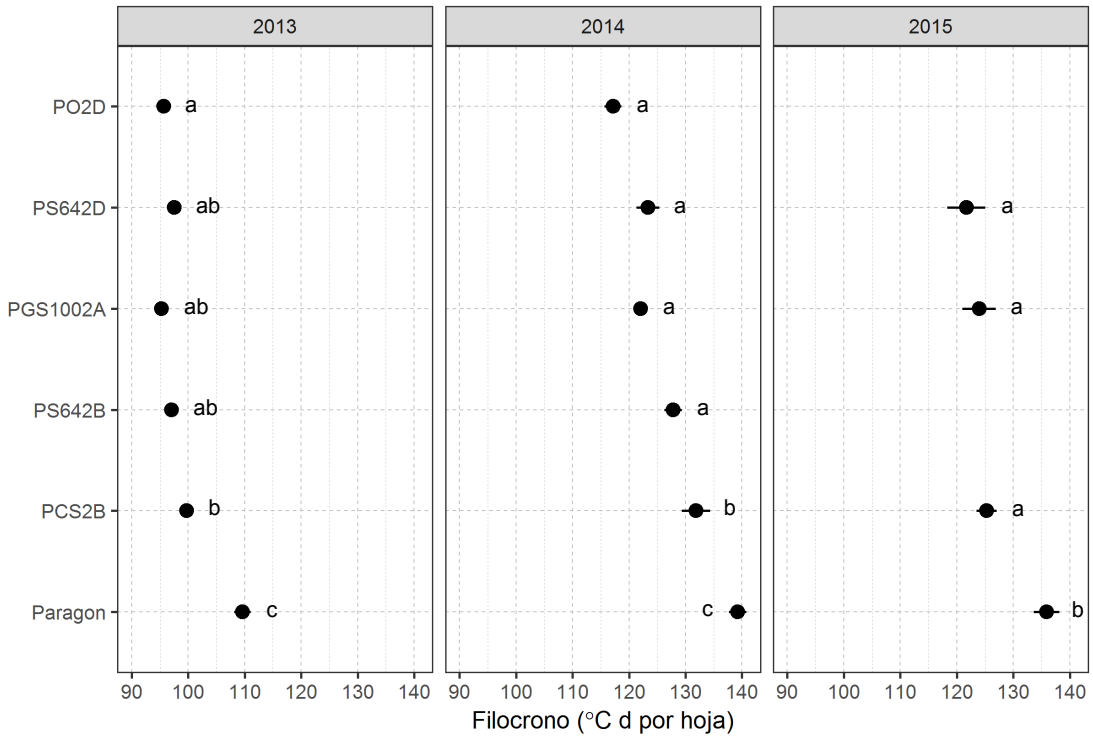

Figura 5.4: Filocrono promedio obtenido de la dinámica de aparición de hojas para genotipos creciendo bajo fotoperíodo natural. El punto representa el valor medio del ajuste y las barras de error se extienden desde el mismo hasta más y menos el valor del error estándar del ajuste.

Todos los alelos *Ppd-1a* aceleraron significativamente la iniciación de la ET con respecto a Paragon en las tres campañas (Fig. 5.5). La magnitud de dicho efecto

dependió de la variante alélica considerada: mientras que la duración de la etapa EM-ET de P(CS-2B), portador de una variante de *Ppd-B1a*, fue menor que la de Paragon, fue también mayor que la de líneas con alelos de insensibilidad *Ppd-D1a* o *Ppd-A1a*. La significancia de esta diferencia dependió de la campaña bajo consideración, siendo particularmente notoria durante 2014.

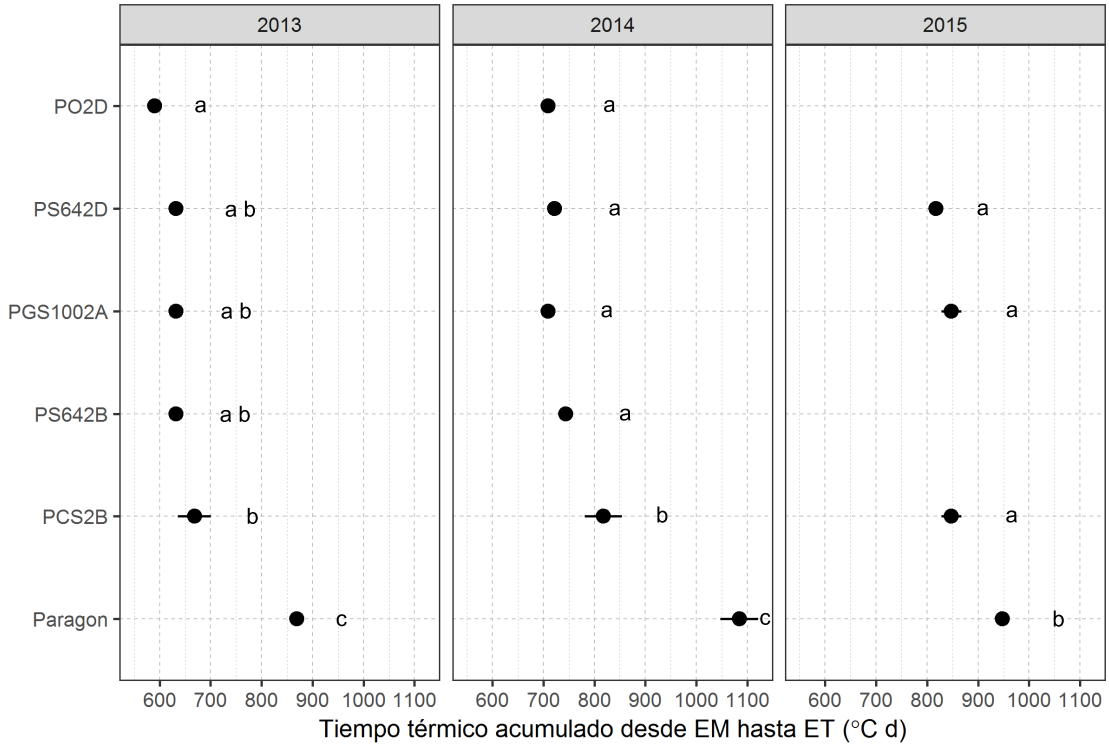

Figura 5.5: Tiempo térmico acumulado desde emergencia (EM) a espiguilla terminal (ET) bajo fotoperíodo natural. Las barras de error se extienden desde la media +/- el error estándar de la media. Letras compartidas entre genotipos para la misma campaña indican que la diferencia entre los mismos no es significativa según la prueba de Tukey (α = 0,05).

5.3.2 Efecto de los genes sobre la respuesta directa a extensiones de fotoperíodo durante la ERTA

Los alelos de insensibilidad *Ppd-1a* también acortaron la duración de la ERTA bajo fotoperíodo natural (ver símbolos llenos entre genotipos para cada campaña en la Fig. 5.6). La magnitud de este efecto varió desde *c.* 95 a 185 ºC d. Los alelos *Ppd-D1a* fueron los que más acortaron la ERTA, mientras que *Ppd-A1a* tuvo una magnitud comparable a éste, excepto para la campaña 2014, cuando su efecto fue levemente menor que el de *Ppd-D1a*. Los alelos *Ppd-B1a* ejercieron efectos más débiles, particularmente el de P(CS-2B). Esta línea tuvo una mayor duración de la ERTA que aquellas que portaron otros alelos de insensibilidad durante las campañas 2013 y 2014. No se detectaron diferencias significativas para la duración de la ERTA entre líneas con algún alelo *Ppd-1a* para la campaña 2015, pero en todas las campañas la ERTA de las líneas con algún grado de insensibilidad fue más breve que la de Paragon, con tres *Ppd-1b*.

La respuesta a los tratamientos de extensión de fotoperíodo varió entre genotipos y campañas (ver distancia entre símbolos para cada panel en Fig. 5.6). Paragon siempre respondió significativamente a los tratamientos de extensión de fotoperíodo con un acortamiento en la duración de su ERTA con una magnitud de ese acortamiento que

varió entre 85 y 115 ºC d. Para la campaña 2013, sólo Paragon mostró respuesta en la duración de la ERTA a los tratamientos de extensión de fotoperíodo. En contraste, para la campaña 2014, con una siembra *c.* 6 semanas adelantada con respecto a la de 2013, todos los genotipos a excepción de P(O-2D) (*Ppd-D1a*) acortaron la duración de la ERTA ante exposiciones a fotoperíodo extendido durante la misma. Todos los genotipos mostraron respuestas significativas durante la campaña 2015, aunque la magnitud promedio de esta respuesta fue menor que para la campaña 2014. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey α = 0,05) entre los genoptipos con algún *Ppd-1a* para la magnitud del acortamiento de la ERTA en respuesta al fotoperíodo en cada campaña.

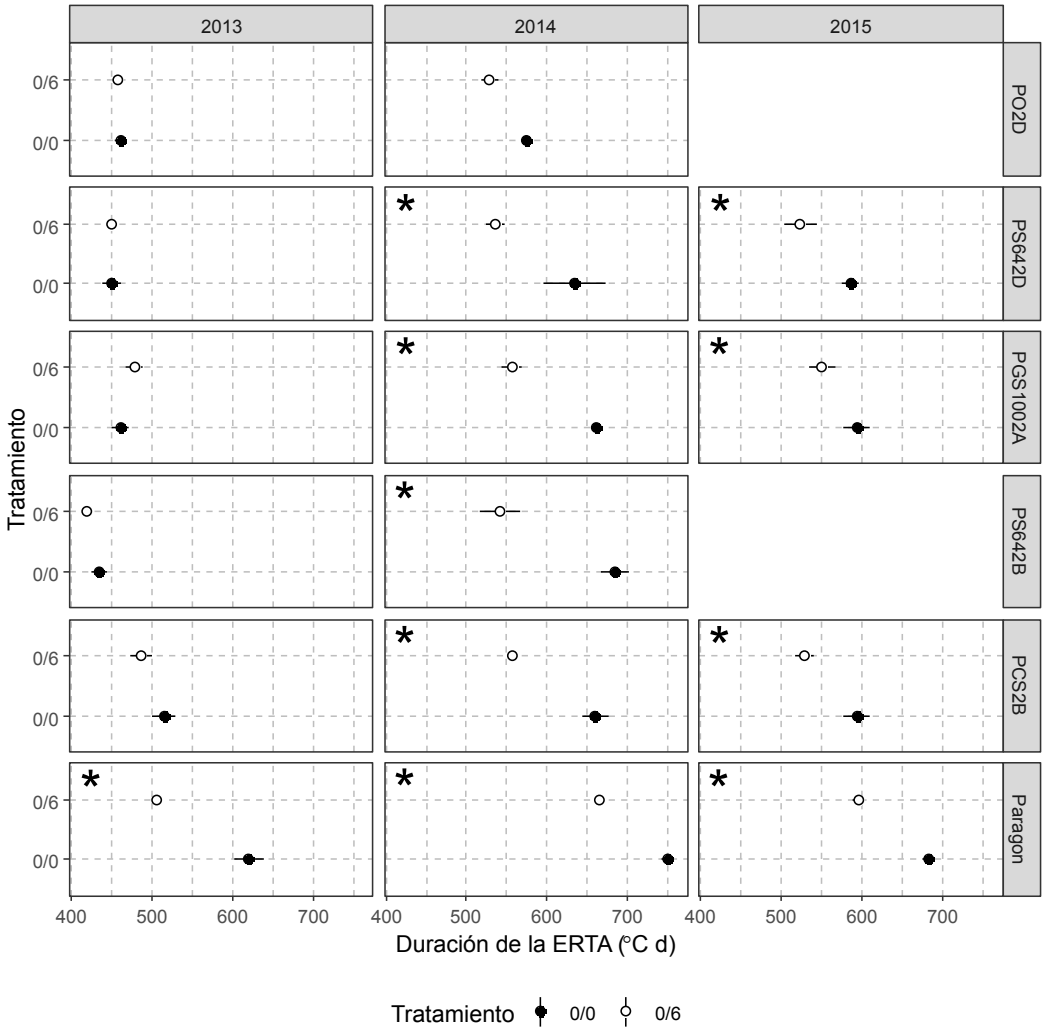

Figura 5.6: Duración de la ERTA según el tratamiento de extensión de fotoperíodo para cada genotipo en tres campañas (2013, 2014 y 2015). Los puntos muestran la media obtenida de tres repeticiones y las barras de error se extienden desde la media +/- su error estándar. Los asteriscos indican significancia de la respuesta para ese genotipo en esa campaña según contraste entre tratamientos (α = 0,05).

Bajo fotoperíodo natural, Paragon alcanzó los mayores valores de peso seco de la espiga en antesis (PSE), que fueron hasta un 43, 42 y 25 % mayores que los de los genotipos con menores PSE en las campañas 2013, 2014 y 2015, excepto P(GS-100-2A) en 2015 (Fig. 5.7). Sin embargo, las diferencias entre genotipos para cada campaña no fueron estadísticamente significativas.

Las respuestas de disminución de PSE ante la exposición a fotoperíodos extendidos estuvieron casi completamente restringidas a Paragon, el único genotipo que mostró respuestas significativas en dos de las tres campañas. P(S64-2B) mostró una respuesta de menor magnitud, pero aún significativa estadísticamente para la campaña 2014 (Fig. 5.7).

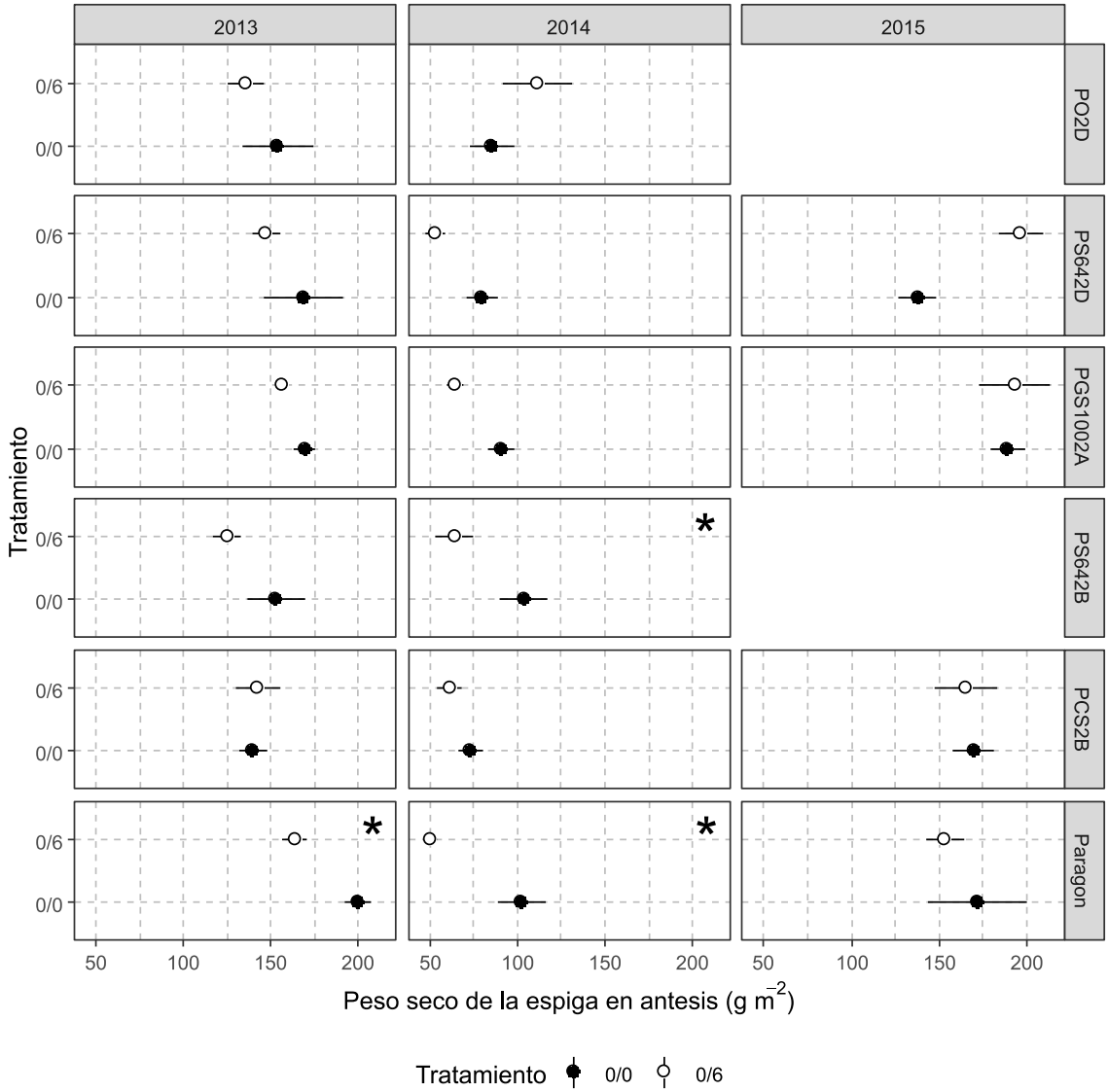

Figura 5.7: Respuesta del peso seco de la espiga en antesis por metro cuadrado para cada genotipo en las tres campañas. Los símbolos muestran la media de tres unidades experimentales y las barras de error se extienden hasta +/- su error estándar. Los asteriscos indican significancia de la respuesta para ese genotipo en esa campaña según contraste entre tratamientos (α = 0,05).

Analizando en forma conjunta todas las campañas y tratamientos el PSE estuvo relacionado tanto a la RFAia como a la partición de biomasa a las espigas (R^2_{aj} = 0,78, p < 0,001). Dicha regresión múltiple con las variables escaladas mostró que el efecto de la RFAia (0,51 ± 0,05, p < 0,001) fue similar al que tuvo la partición de biomasa (0,61 ± 0,05, p < 0,001) sobre el PSE. Asimismo, la RFAia estuvo significativamente asociada a la duración de la ERTA en cada campaña, tanto cuando la ERTA se midió en tiempo térmico (R^2_{aj} = 0,96, p < 0,01) como en días (R^2_{aj} = 0,89, p < 0,001). Sin embargo, el efecto

de los genes *Ppd-1* sobre la respuesta de la duración de la ERTA a cambios en el fotoperíodo (Fig. 5.6) no siempre estuvo relacionado a un efecto equivalente sobre la respuesta del PSE (Fig. 5.7).

Al considerar tanto las diferencias entre campañas y genotipos y la variabilidad en la partición de biomasa a las espigas, fue posible distinguir algunas tendencias que permitieran explicarlo. La más clara es aquella que se puede establecer para Paragon, ya que en las tres campañas, la disminución en la duración de ERTA por respuesta a fotoperído estuvo acompañada de una reducción en el PSE (ver diferencias entre símbolos llenos y vacíos en Fig. 5.8). Si bien en algunas otras líneas se observó la misma tendencia en algunos años, hay otros en los que la menor respuesta en duración de la ERTA no tuvo impacto sobre el PSE o éste fue inverso al esperado. En estos casos, se destaca el efecto de compensación de la menor duración de la ERTA con un aumento en la partición de biomasa a espiga, el otro componente que permite explicar la variación en PSE. Esto se observó sobre todo para las campañas 2013 y 2015 cuando las respuestas en duración de la ERTA de las líneas con algún grado de insensibilidad fueron menores que en 2014. En general, mayores duraciones de ERTA estuvieron asociadas a menores valores de partición a espiga.

Aunque las diferencias entre genotipos en NFF m^{-2} bajo fotoperíodo natural no fueron significativas estadísticamente para ninguna de las tres campañas, Paragon siempre tendió a lograr más flores fértiles por unidad de superficie que el resto de los genotipos (Fig. 5.9). La respuesta del NFF m^{-2} de los genotipos a la extensión de fotoperíodo varió con la campaña. La extensión de fotoperíodo generó una reducción en el $\mathrm{NFF\,m^{-2}}$ en P(S64-2B) solamente durante la campaña 2013, mientras que tanto Paragon como P(GS-100-2A) y P(S64-2D) respondieron de la misma manera durante 2014 y P(CS-2B) mostró una fuerte tendencia (p = 0,06). El NFF m^{-2} estuvo fuerte y positivamente asociado al PSE para cada uno de los tres ambientes contemplando ambos tratamientos de fotoperíodo (Fig. 5.9, R^2 = 0,67, 0,80 y 0,66 para 2013, 2014 y 2015 respectivamente, con $p < 0{,}05$ en todos los casos).

Las diferencias en $\mathrm{NFF\,m^{-2}}$ debidas a efectos de *Ppd-1a* o en respuesta a los tratamientos de fotoperíodo impuestos (en Paragon, P(CS-2B) y P(S64-2B)) se debieron principalmente a cambios en el $\mathrm{NFF\,espiga^{-1}}$: las dos variables están positivamente correlacionadas (r Pearson 0,61, $p < 0{,}01$). Si bien hubo variabilidad para el número de espigas m^{-2}, otra variable que podría haber mediado en la respuesta del $\mathrm{NFF\,m^{-2}}$ dada su alta correlación (r Pearson 0,82, $p < 0{,}01$), la misma no estuvo consistentemente asociada a variabilidad en *Ppd-1* ni a los tratamientos de fotoperíodo.

La respuesta del NFF $espiga^{-1}$ a cambios en el fotoperíodo fue clara en el perfil de fertilidad de las espigas de Paragon durante las campañas 2014 y 2015 (Fig. 5.10) y se encontró concentrada en las espiguillas centrales (2014, 2015) aunque también se observaron diferencias en espiguillas más basales (2015) y apicales (2014). Las líneas portadoras de *Ppd-B1a* de Chinese Spring (2015) y Sonora 64 (2013) y *Ppd-D1a* de Sonora 64 (2015) también mostraron respuesta, aunque de menor magnitud y de forma menos consistente (Fig. 5.10). La misma estuvo concentrada principalmente en espiguillas ubicadas desde el centro hacia la zona más basal de la espiga.

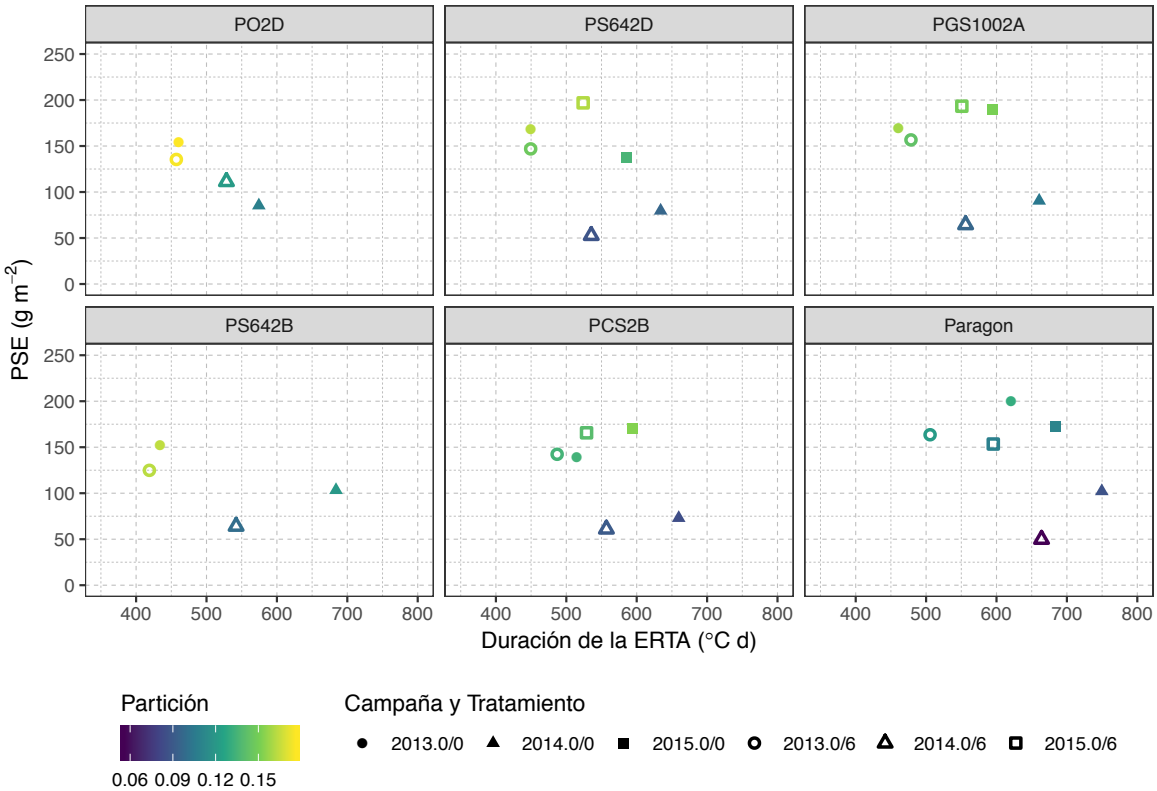

Figura 5.8: Peso seco de espigas en antesis por unidad de área (PSE) en relación a la duración de la etapa reproductiva tardía (ERTA) en tiempo térmico (ºC d). El gradiente de color indica la partición de biomasa a la espiga.

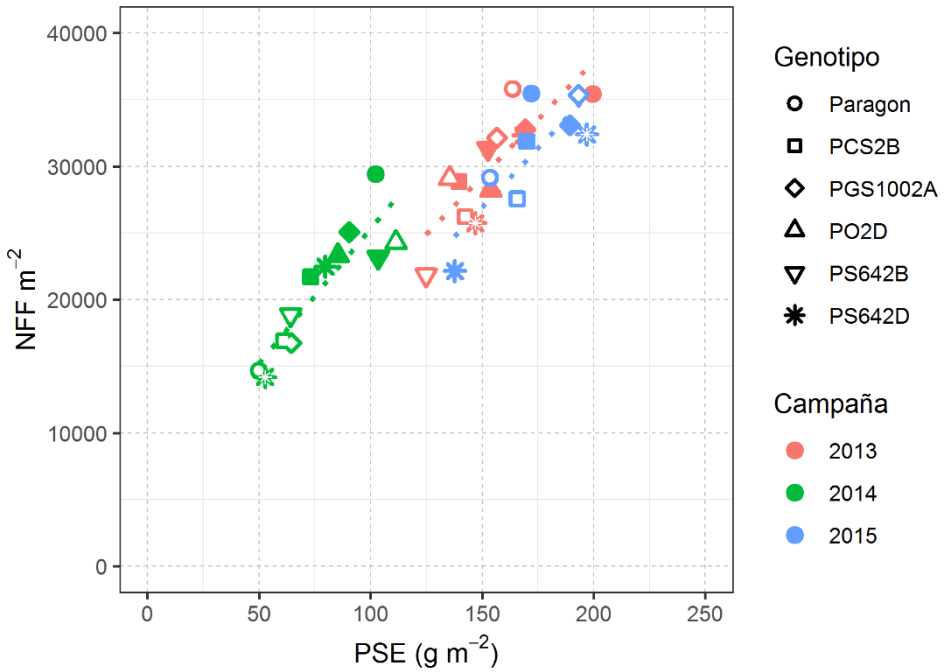

Figura 5.9: Número de flores fértiles por metro cuadrado (NFF m^{-2}) en relación al peso seco de la espiga en antesis en la misma superficie (PSE m^{-2}). Símbolos vacíos y llenos representan medias de parcelas bajo fotoperíodo extendido y natural, respectivamente.

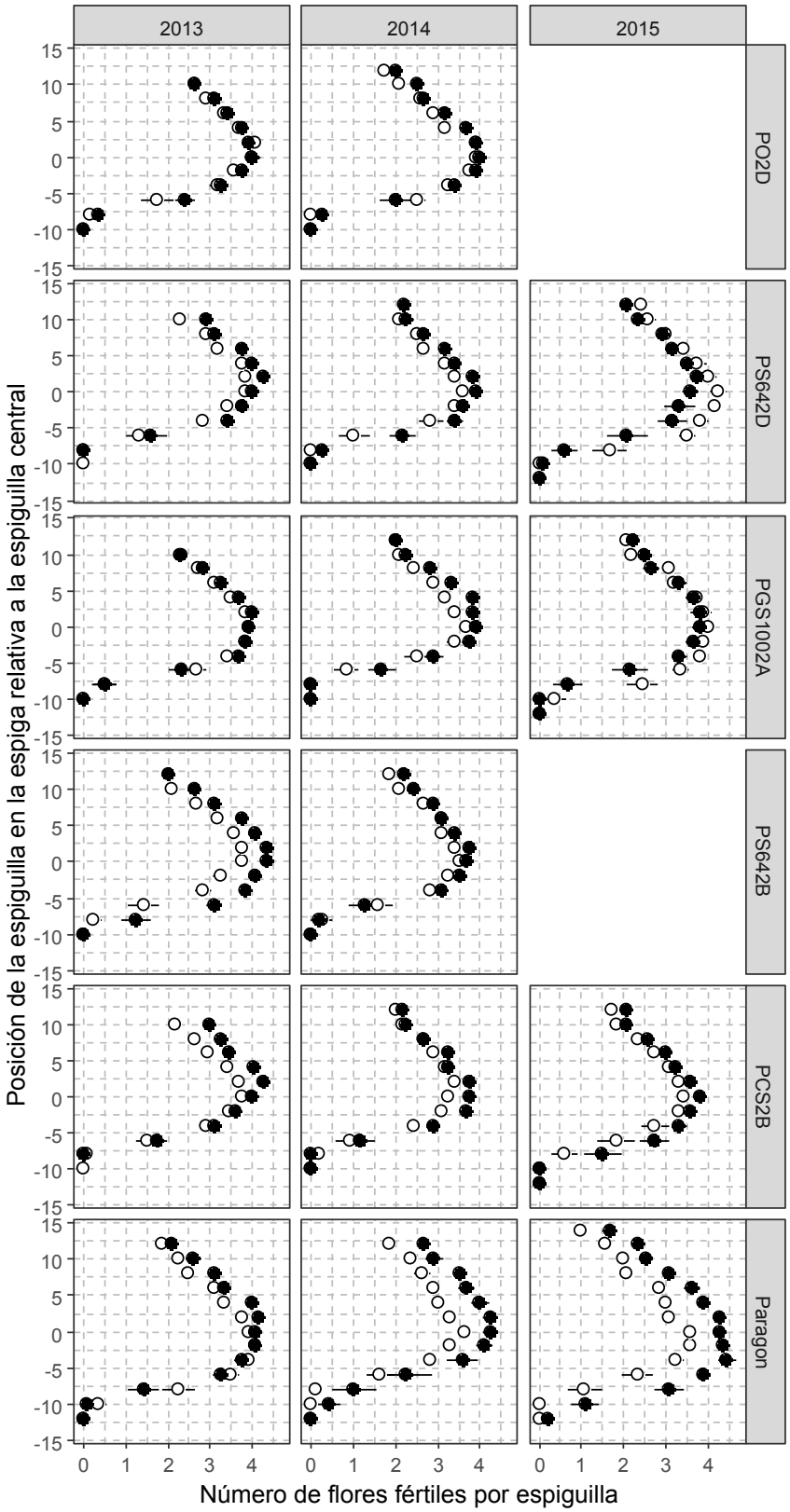

Figura 5.10: Perfil de fertilidad de una espiga promedio del vástago principal centradas por su espiguilla central. Cada gráfico muestra el número de flores fértiles por espiguilla en antesis en una mitad de la espiga y en la espiguilla terminal. Símbolos vacíos muestran datos correspondientes a fotoperíodo extendido (0/6) y los llenos, a fotoperíodo natural (0/0). Las barras de error se extienden has +/- el error estándar de la media.

5.4 Discusión

5.4.1 Respuesta a fotoperíodo de la duración de la etapa reproductiva tardía

Cuando se revisan los resultados de todas las campañas en conjunto, puede pensarse que los genes *Ppd-1* hubieran afectado la respuesta directa a cambios en fotoperíodo durante la ERTA. Paragon siempre respondió significativamente a los tratamientos de extensión de fotoperíodo con un acortamiento en la duración de su ERTA, mientras que la introgresión de cualquier alelo *Ppd-1a* disminuyó tanto la frecuencia con la que se identificaron respuestas significativas a través de las campañas como la magnitud de las mismas en los casos en que las hubo. Aunque la magnitud de las respuestas no pudo asociarse directamente con el gradiente de sensibilidad reportado para los alelos *Ppd-1a* en el Capítulo 4, que incluye efectos directos y de memoria, podría decirse que la respuesta directa de Paragon fue relativamente mayor: El comienzo de la ERTA en Paragon se dio entre *c.* una semana (2015) y un mes y medio (2014) más tarde que en las líneas insensibles. Esto expuso la ERTA de Paragon a fotoperíodos promedio durante esa etapa entre 0,5 y 0,75 h mayores a los que experimentaron las otras líneas (Fig. 5.1), y aun así mostró valores similares o mayores de respuesta que las líneas insensibles. El caso extremo se dio en 2013, cuando, por una siembra relativamente tardía, todos los genotipos exploraron fotoperíodos mayores durante la ERTA (Fig. 5.1). Paragon, por su lado, experimentó fotoperíodos c. 1 h mayores que los explorados por los genotipos insensibles durante dicha campaña (Fig. 5.1), y aun así mostró respuesta a la extensión de fotoperíodo cuando ningún otro genotipo lo hizo (Fig. 5.6). Estos resultados concuerdan parcialmente con reportes en los que no se encontró respuesta a extensión de fotoperíodo en líneas portadoras de *Ppd-D1a* (Whitechurch y Slafer 2002, González *et al.* 2005b) ni de *Ppd-B1a* de Chinese Spring (Whitechurch y Slafer 2002), similar a los resultados de la campaña 2013.

Esta tendencia se desvanece cuando se evalúan las campañas de forma individual. En 2014 y 2015, los genotipos portadores de cada una de las variantes probadas de *Ppd-1a* respondieron a la extensión de fotoperíodo durante la ERTA, acortándola significativamente, es decir, mostraron respuesta directa (Fig. 5.6). Tampoco se pudieron detectar diferencias en la magnitud de esa respuesta de la ERTA entre genotipos con distintos alelos *Ppd-1a*. Este punto estaría de acuerdo con lo concluido en el Capítulo 4 de esta tesis (y su publicación derivada (Pérez-Gianmarco *et al.* 2020), en el que se propone que los genes *Ppd-1* no controlan la sensibilidad a fotoperíodo actual durante la ERTA. Las diferencias entre las campañas pueden haber sido causadas por el fotoperíodo explorado no durante la ERTA, sino hasta el comienzo de la misma, es decir, desde la EM hasta ET. En 2013, cuando el fotoperíodo promedio durante esta etapa promedió más de 12 h en todos los genotipos (Fig. 5.1), puede que haya alcanzado valores puntuales cerca de ET lo suficientemente altos como para inducir la floración, sobretodo en líneas con algún alelo *Ppd-1a*, en las que la transcripción de estos genes es ya de por sí alta aún bajo fotoperíodos relativamente cortos (Shaw *et al.* 2012). Como el fotoperíodo promedio entre EM y ET durante las campañas 2014 y 2015 fue considerablemente menor, puede que haya sido lo suficientemente corto para permitir observar respuesta a extensiones de fotoperíodo, aun en los genotipos con algún grado de insensibilidad. El estudio de estos genotipos bajo tratamientos de transferencias recíprocas entre distintos fotoperíodos al momento de ET permitirá separar mejor las respuestas directa y memoria al fotoperíodo de la duración de la ERTA.

Aunque no se encontró evidencia concluyente que respalde el efecto de *Ppd-1* sobre la respuesta directa a cambios en el fotoperíodo durante la ERTA, existen reportes de cultivares que muestran diferencias entre ellos para esta característica (Slafer y Rawson 1997, Miralles *et al.* 2003, Whitechurch *et al.* 2007). Mientras que *Ppd-1* se considera como un gen mayor y el principal determinante de la respuesta a fotoperíodo (Scarth y Law 1984, Scarth *et al.* 1985, Snape *et al.* 2001), existen otros *loci* con efectos sobre esta característica también (Law *et al*. 1998, Cockram *et al*. 2007, Khlestkina *et al*. 2009). Sus efectos sobre la duración de las etapas pre-antesis y sus cambios en respuesta a fotoperíodo son aun desocnocidos, pero la variabilidad en estos *loci* a través de los cultivares de los estudios mencionados antes pudo haber dado origen a sus resultados. Por otro lado, estudios moleculares recientes sugieren que los sistemas de percepción del largo del día, en particular el fitocromo C, pueden regular el tiempo a floración a través de rutas metabólicas alternativas a aquella en la que participa *Ppd-1* (Pearce *et al.* 2016, 2017). En la medida en que se conozca más sobre las rutas metabólicas que regulan el desarrollo, mutantes de nuevos genes podrían ser útiles para seguir poniendo a prueba la hipótesis general de este capítulo.

5.4.2 Respuesta al fotoperíodo del número de flores fértiles en antesis y sus determinantes fisiológicos

La respuesta en duración de la ERTA no siempre estuvo acompañada por una respuesta en $\mathrm{NFF\,m^{-2}}$. Si bien dicha variable estuvo fuertemente asociada al PSE de acuerdo con la bibliografía (Fischer y Stockman 1980, Stockman *et al.* 1983), no siempre respondió a la extensión del fotoperíodo en el mismo sentido que la duración de la ERTA. Esto probablemente haya sido consecuencia de la poca variación en RFAia en respuesta a la extensión de fotoperíodo y de la compensación en PSE a través de un aumento en la partición de biomasa a espigas también como consecuencia del tratamiento de fotoperíodo. De manera similar, Whitechurch y Slafer (2002) tampoco encontraron respuesta en el número de granos en un genotipo con sus tres *Ppd-1b*, aun cuando sí acortó su ERTA ante extensiones de 4 y 7 h de fotoperíodo por sobre el natural. González *et al.* (2005b) también observaron esta falta de relación entre la respuesta de la ERTA y la del PSE ante extensiones de fotoperíodo en *Ppd-B1* (Chinese Spring), planteando como posible explicación cambios en la tasa de crecimiento de la espiga en respuesta a la extensión del fotoperíodo, como los reportados en Gonzalez *et al*. (2003a). En estos ensayos, la partición tendió a aumentar con las extensiones de fotoperíodo (ver gradiente de color en Fig. 5.8 entre símbolos llenos y vacíos), compensando la posible disminución en la radiación interceptada por leves disminuciones en la ERTA. Hay reportes que indican que la espiga puede adelantar el crecimiento a tasa máxima (más próximo al momento de diferenciación de la espiguilla terminal) en respuesta a la extensión del fotoperíodo (González *et al.* 2005a). En este y todos los reportes citados como antecedentes, la duración de la ERTA fue considerada como un *proxy* del período de crecimiento de la espiga, en concordancia con la bibliografía, por lo que tales cambios en la dinámica de crecimiento de la espiga pueden haber pasado desapercibidos. Para comprender mejor el efecto que *Ppd-1* y otros genes pudieran tener sobre el crecimiento de la espiga y su respuesta a cambios en el fotoperíodo, parecería ser necesario realizar el seguimiento de la dinámica de crecimiento de la espiga como sugiere Fischer (2011), aunque resultaría poco práctico para un gran número de combinaciones alélicas, tratamientos y repeticiones.

5.5 Conclusión

Todas las combinaciones alélicas en *Ppd-1* mostraron respuesta directa de la duración de la ERTA a cambios en el fotoperíodo, pero la magnitud de la respuesta de cada genotipo no pudo asociarse directamente con el gradiente de sensibilidad reportado para los alelos *Ppd-1a* que portaban. La respuesta en duración de la ERTA no siempre estuvo acompañada por una respuesta en NFF m^{-2} aunque esta variable estuvo muy relacionada al PSE. El efecto de los genes *Ppd-1* sobre la dinámica de crecimiento de la espiga y su relación con las etapas del desarrollo como se definen en este capítulo no son aún completamente comprendidas, pero a la luz los resultados obtenidos, parece poco probable que la sola manipulación de *Ppd-1* fuera a permitir ajustar la sensibilidad de las etapas de pre-antesis de manera independiente. La caracterización de otros genes que se sabe que están asociados a la respuesta a fotoperíodo, pero cuyo efecto sobre la fisiología del cultivo y su interacción con *Ppd-1* bajo distintos tratamientos de fotoperíodo han sido poco estudiados, permitiría seguir poniendo a prueba la hipótesis general de este capítulo.

Capítulo 6: Balance entre respuesta directa y memoria al fotoperíodo en el desarrollo a antesis según la composición alélica en *Ppd-1*

6.1 Introducción

Una manera de optimizar la duración relativa de las distintas etapas pre-antesis sería a través de manipular la sensibilidad a fotoperíodo de esas etapas de manera independiente. El hallazgo de que las duraciones relativas de etapas particulares pudieran responder de manera diferencial al ambiente en general (Halloran y Pennell 1982) y al fotoperíodo en particular (Allison y Daynard 1976, Slafer *et al.* 1996, Miralles y Richards 2000) entre cultivares permitió sugerir que esta característica estuviera bajo un control genético al menos parcialmente independiente (Halloran y Pennell 1982, Slafer y Rawson 1996). Esto permitiría, por ejemplo, aumentar la duración de la ERTA sin modificar el tiempo a antesis, para así lograr espigas más pesadas con más flores fértiles sin modificar la adaptación a un ambiente particular (Slafer *et al.* 1996, 2001).

Sin embargo, se ha observado mediante transferencias recíprocas entre tratamientos de fotoperíodo que las duraciones de tanto la ERTE (Allison y Daynard 1976) como la ERTA (Slafer *et al.* 1994, Miralles y Richards 2000) son afectadas no solo por el fotoperíodo promedio (directo) al que se exponen, sino también por el fotoperíodo explorado durante etapas previas, remarcando que el desarrollo es un proceso contínuo a lo largo del ciclo. Como se menciona en Capítulos previos, los primordios de hojas son diferenciados desde que el ápice meristemático se vuelve activo después de la imbibición hasta la iniciación floral (Kirby 1974, 1990), aunque el número final de hojas puede definirse tan tarde como alrededor del momento de diferenciación de la espiguilla terminal (ET) (Brooking *et al.* 1995). Dado que la tasa a la que las hojas se diferencian suele ser el doble de aquella a la que aparecen (Kirby 1990, Hay y Kirby 1991), aquellas que se hayan acumulado hasta ET son las que restan aparecer hasta el momento de hoja bandera, unos días antes de la antesis (Hay y Kirby 1991). Por otro lado, el número final de hojas puede variar en respuesta al fotoperíodo durante la EVE, porque la duración de la etapa es sensible a fotoperíodo, pero no la tasa a la que las hojas se diferencian (Miglietta 1989, Slafer y Rawson 1994, Pérez-Gianmarco *et al.* 2018- Capítulo 2). Así, Slafer *et al.* (1994) encontraron que la duración de la ERTA no tuvo ninguna relación con el fotoperíodo pormedio (directo) durante esa etapa en dos genotipos de distinta sensibilidad a fotoperíodo, pero sí mostró una fuerte relación positiva con la duración de la etapa previa. Slafer y Rawson (1995) y Miralles y Richards (2000), por el contrario, haciendo transferencias recíprocas entre fotoperíodos más contrastantes que en el caso anterior, mostraron una fuerte respuesta directa durante la ERTA, mientras que la respuesta al fotoperiodo de la etapa previa (memoria) fue marginal. Considerando entonces el número de hojas que restan expandir, la respuesta al fotoperíodo promedio durante la ERTA (respuesta directa) está condicionada en mayor o menor medida por el fotoperíodo explorado previamente (respuesta memoria). Si bien los trabajos citados han aportado evidencias de la respuesta directa y memoria de distintas etapas del desarrollo al fotoperíodo directo y al explorado previamente, no se conoce el efecto que los genes *Ppd-1* puedan tener sobre estas respuestas. Whitechurch y Slafer (2002) expusieron genotipos con distintas combinaciones alélicas para *Ppd-1* a distintos tratamientos de fotoperíodo, pero los mismos fueron constantes durante todo el ciclo, por lo que es imposible diferenciar la respuesta directa de la memoria e inferir sobre el efecto de *Ppd-1* sobre ese balance.

En función de los resultados del Capítulo 4, parecería improbable que la duración de ERTA se pueda manipular de manera independiente sólo a través de manipular la combinación alélica para *Ppd-1*. Sin embargo, aunque nuestra aproximación para modelar el efecto de los genes *Ppd-1* sobre el tiempo a antesis y sobre la duración de las

etapas previas en respuesta al fotoperíodo nos permitió tener en cuenta el efecto memoria del fotoperíodo experimentado en etapas previas, no fue pensado con el objetivo de detectar el efecto de los genes *Ppd-1* sobre el balance entre la respuesta directa y memoria. Por ello en el presente capítulo se evaluó la respuesta directa y de memoria de la ERTA, a través de ensayos de trasferencias recíprocas de fotoperiodo, y cómo dicha respuesta es modulada por diferentes combinaciones alélicas en *Ppd-1*. Por primera vez también se evaluaron dichas respuestas para tanto la duración de la ERTE como de las estructuras diferenciadas durante la misma (espiguillas). Dado que el número final de hojas se puede establecer tan tarde como ET, la respuesta del número de hojas también fue estudiado.

6.2 Materiales y métodos

En este Capítulo se utilizaron 9 lineas isogénicas, utilizando líneas simples (un *Ppd-1a*), dobles (dos *Ppd-1a*), triples (tres *Ppd-1a*) y Paragon (ningún *Ppd-1a*) y diferentes dadores para algunos ellos (e.g. *Ppd-D1a*) (Cuadro 6.2.1)

Cuadro 6.2.1: Genotipo de cada línea isogénica (NIL) para Ppd-1 en los genomas A, B y D. Los alelos Ppd-1a están asociados a fenotipos insensibles a fotoperíodo.

	Genoma			
Nombre	A	B	D	Dador *Ppd-1a*
Paragon	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	
P(CS-2B)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	Chinese Spring
P(GS-100-2A)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1b*	GS-100
P(S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Sonora 64
P(O-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	Opata
P(CS-2B+S64-2D)	*Ppd-A1b*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	
P(GS-100-2A+CS-2B)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1b*	
P(GS-100-2A+S642D)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1b*	*Ppd-D1a*	
P(GS-100-2A+CS-2B+S64-2D)	*Ppd-A1a*	*Ppd-B1a*	*Ppd-D1a*	

6.2.1 Diseño experimental, condiciones experimentales y tratamientos

Para conocer el efecto de los genes *Ppd-1* sobre tanto la respuesta directa (es decir, la respuesta al fotoperíodo promedio durante la etapa considerada, en adelante, *fotoperíodo directo*) como la respuesta memoria (o "efecto memoria", al (o del) fotoperíodo experimentado durante una etapa previa, en adelante *fotoperíodo previo*) de las etapas ERTE y ERTA, se realizaron dos experimentos con macetas a campo y en invernáculo, utilizando las lineas isogénicas descriptas previamente (Cuadro 6.2.1). Esas macetas fueron expuestas a dos grupos de tratamientos de transferencias recíprocas de fotoperíodo, utilizando un diseño factorial completo al azar, con tres repeticiones. Para el primer experimento, se dividió al ciclo desde emergencia (EM) hasta espiguilla terminal (ET) en dos etapas, la etapa vegetativa (EVE) comprendida entre EM y doble lomo (DL) y la etapa reproductiva temprana (ERTE), desde DL hasta ET. Las transferencias recíprocas entre tratamientos de fotoperíodo natural ("n") o extendido por 6 horas ("e") se realizaron cuando las plantas alcanzaron el estado de DL, describiendo entonces a los tratamientos según el fotoperíodo al que se expusieron las plantas hasta y desde DL como "n.n", "n.e", "e.n" y "e.e". Este experimento se llevó a cabo durante los

años 2014 (a campo) y 2017 (en invernáculo). El segundo experimento consistió en trasferencias recíprocas entre fotoperíodo natural ("n") o extendido por 6 horas ("e") al comienzo de la encañazón (CE, primer nudo detectable) de manera que si el ciclo se separa en EM-CE.CE-AN, los tratamientos se pueden describir como "n.n", "n.e", "e.n" y "e.e". Así, la ERTA (CE-AN) estuvo expuesta a dos condiciones contrastantes de fotoperíodo (n, e), después de haber estado durante el desarrollo temprano (EVE + ERTE) en fotoperíodo natural o extendido. Este experimento se llevó a cabo durante los años 2013 y 2014 (a campo), y 2018 (en invernáculo).

6.2.2 Mediciones, variables respuesta y análisis estadístico

Dos a tres veces por semana, desde la emergencia hasta el final de cada experimento, se realizaron determinaciones fenológicas no destructivas (emergencia (DC 09), comienzo de encañazón (31) y antesis (65), de acuerdo a Zadoks *et al.* 1974) en ambos experimentos, y disecciones del ápice meristemático para determinar el momento de DL y ET (Gardner *et al.* 1985) en el primer experimento únicamente. Además, se registró el número final de hojas y el número de espiguillas por espiga en el vástago principal.

En cada experimento y para cada genotipo, la diferencia en la duración de la etapa considerada (ERTE o ERTA) bajo los tratamientos n.n y n.e fue considerada como su respuesta directa, mientras que la diferencia correspondiente entre los tratamientos n.n y e.n fue considerada como su respuesta memoria, ambas respuestas a la extensión de fotoperíodo. También se calcularon las respuestas del número de hojas y de espiguillas por espiga a los distintos tratamientos de fotoperíodo.

El análisis de los resultados de los dos experimentos se realizó por separado, pero siguiendo la misma metodología que se detalla a continuación. En lugar de descartar variables explicativas mediante un umbral de significancia, se realizaron inferencias multimodelo (Garibaldi *et al.* 2017) de manera similar a lo descripto en detalle para el Capítulo 4. Se propusieron una variedad de modelos posibles que explicaran la relación entre la duración de las etapas por un lado y del número de estructuras diferenciadas por otro, a los tratamientos de fotoperíodo directo, memoria o en ambas instancias (Cuadro 6.2.2). En particular, se definieron modelos según variables respuesta en tres grupos: 1) duración de la EVE y la ERTE (multivariados), 2) número final de hojas y de espiguillas por espiga (multivariados) y 3) duración de la ERTA (univariados). Los distintos modelos propuestos para 1 y 3 consideraron si:

- la duración de las etapas EVE, ERTE y ERTA respondía a fotoperíodo directo,
- la duración de las etapas ERTE y ERTA respondía a fotoperíodo previo,
- esas respuestas eran afectadas por la combinación alélica para *Ppd-1*

Las mismas hipótesis fueron planteadas en los casos en que el número de estructuras (hojas y espiguillas, Modelos 2) fueron las variables respuesta, pero se probó además si el número final de hojas podía ser afectado por el fotoperíodo durante la ERTE, y si esa respuesta era afectada por la combinación alélica en *Ppd-1* o no. Para todos estos modelos, el año durante el cual se realizó el experimento y el tratamiento de fotoperíodo fueron considerados efectos a nivel poblacional (i.e. efectos fijos en la terminología frecuentista) mientras que el efecto de la combinación alélica sobre la respuesta a fotoperíodo fue considerado como un efecto a nivel de grupo (i.e. efectos aleatorios) (Cuadro 6.2). El efecto del fotoperíodo directo durante ERTE y ERTA fue anidado en el tratamiento de fotoperíodo previo, lo que permitió considerar por separado a unidades experimentales provenientes de un fotoperíodo previo distinto (de

acuerdo a lo que se propuso en el Capítulo 4, ítem 4.4). A su vez, el efecto del fotoperíodo tanto memoria como directo siempre estuvo anidado en el experimento, ya que existieron diferencias considerables entre los mismos. Los resultados fueron analizados teniendo en cuenta este efecto y las figuras también respetan esa estructura.

Estos modelos se ajustaron en el lenguaje Stan (Carpenter *et al.* 2017) a través del paquete brms (Bürkner 2017) para R (R Core Team 2018). En cada caso, se seleccionaron los modelos más parsimoniosos comparando su habilidad predictiva esperada (ΔHPE) según criterios de información basados en validación cruzada "loo", o LOOIC, usando la función loo_compare del paquete loo (Vehtari *et al.* 2017) para R. Además, se calculó una estimación de bondad de ajuste similar al R^2 de cada modelo usando la función bayes_R2 del paquete rstantools.

Cuadro 6.2.2: Modelos de respuesta a fotoperíodo y del efecto de Ppd-1 sobre esas respuestas. En negrita, el modelo elegido en cada caso."-" indica a) que la respuesta a fotoperíodo no aplicaba, y b) que no correspondía considerar efecto de Ppd-1 sobre esa respuesta.

		Responde a fotoperíodo durante			*Ppd-1* modulan respuesta	
Modelo	Variable	EVE	ERTE	ERTA	directa	memoria
1.A	**EVE**	**SI**	**-**	**-**	**SI**	**-**
	ERTE	**SI**	**SI**	**-**	**SI**	**SI**
1.B	EVE	NO	-	-	-	-
	ERTE	SI	SI	-	SI	SI
1.C	EVE	SI	-	-	SI	-
	ERTE	SI	NO	-	-	SI
1.D	EVE	NO	-	-	-	-
	ERTE	SI	NO	-	-	SI
1.E	EVE	SI	-	-	SI	-
	ERTE	NO	SI	-	SI	-
1.F	EVE	SI	-	-	SI	-
	ERTE	SI	SI	-	SI	NO
1.G	EVE	SI	-	-	NO	-
	ERTE	SI	SI	-	SI	NO
1.H	EVE	SI	-	-	SI	-
	ERTE	SI	SI	-	NO	SI
1.I	EVE	SI	-	-	NO	-
	ERTE	SI	SI	-	NO	NO
2.A	**NFH y ESPIGUILLAS**	**SI**	**SI**	**-**	**SI**	
2.B	NFH y ESPIGUILLAS	SI	SI	-	Solo a fotop. durante ERTE	
2.C	NFH y ESPIGUILLAS	SI	SI	-	Solo a fotop. durante EVE	
2.D	NFH y ESPIGUILLAS	SI	SI	-	NO	
2.E	NFH y ESPIGUILLAS	NO	SI	-	Solo a fotop. durante ERTE	
2.F	NFH y ESPIGUILLAS	SI	NO	-	Solo a fotop. durante EVE	
2.G	NFH	SI	NO	-	Solo a fotop. durante EVE	
	ESPIGUILLAS	SI	SI	-	SI	
2.H	NFH	SI	NO	-	Solo a fotop. durante EVE	
	ESPIGUILLAS	NO	SI	-	Solo a fotop. durante EVE	
3.A	**ERTA**		**SI**	**SI**	**SI**	**SI**
3.B	ERTA		SI	SI	SI	NO
3.C	ERTA		NO	SI	SI	-
3.D	ERTA		SI	NO	-	SI
3.E	ERTA		SI	SI	NO	SI
3.F	ERTA		SI	SI	NO	NO

6.3 Resultados

6.3.1 Duraciones de la EVE y la ERTE y sus respuestas directa y memoria

Los modelos de mayor habilidad predictiva esperada fueron los modelos 1.F y 1.A, que también mostraron una bondad de ajuste máxima (R^2 = 0,97) (Cuadro 6.3.1). Ambos modelos postulan que las duraciones de tanto la EVE como la ERTE muestran respuesta directa al fotoperíodo y que la duración de la ERTE también responde al fotoperíodo explorado previamente (respuesta memoria). Su habilidad predictiva es considerablemente mayor que la de aquellos modelos de los que difieren por no considerar respuesta directa a fotoperíodo de la EVE (modelo 1.B), de la ERTE (modelo 1.C) o ninguna de ellas (modelo 1.D), o por no considerar la respuesta memoria de la ERTE (modelo 1.E). También son superiores a aquellos modelos que postulan que los genes *Ppd-1* no tienen efecto sobre la magnitud de la respuesta directa de la EVE ni de la memoria de la ERTE (modelo 1.G), sobre la magnitud de la respuesta directa de la ERTE (modelo 1.H), o sobre la magnitud de ninguna de las respuestas (modelo1.I). Lo que diferencia a los modelos 1.F y 1.A es que mientras que el modelo 1.A postula que los genes *Ppd-1* modulan la magnitud de la respuesta a fotoperíodo tanto directa de la EVE y de la ERTE, como la respuesta memoria durante la ERTE, el modelo 1.F no considera este último efecto. Las diferencias entre ambos son insignificantes tanto en habilidad predictiva (*c.* -0,7, Cuadro 6.3.1) como en su bondad de ajuste, pero se muestra el efecto de los genes *Ppd-1* sobre los parámetros del modelo 1.A por sobre el 1.F, porque a pesar de tener más parámetros, eso no perjudicó significativamente a su parsimonia y permitió obtener más información sobre el efecto de *Ppd-1* sobre la respuesta a fotoperíodo. Esto es razonable ya que las diferencias entre genotipos para la respuesta memoria de la ERTE parecen ser considerables (ver más adelante). El modelo 1.A considera al efecto del fotoperíodo tanto directo como previo sobre duraciones de la EVE y la ERTE como estando anidado dentro de cada año experimental (i.e. efecto año), por lo que la respuesta a fotoperíodo sobre la duración de las etapas se mostró para cada año por separado. A su vez, el efecto del tratamiento de fotoperíodo sobre la duración de la ERTE estuvo anidado adentro del efecto del tratamiento de fotoperíodo durante la EVE, ya que no fue independiente de éste.

Cuadro 6.3.1: Evaluación de modelos según diferencias en su habilidad predictiva esperada (ΔHPE) con el modelo de mayor HPE ± el error estándar de esa diferencia. También se detalla la bondad de ajuste (R^2) de cada modelo.

Modelo	ΔHPE	R^2
1.F	-	0,97
1.A	-0,714 ± 1,03	0,97
1.E	-137 ± 23,7	0,97
1.H	-148 ± 30,4	0,97
1.C	-197 ± 32,8	0,97
1.G	-380 ± 25,3	0,40
1.B	-386 ± 19,1	0,35
1.I	-554 ± 38,1	0,40
1.D	-577 ± 38,4	0,35

La duración de la EVE bajo fotoperíodo extendido fue similar entre los genotipos, rondando los 245 °C d en 2014 y los 221 °C d en 2017 (símbolos vacíos en la Fig. 6.1). La excepción fue Paragon en 2017, cuando la duración de la EVE (254 °C d) fue significativamente mayor que para el resto, que no difirieron entre sí (217 °C d). Los genotipos sí difirieron considerablemente en la duración de la EVE bajo fotoperíodo natural en ambos años (símbolos llenos en la Fig. 6.1) y por lo tanto, en la respuesta directa de esta etapa a la extensión de fotoperíodo. La respuesta de la EVE a la extensión de fotoperíodo, promediada a través de los genotipos, fue de entre 109 y 105 °C d para 2014 y 2017, respectivamente (con intervalos de credibilidad del 95% (IC95) 58-158 °C d, 46-160 °C d). Pero los genes *Ppd-1* tuvieron un efecto considerable sobre esa respuesta directa (diferencia para cada genotipo entre puntos llenos y vacíos en la Fig. 6.1). Paragon, con tres alelos *Ppd-1b,* mostró respuestas máximas de 340 y 345 °C d en 2014 y 2017 respectivamente, mientras que el genotipo triple insensible (con tres *Ppd-1a*) mostró valores de entre 60 y 40 °C d en 2014 y 2017 respectivamente. Los genotipos con solo un alelo *Ppd-1a* variaron considerablemente en la magnitud de sus respuestas. P(CS-2B), el genotipo con el alelo *Ppd-1a* de menor intensidad, mostró respuestas de entre 144 y 176 °C d (2014 y 2017, respectivamente), mientras que la respuesta de P(GS-100-2A) fue signiticativamente menor, entre 119 (2014) y 74 (2017) °C d. La respuesta de P(O-2D) y P(S64-2D) fue tan reducida como las de los genotipos con dos o tres alelos *Ppd-1a* apilados, en ambos años.

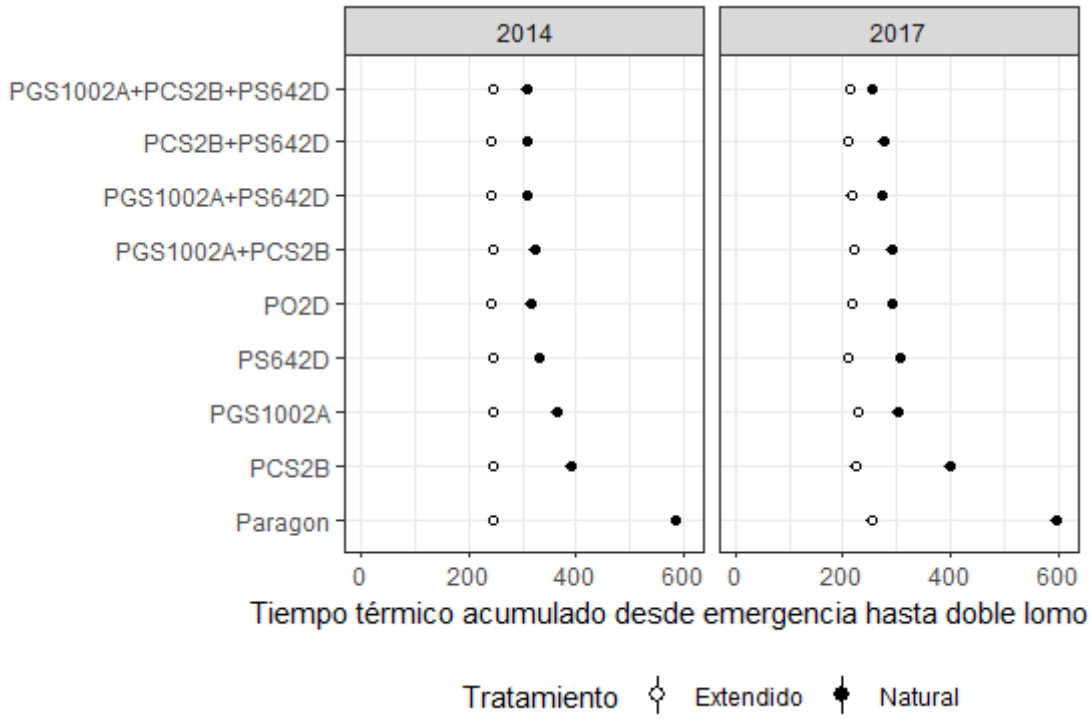

Figura 6.1: Duración de la etapa vegetativa (EVE), desde emergencia hasta doble lomo, bajo fotoperíodo natural y extendido para distintos genotipos (ver combinaciones alélicas en Ppd-1 correspondientes a cada uno en Cuadro 6.2.1).

La duración de la ERTE varío considerablemente entre años, en promedio *c.* 70 °C d (IC95 36-104) más larga en 2014, y esa diferencia fue notable aún bajo fotoperíodo extendido, tanto para genotipos sensibles (Paragon, 130 °C d) como insensibles (Triple Insensible, 70 °C d). Por lo tanto, los resultados se presentan por separado para cada año experimental, dado que si bien las tendencias se mantuvieron

entre los años, las magnitudes de las respuestas difirieron (Fig. 6.2). Durante 2014, la duración de la ERTE bajo fotoperíodo extendido desde EM (tratamiento e.e.) varió ente 283 y 193 °C d en Paragon y en P(GS-100-2A+S64-2D), respectivamente. Durante 2017 no se pudieron detectar diferencias significativas entre genotipos para la duración de la ERTE cuando las plantas crecieron bajo fotoperíodo extendido desde EM, ya que su duración varió de forma mínima, entre 153 y 143 °C d. Cuando las plantas fueron mantenidas bajo fotoperíodo natural desde EM (tratamiento n.n), las diferencias entre genotipos fueron máximas. Durante 2014, la duración de la ERTE bajo esas condiciones varío entre 815 y 260 °C d (Paragon y el genotipo Triple Insensible, respectivamente), mientras que en 2017, aunque esa tendencia se mantuvo, las magnitudes de las diferencias entre genotipos fueron menores (449 y 143 °C d) (Fig. 6.2). Nuevamente, las líneas con un solo alelo *Ppd-1a* variaron en la duración de sus ERTE desde valores intermedios entre esos extremos (P(CS-2B) 380 y 256 °C d en 2014 y 2017 respectivamente) a duraciones similares a las de las líneas con dos o tres *Ppd-1a* (P(O-2D) 266 y 165 °C d en 2014 y 2017 respectivamente) (Fig. 6.2).

Tanto la respuesta directa como la respuesta memoria de la ERTE a la extensión de fotoperíodo fueron muy variables entre genotipos para ambas campañas (2014 y 2017, Fig. 6.3). Aunque las magnitudes variaron considerablemente entre años, la respuesta directa a la extensión de fotoperíodo (tratmientos n.n - n.e) fue siempre máxima para Paragon, tomando valores de *c.* 570 y *c.* 240 °C d para 2014 y 2017 respectivamente; intermedia para P(CS-2B), que acortó la ERTE entre *c.* 160 (2014) y *c.* 95 °C d (2017), y mínima para el resto de genotipos con al menos un alelo *Ppd-A1a* o *Ppd-D1a*, que no difirieron significativamente entre sí y para los que la respuesta directa promedió *c.* 60 °C d durante 2014. Para la mayoría estos genotipos, su respuesta directa a la extensión de fotoperíodo durante 2017 fue tan baja que no llegó a ser significativa estadísticamente (ver puntos llenos en el panel derecho de la Fig. 6.3). La respuesta memoria durante la ERTE a la extensión de fotopériodo (tratamientos n.n - e.n) siguió el mismo patrón a través de los años y de los genotipos que el descripto arriba para la respuesta directa. Su magnitud fue en general menor que la de la respuesta directa en todos los genotipos durante el 2014, y tomó valores de *c.* 360 °C d para Paragon, *c.* 110 °C d para P(CS-2B) y 45-50 °C d para P(S64-2D) y P(GS-100-2A+CS-2B), mientras que en el resto de genotipos, no fue significativamente distinta de 0. En 2017, la respuesta memoria de la ERTE a la extensión de fotoperíodo tomó valores de *c.* 305 °C d para Paragon, *c.* 105 °C d para P(CS-2B) y *c.* 40 °C d para P(GS-100-2A) y P(GS-100-2A + S64-2D), mientras que en el resto de genotipos, no fue significativamente distinta de 0.

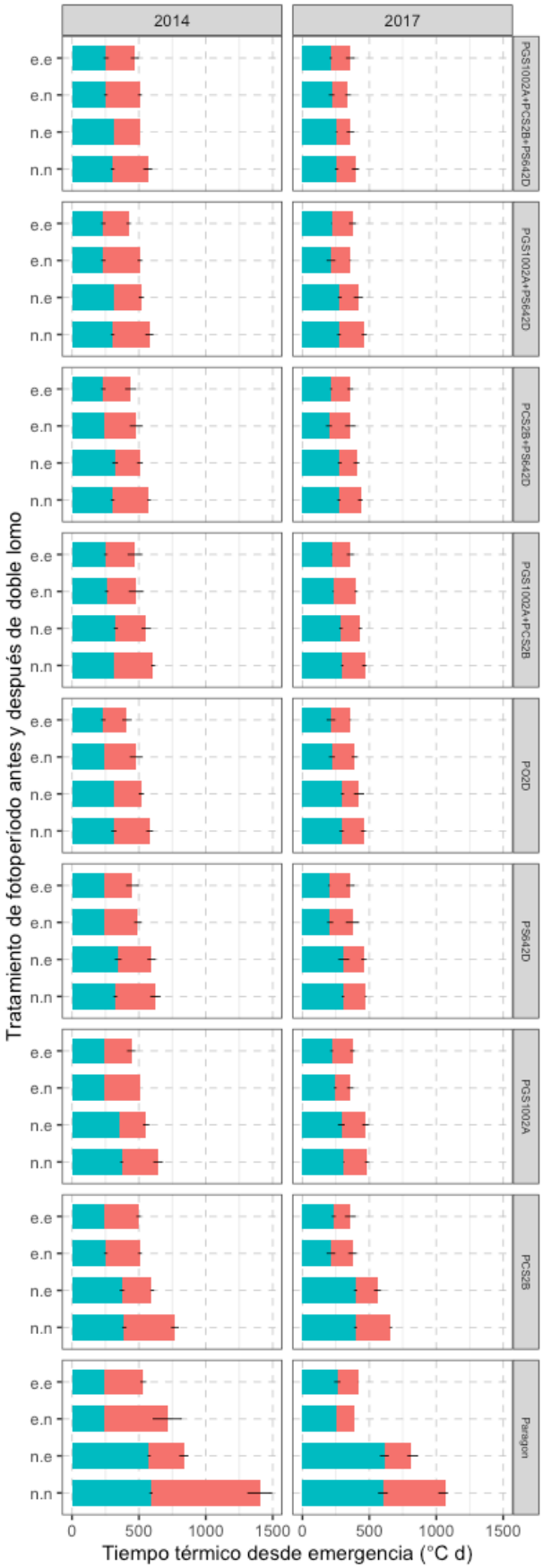

Figura 6.2: Tiempo térmico desde emergencia hasta doble lomo (EVE, azul) y desde doble lomo hasta espiguilla terminal (ERTE, rojo) bajo cuatro tratamientos de fotoperíodo, en los dos años experimentales y para cada genotipo.

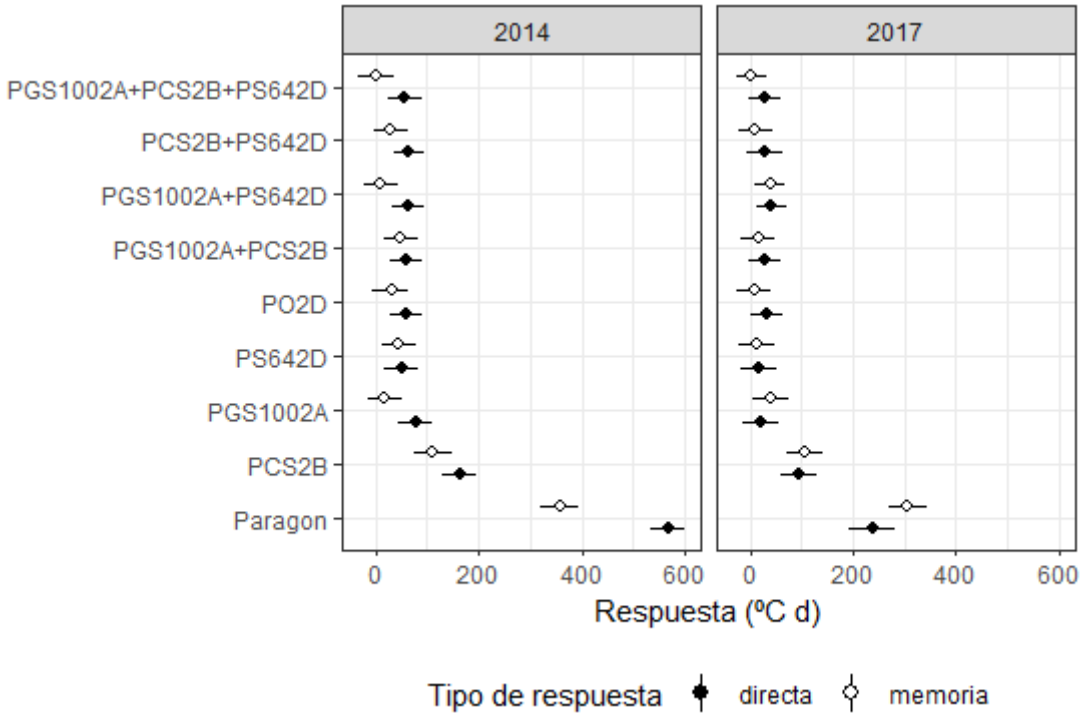

Figura 6.3: Respuesta directa y memoria de la etapa reproductiva temprana (ERTE) a la extensión del fotoperíodo para distintos genotipos. Los símbolos representan la media ajustada mientras que los segmentos a los costados de cada uno se extienden hasta los límites inferior y superior del intervalo de credibilidad del 95%. Por lo tanto, el solapamiento de esos intervalos entre los valores de dos tratamientos o genotipos indica que no habría diferencia significativa entre ellos.

6.3.2 La respuesta del número de estructuras a cambios en el fotoperíodo entre emergencia y espiguilla terminal

En general, genotipos con mayor sensibilidad diferenciaron un mayor número de estructuras, tanto hojas como espiguillas, aunque esa distinción fue más notable cuando tanto la EVE como la ERTE fueron expuestas a fotoperíodo natural (Fig. 6.4). Bajo esa condición (tratamiento n.n), Paragon produjo *c.* 12 hojas mientras que el genotipo Triple Insensible produjo *c.* 8 hojas, promediando a través de los años, mientras que bajo fotoperíodo extendido desde EM hasta ET (tratameinto e.e), esos valores se redujeron a *c.* 7 y 6,6 hojas, respectivamente. En cuanto al número de espiguillas por espiga, esa misma tendencia se mantuvo, sobre todo para 2014: Paragon produjo *c.* 21 y el Triple Insensible *c.* 18. Sin embargo, durante 2017 las diferencias entre genotipos para el número de espiguillas por espiga aún bajo fotoperíodo natural se vieron muy reducidas. En promedio, al igual que con la duración de las etapas, los valores de ambas variables fueron menores para 2017 que para 2014, pero la variabilidad entre años fue mayor en el número de espiguillas por espiga (*c.* 5) que en el número final de hojas (*c.* 1).

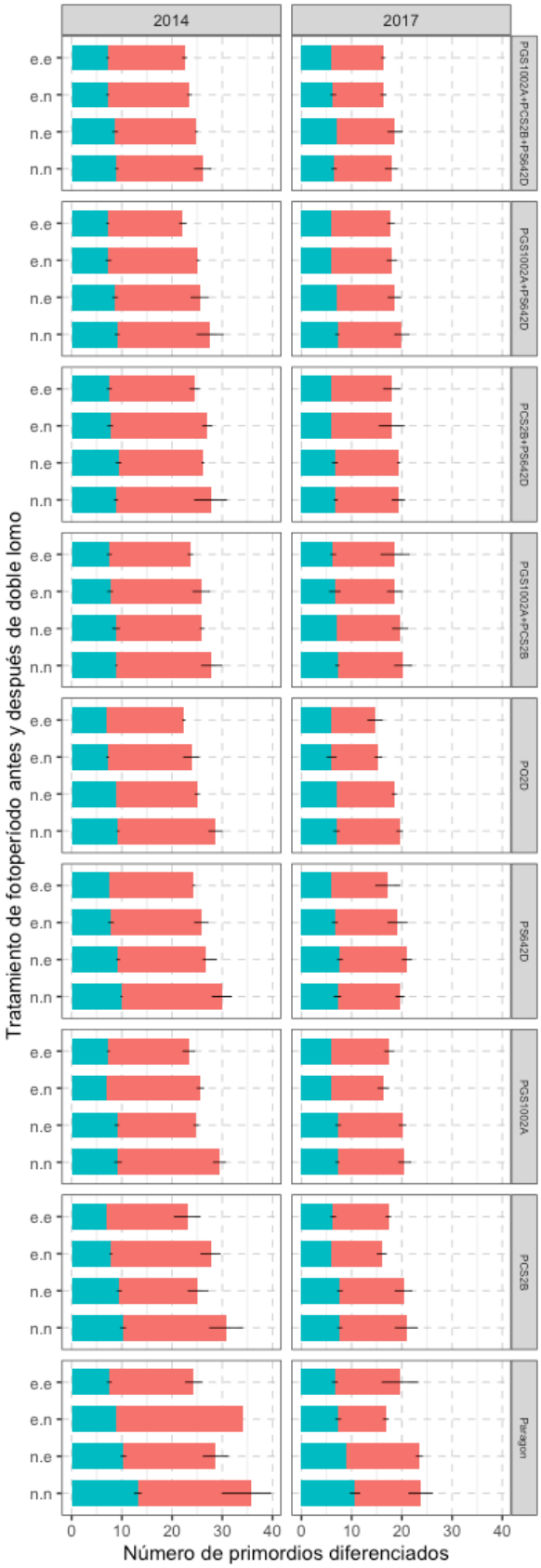

Figura 6.4: Número de estructuras (i.e. hojas, en azul y espiguillas, en rojo) producidas por cada genotipo en cada año experimental y bajo cada uno de las combinaciones posibles de tratamientos de fotoperíodo entre emergencia y espiguilla terminal. Cada barra representa el valor promedio del número de estructuras en esa muestra, mientras que el segmento muestra el desvío estándar de esa muestra.

Los modelos de mayor habilidad predictiva esperada fueron los modelos 2.A y 2.B, que también mostraron una bondad de ajuste máxima (R^2 = 0,89, Cuadro 6.3.2) y mayor a la del resto de los modelos propuestos (Cuadro 6.3.2). Estos modelos superaron en ambos sentidos a modelos que proponían que la combinación alélica para *Ppd-1* no tenía efecto sobre la magnitud de la respuesta a fotoperíodo (modelo 2.D), o que sólo lo tenían sobre la magnitud de respuesta al fotoperíodo durante la EVE (modelo 2.C). También fueron mejores que cuando no se consideró el efecto del fotoperíodo durante la EVE (modelo 2.E) o la ERTE (modelo 2.F) sobre el número de hojas y espiguillas. Notablemente, los modelos 2.A y 2.B se comportaron mejor que aquellos que no consideraron el efecto del fotoperíodo explorado en etapas diferentes de las que normalmente se definen como de diferenciación de primordios de un tipo de estructura en particular, por ejemplo, el efecto del fotoperiodo durante la ERTE sobre el NFH (modelo 2.G) o del explorado durante la EVE sobre el número de espiguillas por espiga (modelo 2.H). Ambos modelos (2.A y 2.B) postulan que el número de estructuras (tanto de hojas como de espiguillas) responden no solo al fotoperíodo directo durante la etapa en la que los primordios de cada una de ellas se diferencian, sino también al fotoperíodo durante la otra etapa. Sus diferencias radican en que mientras que el modelo 2.A considera que *Ppd-1* afecta la magnitud de la respuesta de esas variables a tanto el tratamiento de fotoperíodo durante la EVE como durante la ERTE, el modelo 2.B considera efectos de *Ppd-1* solo sobre la respuesta al tratamiento de fotoperíodo durante la ERTE. Se eligió mostrar el modelo 2.A (Cuadro 6.2.2) para describir la respuesta del número de estructuras a los tratamientos de fotoperíodo y al efecto de *Ppd-1* sobre las mismas, ya que a pesar de ser más complejo (tener más parámetros), eso no afectó significativamente su habilidad predictiva (Cuadro 6.3.2) y al mismo tiempo permitió una evaluación más amplia del efecto de *Ppd-1* sobre la respuesta de hojas y espiguillas a los tratamientos de fotoperíodo.

Cuadro 6.3.2: Evaluación de modelos que relacionan el número de estructuras a los tratamientos de fotopériodo durante la EVE y la ERTE según diferencias en su habilidad predictiva esperada (ΔHPE) y su error estándar, en relación al mejor modelo con ese criterio. También se detalla la bondad de ajuste (R^2) de cada modelo.

Modelo	ΔHPE	R^2
2.B	-	0,89
2.A	-0,459 ± 1,90	0,89
2.C	-15,6 ± 11,6	0,86
2.G	-26,1 ± 13,3	0,85
2.H	-27,1 ± 13,9	0,85
2.F	-47,0 ± 14,5	0,85
2.D	-129 ± 24,0	0,63
2.E	-161 ± 16,1	0,55

El NFH respondió a la extensión de fotoperíodo no sólo durante la EVE, sino también durante la ERTE (paneles superiores Fig. 6.5). Al igual que para las respuestas de la duración de la EVE y la ERTE, la magnitud de las respuestas del NFH fue mayor durante 2014. Cuando se alargó el fotoperíodo sólo durante la EVE, el NFH se redujo entre *c.* 2,1 y *c.* 1,1 en 2014 y 2017, respectivamente, en promedio a través de los genotipos (tratamientos n.n - e.n). La respuesta al alargamiento del fotoperíodo durante la ERTE (tratamientos n.n - n.e) fue menor, promediando *c.* 0,6 hojas para 2014, mientras que para 2017 no fue significativa en promedio, pero sí en genotipos particulares (ver más adelante). La respuesta del NFH a la extensión de fotoperíodo

cuando el fotoperíodo se extendió desde EM hasta ET (tratamientos n.n - e.e, *c.* 2,4 y 1,3 en 2014 y 2017 respectivamente) fue similar a la obtenida cuando el fotoperíodo se extendió solo durante la EVE (ver arriba).

De manera similar, el número de espiguillas por espiga respondió no sólo a los tratamientos de fotoperíodo durante la ERTE sino también durante la EVE, y las magnitudes de esas respuestas variaron entre años (paneles inferiores Fig. 6.5). Cuando se observaron los valores promedio entre genotipos, en 2014 la respuesta al tratamiento de extensión de fotoperíodo durante solo la ERTE (tratamiento n.n - n.e, *c.* 2,7 espiguillas) fue mayor que al aplicado sólo durante la EVE (tratamiento n.n - e.n, 1,1 espiguillas, no significativo), mientras que en 2017 esta relación se invirtió (*c.* 0,2 espiguillas en n.n-n.e, no significativo y *c.* 1,9 espifuillas en n.n – e.n).

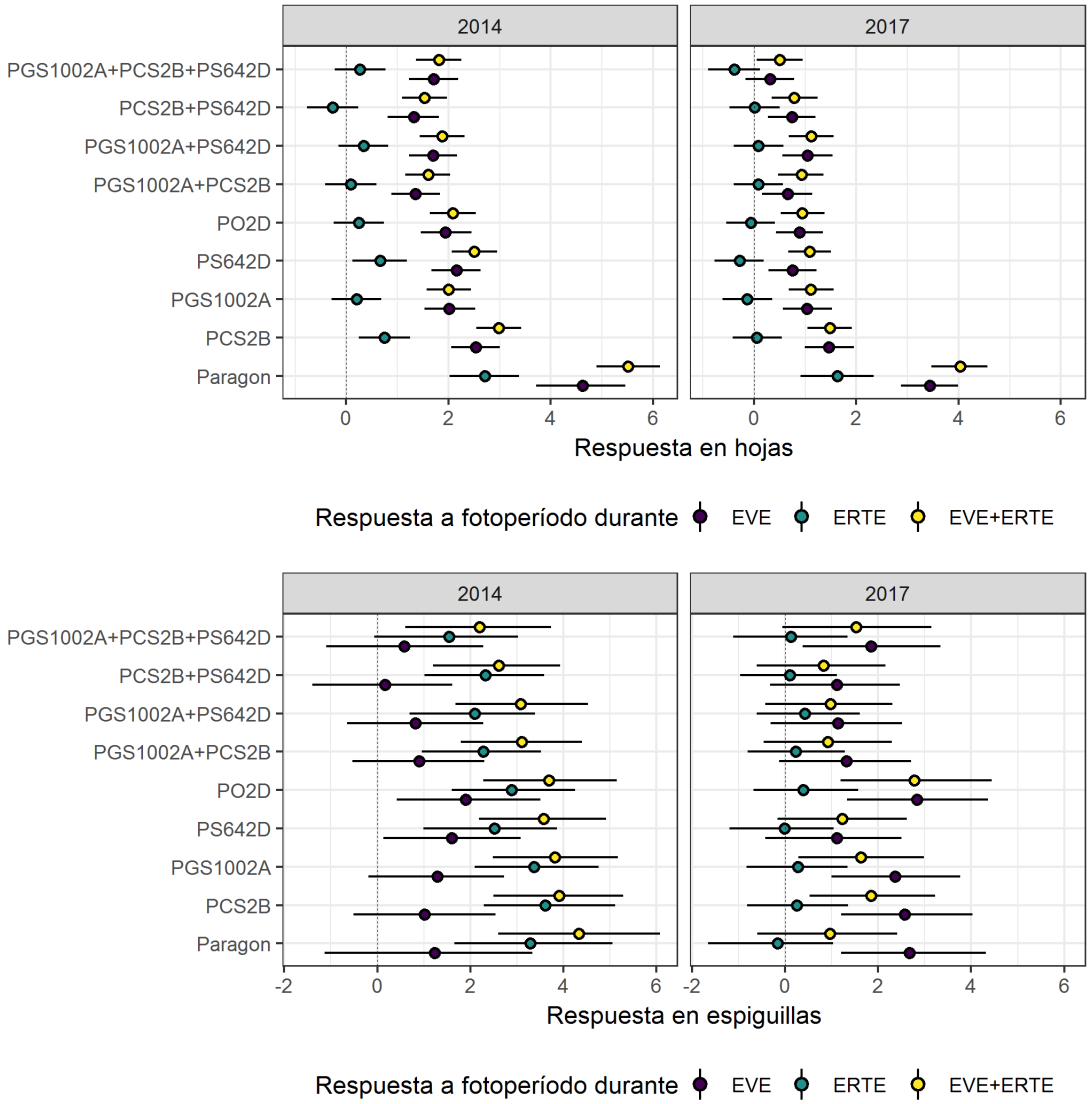

Figura 6.5: Respuesta del número de estructuras al tratamiento de extensión de fotoperíodo durante la EVE (n.n – e.n), la ERTE (n.n – n.e) o ambas (EVE + ERTE, n.n – e.e) según la combinación alélica para Ppd-1. Los símbolos representan la media ajustada mientras que los segmentos a los costados de cada uno se extienden hasta los límites inferior y superior del intervalo de credibilidad del 95%. Por lo tanto, el solapamiento de esos intervalos entre los valores de dos tratamientos o genotipos indica que no habría diferencia significativa entre ellos.

Pero según el modelo 2.A (Cuadro 6.2.2), la combinación alélica en *Ppd-1* afectó considerablemente la respuesta de tanto el NFH como del número de espiguillas por espiga la extensión del fotoperíodo durante tanto la EVE como la ERTE (Fig. 6.5). El efecto de los genes *Ppd-1* sobre la respuesta del NFH fue mucho más claro que el que tuvieron sobre la respuesta del número de espiguillas, en ambos casos a cambios en el fotoperíodo durante la EVE, la ERTE o ambas (ver barras de error y distribución de puntos en paneles superiores y paneles inferiores de Fig. 6.5). Mientras que fue difícil encontrar diferencias significativas entre los genotipos para su respuesta en número de espiguillas por espigas al fotoperíodo durante la EVE, la ERTE o ambas, hubo una tendencia a que Paragon respondiera con hasta 2 espiguillas más que el genotipo triple insensible durante 2014 cuando el fotoperíodo se extendió desde EM hasta ET (EVE+ERTE), mientras que en 2017 ninguna tendencia fue evidente (paneles inferiores en Fig. 6.5). Las diferencias entre genotipos fueron más claras para la respuesta del NFH a los tratamientos de fotoperíodo (paneles superiores en Fig. 6.5). Paragon fue el genotipo que mayor respuesta mostró al fotoperíodo durante la EVE (4,6 hojas en 2014 y 3,4 en 2017), mientras que P(CS-2B) mostró una respuesta intermedia (2,5 hojas en 2014 y 1,5 en 2017), seguida por el resto de los genotipos con uno solo *Ppd-1a*, de los que no se diferenció significativamente. Los genotipos con dos o tres alelos *Ppd-1a* fueron los que mostraron las menores respuestas, llegando a ser nulas en el caso del genotipo triple insensible durante 2017. La respuesta del NFH al fotoperíodo durante la ERTE estuvo prácticamente limitada a Paragon (2,7 hojas en 2014) y 1,6 hojas en 2017 hojas), mientras que todos los genotipos con al menos un *Ppd-1a* mostraron una respuesta de menos de 1 hoja durante 2014 (sólo significativa en P(CS-2B)), y no mostraron respuesta significativa durante 2017.

6.3.3 Respuesta directa y memoria de la ERTA a extensiones de fotoperiodo

Los modelos 3.B y 3.A fueron considerablemente mejores que el resto, mientras que sus mínimas diferencias en habilidad predictiva esperada no permitieron elegir a uno de ellos por sobre los demás y su bondad de ajuste fue semejante (Cuadro 6.3.3). Los dos modelos proponen que la duración de la ERTA depende tanto del fotoperíodo experimentado antes del CE como del experimentado durante la misma, es decir, que consideran que tanto la respuesta memoria como la respuesta directa son significativas. Como resultado, su habilidad predictiva es mayor que la de modelos que proponen que la duración de la ERTA no está relacionada al fotoperíodo previo a la misma, pero sí al directo (modelo 3.C), o que no está relacionada al fotopériodo directo, pero sí al previo (modelo 3.D). También son mejores que aquel que plantea que no hay efecto de los genes *Ppd-1* sobre la magnitud de la respuesta directa, ni sobre la magnitud de la respuesta memoria (modelo 3.F). Por otro lado, no hay evidencia clara de que el modelo 3.E, que propone que estos genes modulan sólo la respuesta memoria, sin efecto sobre la respuesta directa sea significativamente menos parsimonioso que los modelos 3.B y 3.A, aunque su bondad de ajuste es levemente inferior (Cuadro 6.3.3). Los modelos 3.B y 3.A también plantean diferencias entre ellos con respecto al efecto de *Ppd-1* sobre los dos tipos de respuesta a fotoperíodo. Mientras que el modelo 3.A propone que afectan tanto a la respuesta memoria como a la respuesta directa, el modelo 3.B propone que solo tendrían efecto sobre la respuesta directa (Cuadro 6.2.2). El análisis del modelo 3.A y las distribuciones posteriores de él obtenidas permitieron mostrar el efecto de los genes *Ppd-1* sobre las respuestas memoria y directa, sin penalizar la habilidad predictiva esperada o la bondad de ajuste (Cuadro 6.3.3).

Cuadro 6.3.3: Evaluación de modelos que relacionan la duración de la ERTA a los tratamientos antes y durante la misma, según diferencias en su habilidad predictiva esperada (ΔHPE) y su error estándar, en relación al mejor modelo con ese criterio. También se detalla la bondad de ajuste (R^2) de cada modelo.

Modelo	ΔHPE	R^2
3.B	-	0,83
3.A	-0,260 ± 1,99	0,84
3.E	-5,68 ± 8,79	0,81
3.F	-58,9 ± 17,8	0,69
3.C	-68,2 ± 15,7	0,70
3.D	-105 ± 16,8	0,61

Las magnitudes de las respuestas directa y memoria en promedio a través de los genotipos variaron considerablemente entre años (Fig. 6.6). Durante 2013 los valores promedio de respuesta directa rondaron los 40 °C d, mientras que para 2014 y 2018 los promedios fueron considerablemente mayores (*c.* 200 y 135 °C d, respectivamente). Para la respuesta memoria, los mayores valores promedio se observaron durante 2014 (*c.* 155 °C d), fueron intermedios durante 2013 (*c.* 75 °C d) y mínimos durante 2018 (*c.* 20 °C d). Para cada genotipo, dentro de cada año, la respuesta memoria tomó valores cercanos a los de la respuesta directa, excepto para Paragon en 2013, cuando este genotipo mostró una respuesta memoria considerablemente mayor a su respuesta directa.

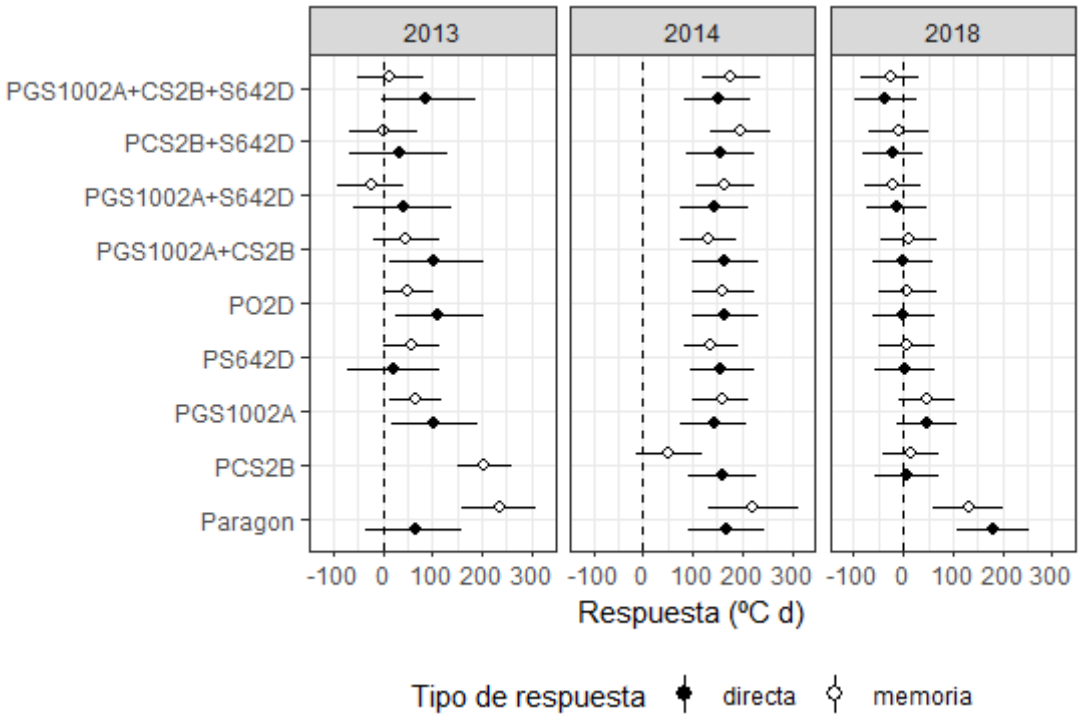

Figura 6.6: Respuesta directa (n.n – n.e) y memoria (n.n.- e.n) de los distintos genotipos durante cada año experimental como magnitud del cambio en el tiempo térmico acumulado entre espiguilla terminal y antesis ante la extensión del fotoperiodo durante el mismo período o durante la etapa anterior (entre emergencia y espiguilla terminal), respectivamente. Los símbolos representan la media ajustada mientras que los segmentos a los costados de cada uno se extienden hasta los límites inferior y superior del intervalo de credibilidad del 95%. Por lo tanto, el solapamiento de esos intervalos entre los valores de dos tratamientos o genotipos indica que no habría diferencia significativa entre ellos.

También los genes *Ppd-1* afectaron la magnitud de tanto la respuesta directa como memoria, aunque en fuerte dependencia del año experimental considerado (Fig. 6.6). Paragon mostró mayor respuesta directa que cualquier genotipo con al menos un alelo *Ppd-1a* durante 2018, aunque no se pudo distinguir un efecto claro de los genes *Ppd-1* sobre esta respuesta tanto durante 2013 como 2014. Por el contrario, Paragon sí mostró una mayor respuesta memoria que la del resto de los genotipos consistentemente a través de dos de los tres años. Ninguno de los genotipos portadores de *Ppd-1a* mostró respuesta memoria considerable durante 2013 ni 2018, excepto P(CS-2B), cuya respuesta memoria no difirió de la de Paragon en 2013. Durante 2014 todos los genotipos mostraron respuesta directa y memoria de la ERTA a extensiones de fotoperíodo. Por otro lado, no se observaron diferencias entre genotipos para ninguna de las respuestas durante 2014, excepto por la respuesta memoria de P(CS-2B) que fue considerablemente menor que la del resto de genotipos.

6.4 Discusión

Las transferencias de fotoperíodo repetidas a través de distintos años permitieron poner a prueba el efecto de los genes *Ppd-1* sobre tanto la respuesta directa de la EVE, ERTE y ERTA, como sobre la respuesta memoria de la ERTE y la ERTA. Las respuestas a fotoperíodo directa (de las tres etapas) y memoria (de la ERTE y la ERTA) fueron consideradas por todos aquellos modelos que tuvieron el mejor comportamiento

o no fueron distinguibles de aquel de mejor comportamiento, mientras que los modelos que no las consideraron fueron penalizados en los dos criterios objetivos tomados para su evaluación (Cuadros 6.3.1 y 6.3.3). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en Capítulos previos (4 y 5). Experimentos con cultivares de distinta sensibilidad a fotoperíodo en los que las plantas fueron sometidas a transferencias entre distintos ambientes fotoperiódicos al momento de espiguilla terminal, mostraron resultados contrastantes en cuanto al balance entre respuesta directa y memoria de la ERTA. Por un lado, Slafer *et al.* (1994) encontraron que la duración de la ERTA no estuvo relacionada con el fotoperíodo durante la misma, sino que la variabilidad en su duración fue explicada casi completamente por la variabilidad en el fotoperíodo explorado hasta espiguilla terminal, es decir, que encontró una fuerte respuesta memoria, pero no hubo respuesta directa. En contraste, Miralles y Richards (2000) encontraron una fuerte respuesta directa de la ERTA en el cultivar UQ189 cuando fue expuesta a fotoperíodos muy contrastantes en cámaras de crecimiento, mientras que la respuesta memoria fue limitada (*c.* un día). Aunque la combinación alélica para *Ppd-1* afectó la magnitud de tanto la respuesta directa como de la memoria en este estudio, no afectó en gran medida la relación entre ellas (ver abajo).

Por otro lado, el efecto de la combinación alélica en *Ppd-1* sobre la respuesta memoria y directa de la ERTA fue detectado sólo en algunos de los tres años experimentales, dependiendo de los genotipos (Fig. 6.6). Cuando las plantas son cultivadas a campo, y sobre todo cuando la siembra es relativamente tardía, esta etapa está expuesta a fotoperíodos más inductivos (ver fotoperiodo promedio durante la ERTA en 2013 versus 2014 y 2018 en Fig. 6.7). Las diferencias entre genotipos en estas condiciones son menores (Capítulo 2), y por lo tanto más difíciles de detectar. Sin embargo, ni los resultados de este capítulo, ni los de los dos anteiores (Capítulos 4 y 5), obtenidos de dos experimentos independientes en años distintos, proveen evidencia suficiente para afirmar que los genes *Ppd-1* controlen la respuesta directa a fotoperíodo durante la ERTA. Sí parece haber una relación entre mayor sensibilidad a fotoperíodo y mayor magnitud de la respueta memoria durante la ERTA, lo cual es consistente con lo sugerido en el Capítulo 4, usando un set de datos y un análisis distintos a los de este Capítulo. No se conocen antecedentes en la literatura que permitan comparar el efecto que los alelos *Ppd-1a* en combinaciones simples, dobles o triples tuvieron sobre el balance de la respuesta directa y memoria de la ERTE o la ERTA, pero las magnitudes de ambas respuestas de la ERTA en Paragon (Fig. 6.6) están de acuerdo con el único otro reporte de ambas variable en un genotipo *Ppd-1b* (Whitechurch y Slafer 2002) y con los valores de respuesta directa en líneas portadoras *Ppd-1b*, *Ppd-D1a* y *Ppd-B1a* en González *et al.* (2005b).

Tanto Paragon como P(CS-2B) mostraron respuestas directa y memoria significativas de la ERTE, las del primero considerablemente mayores que las del segundo genotipo, mientras que los genotipos con al menos un alelo *Ppd-A1a* o *Ppd-D1a* mostraron respuestas aún menores y cuya significancia dependió del año. Durante 2014, la respuesta directa de esos genotipos rondó los 60 °C d y para aquellos que mostraron respuesta memoria, la misma fue de *c.* 50 °C d. En el único otro reporte existente sobre la respuesta directa y memoria durante la ERTE, Allison y Daynard (1976), también encontraron ambos tipos de respuesta en el cultivar Sonora 64 (*Ppd-D1a* y *Ppd-B1a*) mediante transferencias recíprocas entre tratamientos de fotoperiodo al momento de doble lomo, con magnitudes similares. Tanto la respuesta memoria como directa rondaron los *c.* 40 °C d.

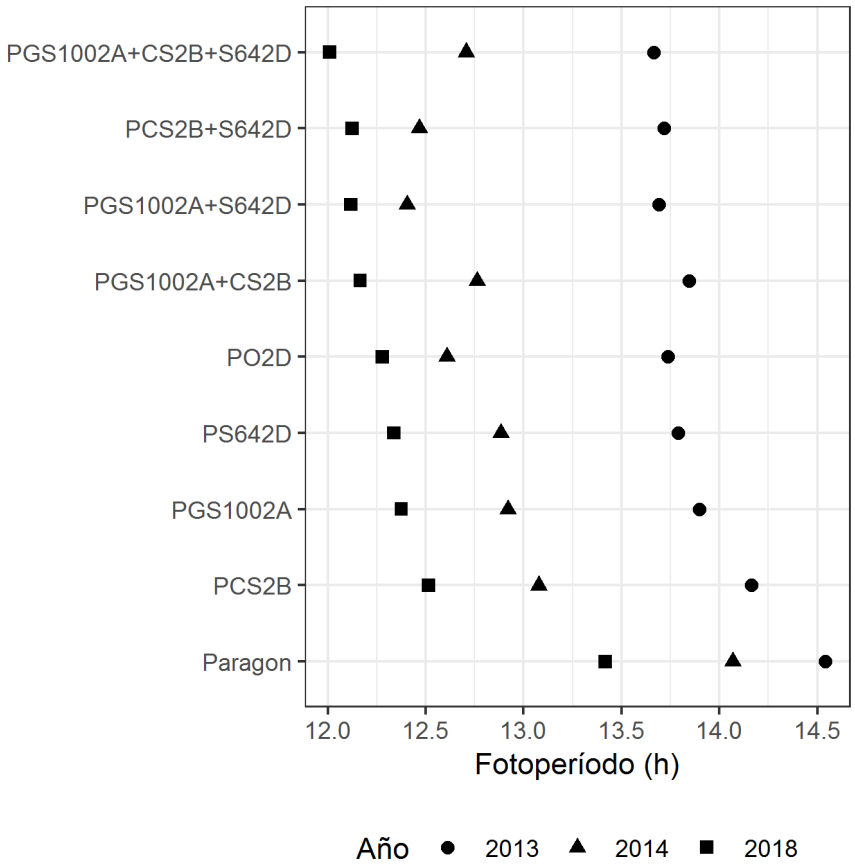

Figura 6.7: Fotoperiodo promedio explorado entre espiguilla terminal y antesis por los distintos genotipos cundo estuvieron bajo fotoperiodo natural durante todo el ciclo, en distintos años.

Los genes *Ppd-1* no solo afectaron algunas de las respuestas de la duración de las etapas sino también la del número de estructuras a cambios en el fotoperiodo durante la EVE y la ERTE. El número final de hojas, por ejemplo, no solo respondió al fotoperiodo durante la EVE, sino que para Paragon durante ambos años y para P(CS-2B) en el 2017, también respondió al fotoperiodo durante la ERTE, mientras que ninguno de los portadores de tanto *Ppd-A1a* como *Ppd-D1a* mostraron este tipo de respuesta. Esto coincide con único otro reporte conocido sobre el efecto de las transferencias de fotoperiodo en doble lomo sobre el número final de hojas y espiguillas, en el que Allison y Daynard (1976) no encontraron cambios significativos en el número de hojas en respuesta a transferencias a partir de doble lomo en Sonora 64, portador de dos alelos *Ppd-1a*. Brooking *et al.* (1995) sugirieron, a partir de experimentos con cultivares de distinta sensibilidad a fotoperiodo y a vernalización, que los últimos primordios de hojas y los primeros de espiguilla podían convertirse en una u otra estructura si se daban cambios abruptos en el ambiente (i.e. fotoperiodo) hasta tanto no estuvieran "comprometidos" a convertirse en hojas o espiguillas, y que esto podía pasar tan tarde como aún después de la diferenciación de la espiguilla terminal. Esto explicaría que el número de hojas, al menos en los genotipos de mayor sensibilidad a fotoperiodo (Paragon y P(CS-2B)) respondiera al fotoperiodo hasta ET. Considerando la variabilidad inducida en la respuesta al fotoperiodo después de doble lomo, pareciera ser que la composición alélica en *Ppd-1* determina en alguna medida la labilidad de los primordios no comprometidos, en el marco de la teoría propuesta por Brooking *et al.* (1995).

6.5 Conclusión

Las duraciones de todas las etapas mostraron respuesta directa al fotoperíodo, y la combinación alélica en *Ppd-1* afectó la magnitud de esa respuesta durante la EVE y la ERTE, pero no tuvieron un efecto claro sobre la respuesta directa de la ERTA. Las etapas reproductivas también mostraron respuesta al fotoperíodo explorado durante etapas previas, y las magnitudes de estas respuestas memoria también estuvieron afectadas por *Ppd-1*. Sin embargo, ninguna combinación alélica pareció modificar de manera consistente el balance entre respuesta directa y respuesta memoria de ninguna etapa particular en forma consistente.

Capítulo 7: Discusión general

Manipular procesos fisiológicos relacionados al rendimiento potencial a través de la selección indirecta de una característica secundaria funcionalmente asociada al rendimiento (mejoramiento analítico y/o fisiológico) (Araus *et al.* 2008) permitiría mejorar su tasa de progreso (Slafer 2003, Reynolds *et al.* 2009, Fischer 2011, Foulkes *et al.* 2011), en comparación con la alcanzada mediante la selección tradicional de rendimiento *per se* en el ambiente objetivo de mejora (mejoramiento empírico o convencional) (Foulkes *et al.* 2011). Esta propuesta es interesante dado que los incrementos relativos actuales en los rendimientos son considerablemente menores a los deseables (Slafer *et al.* 2001, Hall y Richards 2013, Fischer y Rebetzke 2018). Pero para que esto pueda implementarse en un programa de mejoramiento, los controles genéticos de estos procesos deberían ser conocidos e idealmente estar dados por pocos genes (Slafer 2003).

El desarrollo es un proceso fisiológico continuo que define el momento de ocurrencia de eventos importantes para la generación de rendimiento (Capítulo 1 ítem 1.1.2, Fig. 7.1) y, en última instancia, fija la fecha de antesis y con ello el grado de adaptación del cultivo a un ambiente dado, estableciendo el rendimiento potencial de acuerdo a las variables ambientales probables de ser exploradas por el cultivo (Worland 1996, Snape *et al.* 2001, Capítulo 1 ítem 1.1.2). A pesar de ser un proceso continuo, en él se pueden identificar etapas de distinta importancia relativa en la definición del rendimiento potencial, de acuerdo con lo expuesto en la Introducción General (Capítulo 1, ítem 1.1.2 y 1.1.3). Particularmente, la etapa reproductiva tardía (ERTA) es crítica en este sentido (Fischer 1975, 1985), ya que durante la misma se desarrollan los primordios florales y se define la proporción de ellos que llega a antesis como flor fértil (Fig. 7.1), principal determinante del número de granos (Fischer y Stockman 1980, Stockman *et al.* 1983, Capítulo 1 ítem 1.1.3). La supervivencia floral depende en gran medida de los recursos que el cultivo capture durante esta etapa, lo cual está estrechamente relacionado no sólo con las condiciones ambientales durante la misma, sino también con su duración (González *et al.* 2011a y referencias ahí citadas).

Como se mencionó en la Introducción general, la tasa de desarrollo hasta antesis, o su inversa, la duración, es regulada por factores ambientales (ver detalle en Capítulo 1 ítem 1.1.4), principalmente la temperatura, a través de su efecto *per se* (Slafer 1996) o el de la vernalización (Griffiths *et al.* 1985), y el fotoperíodo (Vince Prue 1975), y la magnitud de esas respuestas son moduladas por un grupo de genes, llamados a veces "genes de floración", los genes *Eps*, *Vrn* y *Ppd*, respectivamente (Worland 1996, Snape *et al.* 2001). Al observarse que las etapas de desarrollo pre-antesis podían mostrar respuesta a fotoperíodo al menos parcialmente independientes (Slafer y Rawson 1994, 1996), se propuso la manipulación de sus sensibilidades a fotoperíodo para mejorar el rendimiento potencial a través de una mayor duración de la ERTA, acortando las etapas previas para no modificar la fecha de antesis (Slafer *et al.* 1996, 2001). Pero, aunque se sabía que la respuesta a fotoperíodo está controlada por los genes *Ppd-1* (ver Capítulo 1 ítem 1.1.5), al comienzo de esta tesis el conocimiento en torno de estos genes se limitaba al efecto de un pequeño número de variantes alélicas (en combinaciones simples en su mayoría) sobre el tiempo a antesis (ver Capítulo 1 ítem 1.1.6). Su impacto sobre la respuesta a fotoperíodo de tanto las duraciones de las etapas pre-antesis como del número de estructuras diferenciadas durante cada una de ellas eran aún poco comprendidas (González *et al.* 2005b), y no había reportes previos sobre la combinación doble y triple de distintos alelos sobre dichas respuestas.

Esta tesis tuvo por objetivo general determinar el efecto de distintas combinaciones alélicas para los genes de sensibilidad al fotoperiodo *Ppd-1* sobre el desarrollo fásico y morfológico del cultivo de trigo a antesis bajo diferentes ambientes

fotoperiódicos (Fig. 7.1). Por ello, la fuente de variación utilizada comprendió tanto a componentes genéticos (líneas isogénicas con variabilidad únicamente en *Ppd-1*) como componentes ambientales (tratamientos de fotoperíodo). A través de los capítulos de resultados de esta tesis se evaluó el efecto de los genes *Ppd-1* bajo diferentes tratamientos de fotoperíodo (continuo y con transferencias) en ensayos en cámaras, invernáculo y a campo, en macetas y parcelas, para determinar su impacto no sólo de la duración del tiempo a antesis, sino también de etapas pre-antesis (EVE, ERTA y ERTA, o EM-CE, CE-HB y HB-AN) (Fig. 7.1). A nivel externo, la aparición de hojas se midió para determinar el numero final de hojas, NFH) y la tasa de aparición de las mismas (TAH o filocrono). La dinámica de diferenciación de primordios de hojas y espiguillas en el ápice meristemático también fue evaluada, junto con la dinámica de diferenciación y mortandad de flores (Fig. 7.1). De esta manera, se cumplieron los objetivos específicos propuestos (Capítulo 1 ítem 1.3) y se pusieron a prueba las hipótesis formuladas (Capítulo 1 ítem 1.4).

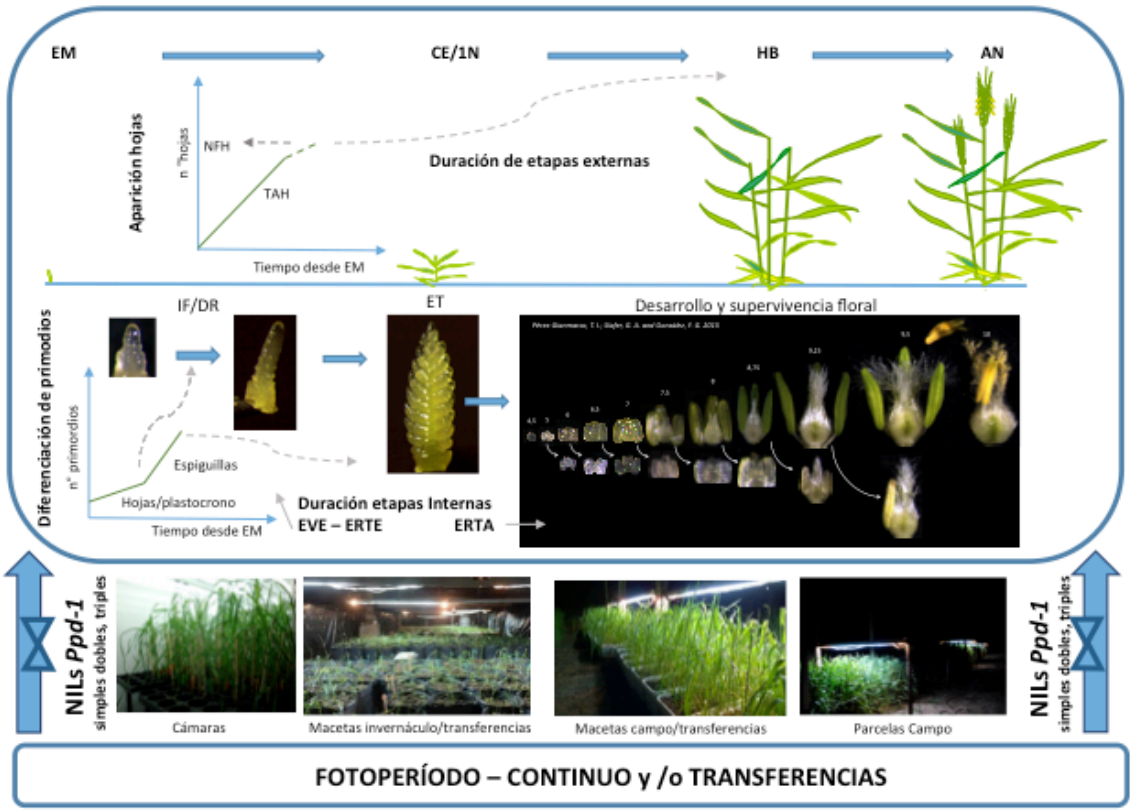

Figura 7.1: Esquema de las fuentes de variabilidad utilizadas, tanto genéticas (distintas combinaciones alélicas en Ppd-1 en forma de las líneas isogénicas, NILs) como ambientales(los tratamientos de fotoperiodo) para caracterizar el efecto de Ppd-1 sobre la respuesta a fotoperíodo del desarrollo fásico (fenología externa e interna) y morfológico (aparición de hojas, diferenciación de primordios, y desarrollo y supervivencia florales).

En cada capítulo previo se discutieron en detalle los resultados obtenidos, por ello en este capítulo final se discuten de forma integrada los resultados obtenidos a través de los capítulos en el marco de la literatura actual no sólo fisiológica sino también molecular. Hacia el final del capítulo se concluye sobre la evidencia provista para evaluar las hipótesis, resaltándose los aportes hechos al estado del arte del tema de

estudio. Finalmente se proponen nuevas líneas de investigación posibles a partir de los interrogantes que estos conocimientos plantean.

7.1 Integración de los resultados a través de los capítulos

7.1.1 Integrando los resultados fisiológicos a los conocimientos sobre ruta metabólica de la floración

El efecto de los alelos de insensibilidad *Ppd-1a* sobre la duración de las etapas pre-antesis (Capítulos 2, 5 y 6), sobre la dinámica de diferenciación de primordios (Capítulos 2 y 3) y por lo tanto sobre el número de estructuras producidas (Capítulos 2, 3 y 6) fueron comparables a los de alargar el fotoperíodo, mientras que la magnitud de dicho efecto dependió de la variante alélica particular considerada. Si se tiene en cuenta la ruta metabólica de la floración en trigo (Distelfeld *et al.* 2009, Chen *et al.* 2014) y, particularmente, el rol de *Ppd-1* en esa ruta (Beales *et al.* 2007, Shaw *et al.* 2012), este resultado parece razonable: los alelos mutantes *Ppd-1a* muestran patrones de expresión alterados, con altos niveles de transcriptos durante la noche (Shaw *et al.* 2012), de manera análoga al efecto que el fotoperíodo largo tendría sobre la expresión de *Ppd-1b*, o *wild-type*. Estos niveles de transcripto elevados promueven a su vez la expresión de *TaFT1*, el ortólogo en trigo de *FLOWERING LOCUS T*, incluso en condiciones no inductivas, i.e. fotoperíodo corto (Turner *et al.* 2005; Beales *et al.* 2007; Díaz *et al.* 2012; Shaw *et al.* 2012). No es sorprendente entonces haber encontrado que genotipos muy insensibles, como aquel con tres *Ppd-1a* por ejemplo, mostraran fenotipos poco variables entre tratamientos de fotoperíodo tanto para la duración de las etapas pre-antesis como para la dinámica de diferenciación de primordios, el número final de hojas por vástago o de espiguillas por espiga (Capítulos 2 y 6) como para la dinámica de primordios florales (Capítulo 3). También en concordancia con este esquema, el comportamiento de los genotipos con mayor sensibilidad a fotoperíodo fue muy similar al del triple insensible cuando se cultivaron bajo fotoperíodo largo. De la misma manera, los efectos de los alelos de insensibilidad a fotoperíodo *Ppd-1a* fueron más notorios bajo fotoperíodo corto (Capítulo 2) y siguieron un gradiente decreciente ante aumentos en el fotoperíodo, hechos evidentes para la duración de las etapas y el número final de hojas (Capítulo 4). Por otro lado esta aproximación permitiría comprender la respuesta "cualitaitva" observada en esta tesis (Capitulo 2 y 6) y reportada previamente por Bentley *et al.* (2011) cuando los genotipos más sensibles, portadores de tres *Ppd-1b* fueron expuestos a fotoperíodos cortos, poco inductivos. La falta de inducción fotoperíodica limita su nivel de expresión en tal magnitud que la expresión de *TaFT1* sería insuficiente para alcanzar la floración (Shaw *et al.* 2012).

Por primera vez pudimos observar que el efecto de los alelos *Ppd-1a* nunca fue completamente aditivo en todas las variables medidas. Es decir, ninguna de las etapas pre-antesis fue acortada (Capítulos 2 y 4) y ninguna de las dinámicas de diferenciación de primordios aceleradas (Capítulos 2 y 3) en el genotipo portador de tres *Ppd-1a* a niveles comparables con la suma de los efectos individuales de cada *Ppd-1a* sobre el fondo sensible de Paragon. Aunque el genotipo triple insensible mostró consistentemente las mayores magnitudes de los efectos de los alelos *Ppd-1a*, también fue difícil de separar su comportamiento del genotipo que portaba únicamente *Ppd-D1a*, el alelo que mostró mayores efectos individuales. Shaw *et al.* (2012) describieron el fenómeno aunque solo para la fecha de antesis, usando éstas y otras líneas sobre el mismo fondo genético pero con otras combinaciones de uno, dos y tres *Ppd-1a*. A pesar de que encontraron una relación directa entre el número creciente de alelos *Ppd-1a* en

un genotipo y los niveles de expresión de *TaFT1* resultantes, la antesis no siempre fue adelantada de acuerdo con los niveles de expresión de este gen en genotipos con dos y tres alelos *Ppd-1a* en fotoperíodo corto (10 h), por lo que sugirieron que podría haber un mecanismo que limite la tasa máxima de desarrollo corriente abajo de *TaFT1*. Ese mismo mecanismo podría explicar la saturación observada de la respuesta a la incorporación de alelos *Ppd-1a* adicionales en este trabajo, no sólo para el tiempo a antesis (Capítulo 2) sino también para la sensibilidad (Capítulo 4) o respuesta (Capítulo 6) a fotoperíodo y la dinámica de primordios (Capítulos 2 y 3). Fisiológicamente, esto tiene sentido bajo el concepto de coordinación del desarrollo en trigo propuesto por Hay y Kirby (1991). Antes de la emergencia, la planta puede contar con entre 5 y 6 hojas diferenciadas en el ápice (ver Cuadro 4.3.4) que deben ser expandidas antes de que termine la elongación del pedúnculo para luego espigar. Como la antesis en trigo suele darse alrededor de la espigazón, esto necesariamente pone un límite inferior para el tiempo desde la emergencia hasta antesis.

Shaw *et al.* (2012) mostraron cómo los productos de la transcripción de *Ppd-1* no son genoma-específicos, es decir los transcriptos de *Ppd-1a* actúan sobre genes blanco en los tres genomas. De esa manera, altos niveles de transcripto de un único *Ppd-1a* caracterizado como de efecto fuerte puede promover niveles suficientemente altos de *TaFT1* como para saturar la respuesta observada. Este descubrimiento es relevante y llama a considerar que es poco probable que nuevas variantes alélicas, también de ganancia de función, tengan un efecto distinto al descripto para estos cinco alelos *Ppd-1a*. Por otro lado, discrepancias en el orden de insensibilidad provisto por los alelos entre diferentes estudios (e.g. Tanio y Kato 2007, Nishida *et al.* 2013 y los resulados reportados en esta tesis) discutidas en el Capítulo 2, ítem 2.5.1, probablemente se deban a nombrar de la misma manera a distintos alelos mutantes de ganancia de función (i.e. que otorgan insensibilidad), al relacionarlos solamente al genoma al que pertenecen. La pertenencia a un genoma en particular en realidad no parece tener un efecto sobre la magnitud de su actividad *per se*, ya que la actividad de los transcriptos de *Ppd-1* se extiende a objetivos corriente abajo en los otros genomas. En cambio, la magnitud de su actividad está dada por el tipo de mutación, que sí ocurre en un genoma en particular (Beales *et al.* 2007, Díaz *et al.* 2012).

7.1.2 Integrando los resultados al modelo de respuesta a fotoperíodo en trigo

Los resultados del Capítulo 4 permiten concluir que el efecto de los alelos *Ppd-1a* sobre el tiempo a antesis bajo fotoperíodo corto, o en todo caso fotoperíodos menores al umbral, reportado en trabajos previos (González *et al.* 2005b, Díaz *et al.* 2012, Shaw *et al.* 2012, Bentley *et al.* 2013, Ochagavía *et al.* 2017, Pérez-Gianmarco *et al.* 2018- Capítulo 2) es exclusivamente debido a su efecto sobre la sensibilidad a fotoperíodo (Fig. 4.3), es decir, dado que reducen la sensibilidad a fotoperíodo, el ciclo a antesis se acorta. No hubo evidencias de que la variabilidad en *Ppd-1* para tiempo a antesis estuviera asociada a cambios en la precocidad intrínseca y el fotoperíodo umbral (Capítulo 4, ítem 4.4.1), de acuerdo con lo que propusieron Whitechurch y Slafer (2002) a través de evaluar el comportamiento de tres líneas de sustitución cromosómica con dos combinaciones alélicas de *Ppd-1a* y Vázquez (2010) para dos líneas de Mercia con *Ppd-D1a y Ppd-B1a*.

Modelar la respuesta a fotoperíodo hasta antesis dividiendo el ciclo en etapas pre-antesis que fueran agronómicamente relevantes (Slafer y Rawson 1994), pero que además contemplaran la evidencia sobre la definición del número de hojas y su dinámica de aparición (Brooking *et al.* 1995, Jamieson *et al.* 1998), junto con

transferencias entre tratamientos de fotoperíodo al comienzo de la encañazón (CE), permitió caracterizar y cuantificar los efectos de los genes *Ppd-1* sobre los mecanismos de dicha respuesta (Capítulo 4, ítem 4.3.1). Así, se vio que en la única etapa en que la sensibilidad a fotoperíodo fue afectada directamente por los genes *Ppd-1* fue la comprendida entre emergencia y el comienzo de la encañazón (EVE + ERTE, Capítulo 4, ítem 4.4.2). En el Capítulo 2 (ítem 2.5.2) se propuso que la respuesta cuantitativa a fotoperíodo aumenta a medida que avanza el desarrollo, dado que la ERTA fue la etapa cuya duración sufrió la mayor reducción al ser cultivadas las plantas en fotoperíodo largo, de manera similar a lo que observaron Whitechurch y Slafer (2002). Sin embargo, esta propuesta fue basada en una respuesta que necesariamente confunde la respuesta a fotoperíodo actual (directo) con la respuesta al fotoperíodo previo (memoria), ya que el mismo permaneció constante (o bajo la misma extensión) durante todo el ciclo. Por lo tanto, el número de hojas, que puede definirse tan tarde como ET (Brooking *et al.* 1995) según la sensibilidad a fotoperíodo durante esa etapa (Capítulo 4, ítem 4.4.4, y capítulo 6, ítem 6.3.2) condicionaría la duración de la ERTA, sin que se corresponda necesariamente con una respuesta directa de la misma a fotoperíodo (ver detalle en Capítulo 4, ítem 4.5). Por otro lado, es indiscutible que solamente durante la ERTA hubo respuesta cualitativa a fotoperíodo, en concordancia con reportes previos (Pugsley 1966, Halse y Weir 1970, Slafer y Rawson 1996), aunque esa respuesta fue sólo observada cuando las plantas fueron cultivadas en cámaras de crecimiento (Capítulo 2) aún cuando las que crecieron a campo hayan estado expuestas a fotoperíodos comparables durante la misma etapa (Fig. 4.5). Las bases funcionales de este fenómeno, son a nuestro mejor entender, poco comprendidas aún. Si bien una posible explicación podría estar asociada a los bajos niveles de expresión bajo fotoperíodo corto (ítem 7.1.1), el hecho de haberlo observado en cámaras pero no a campo bajo fotoperiodos similares podría indicar algún tipo de interacción con la radiación que merece nuevos estudios.

7.1.3 ¿Es posible modificar la sensibilidad a fotoperíodo de las etapas de forma independiente sólo a través de *Ppd-1*?

A la luz de los resultados de esta tesis, parecería poco probable que la variación en *Ppd-1* por sí sola permitiera modificar la sensibilidad a fotoperíodo de una etapa por sobre la de las demás para aumentar la duración relativa de la ERTA y así, el potencial de rendimiento (Slafer *et al.* 1996, Slafer *et al.* 2001). En el Capítulo 2 no se pudo encontrar que alguna combinación particular de alelos *Ppd-1a* permitiera aumentar la participación relativa de alguna etapa en la duración del ciclo a antesis (Figura 7.1) y según el modelo propuesto en el Capítulo 4 para la duración de las etapas particulares (ítem 4.4.2), la sensibilidad al fotoperíodo experimentado durante la etapas CE-HB y HB-AN no pareció ser afectada por la combinación alélica en *Ppd-1*. Este hallazgo fue reforzado por los resultados de los Capítulos 5 y 6, ambos provenientes de ensayos independientes bajo distintas condiciones de cultivo. En el Capítulo 4, la sensibilidad a fotoperíodo por etapas (modelo T, ítem 4.4.2) fue estimada considerando todos los datos y tratamientos de fotoperíodo, por lo que el fotoperíodo experimentado durante la ERTA fue independiente de aquel de etapas previas. Sin embargo, haber considerado todos los tratamientos de fotoperíodo en forma conjunta podría haber dificultado la detección de pequeños efectos de los alelos *Ppd-1a* sobre la respuesta directa de esta etapa. Por eso, los tratamientos con fotoperíodos previos distintos y el estudio de la respuesta directa se consideraron también de forma separada en los Capítulos 5 y 6. Esos experimentos y análisis no permiten concluir que *Ppd-1* module la magnitud de la

respuesta directa durante la ERTA de forma consistente (Capítulo 5 y 6), mientras que aún en los años en que se detectaron indicio de su efecto, el mismo no fue independiente de aquel que tuvieron sobre la EVE y la ERTE (Capítulo 2 y 6) (Fig. 7.2). De manera similar, González *et al.* (2005b) trabajando sobre otras líneas con dos de estos alelos *Ppd-1a* en un fondo genético distinto concluyeron que la variabilidad en *Ppd-1* no parecía responsable de la sensibilidad a fotoperíodo durante la encañazón. En otro tipo de análisis, García *et al.* (2011) encontraron que una mayor participación relativa de la ERTA en el ciclo a antesis incrementó el rendimiento en grano a través de un mayor número de granos, pero no encontraron que esa mayor duración relativa de la ERTA estuviera relacionada con variabilidad en *Ppd-1*.

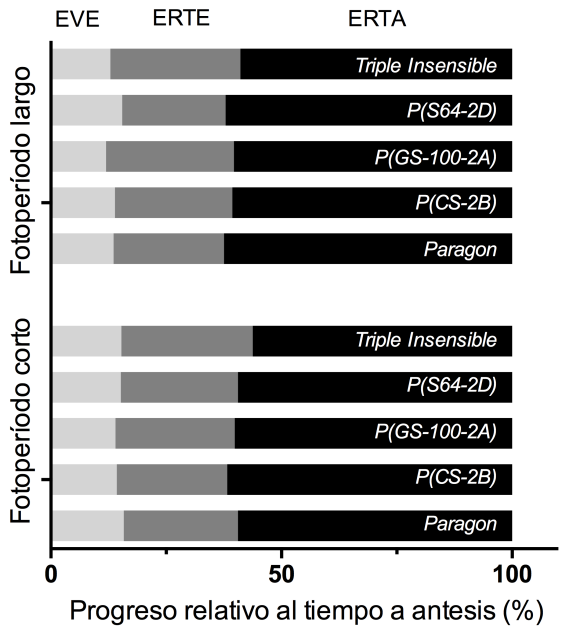

Figura 7.2: Duración de las etapas vegetativa (EVE), reproductiva temprana (ERTE) y tardía (ERTA) relativa al tiempo térmico desde emergencia a antesis para cinco líneas isogénicas portadoras de tres (Triple Insensible), uno (P(CS-2B), P(GS-100-2A), P(S64-2D)) o ningún (Paragon) alelo Ppd-1a, bajo fotoperíodo corto y largo. Datos del Capítulo 2.

Por el momento, y en respuesta a Sylvester-Bradley *et al.* (2012), no tenemos el conocimiento del control genético de la duración de las etapas particulares del ciclo a antesis para manipularlas independientemente. Ciertamente, según los resultados expuestos, la manipulación del locus *Ppd-1* únicamente, no es suficiente para lograrlo. Sin embargo, se ha reportado que los *Ppd-1a* pueden afectar en mayor medida la duración de una etapa pre-antesis que de las otras (Scarth *et al.* 1985, Foulkes *et al.* 2004, González *et al.* 2005b) y hay evidencias de variabilidad en la sensibilidad del filocrono a fotoperíodo en distintos cultivares (Slafer y Rawson 1997, Miralles y Richards 2000, Miralles *et al.* 2003, Whitechurch *et al.* 2007), causando respuestas diferenciales entre las etapas pre-antesis al fotoperíodo experimentado durante las mismas. El hecho de que algunos autores hayan descripto otras relaciones entre la respuesta memoria y la directa en otros genotipos (Miralles y Richards 2000) es alentador. Si se pudieran encontrar los genes responsables de la mayor respuesta directa durante la ERTA que ellos describen, comparada a la respuesta memoria observada en ese cultivar, tal vez se podría lograr un genotipo de menos hojas (y de inicio de encañazón anticipado) a través de la incorporación de *Ppd-1a*, pero que tarde más en expandir esas hojas, y por lo tanto en llegar antesis, con entonces un mayor período de

crecimiento de la espiga, a través de una menor tasa de expansión de hojas o de una mayor duración de la elongación del pedúnculo.

7.2 Evaluación de las hipótesis

1) *(a) Diferentes combinaciones alélicas para los genes Ppd-1 afectan tanto al tiempo a antesis como a la duración de las etapas particulares que lo componen, i.e. EVE, ERTE y ERTA, en forma distinta. (b) Dicho efecto sobre la duración de las etapas repercute sobre el número de estructuras formadas en cada una de ellas, ya que el efecto de los genes sobre la duración es mayor que el que tienen sobre la tasa de diferenciación de primordios/expansión de hojas.*

   Los resultados de duraciones del ciclo a antesis y de sus etapas intermedias en los Capítulos 2, 4 y 6 proveen evidencia suficiente y rigurosa que respalda parcialmente a la primera parte de esta hipótesis (a) y por lo tanto no permite rechazarla. Sin embargo, no se pudo observar un efecto diferencial de las combinaciones alélicas sobre las diferentes etapas. Los resultados de dinámica (Capítulo 2) y número (Capítulos 2, 3 y 6) de primordios proveen evidencia en contra o a favor de la segunda parte de la hipótesis (b), dependiendo de qué tipo de primordio se trate. Tanto el número de hojas (Capítulos 2 y 6) como de primordios florales (Capítulo 3) y flores fértiles en antesis (Capítulo 3 y 5) variaron con la duración de las etapas durante las cuales se definen en su mayor parte, la EVE y la ERTA, respectivamente, lo cual es evidencia a favor de esta parte de la hipótesis. Sin embargo, la relación entre el número de espiguillas y la duración de la ERTE (Capítulos 2 y 6) no fue tan clara para cualquier genotipo distinto de Paragon ya que los alelos *Ppd-1a* tuvieron un efecto importante sobre la tasa de diferenciación de espiguillas (Capítulo 2), por lo que la hipótesis se rechaza parcialmente.

2) *Los genes Ppd-1 afectan en mayor medida la sensibilidad al fotoperíodo con poco o ningún impacto en el fotoperíodo umbral. La duración mínima de la fase o precocidad intrínseca es independiente de los genes Ppd-1 en cualquiera de sus combinaciones.*

   Cuando se analizó el tiempo a antesis en el Capítulo 4, no se pudo encontrar evidencia en contra de esta hipótesis. Sin embargo, al realizar el análisis por etapas, sólo hasta inicio de encañazón (EM-CE o EVE+ERTE) se observó igual respuesta que en antesis. Para la etapa posterior (CE-HB y HB-AN, o ERTA) no se observó el mismo tipo de respuesta. Si bien en los Capitulo 5 y 6 se observó respuesta directa de la ERTA a fotoperíodo, cuya magnitud estuvo determinada por los genes *Ppd-1*, el efecto memoria fue, en algunos casos, de igual magnitud. Por ello cuando todos los tratamientos se consideraron en conjunto (Capítulo 4), no se pudo ajustar una curva de respuesta cuantitativa al fotoperíodo directo, resaltando la importancia y alto peso relativo del efecto memoria. En los modelos propuestos en el Capítulo 4, los genes *Ppd-1* no estuvieron asociados a la sensibilidad al fotoperíodo (directa) durante la ERTA sino que condicionaron la respuesta al fotoperíodo explorado previamente, dado principalmente por el número de hojas que faltaban aparecer a partir de CE y por sensibilidad a fotoperíodo previo. Para la última etapa de elongación del pedúnculo (HB-AN), el efecto de los genes sobre la respuesta general a fotoperiodo fue despreciable. No se encontró para la ERTA (CE-HB ni HB-AN) un valor de

fotoperíodo umbral ni de precocidad intrínseca a pesar de haber explorado fotoperíodos de hasta 23 h.

3) *Existe una respuesta diferencial de las combinaciones alélicas para los genes Ppd-1 a alteraciones en el ambiente fotoperiódico exclusivamente durante la ERTA, modificando la duración de dicha etapa, lo que a su vez genera diferencias en el número de flores fértiles en antesis, asociado con alteraciones en el peso de las espigas en antesis.*

Los resultados de los Capítulos 5 y 6 proveen evidencia en contra de esta hipótesis para la mayor parte de los años experimentales en lo que a duraciones de la ERTA se refiere. Aunque el número de flores fértiles estuvo muy asociado al peso de las espigas en antesis, esta variable no siempre respondió a las extensiones de fotoperíodo de igual manera que la duración de la ERTA, debido a cambios en la partición de biomasa a espiga (Capítulo 5). Estos resultados permiten rechazar esta hipótesis.

4) *La duración de cada etapa del desarrollo responde de manera directa al fotoperíodo explorado durante la misma, aunque dicha respuesta se encuentra condicionada por el fotoperíodo explorado en etapas previas.*

Evidencias provenientes de dos análisis distintos (Capítulos 5 y 6) no permiten rechazar esta hipótesis puesto que la duración de las etapas mostró respuesta al fotoperiodo explorado durante las mismas y también al explorado en etapas previas. Además, se encontró efecto de *Ppd-1* sobre la magnitud de la respuesta directa de la EVE y la ERTE, y sobre la respuesta memoria de la ERTE y la ERTA, aunque no se encontró que *Ppd-1* afecte al balance entre respuesta directa y memoria de manera consistente.

7.3 Principales contribuciones al conocimiento

En forma general, el trabajo llevado a cabo como parte de esta tesis permitió conocer el efecto de combinaciones alélicas simples, dobles y triples con distintas variantes de *Ppd-1a,* la respuesta del desarrollo fásico y morfológico de trigo al fotoperiodo, expandiendo ampliamente los escasos conocimientos previos. Al momento de proponer esta tesis, se conocía el efecto de muy pocos alelos *Ppd-1a* sobre la duración de las etapas pre-antesis y sobre las estructuras producidas durante las mismas, sin información sobre las variantes alélicas en *Ppd-A1*, o relacionado a la aditividad de los efectos de los alelos de insensibilidad. Asimismo, la información sobre el efecto de *Ppd-1* en la dinámica de primordios estaba limitada a la fase desde EM hasta CE y solo para *Ppd-B1a* (Scarth *et al.* 1985). Aunque al momento de finalización de esta tesis existen reportes usando las mismas líneas sobre las duraciones de etapas pre-antesis, la dinámica de primordios y el número de estructuras bajo condiciones de campo (Ochagavía *et al.* 2017, Prieto *et al.* 2018), los resultados obtenidos de esta tesis son los únicos reportados en cámaras de crecimiento. Más notablemente, son los únicos disponibles sobre el efecto de *Ppd-1* sobre la respuesta de estas variables a cambios en el fotoperiodo (Pérez-Gianmarco *et al.* 2018, 2019).

La cantidad de tratamientos de fotoperiodo y transferencias en distintas etapas del ciclo utilizadas no tiene precedente entre los trabajos con esta cantidad de líneas isogénicas para *Ppd-1*. El análisis de los datos así obtenidos, realizado mediante

modelos jerárquicos bayesianos, permitió describir por primera vez en un solo modelo el efecto de cada combinación alélica en *Ppd-1* sobre los parámetros de respuesta a fotoperiodo del tiempo a antesis. Además, permitió proponer un modelo novedoso de respuesta a fotoperiodo de las etapas particulares del ciclo a antesis, con aún menor error que para el ciclo completo (Pérez-Gianmarco *et al.* 2020). Se dispone ahora, por primera vez, de una cuantificación del impacto de cada alelo *Ppd-1a* y sus diferentes combinaciones sobre el valor de sensibilidad a fotoperíodo para la etapa desde emergencia a antesis y desde emergencia al comienzo de la encañazón.

7.4 Interrogantes aún por ser respondidos

Aunque no se pudieron identificar combinaciones alélicas de *Ppd-1* que modifiquen la participación relativa de las distintas etapas pre-antesis, o el balance entre respuesta directa y memoria, el hecho de que algunos autores hayan descripto otras relaciones entre ambas respuestas en otros genotipos (Miralles y Richards 2000) es alentador. De poder vincular esa respuesta contrastante con los genes responsables, podría pensarse en optimizar la duración de las etapas pre-antesis a través de manipulaciones en ese (o esos) gen(es) y *Ppd-1*.

La variabilidad no explicada por el modelo de respuesta a fotoperiodo debería ser explorada desde la interacción entre fotoperíodo y temperatura en base a la propuesta de análisis de las respuestas a combinaciones estos dos factores en cultivares contrastantes (Slafer y Rawson 1996), sobre todo dada la creciente información disponible del control genético de la sensibilidad a la temperatura (Ochagavía *et al.* 2019). Esto sería especialmente interesante dado que a campo, con los cambios en la fecha de siembra no sólo cambia el fotoperiodo al que se expone el cultivo sino también la temperatura. Considerar esta interacción posiblemente contribuya a minimizar los errores de predicción de los modelos de simulación de base genética.

Con el desarrollo de nuevas líneas isogénicas con nuevas combinaciones de alelos, no solo en *Ppd-1* sino en otros genes de respuesta a fotoperíodo que han sido reportados, aunque con menor efecto, se podría seguir cuantificando sus interacciones, de manera de lograr mejores ajustes y comprensión de la regulación del desarrollo a antesis.

Capítulo 8: Bibliografía

Acuña TB, Richards R, Partington D, Merry A, Christy B, Zhang H, O'Leary G, Riffkin P. 2019. Extending the duration of the ear construction phase to increase grain yield of bread wheat. Crop and Pasture Science 70, 428–436.

Allison JCS, Daynard TB. 1976. Effect of photoperiod on development and number of spikelets of a temperate and some low-latitude wheats. Annals of Applied Biology 83, 93–102.

Amir J, Sinclair TR. 1991. A model of the temperature and solar-radiation effects on spring wheat growth and yield. Field Crops Research 28, 47–58.

Araus JL, Slafer GA, Royo C, Serret MD. 2008. Breeding for Yield Potential and Stress Adaptation in Cereals Critical. Reviews in Plant Science 27, 377–412.

Asseng S, Ewert F, Martre P et al. 2015. Rising temperatures reduce global wheat production. Nature Climate Change 5, 143–147.

Baker CK, Gallagher JN. 1983. The development of winter wheat in the field. 1. Relation between apical development and plant morphology within and between seasons. The Journal of Agricultural Science 101, 327.

Beales J, Turner A, Griffiths S, Snape JW, Laurie DA. 2007. A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (Triticum aestivum L.). Theoretical and Applied Genetics 115, 721–733.

Bentley AR, Horsnell R, Werner CP et al. 2013. Short, natural, and extended photoperiod response in BC2F4 lines of bread wheat with different Photoperiod-1 (Ppd-1) alleles. Journal of Experimental Botany 64, 1783–1793.

Bentley AR, Turner AS, Gosman N, Leigh FJ, Maccaferri M, Dreisigacker S, Greenland A, Laurie DA. 2011. Frequency of photoperiod-insensitive Ppd-A1a alleles in tetraploid, hexaploid and synthetic hexaploid wheat germplasm. Plant Breeding 130, 10–15.

Bloomfield MT, Hunt JR, Trevaskis B, Ramm K, Hyles J. 2018. Ability of alleles of PPD1 and VRN1 genes to predict flowering time in diverse Australian wheat (Triticum aestivum) cultivars in controlled environments. Crop and Pasture Science 69, 1061–1075.

Borràs-Gelonch G, Rebetzke GJ, Richards RA, Romagosa I. 2011. Genetic control of duration of pre-anthesis phases in wheat (Triticum aestivum L.) and relationships to leaf appearance, tillering, and dry matter accumulation. Journal of Experimental Botany 63, 69–89.

Brooking IR, Jamieson PD, Porter JR. 1995. The influence of daylength on final leaf number in spring wheat. Field Crops Research 41, 155–165.

Brooking IR, Kirby EJM. 1981. Interrelationships between stem and ear development in winter wheat: The effects of a Norin 10 dwarfing gene, Gai/Rht2. The Journal of Agricultural Science 97, 373–381.

Bürkner P-C. 2017. Brms: An R Package for Bayesian Multilevel Models Using Stan. Journal of Statistical Software 80, 1–28.

Carpenter B, Gelman A, Hoffman MD, Lee D, Goodrich B, Betancourt M, Brubaker M, Guo J, Li P, Riddell A. 2017. Stan: A Probabilistic Programming Language. Journal of Statistical Software 76, 1–32.

Chen A, Li C, Hu W, Lau MY, Lin H, Rockwell NC, Martin SS, Jernstedt JA, Lagarias JC, Dubcovsky J. 2014. PHYTOCHROME C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 10037–10044.

Craufurd PQ, Cartwright PM. 1989. Effect of Photoperiod and Chlormequat on Apical Development and Growth in a Spring Wheat (Triticum aestivum) Cultivar. Annals of Botany 63, 515–525.

Davidson JL, R CK, Jones DB, Bremner PM. 1985. Responses of Wheat to Vernalization and Photoperiod. Australian Journal of Agricultural Research 36, 347–359.

Delécolle R, Hay R, Guérif M, Pluchard P, Varlet-Grancher C. 1989. A method of describing the progress of apical development in wheat, based on the time-course of organogenesis. Field Crops Research 21, 147–160.

Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. 2011. InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba.

Díaz A, Zikhali M, Turner AS, Isaac P, Laurie DA. 2012. Copy Number Variation Affecting the Photoperiod-B1 and Vernalization-A1 Genes Is Associated with Altered Flowering Time in Wheat (Triticum aestivum). PLoS ONE 7, 1–11.

Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. 2009. Regulation of flowering in temperate cereals. Current Opinion in Plant Biology 12, 178–184.

Eagles HA, Cane K, Kuchel H, Hollamby GJ, Vallance N, Eastwood RF, Gororo NN, Martin PJ. 2010. Photoperiod and vernalization gene effects in southern Australian wheat. Crop and Pasture Science 61, 721–730.

Evans LT, Blundell C. 1994. Some Aspects of Photoperiodism in Wheat and its Wild Relatives. Australian Journal of Plant Physiology 21, 551–562.

Evans LT. 1978. The Influence of Irradiance Before and After Anthesis on Grain Yield and Its Components in Microcropsof Wheat Grown in a Constant Daylength and Temperature Regime. Field Crops Research, 5–19.

Fischer RA, Byerlee D, Edmeades G. 2014. Crop yields and global food security: Will yield increase continue to feed the world? Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.

Fischer RA, Connor DJ. 2018. Issues for cropping and agricultural science in the next 20 years. Field Crops Research 222, 121–142.

Fischer RA, Rebetzke GJ. 2018. Indirect selection for potential yield in early-generation, spaced plantings of wheat y other small-grain cereals: A review. Crop and Pasture Science 69, 439–459.

Fischer RA, Stockman YM. 1980. Kernel Number per Spike in Wheat (Triticum Aestivum L.): Responses to Preanthesis Shading. Australian Journal of Plant Physiology 7, 169–180.

Fischer RA. 1975. Yield Potential in a Dwarf Spring Wheat and the Effect of Shading. Crop Science 15, 607–613.

Fischer RA. 1983. Wheat. Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments. Int. Rice Res. Inst., 129–154.

Fischer RA. 1985. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. The Journal of Agricultural Science 105, 447–461.

Fischer RA. 2007. Understanding the physiological basis of yield potential in wheat. The Journal of Agricultural Science 145, 99.

Fischer RA. 2011. Wheat physiology: A review of recent developments. Crop and Pasture Science 62, 95.

Fischer RAT, Edmeades GO. 2010. Breeding and Cereal Yield Progress. Crop Science 50, S–85–S–98.

Foulkes J, Sylvester-Bradley R, Worland AJ, Snape JW. 2004. Effects of a photoperiod-response gene Ppd-D1 on yield potential and drought resistance in UK winter wheat. Euphytica, 63–73.

Foulkes MJ, Slafer GA, Davies WJ, Berry PM, Sylvester-Bradley R, Martre P, Calderini DF, Griffiths S, Reynolds MP. 2011. Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. Journal of Experimental Botany 62, 469–486.

García GA, Dreccer MF, Miralles DJ, Serrago RA. 2015. High night temperatures during grain number determination reduce wheat and barley grain yield: A field study. Global Change Biology 21, 4153–4164.

García GA, Serrago RA, Appendino ML, Lombardo LA, Vanzetti LS, Helguera M, Miralles DJ. 2011. Variability of duration of pre-anthesis phases as a strategy for increasing wheat grain yield. Field Crops Research 124, 408–416.

Gardner JS, Hess WM, Trione EJ. 1985. Development of the young wheat spike: A SEM study of Chinese spring wheat. American Journal of Botany 72, 548–559.

Garibaldi LA, Aristimuño FJ, Oddi FJ, Tiribelli F. 2017. Inferencia multimodelo en ciencias sociales y ambientales. Ecología Austral 27, 348–363.

Gelman A, Carlin JB, Stern HS, Dunson DB, Vehtari A, Rubin DB. 2013. Bayesian Data Analysis. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC.

Ghiglione HO, Gonzalez FG, Serrago R, Maldonado SB, Chilcott C, Curá JA, Miralles DJ, Zhu T, Casal JJ. 2008. Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat. The Plant Journal 55, 1010–1024.

Gonzalez FG, Aldabe ML, Terrile II, Rondanini DP. 2014. Grain Weight Response to Different Postflowering Source:Sink Ratios in Modern High-Yielding Argentinean Wheats Differing in Spike Fruiting Efficiency. Crop Science 54, 297.

Gonzalez FG, Miralles DJ, Slafer GA. 2003b. Floret development and spike growth as affected by photoperiod during stem elongation in wheat. Field Crops Research 81, 29–38.

Gonzalez FG, Miralles DJ, Slafer GA. 2011a. Wheat floret survival as related to pre-anthesis spike growth. Journal of Experimental Botany 62, 4889–4901.

Gonzalez FG, Terrile II, Falcón MO. 2011b. Spike Fertility and Duration of Stem Elongation as Promising Traits to Improve Potential Grain Number (and Yield): Variation in Modern Argentinean Wheats. Crop Science 51, 1693.

Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles D. 2003a. Grain and floret number in response to photoperiod during stem elongation in fully and slightly vernalized wheats. Field Crops Research 81, 17–27.

Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2002. Vernalization and photoperiod responses in wheat pre flowering reproductive phases. Field Crops Research 74, 183–195.

Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2005a. Floret development and survival in wheat plants exposed to contrasting photoperiod and radiation environments during stem elongation. Functional Plant Biology 32, 189–197.

González FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2005b. Pre-anthesis development and number of fertile florets in wheat as affected by photoperiod sensitivity genes Ppd-D1 and Ppd-B1. Euphytica 146, 253–269.

Gonzalez FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2005c. Photoperiod during stem elongation in wheat: Is its impact on fertile floret and grain number determination similar to that of radiation? Functional Plant Biology 32, 181.

González-Navarro OE, Griffiths S, Molero G, Reynolds MP, Slafer GA. 2015. Dynamics of floret development determining differences in spike fertility in an elite population of wheat. Field Crops Research 172, 21–31.

Griffiths FEW, Lyndon RF, Bennett MD. 1985. The Effects of Vernalization on the Growth of the Wheat Shoot Apex. Annals of Botany 56, 501–511.

Guo Z, Chen D, Alqudah AM, Röder MS, Ganal MW, Schnurbusch T. 2016. Genome-wide association analyses of 54 traits identified multiple loci for the determination of floret fertility in wheat. New Phytologist.

Hall AJ, Richards RA. 2013. Prognosis for genetic improvement of yield potential and water-limited yield of major grain crops. Field Crops Research 143, 18–33.

Halloran GH, Pennell AL. 1982. Duration and Rate of Development Phases in Wheat in Two Environments. Annals of Botany 49, 115–121.

Halse NJ, Weir RN. 1970. Effects of vernalization, photoperiod and temperature on phenological development and spikelet number of Australian wheat. Australian Journal of Agricultural Research 21, 383–393.

Haun JR. 1973. Visual Quantification of Wheat Development. Agronomy Journal 65, 116–119.

Hay R. 1986. Sowing date and the relationships between plant and apex development in winter cereals. Field Crops Research 14, 321–337.

Hay R, Kirby EJM. 1991. Convergence and Synchrony - a Review of the Coordiation of Development in Wheat. Australian Journal of Agricultural Research 42, 661–700.

He J, Le Gouis J, Stratonovitch P et al. 2012. Simulation of environmental and genotypic variations of final leaf number and anthesis date for wheat. European Journal of Agronomy 42, 22–33.

Hooker ML, Mohiuddin SH, Kanemasu ET. 1983. The effect of irrigation timing on yield and yield components of winter wheat. Canadian Journal of plant Science 63, 815–823.

IPCC. 2014. Fifth Assessment Report - Synthesis Report.

Jamieson PD, Brooking IR, Semenov MA, Porter JR. 1998. Making sense of wheat development: A critique of methodology. Field Crops Research 55, 117–127.

Kamran A, Iqbal M, Spaner D. 2014. Flowering time in wheat (Triticum aestivum L.): A key factor for global adaptability. Euphytica 197, 1–26.

Kirby EJM, Appleyard M. 1987. Cereal Developmental Guide (A Barron, Ed.). Cereal Unit.

Kirby EJM. 1974. Ear development in spring wheat. The Journal of Agricultural Science 82, 437–447.

Kirby EJM. 1988. Analysis of Leaf, Stem and Ear Growth in Wheat from Terminal Spikelet Stage to Anthesis. Field Crops Research 18, 127–140.

Kirby EJM. 1990. Co-ordination of leaf emergence and leaf and spikelet primordium initiation in wheat. Field Crops Research 25, 253–264.

Kiss T, Balla K, Veisz O, Láng L, Bedő Z, Griffiths S, Isaac P, Karsai I. 2014. Allele frequencies in the VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1 vernalization response and PPD-B1 and PPD-D1 photoperiod sensitivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (Triticum aestivum L.). Molecular Breeding 34, 297–310.

Langer RHM, Hanif M. 1973. A Study of Floret Development in Wheat (Triticum aestivum L.). Annals of Botany 37, 743–751.

Lavine M, Schervish MJ. 1999. Bayes Factors: What They are and What They are Not. The American Statistician 53, 119–122.

Law CN, Sutka J, Worland AJ. 1978. A Genetic study of day-length response in wheat. Heredity 41, 185–191.

Loomis RS, Connor DJ. 2002. Ecología de cultivos. Productividad y manejo en sistemas agrarios. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Longnecker N, Kirby EJM, Robson A. 1993. Leaf Emergence, Tiller Growth, and Apical Development of Nitrogen-Dificient Spring Wheat. Crop Science 33.

Major DJ. 1980. Photoperiod response characteristics controlling flowering of nine crop species. Canadian Journal of plant Science 60, 777–784.

Matsuyama H, Fujita M, Seki M et al. 2015. Growth and Yield Properties of Near-Isogenic Wheat Lines Carrying Different Photoperiodic Response Genes. Plant Production Science 1, 57–68.

McElreath RL. 2015. Statistical Rethinking: A Bayesian Course with Examples in R and Stan. CRC Press.

McIntosh RA, Yamazaki Y, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers WJ, Appels R. 2003. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Tenth International Wheat Genetics Symposium.1–47.

Miglietta F. 1989. Effect of Photoperiod and Temperature on Leaf Initiation Rates in Wheat (Triticum spp.). Field Crops Research 21, 121–130.

Miralles DJ, Richards RA. 2000. Responses of Leaf and Tiller Emergence and Primordium Initiation in Wheat and Barley to Interchanged Photoperiods. Annals of Botany 85, 655–663.

Miralles DJ, Richards RA, Slafer GA. 2000. Duration of the stem elongation period influences the number of fertile florets in wheat and barley. Australian Journal of Plant Physiology 27, 931–940.

Miralles DJ, Slafer GA, Richards RA, Rawson HM. 2003. Quantitative developmental response to the length of exposure to long photoperiod in wheat and barley. The Journal of Agricultural Science 141, 159–167.

Miralles DJ, Slafer GA. 2007. PAPER PRESENTED AT INTERNATIONAL WORKSHOP ON INCREASING WHEAT YIELD POTENTIAL, CIMMYT, OBREGON, MEXICO, 2024 MARCH 2006 Sink limitations to yield in wheat: How could it be reduced? The Journal of Agricultural Science 145, 139–149.

Monteith JL. 1977. Climate and Efficiency of Crop Production in Britain. PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON SERIES B-BIOLOGICAL SCIENCES 281, 277–294.

OECD/FAO (2011), OECD-FAO Agricultural Outlook 2011, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2011-en.

Muterko A, Kalendar R, Cockram J, Balashova I. 2015. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the Photoperiod-A1 gene in wheat. Plant Molecular Biology 88, 149–164.

Nelson GCR. 2010. Food security, farming, and climate change to 2050.

Nishida H, Yoshida T, Kawakami K, Fujita M, Long B, Akashi Y, Laurie DA, Kato K. 2013. Structural variation in the 5 upstream region of photoperiod-insensitive alleles Ppd-A1a and Ppd-B1a identified in hexaploid wheat (Triticum aestivum L.), and their effect on heading time. Molecular Breeding 31, 27–37.

Ochagavía H, Prieto P, Savin R, Griffiths S, Slafer G. 2017. Duration of developmental phases, and dynamics of leaf appearance and tillering, as affected by source and doses of photoperiod insensitivity alleles in wheat under field conditions. Field Crops Research 214, 45–55.

Ochagavía H, Prieto P, Savin R, Griffiths S, Slafer G. 2018. Dynamics of leaf and spikelet primordia initiation in wheat as affected by Ppd-1a alleles under field conditions. Journal of Experimental Botany 69, 2621–2631.

Ochagavía H, Prieto P, Zikhali M, Griffiths S, Slafer GA. 2019. Earliness Per Se by Temperature Interaction on Wheat Development. Scientific Reports 9, 1–11.

Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2018. Wheat pre-anthesis development as affected by photoperiod sensitivity genes (Ppd-1) under contrasting photoperiods. Functional Plant Biology 45, 645–657.

Pérez-Gianmarco TI, Slafer GA, González FG. 2019. Photoperiod-sensitivity genes shape floret development in wheat. Journal of Experimental Botany 70, 1339–1348.

Pérez-Gianmarco TI, Severini AD, González FG. 2020. Photoperiod-sensitivity genes (*Ppd-1*): Quantifying their effect on the photoperiod response model in wheat. Journal of Experimental Botany. En prensa. Disponible en https://doi.org/10.1093/jxb/erz483.

Piironen J, Vehtari A. 2017. Comparison of Bayesian predictive methods for model selection. Statistics and Computing 27, 711–735.

Pinthus MJ, Nerson H. 1984. Effect of photoperiod at different growth stages on the initiation of spikelet primordia in wheat. Australian Journal of Plant Physiology 11, 17–22.

Prieto P, Ochagavía H, Savin R, Griffiths S, Slafer GA. 2018. Dynamics of floret initiation/death determining spike fertility in wheat as affected by Ppd genes under field conditions. Journal of Experimental Botany 69, 2633–2645.

Pugsley AT. 1966. The Photoperiodic Sensitivity of Some Spring Wheats with Special Reference to the Variety Thatcher. Australian Journal of Agricultural Research **17**, 591–599.

R Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
Rahman MS, Wilson JH. 1977. Determination of Spikelet Number in Wheat. I Effect of Varying Photoperiod on Ear Development. Australian Journal of Agricultural Research 28, 565–574.

Rahman MS. 1980. Effect of Photoperiod and Vernalization on the Rate of Development and Spikelet Number per ear in 30 Varieties of Wheat. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 46, 68–70.

Rawson HM. 1970. Spikelet number, its control and relation to yield per ear in wheat. Australian Journal of biological Sciences 23, 1–15.

Rawson HM. 1971. An upper limit for spikelet number per ear in wheat, as controlled by photoperiod. Australian Journal of Agricultural Research 22, 537–546.

Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, Angus WJ. 2009. Raising yield potential in wheat. Journal of Experimental Botany 60, 1899–1918.

Royo C, Dreisigacker S, Alfaro C, Ammar K, Villegas D. 2015. Effect of Ppd-1 genes on durum wheat flowering time and grain filling duration in a wide range of latitudes. The Journal of Agricultural Science 154, 612–631.

Rosen J. 2016. A forest of hypotheses. Nature 536, 239–241.

Sadras VO, Slafer GA. 2012. Environmental modulation of yield components in cereals: Heritabilities reveal a hierarchy of phenotypic plasticities. Field Crops Research 127, 215–224.

Scarth R, Kirby EJM, Law CN. 1985. Effects of the Photoperiod Genes Ppd1 and Ppd2 on Growth and Development of the Shoot Apex in Wheat. Annals of Botany 55, 351–359.

Scarth R, Law CN. 1983. The location of the photoperiod gene, Ppd2 and additional genetic factor for ear-emergence time on chromosome 2B of wheat. Heredity, 607–619.

Scarth R, Law CN. 1984. The Control of the day-length Response in Wheat by the Group-2 Chromosomes. Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung 92, 140–150.

Serrago RA, Miralles DJ, Slafer GA. 2008. Floret fertility in wheat as affected by photoperiod during stem elongation and removal of spikelets at booting. European Journal of Agronomy 28, 301–308.

Shaw LM, Turner AS, Laurie DA. 2012. The impact of photoperiod insensitive Ppd-1a mutations on the photoperiod pathway across the three genomes of hexaploid wheat (Triticum aestivum). The Plant Journal 71, 71–84.

Sibony M, Pinthus MJ. 1988. Floret Initiation and Development in Spring Wheat (Triticum aestivum L.). Annals of Botany 61, 473–479.

Siddique KHM, Kirby EJM, Perry MW. 1989. Ear:Stem Ratio in Old and Modern Varieties; Relationship with Improvement in Number of Grains per Ear and Yield. Field Crops Research 21, 59–78.

Slafer GA, Abeledo LG, Miralles DJ, Gonzalez FG, Whitechurch E. 2001. Photoperiod sensitivity during stem elongation as an avenue to raise potential yield in wheat. Euphytica 119, 191–197.

Slafer GA, Andrade FH. 1993. Physiological attributes related to the generation of grain yield in bread wheat cultivars released at different eras. Field Crops Research 31, 351–367.

Slafer GA, Calderini DF, Miralles DJ. 1996. Yield components and compensation in wheat: Opportunities for further increasing yield potential. In: Reynolds MP, In: Rajaram S, In: McNab A, eds. Increasing Yield Potential in Wheat. CIMMYT, 101–133.

Slafer GA, Rawson HM. 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: A Re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. Australian Journal of Plant Physiology 21, 393–426.

Slafer GA, Rawson HM. 1995. Development in wheat as affected by timing and length of exposure to long photoperiod. Journal of Experimental Botany 46, 1877–1886.

Slafer GA, Rawson HM. 1996. Responses to photoperiod change with phenophase and temperature during wheat development. Field Crops Research 46, 1–13.

Slafer GA, Rawson HM. 1997. Phyllochron in Wheat as Affected by Photoperiod Under Two Temperature Regimes. Australian Journal of Plant Physiology 24, 151–158.

Slafer GA, Halloran GM, Connor DJ. 1994. Development Rate in Wheat as Affected by Duration and Rate of Change of Photoperiod. Annals of Botany 73, 671–677.

Slafer GA. 1996. Differences in phasic development rate amongst wheat cultivars independent of responses to photoperiod and vernalization. A viewpoint of the intrinsic earliness hypothesis. Journal of Agronomy y Crop Science 44, 403–419.

Slafer GA. 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. Annals of Applied Biology 142, 117–128.

Slafer GA, Savin R, Sadras VO. 2014. Coarse and fine regulation of wheat yield components in response to genotype and environment. Field Crops Research 157, 71–83.

Snape JW, Butterworth K, Whitechurch E, Worland AJ. 2001. Waiting for fine times: Genetics of flowering time in wheat. Euphytica 119, 185–190.

Stelmakh AF. 1997. Genetic systems regulating flowering response in wheat. In: Braun HJ, In: Altay F, In: Kronstad WE, In: Beniwal SPS, In: McNab A, eds. Wheat: Prospects for Global Improvement: Proceedings of the 5th International Wheat Conference, 1014 June, 1996, Ankara, Turkey. Dordrecht: Springer Netherlands, 491–501.

Stockman YM, Fischer RA, Brittain EG. 1983. Assimilate Supply and Floret Development Within the Spike of Wheat (Triticum aestivum L.). Australian Journal of Plant Physiology 10, 585–594.

Sylvester-Bradley R, Riffkin P, O'Leary G. 2012. Designing resource-efficient ideotypes for new cropping conditions: Wheat (Triticum aestivum L.) in the High Rainfall Zone of southern Australia. Field Crops Research 125, 69–82.

Tanio M, Kato K. 2007. Development of Near-isogenic Lines for Photoperiod-insensitivity Genes, Ppd-B1 and Ppd-D1, Carried by the Japanese Wheat Cultivars and their Effect on Apical Development. Breeding Science 57, 65–72.

Turner AS, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA. 2005. The Pseudo-Response Regulator Ppd-H1 Provides Adaptation to Photoperiod in Barley. Science 310, 1031–1034.

Tweeten L, Thompson SR. 2008. Long-term Global Agricultural Output Supply-Demand Balance and Real Farm and Food Prices. , 1–33.

Vázquez M. 2010. Función de los genes de sensibilidad al fotoperíodo (Ppd-1) durante las etapas pre-antesis y su impacto en la generación del rendimiento en trigo.

Vehtari A, Gelman A, Gabry J. 2017. Practical Bayesian model evaluation using leave-one-out cross-validation and WAIC. Statistics and Computing 27, 1413–1432.

Vince Prue D. 1975. Photoperiodism in plants. McGraw-Hill: London & New York.

Waddington SR, Cartwrigth PM, Wall PC. 1983. A Quantitative Scale of Spike Initial and Pistil Development in Barley and Wheat. Annals of Botany 51, 119–130.

Wallach D, Makowski D, Jones JW, Brun F (Eds.). 2014. Working with dynamic crop models: methods, tools and examples for agriculture and environment. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

White JW, Herndl M, Hunt LA, Payne TS, Hoogenboom G. 2008. Simulation-Based Analysis of Effects of Vrn and Ppd Loci on Flowering in Wheat. Crop Science 48, 678–687.

Whitechurch EM, Slafer GA, Miralles DJ. 2007. Variability in the Duration of Stem Elongation in Wheat Genotypes and Sensitivity to Photoperiod and Vernalization. Journal of Agronomy and Crop Science 193, 131–137.

Whitechurch EM, Slafer GA. 2002. Contrasting Ppd alleles in wheat: Effects on sensitivity to photoperiod in different phases. Field Crops Research 73, 95–105.

Wilhelm WW, McMaster GS, Rickman RW, Klepper B. 1993. Above-gound vegetative development and growth of winter wheat as influenced by nitrogen and water availability. Ecological Modelling 68, 183–203.

Wilhelm EP, Turner AS, Laurie DA. 2009. Photoperiod insensitive Ppd-A1a mutations in tetraploid wheat (Triticum durum Desf.). Theoretical and Applied Genetics 118, 285–294.

Worland AJ. 1996. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. Euphytica 89, 49–57.

Yin X, van der Linden CG, Struik PC. 2018. Bringing genetics and biochemistry to crop modelling, and vice versa. European Journal of Agronomy 100, 132–140.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research 14, 415–421.

Zheng B, Biddulph B, Li D, Kuchel H, Chapman S. 2013. Quantification of the effects of VRN1 and Ppd-D1 to predict spring wheat (Triticum aestivum) heading time across diverse environments. Journal of Experimental Botany 64, 3747–3761.