# DETECCIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS ASOCIADAS A LA TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ

Tesina de la

# Alumna

# ESTEFANÍA AYLÉN FESSER

Este trabajo ha sido presentado

como requisito para la obtención del título de

# LICENCIADA EN GENÉTICA

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 10 de Noviembre de 2014-

# DETECCIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS ASOCIADAS A LA TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ

Tesina de la

Alumna

# ESTEFANÍA AYLÉN FESSER

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

> Ing. Agr. Erika Mroginski Directora

.....

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

#### AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por su apoyo, paciencia y confianza. Artesanos de mi esencia.

A Mauro por su amor, compañía y contención.

A mis amigos por estar en las buenas y en las ásperas.

A todos mis compañeros de Agronomía y Genética por las anécdotas y lindos momentos, especialmente a Guille, Nati, Caro, Anto, Diana, Manu, Chari, Mara, Maxi, Omar y Elías por hacer de la facultad una etapa genial y sobre todo por su amistad.

A todos los profesores de la Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales, y Ambientales de la UNNOBA por su contribución a mi formación profesional, en especial a Susana Pistorale, Roque Guillén, Lola Maciel, Virginia Pasquinelli y Paola Ferrero por guiarme y animarme. A Edith Frutos por generar una sonrisa en mí cada vez que la recuerdo.

A las personas que hicieron posible este trabajo: a la Ing. Agr. *MSc*. Erika Mroginski y el Dr. Guillermo Eyherabide por su confianza y sus aportes durante este trabajo, a Luciana Galizia, Manuela Carrere, Daniela Lopez Miro y Valeria Salse por su paciencia y su colaboración en este trabajo.

Al mis compañeros del Edificio Maíz y del Laboratorio Regional de la EEA-Pergamino por su apoyo, simpatía y buena predisposición, especialmente a Ceci, Emi, Agos, Lucho, Vivi, Marce, Guille. R, Carla, Antonio, Alexis y nuevamente a Manu y Dani por hacer de mi estadía en INTA una etapa alegre y confortable.

# ÍNDICE

IN	NRODUCCIÓN	6
1	- El cultivo del maíz y su importancia	6
2	- Estrés por bajas temperaturas	7
3	- Efectos de las bajas temperaturas sobre la germinación del maíz	8
4	- Control genético de la tolerancia a bajas temperaturas	9
5	- Marcadores moleculares	9
6	- Mapeo de QTL	.11
7	- Estudios de mapeo de QTL asociados a la tolerancia a bajas temperaturas en maíz	14
8	- Antecedentes del equipo de investigación	15
9	- Hipótesis	.16
10	- Objetivos	16
	10.1- Objetivo General	16
	10.2- Objetivos específicos	.16
Μ	IATERIALES Y MÉTODOS	17
1	- Material vegetal	17
2	- Evaluación fenotípica	.19
3	- Evaluación genotípica. Identificación de polimorfismos en los parentales	.20
	3.1- Extracción de ADN	20
	3.2- Cuantificación de ADN	21
	3.3- Análisis SSR	.22
	3.4- Visualización de los productos de amplificación	23
4	- Caracterización genotípica de la población de mapeo	25

4.1- Análisis de segregación de los marcadores	25
4.2- Mapa de Ligamiento	25
5 - Estudio de asociación entre el fenotipo y genotipo	26
RESULTADOS	27
1 - Evaluación fenotípica	27
2 - Evaluación genotípica. Identificación de polimorfismos en los parentales	
3 - Caracterización genotípica de la población de mapeo	
3.1 - Análisis de segregación de marcadores	
3.2 - Mapa de ligamiento	34
4 - Estudio de asociación entre el fenotipo y genotipo	35
DISCUSIÓN	
1 - Evaluación fenotípica	
2 - Caracterización genotípica de la población de mapeo	40
2.1- Segregación de los marcadores	40
2.2- Mapa de ligamiento	41
3 - Mapeo de QTL	41
CONCLUSIÓN	43
BIBLIOGRAFÍA	44
RESÚMEN	52
ANEXOS	53

### **INTRODUCCIÓN**

#### 1 - El cultivo del maíz y su importancia

El maíz es uno de los principales cultivos en el mundo. Pertenece a la familia de las *Poáceas* (*Gramíneas*), tribu *Maydeas* y es la única especie cultivada de este género. Esta especie diploide que consta de diez pares de cromosomas (2n=2x=10) se reproduce por semillas resultantes de la fecundación cruzada. La inflorescencia femenina es una espiga, generalmente única y en posición axial, mientras que la inflorescencia masculina es una panoja ubicada en la parte apical del tallo. La polinización es anemófila y el porcentaje de autofecundación muy reducido (Flavell, R. B. *et al.*, 1974).

El cultivo del maíz es de gran importancia económica debido a que posee numerosos y diversos usos nutricionales e industriales. En el año 2013, el área cosechada a nivel global fue de 184.192.053 hectáreas (ha), el rendimiento de 55.200 hectogramos por hectárea (hg/ha) y su producción de 1.016.736.092 toneladas (t) de las cuales 32.119.211 t corresponden a la producción argentina (http://faostat.fao.org/). Sus principales usos son como consumo humano y como forraje o alimento animal, y en los últimos años, una parte importante de la producción está siendo derivada a la obtención de combustible (FAO, 2003; GBEP-FAO, 2008). Para garantizar el abastecimiento de las múltiples demandas de maíz, el aumento de la producción deberá reducir la brecha entre los rendimientos potenciales y los reales (Cassman *et al.*, 2003; Fischer & Edmeades, 2010), principalmente a través de un mejor aprovechamiento de los recursos, cuando éstos se encuentran en condiciones deficitarias.

Las siembras tempranas de maíz presentan los máximos potenciales de producción -mientras no ocurran deficiencias hídricas, nutricionales o sanitarias severas en su floración-, debido a que aprovechan las mejores condiciones ambientales para el crecimiento del cultivo, la fijación de un alto número de granos y la producción de asimilados en la planta para abastecer el llenado de los mismos (Cirilo, 2004). Sin embargo, se incrementa la posibilidad de que las plantas de maíz enfrenten condiciones de temperatura sub-óptimas durante las primeras etapas del desarrollo

(Padilla & Otegui, 2005). Por otro lado, en sistemas de cero laboreo y labranza reducida, la presencia de residuos vegetales sobre la superficie trae como consecuencia la disminución de la temperatura del suelo, efecto que tienden a retrasar la germinación, emergencia y crecimiento temprano de los cultivos (Barber, 1971; Wicks *et al.*, 1994). Cabe señalar que en Pergamino, durante el mes de agosto, se esperan temperaturas inferiores a la base de 8° C con una probabilidad del 25%. Por lo tanto, en las siembras durante ese período, se aumenta el riesgo de exponer a la semilla al desarrollo de enfermedades y/o al ataque de plagas (Totis de Zeljkovich, 2012).

### 2 - Estrés por bajas temperaturas

El estrés abiótico se puede definir como toda alteración morfológica o fisiológica que daña las partes o los productos de la planta y que es inducida por una condición ambiental adversa sea química o física (Botta & González, 2012). Se denomina estrés por temperaturas sub-óptimas a la reducción en crecimiento o inducción de daños metabólicos, celulares o tisulares que resultan en limitaciones del rendimiento potencial genéticamente determinado, causado por la exposición directa a temperaturas inferiores a los umbrales óptimos de los procesos bioquímicos y fisiológicos o del desarrollo morfológico (Greaves, 1996). El daño por enfriamiento ("*chilling injury*") se produce cuando las plantas son expuestas a bajas temperaturas las plantas pueden continuar creciendo y realizar fotosíntesis, siendo capaces de desarrollar procesos de adaptación para sobrevivir a las temperaturas más desfavorables (Leipner & Stamp, 2009). La temperatura que marca el límite superior por debajo del cual ocurre este tipo de daño varía de acuerdo a la especie y al cultivar (Bedi & Basra, 1993).

El maíz, al ser una planta C4 de origen tropical, es sensible al frío, encontrándose su temperatura óptima para el desarrollo entre los 30 y 34°C (Cirilo *et al.*, 2012). A medida que decrece la temperatura, el crecimiento de la planta disminuye y se detiene a los 6-8°C, ocurriendo daños irreversibles en los tejidos y en las células si dicha exposición es prolongada (Miedema, 1982; Marocco *et al.*, 2005).

#### 3 - Efectos de las bajas temperaturas sobre la germinación del maíz

Durante el período de desarrollo temprano del maíz se pueden definir tres etapas -germinación, fase de crecimiento heterotrófico y fase de crecimiento autotrófico temprano- durante las cuales las bajas temperaturas afectan a las plántulas en forma diferencial siendo también distintos los factores genéticos que rigen los mecanismos de tolerancia en cada una.

La germinación es el proceso de activación del embrión que se inicia con la imbibición de la semilla y el consiguiente comienzo de la actividad metabólica, terminando con la emergencia de la radícula. Se ha comprobado que si la imbibición ocurre a temperaturas inferiores a 10-12°C, las semillas fallan en germinar y pueden alterarse las membranas celulares (Cal & Obedorf, 1972; Herner, 1986; Evangelista de Menezes *et al.*, 1997).

El desarrollo heterotrófico abarca los cambios fisiológicos que ocurren desde la germinación hasta el punto en que la plántula deja de depender de las reservas de la semilla. Las bajas temperaturas durante este período pueden causar reducción del crecimiento de las plántulas, anormalidades en las raíces o radículas abortadas y proliferación de raíces seminales y lesiones del tejido de conducción (Blacklow, 1972; Cal & Obendorf, 1972; Cohn *et al.*, 1979). Asimismo se ha observado una menor velocidad de germinación y emergencia (Miedema, 1982; Greaves, 1996; Marocco *et al.*, 2005).

Cuando la plántula tiene entre 3 y 4 hojas se acaban las reservas de la semilla y comienza la etapa del desarrollo autotrófico, dependiendo su crecimiento de la acumulación de carbono vía fotosíntesis (Cooper & MacDonald, 1970). En esta etapa de las plántulas, las temperaturas subóptimas afectan al crecimiento de la hoja (Stone *et al.*, 1999) y de la raíz (Engels, 1994), la eficiencia fotosintética de las plántulas y el desarrollo de los cloroplastos (Leipner *et al.*, 1999; Nie *et al.*, 1992). Entre las etapas de crecimiento heterotrófico y autotrófico existe un período de transición durante el cual la plántula en desarrollo comienza a realizar la fotosíntesis además de usar las reservas de la semilla (Greaves, 1996; Leipner & Stamp, 2005). Según Stamp (1984) este sería el período de mayor susceptibilidad al frío.

#### 4 - Control genético de la tolerancia a bajas temperaturas

En los últimos años ha adquirido importancia el mejoramiento para adaptación a diferentes tipos de estrés, entre ellos, las bajas temperaturas. Para una correcta estrategia de mejoramiento es necesario conocer cuáles son los caracteres de la planta que limitan el rendimiento con bajas temperaturas y cuál es la variación genética de esos caracteres.

Son muchos los estudios de variabilidad genética realizados sobre el comportamiento del maíz frente a temperaturas sub-óptimas, durante las fases tempranas de su desarrollo, ya sea en ambientes controlados o en el campo. Estos encontraron diferencias genéticas en numerosos parámetros fisiológicos relacionados, como ser porcentaje de germinación, velocidad de emergencia, sobrevivencia, velocidad de desarrollo y acumulación de materia seca (Revilla *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Asimismo, han comprobado que el vigor temprano en el maíz es un carácter cuantitativo complejo, que está controlado por diversos factores genéticos con efectos aditivos, de dominancia, epistáticos y maternos dependiendo del parámetro fisiológico medido, de la población, del ambiente y del estado de desarrollo (Aidun *et al.*, 1991; Presterl *et al.*, 2007; Fesser *et al.*, 2012).

#### 5 - <u>Marcadores moleculares</u>

Un marcador genético es una característica polimórfica, fácilmente visualizada o medida, heredable según las leyes de Mendel y utilizada en análisis genéticos (Rojas-Beltrán, 2007). El polimorfismo puede ser considerado en diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos hasta la variación de un solo nucleótido en el ADN.

Los avances de la biología molecular han posibilitado el desarrollo de los marcadores moleculares, los cuales permiten evidenciar variaciones en la secuencia del ADN entre individuos de la misma especie o entre especies emparentadas (Collard *et al.*, 2005; Ferreira & Grattapaglia, 1996; Picca *et al.*, 2004; Rojas-Beltran, 2007). Un marcador molecular es un punto de referencia en un cromosoma que puede o no pertenecer a regiones codificantes, funcionando como señalizadores de diferentes regiones del genoma (Cervigni *et al.*, 2010). Estas diferencias en el ADN surgen de

diferentes clases de mutaciones: sustituciones, inserciones y deleciones de bases simples o rearreglos cromosómicos (inserciones, deleciones y/o inversiones de grandes fragmentos).

Dado que los marcadores moleculares son muy abundantes y altamente polimórficos y no se ven afectados por el ambiente ni el estado de desarrollo de la planta (Collard *et al.*, 2005), poseen numerosas aplicaciones en el mejoramiento vegetal. Entre ellas figuran la identificación varietal, el análisis de la biodiversidad de poblaciones y estudios filogenéticos, estudios comparativos entre genomas de diferentes especies, construcción de mapas genéticos y localización de genes o regiones genómicas de interés (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Kumar, 1999).

En la actualidad existen numerosas técnicas que permiten revelar marcadores moleculares y regularmente se desarrollan nuevas o surgen variaciones de las técnicas ya existentes (Rojas-Beltran, 2007). Una de las más utilizadas son los microsatélites o SSRs (*"Simple Sequence Repeats"*, Secuencias Simples Repetidas) (Litt & Lutty, 1989; Weber & May, 1989). Estos consisten en regiones que contienen arreglos de secuencias simples, de 1 a 4 nucleótidos, repetidas en tándem entre 10 a 100 veces y flanqueadas por regiones únicas conservadas (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Picca *et al.*, 2004). Constituyen *loci* genéticos hipervariables pero lo suficientemente conservados como para ser heredados por varias generaciones en forma mendeliana (Morgante & Olivieri, 1993).

Las regiones conteniendo las secuencias simples repetidas son amplificadas individualmente mediante PCR utilizando un par de iniciadores (de alrededor de 20 pares de bases) complementarios a secuencias únicas que flanquean el SSR. Los fragmentos amplificados difieren en su tamaño como consecuencia de la variación en el número de elementos simples repetidos. De este modo, cada segmento de tamaño diferente representa un alelo distinto del mismo locus. Los SSRs amplificados pueden ser separados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida o agarosa de alta resolución, visualizándose las bandas mediante tinción con Bromuro de Etidio o Nitrato de Plata (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Picca *et al.*, 2004). También se pueden resolver por electroforesis capilar (MegaBace, Suiza).

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas ya que combinan varias ventajas como su codominancia, multialelismo y su elevada reproducibilidad. Además, son genoma-específicos y están distribuidas al azar cubriendo todo el genoma (Picca *et al.*, 2004). Son muy frecuentes en los organismos eucariotas (Lagercrantz *et al.*, 1993), encontrándose en las plantas con una frecuencia de 1 cada 21,2 kb (kilobases) en las dicotiledóneas y cada 64,6 kb en monocotiledóneas (Wang *et al.*, 1994). Su localización es conocida y generalmente conservada entre las distintas especies de un mismo género, lo que hace posible la transferencia de marcadores entre especies relacionadas. Asimismo, el alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos muy emparentados. Los SSRs constituyen una técnica simple, fácil de automatizar y que no requiere del uso de radiactivos en el caso que se use tinción con Nitrato de plata (Ferreira & Grattapaglia, 1996; McGregor *et al.*, 2000).

En el maíz la localización genómica de estos marcadores es de disponibilidad pública y se encuentran en las bases de datos de internet (*maize databank*: <u>http://www.maizegdb.org</u>).

### 6 - Mapeo de QTL

La mayoría de los caracteres de importancia económica, como rendimiento, madurez, calidad, tolerancia a factores abióticos y algunos tipos de resistencia a enfermedades, están controlados por muchos genes, cada uno con una contribución pequeña en la expresión del fenotipo, presentando una variación continua, en lugar de clases fenotípicas discretas. Estos caracteres son denominados poligénicos, cuantitativos o de herencia compleja y los *loci* que controlan su expresión se denominan "*Loci* de caracteres cuantitativos" o QTL ("*Quantitative Trait Loci*").

El mapeo de QTL mediante marcadores moleculares se basa en la determinación del ligamiento genético entre marcador y QTL. Si un QTL se encuentra próximo a un marcador, hay menor probabilidad de que ocurra recombinación entre ellos y ambos co-segregarán y serán heredados conjuntamente en la progenie. Este desequilibrio de ligamiento genera efectos cuantitativos asociados al marcador que pueden ser detectados y estimados a través de análisis estadísticos adecuados (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Collard *et al.*, 2005).

Las estrategias de mapeo de QTL emplean poblaciones segregantes construidas a partir de parentales que difieren en el carácter de interés. Los individuos de la progenie son evaluados para las características cuantitativas y caracterizados con marcadores distribuidos a intervalos regulares en el genoma. Posteriormente, mediante análisis estadísticos, se establece la asociación entre la información molecular (marcadores) y la información fenotípica (carácter cuantitativo).

Algunos de los métodos más comúnmente usados para el mapeo de QTL son: mapeo basado en marcadores individuales ("*Single-marker Analysis*"); por intervalo simple o IM ("*Interval mapping*") y por intervalo compuesto o CIM ("*Composite interval mapping*") (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Doerge, 2002; Malosetti & Van Berloo, 2007).

El mapeo basado en marcadores individuales es el método más simple y se sigue empleando como punto de partida para los análisis posteriores. No requiere de la construcción de un mapa genético y se puede realizar con programas estadísticos comunes como por ejemplo INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2010) y R (Gentleman & Ihaka, 1991). La metodología consiste en la determinación de la existencia de diferencia significativa entre medias de grupos genotípicos. Brevemente, para cada marcador, se clasifica a la población en distintos grupos genotípicos de acuerdo a que clase (alelo) del marcador posea el individuo. Se analiza si existen diferencias significativas entre las medias fenotípicas de cada clase del marcador mediante la prueba de t (*t-test*), análisis de la varianza (ANOVA) y regresión lineal simple. La hipótesis nula que se prueba es que la media del carácter es independiente del genotipo para un determinado marcador y por lo tanto no existe un QTL asociado al marcador bajo estudio. Si el marcador y el QTL están débilmente ligados o no lo están, segregarán en forma independiente y no se encontrarán diferencias significativas entre las medias fenotípicas de cada clase del marcador. En cambio, si dichas medias difieren significativamente indicaría que el marcador está ligado a un QTL controlando el carácter (Doerge, 2002; Collard *et al.*, 2005).

La principal limitación de esta aproximación es que sólo podremos concluir que hay un QTL cercano a un determinado marcador y no se podrán estimar la magnitud de los efectos del QTL ni su

localización exacta. Además existe alta probabilidad de encontrar falsos QTL. Esto se podría solucionar aumentando el nivel de significancia de las pruebas estadísticas en detrimento del poder de detección (Doerge, 2002).

El mapeo por intervalo simple (IM) fue propuesto originalmente por Lander y Botstein (1989) y es la base de todos los métodos de mapeo que se utilizan actualmente. Requiere la construcción previa de un mapa genético ya que analiza intervalos definidos por pares de marcadores ligados. Mediante el método de máxima verosimilitud se evalúa la probabilidad de la presencia de un QTL en cada punto de dicho intervalo, estimando el efecto del QTL y la frecuencia de recombinación entre el QTL y el marcador que maximicen la función de verosimilitud y por lo tanto que más se ajusten a los datos observados. Los resultados generalmente se expresan a través de gráficas de valores LOD, que indican en escala logarítmica la razón entre la verosimilitud del modelo con QTL (probabilidad de que los datos observados hayan surgido asumiendo la presencia de un QTL) y la del modelo sin QTL. En cada posición en el genoma se estiman los parámetros para ambos modelos y se calcula el valor LOD. La presencia de un QTL es inferida cuando el máximo valor de LOD obtenido es mayor a un umbral previamente establecido. Por convención, el LOD umbral usado para declarar la presencia de un QTL es 3, el cual corresponde a una razón de 1000:1 (la probabilidad de que el QTL esté ligado al marcador es 1000 veces mayor que la probabilidad de que el QTL no esté ligado al marcador) (Cervigni, 2010; Van Ooijen, 1999; Bernardo, 2010).

El mapeo por intervalo compuesto (CIM) fue propuesto independiente por Jansen y Stam (1994) en Holanda y Zeng (1994) en Estados Unidos. Es una extensión del modelo de intervalo simple, en el cual se incluyen una serie de marcadores como cofactores. Esto permite corregir el efecto de los QTL que afectan el carácter en cuestión y que se encuentran distribuidos en el genoma fuera del intervalo que se está analizando, lo que hace al CIM sea más preciso y efectivo en la detección de QTL en comparación con el IM (Collard *et al.*, 2005; Malosetti & Van Berloo; 2007). Tanto el mapeo de QTL por intervalo simple como el mapeo por intervalo compuesto se realizan con programas computacionales específicos de mapeo de QTL como por ejemplo: Windows QTL

Cartographer V2.5 (Wang *et al.*, 2007), GQMOL (Schuster & Cruz, 2004), MapManagerQTX (Manly *et al.*, 2001) y MapQTL (Van Ooijen *et al.*, 2002).

Existen diferentes métodos que permiten calcular un valor de LOD umbral que se ajuste más a los datos del experimento. Uno de ellos es el de permutaciones (Churchill & Doerge, 1994) que consiste en reordenar al azar los valores fenotípicos de la población mientras los datos genotípicos se mantienen constantes (de esta forma se rompe la asociación entre los marcadores y el carácter fenotípico) y realizar un análisis de QTL determinándose la cantidad de falsos positivos en la asociación marcador-fenotipo. Este proceso se repite muchas veces (500-1000) y los niveles de significancia se obtienen en base al nivel de falsos positivos.

# 7 - Estudios de mapeo de QTL asociados a la tolerancia a bajas temperaturas en maíz

En maíz, se han detectado QTL para tolerancia a estrés abiótico, incluyendo deficiencia de nitrógeno (Agrama *et al.*, 1999; Bertin & Gallais, 2001) y sequía (Ribaut *et al.*, 1996). Los primeros estudios de QTL para tolerancia a bajas temperaturas, especialmente del aparato fotosintético fueron publicados por Fracheboud *et al.* (2002, 2004), Hund *et al.* (2004) y Jompuk *et al.* (2005). Hund *et al.* (2004) identificaron 20 QTL asociados a caracteres morfofisiológicos de raíz y tallo relacionados con el vigor de plántulas en condiciones de bajas temperaturas, encontrándose varios QTL relacionados con el número, longitud, diámetro y peso de raíces primarias y seminales en los cromosomas 1 y 5. Presterl *et al.* (2007) detectaron QTL para vigor temprano de plántulas de maíz en el campo, en 11 ambientes diferentes de zonas con bajas temperatura. Varios QTL para peso húmedo de plantas con 6-8 hojas se encontraron en el cromosoma 5. El único estudio de QTL para caracteres de germinación a bajas temperaturas fue el de Huang *et al.* (2013), quienes mediante un estudio de mapeo de asociación en todo el genoma, detectaron 43 SNP (Polimorfismos de nucleótido simple) relacionados con la tolerancia al enfriamiento durante la germinación y de plántulas en el estado de 3 hojas.

# 8 - Antecedentes del equipo de investigación

En la EEA-Pergamino, se ha puesto a punto la metodología a emplear para la evaluación del comportamiento germinativo de diferentes genotipos de maíz a bajas temperaturas, bajo condiciones controladas (Mroginski *et al.*, 2010). Con el fin de profundizar el conocimiento sobre la herencia y factores genéticos que gobiernan la respuesta a bajas temperaturas durante la geminación en maíz, se evaluaron 20 híbridos simples y recíprocos provenientes de la cruza dialélica de 5 líneas endocriadas de INTA (LP179, LP214, LP29, LP2542, LP122-2) Los efectos no aditivos fueron importantes para la mayoría de las variables analizadas, mientras que la acción génica aditiva fue significativa para porcentaje de germinación y de semillas con coleóptilo de 1 cm. La existencia de efectos recíprocos significativos fue observada para: peso húmedo, peso seco, porcentaje de germinación y porcentaje de semillas con coleóptilo de 1 cm., lo que denota el rol materno de las líneas en la regulación de estos caracteres (Fesser *et al.*, 2012).

Mroginski *et al.*, (2012) caracterizaron 75 líneas endocriadas del programa de mejoramiento de maíz de INTA-EEA Pergamino, 6 líneas provenientes de Canadá y 1 población canadiense tolerante al frío (testigo). Las mismas fueron sometidas a dos tratamientos: Control (24°C) y Baja temperatura (siembra a 8°C y aumento gradual hasta 15°C) y periódicamente (cada 2 y 7 días en el tratamiento Control y Baja Temperatura, respectivamente) se tomaron datos de: nº de semillas germinadas y nº de semillas con coleóptilo de 1 cm. Al finalizar el experimento (7 y 42 días para el tratamiento Control y Baja Temperatura, respectivamente) se midió el porcentaje final de plántulas (%), peso húmedo y seco de raíz (PHR, PSR, mg) y de parte aérea (PHPA, PSPA, mg), longitud de raíz (LR, cm) y de parte aérea (LPA, cm). Además realizaron la siembra temprana en el campo de las líneas con comportamiento extremos para evaluar su emergencia a los 20 y 30 días (%). Las líneas pudieron dividirse en cuanto a su germinación a bajas temperaturas en 3 grupos: a) de buen comportamiento, que superaron al testigo, b) intermedias y c) susceptibles al frío, con valores menores al testigo en todos los caracteres evaluados. Se observaron diferentes patrones de repuesta indicando la presencia de distintos factores genéticos interviniendo en la tolerancia al frío. Entre las

líneas de "buen comportamiento" se destacó LP3830, mientras que LP179 resultó susceptible al frío. Ambas presentaron valores significativamente diferentes para todas las variables medidas. A partir del cruzamiento entre estas líneas se generó una población de mapeo constituida por 300 familias F2:3.

Por otro lado, las líneas LP3830 y LP179 al igual que las líneas remanentes pertenecientes al programa de mejoramiento de maíz de INTA Pergamino, se caracterizaron con 50 SSR a fin de estimar la estructura genética de la población empleando el programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Este análisis (Olmos *et al.*, 2010) agrupó a las líneas LP3830 y LP179 en clusters distintos a lo largo de los sucesivos ciclos de simulación de agrupamientos, evidenciando a nivel molecular la diferenciación fenotípica contrastante observada previamente.

# 9 – <u>Hipótesis</u>

Existen regiones cromosómicas relacionadas con el comportamiento germinativo del maíz a bajas temperaturas que pueden ser identificadas mediante marcadores moleculares.

### 10 – <u>Objetivos</u>

#### **10.1 – Objetivo General:**

Identificar marcadores moleculares ligados a *loci* relacionados con la tolerancia al frío durante la germinación del maíz.

### 10.2 – Objetivos específicos:

1. Determinar el comportamiento germinativo a bajas temperaturas de una población segregante F2:3 de maíz.

2. Identificar marcadores moleculares microsatélites que revelen polimorfismos a nivel de ADN entre las líneas parentales de dicha población.

3. Caracterizar genotípicamente la población F2 de maíz con marcadores microsatélites.

4. Estudiar la relación existente entre marcadores moleculares y el comportamiento germinativo a bajas temperaturas de la población.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 1 - Material vegetal

El material genético evaluado está constituido por una población F2, derivada del cruzamiento entre dos líneas endocriadas de maíz contrastantes para los caracteres fenotípicos a evaluar (LP 3830 x LP179) (Figura 1). En estudios previos, la línea LP179 resultó susceptible al frío durante la germinación, mientras que LP3830 presentó un buen comportamiento germinativo a bajas temperaturas, superando al testigo (población canadiense COP) (Mroginski *et al.*, 2012). La caracterización fenotípica se realizó en las familias F2:3 derivadas de la autofecundación de las plantas F2. Las semillas fueron obtenidas en el campo de INTA EEA Pergamino durante la campaña 2012/2013 y multiplicadas durante la campaña 2013/2014. Asimismo, durante la campaña 2012/2013 se realizó el muestreo y liofilización de hojas de cada planta F2 para la extracción de ADN y caracterización molecular empleando marcadores microsatélites.





Obtención de la población

# 2 – Evaluación fenotípica

Se evaluaron fenotípicamente los parentales y 136 familias F2:3 bajo condiciones controladas en cámara de incubación. Se sometieron a dos tratamientos de incubación: "Control": 24°C (oscuridad) durante 7 días; "Frío": siembra a 8°C (oscuridad), luego un aumento gradual de la temperatura cada 7días a 9°C, 10°C, 13°C y 14 °C (Figura 2). En cada tratamiento se sembraron 2 repeticiones de 25 semillas cada una, en un diseño de bloques completos al azar (DBCA). Las semillas, previamente tratadas con fungicida (Maxim 10%), fueron colocadas sobre toallas de papel humedecidas y luego enrolladas y puestas en bolsas de polietileno transparentes.

Figura 2. Esquema de los cambios de temperaturas y momentos de toma de datos en el tratamiento "Frío".

Temperatura:				8°	С						(	9°C					104	С	
Días:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Siembra							1° Toma de datos							2° Toma de datos				
Temperatura:	1	0°C					13℃						1	l4℃					
Días:	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
			3° Toma de datos							4° Toma de datos							5° Toma de datos		Finalización

Los datos registrados e índices calculados fueron los siguientes:

% GermC : Nº de semillas germinadas a los 5 días de incubación / nº de semillas sembradas.
Al finalizar el experimento (7 días), se midió:
n°plC : número de plántulas normales con raíz y coleoptilo mayores a 1cm.
PHPAC : Peso húmedo total de partes aéreas (mg).
PHPAiC : Peso húmedo de la parte aérea por plántula individual (mg). PHPAiC= PHPAC / nºplC
PHRC : Peso húmedo total de raíces (mg).
PHRiC : Peso húmedo de la raíz por plántula individual (mg). PHRiC= PHRC / nºplC
PSPAC : Peso seco total de partes aéreas (mg).
PSPAiC : Peso seco de la parte aérea por plántula individual (mg). PSPAiC = PSPAC / nºplC
PSRC : Peso seco total de raíces (mg).
PSRiC : Peso seco de la raíz por plántula individual (mg). PSRiC= PSRC / n°plC

# Tratamiento Frío:

A partir del 7	m	no día y cada siete días, previo al cambio de temperatura, se registró:
%GermF	:	Nº de semillas germinadas (con radícula y/o coleóptilo mayor o igual a 0,1cm)/ nº de semillas sembradas.
%R05F	:	Nº de semillas con radícula mayor o igual a 0,5 cm / nº de semillas sembradas.
%R1F	:	Nº de semillas con radícula mayor o igual a 1 cm / nº de semillas sembradas.
%Col05F	:	Nº de semillas con coleóptilo mayor o igual a 0,5 cm / nº de semillas sembradas.
%Col1F	:	Nº de semillas con coleóptilo mayor o igual a1 cm / nº de semillas sembradas.
%rsF	:	Nº de semillas con presencia de raíces seminales / nº de semillas sembradas.
%rF	:	Nº de plántulas con aborto o necrosis de la raíz principal / nº de semillas sembradas.
%cF	:	Nº de plántulas con coleóptilos anormales / nº de semillas sembradas.
Al finalizar el	1 e	experimento ( a los 40 días) se midió:
n°plF	:	número de plántulas normales con raíz y coleoptilo mayores a 1cm.
PHPAF	:	Peso húmedo total de partes aéreas (mg).
PHPAiF	:	Peso húmedo de la parte aérea por plántula individual (mg). PHPAiF= PHPAF / nºplF
PHRF	:	Peso húmedo total de raíces (mg).
PHRiF	:	Peso húmedo de la raíz por plántula individual (mg). PHRiF= PHRF / n°plF
PSPAF	:	Peso seco total de partes aéreas (mg).
PSPAiF	:	Peso seco de la parte aérea por plántula individual (mg). PSPAiF= PSPAF / n°plF
PSRF	:	Peso seco total de raíces (mg).
PSRiF	:	Peso seco de la raíz por plántula individual (mg). PSRiF= PSRF / nºplF

# Índice Frío/Control calculado:

I_G : % GermF / % GermC	
-------------------------	--

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2010). Se visualizó la distribución de los datos mediante la construcción de histogramas de frecuencia y se comprobó la normalidad de los mismos mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado, en el caso de falta de normalidad se realizaron transformaciones clásicas previas a la realización de los análisis.

# 3 - Evaluación genotípica. Identificación de polimorfismos en los parentales

### 3.1- Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico de los genotipos parentales a partir de muestras de tejido foliar siguiendo el protocolo descripto por Kleinhofs *et al.* (1993). Para ello, al material vegetal previamente molido se agregó 600µl de *buffer* de extracción (Tabla 1). Luego de incubarse en baño de agua a 65°C durante 30 minutos, se agregó 750µl de cloroformo, mezclando suavemente mediante inversiones durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 revoluciones por minuto (rpm.), 30 minutos. La fase acuosa se transfirió a otro microtubo y se agregó un volumen igual de cloroformo ( $\pm$  670µl), mezclando nuevamente mediante inversiones durante 10 minutos. Se repitió la centrifugación a 12.000 rpm., durante 30 minutos y se extrajo la fase acuosa colocándola en un nuevo microtubo. Se precipitó el ADN presente en la muestra con isopropanol frio (agregando un 60% del volumen), mezclando suavemente. Luego de centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm. se descartó la fase acuosa, prosiguiendo con el lavado de los *pellet*. Para ello, se agregó 1 ml de etanol 70%, se centrifugó y se descartó la fase acuosa. Luego de repetir el lavado, se dejó secar los *pellet* hasta evaporación total del etanol al 70%. Finalmente se resuspendió el ADN con 40µl de solución TE (10mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA).

**Tabla 1.** Composición del buffer de extracción. TrisClh: Tris-hidroximetil-aminometano(pH=8, ajustado con ácido clorhídrico); NaCl: Cloruro de sodio; EDTA: Ácidoetildiaminotetraacético; SDS: Dodecilsulfato sódico; CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

Componentes	Concentración final	1X
1M TrisClH (pH 8)	100mM	75µl
5M NaCl	700mM	105µl
0.5M EDTA (pH 8)	50mM	75µl
SDS 20% *	2%	75µl
CTAB 10% *	1%	75µl
H <sub>2</sub> O		345µl
Volumen total		750µl

(\* Agregado después de calentar 10 min a 65 °C)

#### 3.2- Cuantificación de ADN

Para la cuantificación y control de la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,1 $\mu$ g/ml). Por pocillo se sembró un volumen de 2 $\mu$ l de muestra con 6 $\mu$ l de azul de bromo fenol (BPB). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 Volts/cm aproximadamente durante 30 minutos en *buffer* TAE 1X (40mM Tris, 5mM de Acido Acético Glacial (NaOAc), 0,7 mM EDTA, en un volumen final de 100ml de agua destilada y ajustado a pH 8.0 con Ácido Acético Glacial). La visualización del ADN se realizó con luz ultravioleta en transiluminador UVP Modelo M-20. La concentración de ADN se determinó visualmente y como referencia se utilizaron muestras de ADN con concentraciones conocidas.

#### 3.3- Análisis SSR

Se evaluaron los parentales utilizando marcadores moleculares SSR distribuidos uniformemente en los cromosomas 1 y 5 del genoma de maíz. Dichos cromosomas fueron seleccionados de acuerdo a los antecedentes bibliográficos. Las secuencias de los iniciadores y las condiciones de reacción para cada SSR fueron obtenidas de la base de datos pública "*Maize Genetics and Genomics Database*" (<u>http://www.maizegdb.org</u>). La lista de los iniciadores SSRs utilizados se detalla en el Anexo 1.

Las muestras de ADN fueron amplificadas en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción de 12,5µl. En cada reacción se utilizó 0,13µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 200µM cada uno, 1,67µl *Buffer* Taq 10X, 0,67µl de Mg<sup>++</sup> 2,5 mM, 1 µl de cada oligonucleótido (cebador *forward* y *reverse*), 0,125 µl Taq-Polimerasa (Invitrogen®) y 60ng de ADN templado.

Las reacciones de amplificación (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100, utilizando un perfil de PCR según se detalla a continuación:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 minutos;
- 10 ciclos:

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos;

Hibridación: 65-55°C (decrece 1°C/ciclo) durante 30 segundos; Extensión: 72° C durante 30 segundos;

• 35 ciclos:

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos; Hibridación: 65-55°C (decrece 1°C/ciclo) durante 30 segundos; Extensión: 72° C durante 30 segundos;

• Extensión final: 72°C durante 10 minutos.

#### 3.4 - Visualización de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (Acrilamida: Bis-acrilamida (19:1) y urea 7M, polimerizado con 0,01% de TEMED y 0,035% de Persulfato de Amonio en TBE 1X (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico y 2mM EDTA pH 8))

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis vertical en cubas de secuenciación en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (Acrilamida: Bis-acrilamida (19:1) y urea 5M en buffer TBE (11% tris base, 6% ácido bórico, 0,6% EDTA 0,5M) de 0,4 mm de espesor utilizando el equipo *Sequi-Gen DNA Electrophoresis Cell*, Bio-Rad.

El armado de los geles y preparación de los vidrios se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vidrios recibieron un tratamiento especial con la finalidad de adherir el gel a uno sólo de ellos. Para esto, se trató el vidrio con solución adherente (3µl *Bind Silane*, 5µl ácido acético glacial 0,5%, 950 µl etanol) y la cuba se trató con solución hidrofóbica (Rain X®). La cuba y el vidrio fueron ensamblados usando espaciadores de 4mm de espesor y posteriormente se introdujo entre ellos 60 ml de la solución de poliacrilamida 6% con 35 µl de TEMED y 350 µl de Persulfato de Amonio 10%). Se dejó polimerizar como mínimo durante dos horas. Se emplearon peines de 97 calles.

El gel fue sometido a una pre-corrida en *buffer* TBE de dos concentraciones distintas (0,5X arriba y 1X abajo). Previo a la siembra, se agregó a las muestras amplificadas *buffer* de carga (200µl EDTA 0,5M, 9,6ml formamida y 300µl colorante-azul bromofenol y xileno cianol) y se desnaturalizó por calentamiento a 94°C durante 5 minutos y enfriando posteriormente en hielo para evitar la unión de las cadenas. El volumen de siembra fue de 2 µl por calle.

La electroforesis de las muestras se llevó a cabo durante una hora y media aproximadamente a una potencia constante de 55W, con un voltaje variable entre 14.000 y 2.000 volts y controlando que la temperatura no supere los 55° C).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se separaron los vidrios y se procedió a la tinción de los mismos siguiendo el protocolo de tinción con plata para secuenciación de Promega Corp. El método consiste en la reducción en medio alcalino de los iones Ag++ que se depositan sobre el ADN, en presencia de Formaldehído.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se separó de la cuba el vidrio, quedando el gel adherido a él. Para prevenir la difusión de los fragmentos de ADN, se colocó el gel en una solución de Ácido Acético 10% (solución fijadora) en agitación durante aproximadamente 20 minutos, hasta que el colorante xileno cianol no fuera visible. Se removió el exceso de urea, buffer TBE y Ácido acético mediante 3 enjuagues con agua bidestilada de 2 minutos cada uno. Posteriormente se transfirió el gel a una solución de tinción (1g/l de Nitrato de Plata y 0,15% v/v de Formaldehído 37%) incubándolo durante 30 minutos en agitación suave. Luego se sumergió el gel en agua bidestilada durante 5 segundos, escurriéndolo 3 veces para remover el exceso de plata. Finalmente se reveló por precipitado de la plata en una solución de 30 g/l de Carbonato de Sodio con 2 mg/l de Tiosulfato de Sodio y 0,15% v/v de Formaldehído 37%. Esta solución fue previamente enfriada a 10°C, ya que la velocidad de la reacción es dependiente de la temperatura. Una vez que se visualizaron nítidamente las bandas se procedió a la detención de la reacción mediante el agregado de Ácido Acético 10%. Finalmente el gel se enjuagó dos veces con agua destilada durante 2 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez secos los geles se registraron las bandas obtenidas mediante la visualización de los productos de amplificación, colocando los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca. Se consideró "A" al alelo presente en el padre LP3830 y "B" a al alelo correspondiente al padre LP179. Las imágenes se almacenaron mediante digitalización, utilizando Scanner Astra 2400slt.

Los marcadores SSR evaluados fueron clasificados como:

 a) SSRs "polimórficos": aquellos que evidenciaron diferencias en la secuencia de ADN de la región amplificada en los parentales.

b) SSRs "monomórficos": no revelaban diferencias en la región amplificada en los padres.

- c) SSRs sin producto de amplificación
- d) Dudosos: SSRs cuyo patrón de bandas no podía interpretarse claramente.

#### 4 - Caracterización genotípica de la población de mapeo

Se caracterizó genotípicamente 136 individuos F2 mediante los marcadores SSR que previamente mostraron polimorfismo entre los padres contrastantes. Se extrajo el ADN genómico de cada individuo F2 a partir de muestras de tejido foliar previamente liofilizado y se realizó la amplificación de los microsatélites y la visualización de los productos de PCR obtenidos siguiendo los mismos procedimientos indicados para los genotipos parentales. Se registró el genotipo de cada individuo, asignando "A" a los homocigotas para el alelo proveniente del padre LP3830, "B" a los homocigotas para el alelo del padre LP179 y "AB" a los individuos heterocigotas.

# 4.1 - Análisis de segregación de los marcadores

La segregación 1:2:1 de los SSR fue evaluada mediante la prueba de chi cuadrado  $X^2$ , con 2 dos grados de libertad, entre la frecuencia observada y la frecuencia esperada de cada una de los alelos posibles, utilizando el programa GQMOL (Schuster & Cruz, 2004).

$$X^{2} = \sum \frac{(\text{frecuencia observada- frecuencia esperada})^{2}}{\text{frecuencia esperada}} \sim X^{2}_{\text{gl: clases alélicas}}$$

Para establecer el nivel crítico individual se empleó el método estadístico *False Discovery Rate* (FDR) que se encarga de controlar la proporción de hipótesis nulas (H0) rechazadas incorrectamente cuando se tiene muchas hipótesis que testear (Benjamini & Hocheberg, 1995). Se considero un nivel de significancia global del 5%.

### 4.2 - Mapa de Ligamiento

El análisis de ligamiento se realizó empleando el programa MapManagerQTX (Manly *et al.*, 2001). Las distancias genéticas fueron estimadas mediante la función de mapeo de Kosambi (1944) y un criterio de ligamiento significativo de p=0.05, indicando la probabilidad de falsos positivos.

#### 5 - Estudio de asociación entre el fenotipo y genotipo

Se estudió la asociación entre el fenotipo y genotipo mediante análisis de regresión de marcadores individuales y mapeo de QTL por intervalos simple (IM), empleando el programa Windows QTL Cartographer V2.5 (Wang *et al.*, 2007).

Se probó la significancia de los marcadores individuales mediante el modelo regresión linear simple y = b0 + b1 x + e, obteniéndose los estimadores b0 y b1 y calculando el estadístico F para cada marcador. Para establecer si el marcador estaba ligado a un QTL se determinó si b1 es significativamente diferente de cero. Esto se testeó mediante el estadístico F comparando la hipótesis nula (H0: b1 = 0) con la alternativa (H1: b1  $\neq$  0) dando un valor de probabilidad (p valor). Se utilizó el coeficiente r<sup>2</sup> de la regresión como indicador de la proporción de la variación fenotípica explicada por el marcador.

Se calcularon los efectos aditivos (a´) y de dominancia (d´) mediante los siguientes contrastes de medias de clases de marcadores:

a' = 
$$(M_A - M_B)/2 = a (1-2r)$$
 \*  
d'=  $M_{AB} - [(M_A + M_B)/2] = d (1-2r)^2$  \*

(\* a' y d' son efectos aditivos y de dominancia sesgados por la frecuencia de recombinación r entre marcador y QTL; M<sub>A</sub>: media para el carácter de los individuos homocigotas para el alelo A, proveniente del parental LP3830; M<sub>B</sub>: media de los individuos homocigotas para el alelo B, proveniente del parental LP179; M<sub>AB</sub>: media de los individuos heterocigotas).

En el método de mapeo por intervalo se estimaron, para cada posición en el genoma (cada 1 cM), los efectos de aditividad y de dominancia del QTL, el  $r^2$  de la regresión y la función de verosimilitud de la presencia de un QTL segregando. Para determinar la presencia de un QTL ligado, se comparó esta última con la verosimilitud para la situación en que no hay QTL segregando a través del valor LOD (logaritmo en base diez del cociente de las respectivas verosimilitudes). El valor de LOD umbral se calculó mediante el método de permutaciones (Churchill & Doerge, 1994), con 500 permutaciones y un nivel de significancia de 0,05.

#### **RESULTADOS**

#### 1 - Evaluación fenotípica

Los histogramas de frecuencia de los valores para cada variable estudiada se presentan en los Anexos 2, 3 y 4. En la distribución de frecuencias de la población se encontró segregación transgresiva en todos los caracteres evaluados, dado que las familias F2:3 arrojaron valores mayores y/o menores que las líneas parentales.

En la primera toma de datos del tratamiento "Frio", es decir luego de 7 días de incubación a 8°C, no se observaron semillas germinadas. En la segunda toma de datos (a los 14 días) solo se observaron semillas hinchadas siendo el porcentaje de semillas germinadas muy pequeño. Por ello no se analizaron los valores correspondientes a las mismas. En la tercera toma de datos (luego de 21 días de incubación) solo se analizó el porcentaje de germinación, ya que fue muy reducido el nº de semillas con radículas y coleóptilos mayores a 0,5 cm.

Tanto en el tratamiento "Frío" como en "Control", las variables medidas como proporciones (%GermF, %R05F, %R1F, %Col05F, %Col1F, %rsF, %rF, %cF, %GermC y I\_G) no presentaron distribución normal, por lo que se aplicó la transformación Arcsen ( $\sqrt{y}$ ) para continuar con los análisis. Mediante el análisis de la varianza (ANOVA) se detectaron diferencias significativas entre genotipos en todas las variables, con excepción de %cF.

El parental LP3830 se destacó por su buen comportamiento germinativo a bajas temperaturas, mientras que LP179 resultó susceptible al frío durante la germinación, presentado valores significativamente inferiores en cuanto a porcentajes de germinación, de semilla con radículas y de semilla con coleóptilos, pesos húmedo y seco de parte aérea y de raíz (Figura 3). Ambos parentales se comportaron de manera similar en el tratamiento "Control", presentando valores que no difirieron significativamente en todas las variables estudiadas.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza, los estadísticos descriptivos y los valores obtenidos por los genotipos parentales, se presentan en la Tabla 2.

**Figura 3:** Comportamiento germinativo de los parentales (LP3830 y LP179) a los 37 días, finalizando el período de incubación a 14°C.



**Tabla 2:** Resumen de medidas estadísticas: media general; Desvío estándar (DE); Valor mínimo (Mín); Valor máximo (Máx); Medias de los parentales (LP3830 y LP179); Valor de probabilidad (p valor); Coeficiente de Variación (CV) y Coeficiente de regresión ( $\mathbb{R}^2$ ). <sup>*a*</sup> :Variables transformadas según Arcsen ( $\sqrt{y}$ ). *TD3, TD4* y *TD5*: toma de datos a los 21, 28 y 35 días de incubación en frío, respectivamente.

Variable		Media	DE	Mín	Máx	LP3830	LP179	p valor	CV	$\mathbf{R}^2$
%GermF (TD3)	а	0,8178	0,3473	0,00	1,57	1,1282	0,2217	<0,0001	24,53	0,83
%GermF (TD4)	а	1,1323	0,2224	0,60	1,57	1,3150	0,7376	<0,0001	13,91	0,75
%R05F (TD4)	а	0,9614	0,2884	0,00	1,57	1,2275	0,3603	<0,0001	18,85	0,80
%R1F (TD4)	а	0,7947	0,3318	0,00	1,57	1,1761	0,0671	<0,0001	23,16	0,85
%Col01F (TD4)	а	1,0738	0,2338	0,51	1,57	1,2553	0,7162	<0,0001	15,07	0,76
%Col05F (TD4)	а	0,8241	0,3388	0,00	1,57	1,0826	0,3095	<0,0001	23,01	0,84
%Col1F (TD4)	а	0,3128	0,3520	0,00	1,37	0,5690	0,0000	<0,0001	73,52	0,79
%rsF (TD4)	а	0,8864	0,3124	0,00	1,57	1,0127	0,3390	0,0002	26,95	0,71
%rF (TD4)	а	0,1715	0,2040	0,00	0,81	0,0671	0,0336	0,0015	90,98	0,71
%cF (TD4)	а	0,0172	0,0594	0,00	0,35	0,0000	0,0000	0,0926	326,43	0,56
%GermF (TD5)	а	1,2000	0,1900	0,77	1,57	1,3882	0,9267	<0,0001	10,62	0,78
%R05F (TD5)	а	1,1484	0,1976	0,60	1,57	1,3770	0,6908	<0,0001	11,35	0,78
%R1F (TD5)	а	1,1165	0,2056	0,51	1,57	1,3338	0,6008	<0,0001	12,45	0,77
%Col01F (TD5)	а	1,1819	0,1986	0,68	1,57	1,3338	0,8980	<0,0001	11,32	0,77
%Col05F (TD5)	а	1,1329	0,1994	0,60	1,57	1,3053	0,7445	<0,0001	11,97	0,77
%Col1F (TD5)	а	1,0404	0,2272	0,00	1,57	1,2585	0,4523	<0,0001	13,93	0,80
%rsF (TD5)	а	1,1156	0,2302	0,00	1,57	1,3150	0,6978	<0,0001	16,24	0,69
%rF (TD5)	а	0,4117	0,2247	0,00	1,11	0,2774	0,4040	<0,0001	44,27	0,67
%cF (TD5)	а	0,2029	0,1790	0,00	0,85	0,1252	0,0478	0,0001	70,82	0,68
%GermC	а	1,2975	0,1837	0,67	1,57	1,3294	1,4104	<0,0001	10,86	0,71
I_G (TD3)	а	0,8633	0,3718	0,00	1,57	0,9860	0,2257	<0,0001	26,73	0,82
I_G (TD4)	а	1,1960	0,2238	0,60	1,57	0,9039	0,7598	0,0012	14,68	0,75
I_G (TD5)	а	1,2675	0,1811	0,77	1,57	0,9964	0,9604	0,0089	11,81	0,72

# Tabla 2: Continuación.

Variable	Media	DE	Mín	Máx	LP3830	LP179	p valor	CV	$\mathbb{R}^2$
PHPAC	6834,8183	3709,0249	177,50	17008,00	5446,3800	7110,1400	0,0158	32,91	0,81
PHRC	3015,1982	1103,2196	461,20	6296,00	2415,2600	2895,9800	0,0014	31,12	0,63
PSPAC	457,8153	218,2782	43,70	1216,50	374,0800	428,6600	0,0888	36,06	0,70
PSRC	270,3078	108,3769	30,70	773,60	232,0000	276,1600	0,0106	35,02	0,61
PHPAiC	302,8164	148,6477	20,52	678,00	243,1680	336,7420	0,0177	28,92	0,81
PHRiC	135,1890	41,8712	27,04	262,33	107,4400	135,5640	0,0007	26,13	0,64
PSPAiC	20,3593	8,6476	2,19	52,89	16,6740	20,3520	0,1956	32,92	0,69
PSRiC	12,0763	4,1652	2,10	30,94	10,1280	13,0100	0,013	30,61	0,60
PHPAF	2710,8618	1168,5246	462,30	6509,10	4100,4200	770,5400	<0,0001	23,04	0,85
PHRF	2180,1618	909,2832	310,90	4717,20	2997,0600	559,6000	<0,0001	24,76	0,81
PSPAF	225,7344	82,7924	51,90	454,60	359,0600	80,4400	<0,0001	20,29	0,83
PSRF	185,8396	71,4827	20,80	429,50	257,5000	55,6600	<0,0001	25,67	0,76
PHPAiF	131,9398	45,5346	35,08	295,87	169,8140	48,1900	<0,0001	19,02	0,84
PHRiF	105,8697	34,8930	22,21	229,22	123,7720	37,9100	<0,0001	19,90	0,81
PSPAiF	11,0652	3,0897	3,71	19,77	14,8760	5,1160	<0,0001	17,38	0,79
PSRiF	9,1177	2,8469	1,49	17,90	10,6400	3,8700	<0,0001	20,65	0,77

# 2 - Evaluación genotípica. Identificación de polimorfismos en los parentales

Con el fin de seleccionar los marcadores SSRs que evidenciaran variaciones en la secuencia de ADN de los parentales, se realizaron pruebas con los parentales, el genotipo F1 y el de la línea B73 (Figura 4). Se evaluaron 205 SSRs, de los cuales el 88,8% generó productos de amplificación. De estos, el 30,7% presentó patrones de bandas diferentes en los genotipos parentales, 8,8% resultó dudoso y los restantes SSRs (49,3%), monomórficos. En el cromosoma 1 se evaluaron 132 SSRs, de los cuales 36 resultaron polimórficos y en el cromosoma 5 se encontraron 27 polimórficos de 73 analizados (Tabla 3).

**Figura 4:** Productos de amplificación de los parentales (LP3830 y LP179), F1 y línea B73, visualizados en gel desnaturalizante de poliacrilamida 6% y tinción con plata, obtenidos para el cromosoma 1 con los marcadores SSRs phi056, bnlg109, umc2225, umc2229, bnlg2238, bnlg1884, umc1335, umc1706, phi037, umc1715, phi011, bnlg1347 y umc1553. Para cada SSRs se sembró en orden dos calles del genotipo LP3830 (P1), dos calles de LP179 (P2), una calle para la F1 y una calle para B73. El orden se indica en el primer SSR. *P: Polimórfico; M: Monomórfico; NA: No amplificó; PH: Un parental heterocigota.* 



**Tabla 3:** Número y porcentaje de marcadores SSRs polimórficos, monomórficos, dudosos y sin producto de amplificación, obtenidos a partir de pruebas preliminares con los genotipos parentales (LP3830 y LP179), F1 y la línea B73

Cromosomo	Polim	órficos	Monor	nórfico	No an	plificó	Duc	loso	Total		
CIOIDOSOIDA	nº	%	n°	%	n°	%	n°	%	nº	%	
1	36	27,3	66	50,0	21	15,9	9	6,8	132	64,4	
5	27	37,0	35	47,9	2	2,7	9	12,3	73	35,6	
Total	63	30,7	101	49,3	23	11,2	18	8,8	205	100,0	

#### 3 - Caracterización genotípica de la población de mapeo

#### 3.1- Análisis de segregación de marcadores

La población F2 se caracterizó genotípicamente con 23 marcadores (15 pertenecientes al cromosoma 1 y 8 al cromosoma 5) que previamente revelaron polimorfismo entre los parentales. Se evaluó la segregación 1:2:1 de los mismos mediante el método estadístico False Discovery Rate (FDR), considerando un nivel de significancia global del 5%.

Solo 5 microsatélites se alejaron de la segregación esperada según las leyes de Mendel (Tabla 4). Cuatro de ellos se agruparon en los bin 1.07, 1.08 y 1.09. El restante SSR se localizó en el cromosoma 5 (bin 5.09).

Marcador SSR	Bin	Seg	regación obser	vada en las c	ases	Qui-quadrado	Probabilida	ud(%)
		А	AB	В	sd			
phi056	1.01	37	70	23	6	3,785	15,0724	ns
umc1177	1.02	34	77	25	0	3,574	16,7501	ns
umc2225	1.02	35	60	35	6	0,769	68,0712	ns
umc1976	1.02	31	79	26	0	3,926	14,0403	ns
umc1479	1.03	39	59	37	1	2,2	33,2871	ns
bnlg1203	1.03	35	62	32	7	0,333	84,6482	ns
bnlg2238	1.04	42	55	35	4	4,409	11,0301	ns
umc2229	1.04	37	67	30	2	0,731	69,3731	ns
umc1245	1.07	41	75	16	4	11,924	0,2574	*
dup12	1.08	48	73		1	18,022	0,0122	*
phi055	1.09	44	76	12	4	18,545	0,0094	*
umc1715	1.09	47	72	14	3	17,286	0,0176	*
umc1431	1.09	35	78	21	2	6,537	3,8058	ns
bnlg1347	1.1	42	66	25	3	4,353	11,3416	ns
umc1797	1.11-1.12	27	61	43	5	4,527	10,4001	ns
bnlg1700	5.03	35	65	29	7	0,566	75,3561	ns
umc2140	5.03	34	65	34	3	0,068	96,6731	ns
bnlg1287	5.04	30	77	27	2	3,119	21,0199	ns
umc1800	5.05	30	76	24	6	4,277	11,7836	ns
umc1680	5.06	25	85	24	2	9,687	0,7881	ns
phi128	5.07	29	57	46	4	6,833	3,2822	ns
umc1153	5.09	28	59	46	3	6,564	3,7555	ns
bnlg389	5.09	18	59	57	2	24,612	0,0005	*

 Tabla 4: Análisis de segregación de 23 SSRs utilizando el criterio FDR y un nivel de significancia de 5%. sd: dato faltante.

Nivel crítico: 0,788 %

#### 3.2 - Mapa de ligamiento

Se realizó el análisis de ligamiento de 18 marcadores moleculares en base a su segregación en la progenie F2 empleando el programa MapManagerQTX (Manly *et al.*, 2001). Los mapas de ligamiento generados se muestran en la Figura 5. Los marcadores se agruparon en 4 grupos de ligamiento, 3 correspondientes al cromosoma 1 y el restante al cromosoma 5. En el cromosoma 1 se cubrió un total de 87,9 cM, con una densidad promedio de un marcador cada 8,79 cM. En el cromosoma 5 se cubrió un total de 80,3 cM, con una densidad promedio de un marcador cada 16,06 cM. Tres marcadores (umc1797, phi128 y umc1153) no se asociaron con otros marcadores dentro del mapa.

**Figura 5:** Mapa de ligamiento correspondientes a los cromosomas 1 y 5 del maíz. *A* la izquierda se indican las distancias en cM y a la derecha el nombre de los marcadores. GL: grupos de ligamiento.



#### 4 - Estudio de asociación entre el fenotipo y genotipo

En el mapeo de QTL por análisis de marcadores individuales se detectaron siete marcadores SSR que presentaron asociación significativa (p>0,05) con algunos de los caracteres fenotípicos evaluados. Cinco de ellos se asociaron en forma altamente significativa (p>0,01): bnlg1287, umc1800, phi128, umc1479 y umc1797 (Tabla 5). En todos los casos, el alelo que favorece el carácter proviene del parental LP3830.

En el cromosoma 5, los marcadores bnlg1287 y umc1800 se encontraron asociados con el peso de la parte aérea de cada plántula individual. El SSR bnlg1287 se relacionó con PHPAiF y PSPAiF, explicando un 5,57 y 6,23% de la variación fenotípica observada, respectivamente. El efecto aditivo para PHPAiF fue de 12,150 mg y el de dominancia de 2,620 mg. Para la variable PSPAiF los efectos de

aditividad y dominancia fueron 0,890 mg y 0,140 mg, respectivamente. EL SSR umc1800 se asoció al PSPAiF, con un  $r^2$  de 0,057 y valores aditivos y de dominancia de 0,9 mg y -0,09 mg, respectivamente.

En el mismo cromosoma, el SSR phi128 se asoció al porcentaje de germinación luego de 21 días de incubación en frío, explicando un 4,86% de la variación fenotípica observada y presentando un efecto aditivo de 0,055 y de dominancia de 0,125.

En el cromosoma 1, el marcador umc1479 explicó el 5,3% de la variación observada en PHPAiF, con valores de aditividad de 10,170 mg y de dominancia de 0,470mg. El SSR umc1797 fue el único marcador asociado al peso de la raíz, explicando 4,8% de la variación fenotípica observada en PHRiF y presentando valores de a'= 9,180 mg y d'= -3,410 mg.

El mapeo por intervalo se realizó con los microsatélites localizados en los grupos de ligamiento 1 y 4, correspondientes a los cromosomas 1 y 5 del maíz, respectivamente. Los marcadores que tuvieron un resultado significativo empleando el método de mapeo con marcadores individuales no superaron el valor de LOD umbral (2,5) en mapeo por intervalo simple, por lo que no se detectaron QTL mediante este método.

**Tabla 5:** Análisis de marcadores individuales. Media del genotipo homocigota A (M<sub>A</sub>); Media del genotipo heterocigota (M<sub>AB</sub>); Medio de los genotipos homocigotas B (M<sub>B</sub>); Efecto aditivo (a'); Efecto de dominancia (d'); Valor de probabilidad (p valor) y Coeficiente de regresión ( $\mathbb{R}^2$ ). <sup>*a*</sup>:Variables transformadas según Arcsen ( $\sqrt{y}$ ).

SSR	bin	Variable	MA	MAB	MB	a´	ď	p valor		$\mathbb{R}^2$
uma1076	1.02	I_G (TD5)	0,98	0,94	0,93	0,025	-0,015	0,023	*	0,038
unic 1970	1.02	PSRF	211,41	183,60	174,79	18,310	-9,500	0,018	*	0,041
		%GermF (TD3) <sup>a</sup>	0,88	0,84	0,77	0,055	0,015	0,033	*	0,035
		%R1F (TD4) <sup>a</sup>	0,89	0,80	0,73	0,080	-0,010	0,018	*	0,043
		%Col05F (TD4) <sup>a</sup>	0,86	0,84	0,79	0,035	0,015	0,017	*	0,042
bnlg1203	1.03	PHPAF	2942,11	2801,46	2439,41	251,350	110,700	0,022	*	0,045
		PSPAF	241,61	233,45	202,85	19,380	11,220	0,032	*	0,042
		PHPAiF	144,16	132,71	123,35	10,405	-1,045	0,017	*	0,050
		PSPAiF	11,88	11,16	10,32	0,780	0,060	0,042	*	0,039
		%GermF (TD3) $^{a}$	0,88	0,83	0,76	0,060	0,010	0,033	*	0,033
		%R05 (TD4) <sup>a</sup>	1,04	0,96	0,92	0,060	-0,020	0,041	*	0,032
		%R1F (TD4) <sup><i>a</i></sup>	0,90	0,77	0,75	0,075	-0,055	0,038	*	0,031
umc1479	1.03	PHPAF	2938,48	2779,87	2459,83	239,325	80,715	0,011	*	0,047
		PSPAF	243,00	231,83	205,12	18,940	7,770	0,012	*	0,046
		PHPAiF	142,98	133,28	122,64	10,170	0,470	0,006	**	0,053
		PSPAiF	11,87	11,21	10,30	0,785	0,125	0,011	*	0,046
		PHPAF	2850,76	2808,88	2446,87	201,945	160,065	0,048	*	0,027
		PSPAF	235,89	233,94	202,75	16,570	14,620	0,046	*	0,028
umc2229	1.04	PHPAiF	139,15	135,77	119,94	9,605	6,225	0,018	*	0,039
		PSPAiF	11,56	11,39	10,04	0,760	0,590	0,016	*	0,040
		PSRiF	9,81	9,11	8,66	0,575	-0,125	0,039	*	0,034
		%Col05F (TD4) a	0,85	0,84	0,78	0,035	0,025	0,035	*	0,029
bnlg2238	1.04	PHPAF	2894,79	2765,34	2502,31	196,242	66,788	0,026	*	0,031
		PHPAiF	140,70	131,85	124,58	8,060	-0,790	0,017	*	0,034
umc1797	1.11-1.12	PHRF	2480,23	2231,11	2056,27	211,980	-37,140	0,012	*	0,042
		PHRiF	119,72	107,13	101,36	9,180	-3,410	0,007	**	0,048
umc2140	5.03	PHPAiF	144,09	130,64	127,34	8,375	-5,075	0,019	*	0,032
u	5.05	PSPAiF	11,77	11,02	10,72	0,525	-0,225	0,029	*	0,027
bnlø1287	5.04	PHPAiF	143,00	133,47	118,70	12,150	2,620	0,009	**	0,056
oingi207	0.01	PSPAiF	11,90	11,15	10,12	0,890	0,140	0,005	**	0,062
		%Col1 (TD5) <sup>a</sup>	1,08	1,06	0,99	0,045	0,025	0,026	*	0,039
umc1800	5.05	PHRC	2704,53	3173,73	3183,52	239,495	229,705	0,039	*	0,033
		PHPAiF	141,72	131,99	120,61	10,555	0,825	0,024	*	0,039
		PSPAiF	11,98	10,99	10,18	0,900	-0,090	0,006	**	0,057
umc1680		PHPAF	2972,25	2731,66	2490,80	240,725	0,135	0,041	*	0,031
	5.06	PSPAF	242,89	229,14	204,15	19,370	5,620	0,041	*	0,031
		PHPAiF	142,85	133,38	121,05	10,900	1,430	0,021	*	0,039
		PSPAiF	11,78	11,26	9,99	0,895	0,375	0,011	*	0,047
phi128	5.07	%GermF (TD3) <sup>a</sup>	0,83	0,90	0,72	0,055	0,125	0,009	**	0,0486
umc1153	5.09	%R05 (TD4) <sup>a</sup>	0,97	1,00	0,92	0,025	0,055	0,042	*	0,0305

#### DISCUSIÓN

#### 1 - Evaluación fenotípica

En este trabajo se estudió el efecto de las temperaturas sub-óptimas durante la germinación y durante la fase heterotrófica del crecimiento temprano. Las variables analizadas permitieron establecer diferencias entre los genotipos sometidos a estrés por bajas temperaturas a partir de los 28 días de incubación (finalizando el período de incubación a 13°C. Los genotipos con mejor comportamiento no se vieron afectados, presentaron altos porcentajes de germinación y altos pesos de parte aérea y raíz. En los más susceptibles al frío se observaron fallas en la germinación, coleóptilos anormales y necrosis y/o aborto de radículas. En algunos casos respondieron con la proliferación de raíces seminales. Estas repuestas coinciden con las reportadas en trabajos previos donde encontraron que las bajas temperaturas causaron menor velocidad de germinación y emergencia (Miedema, 1982; Greaves, 1996; Marocco *et al.*, 2005), reducción del crecimiento de las plántulas, anormalidades en las raíces o radículas abortadas y proliferación de raíces seminales y lesiones del tejido de conducción (Blacklow, 1972; Cal & Obendorf, 1972; Cohn *et al.*, 1979).

La población de familias F2:3 presentó variabilidad genotípica para la mayoría de los caracteres estudiados (p<0,001), confirmando la utilidad del germoplasma para el estudio de las bases genéticas de la tolerancia al frío durante la germinación.

El frío afectó severamente el comportamiento germinativo del parental LP179. Sin embargo, en condiciones idénticas, LP3830 obtuvo valores superiores para el porcentaje de germinación, proporción de semilla con radículas y de semilla con coleóptilos, pesos húmedo y seco de parte aérea y de raíz, confirmando los resultados obtenidos por Mrogisnki *et al.*, (2012) que incorporaron a ambas líneas en diferentes grupos de clasificación de acuerdo con su comportamiento frente a bajas temperaturas.

#### 2 - Caracterización genotípica de la población de mapeo

#### 2. 1- Segregación de los marcadores

La distorsión de la segregación influye en las frecuencias de recombinación y, por lo tanto, en la precisión del mapeo y análisis de QTL (Wu *et al.*, 2010). Cinco de los veintitrés SSRs analizados en este trabajo mostraron distorsión en la segregación. En el cromosoma 1, los marcadores umc1245, dup12, phi055 y umc1715 exhibieron un sesgo de distorsión con dirección al parental LP3830. Estos marcadores se encuentran agrupados en los bin 1.07, 1.08 y 1.09 del brazo inferior del cromosoma 1. En el cromosoma 5 sólo bnlg389 (bin 5.09) presentó un sesgo de distorsión cuya dirección fue el parental LP179.

La mayoría de los *loci* distorsionados tienden a formar *clusters* definiendo regiones de segregación distorsionada (SDRs). Estas SRDs se han encontrado muchas especies de importancia agronómica como arroz, trigo y sorgo entre otros (Li *et al.*, 2010; Xu, 2008; Tai *et al.*, 2000). Lu *et al.*, (2002) detectaron 18 SDRs en maíz utilizando cuatro poblaciones de mapeo diferentes. Tres SDRs fueron halladas en el cromosoma 1 abarcando desde el bin 1.02 a 1.11 y una en el cromosoma 5 abarcando los bin 5.05 a 5.07. La distorsión observada en este trabajo en el cromosoma 1 (umc1245, dup12, phi055 y umc1715) coincide con dos amplias SDRs del cromosoma 1, que abarcan los bin 1.07, 1.08 y 1.09.

Una de las principales causas de segregación distorsionada es la competencia gametofítica, que provoca la fertilización o aborto preferencial de los gametos masculinos o femeninos (Taylor & Ingvarsson, 2003; Lyttle, 1991). El exceso o déficit en el número de marcadores para un genotipo homocigota en particular observado en el presente trabajo es consistente con el efecto de los factores gametofíticos. En el cromosoma 5, Lu *et al.* (2002) y Wang *et al.* (2012) han encontrado factores gametofíticos que abarcan los bin 5.00 a 5.06, por lo que dichos factores podrían estar causando la mala segregación del marcador bnlg389 en dicho cromosoma.

Asimismo la segregación distorsionada podría estar provocada por otros factores como mutaciones, genes gametofíticos, genes deletéreos y genes citoplasmáticos, aún desconocidos. Actualmente, la proporción de *loci* de segregación distorsionada descubiertos es muy baja debido a su difícil detección siendo todavía un tema en estudio (Liu *et al.*, 2010)

#### 2.2- Mapa de ligamiento

Mediante el análisis de ligamiento de los marcadores moleculares en base a su segregación en la progenie F2 se construyeron los mapas genéticos correspondientes a cada cromosoma (1 y 5). Los microsatélites localizados permitieron asociar 3 grupos de ligamiento al cromosoma 1 y un grupo de ligamiento al cromosoma 5.

Los mapas de los cromosomas 1 y 5 cubren 87,9 y 80,3 cM, respectivamente. La longitud del cromosoma 1 coincide con Mandolino *et al.* (2014) quienes construyeron un mapa de ligamiento a partir de una población de RILs (líneas recombinantes endocriadas) generadas mediante el cruzamiento de las líneas B100 x LP2 y obtuvieron un tamaño de 73,2 cM para el cromosoma 1 y 37.3 para el cromosoma 5. El tamaño de los mismos es menor en comparación a los presentados en mapas genéticos construidos por otros investigadores, que figuran en la base de datos pública *"Maize Genetics and Genomics Database"* (<u>http://www.maizegdb.org</u>), indicando que la cobertura del genoma fue incompleta, por lo que se debería saturar aún más las regiones de los cromosomas estudiadas con nuevos marcadores.

#### 3 - Mapeo de QTL

El mapeo de QTL mediante el método de marcadores individuales permitió detectar regiones en los cromosomas 1 y 5 asociadas a caracteres relacionados con la tolerancia a las bajas temperaturas durante la germinación y la fase heterotrófica temprana del maíz, sugiriendo la presencia de posibles QTL. En este trabajo, el marcador umc1797 se encontró ligado al peso húmedo de raíces de plántulas individuales. El mismo se encuentra en el bin 1.11-1.12 coincidiendo su ubicación con un QTL detectado por Hund *et al.* (2004) relacionado con caracteres morfofisiológicos de raíz y con el área foliar de plántulas en condiciones de bajas temperaturas. En el cromosoma 5 se detectaron 3 SSRs asociados al peso de la parte aérea de plántulas bajo condiciones de incubación en bajas temperaturas. Presterl *et al.* (2007) detectaron QTL para vigor temprano de plántulas de maíz en el campo, en 11 ambientes diferentes de zonas con bajas temperatura, uno de ellos se ubicado en el cromosoma 1 se asoció a materia fresca de plantas en estado de 6 hojas en siembras tempranas a campo. El mismo concuerda con el encontrado en el presente trabajo para PHPAiF y PSPAiF, ligado al marcador bnlg1287.

En la mayoría de los experimentos de QTL las condiciones de incubación durante la imbibición y germinación de semillas fueron óptimas realizándose el pasaje a condiciones de bajas temperaturas cuando las plántulas desarrollaron 1 o 3 hojas. En este trabajo, las semillas fueron sometidas durante las etapas de imbibición y germinación a estrés por bajas temperaturas. El microsatélite phi128 asociado al porcentaje de germinación en frío podría estar indicando la presencia de una nueva región cromosómica, no reportada en trabajos anteriores.

La población segregante utilizada (F2) y la naturaleza codominante de los marcadores microsatélites permitieron estimar efectos aditivos y de dominancia para los QTL encontrados. Sin embargo los mismos estaban sesgados por la frecuencia de recombinación entre el marcador y el posible QTL. Dado que no se detectaron QTL mediante el mapeo por intervalo simple, estos efectos no pudieron estimarse con mayor precisión. Para una estimación más precisa de los mismos, como así también la localización de los QTL, sería necesario aumentar el número de marcadores mapeados.

# CONCLUSIÓN

Las variables fenotípicas analizadas, relacionadas a la tolerancia a bajas temperaturas durante la germinación y la etapa heterotrófica temprana del maíz, se comportaron como caracteres poligénicos, observándose, en todos los casos, segregación transgresiva.

Los marcadores moleculares posibilitaron identificar regiones cromosómicas asociadas a la tolerancia al frío durante la germinación del maíz, provenientes del parental tolerante. Se detectaron posibles QTL en los cromosomas 1 y 5 relacionados al peso de las partes aéreas y raíces de plántulas sometidas a estrés por frío y al porcentaje de germinación a bajas temperaturas.

Este trabajo se completaría con la búsqueda de regiones genéticas asociadas al carácter en los restantes cromosomas del maíz y con la saturación del mapa de ligamiento con un número mayor de marcadores en las regiones donde se detectaron posibles QTL.

La información obtenida mediante el mapeo de QTL relacionados con la tolerancia al frío en el genoma del maíz, permitirá incrementar los conocimientos de las bases genéticas de dicho carácter y beneficiar los programas de mejoramiento que se desarrollan actualmente mediante la selección asistida por marcadores moleculares.

### **BIBLIOGRAFÍA**

• Agrama, H.A.S.; Zakaria, A.G.; Said, F.B. & Tuinstra, M. (1999). Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. Mol Breed 5:187–195.

• Aidun, V.L.; Migus, W.N. & Hamilton, R.I. (1991). Use of Inbres seedling cold tolerance to predict hybrid cold tolerance in maize (*Zea mays* L.). Can J of Plant Sci 71: 663-667.

• Alladr, R.W. (1980). Principios de la mejora genética de las plantas, Cuarta edición, Editorial OMEGA.

• Andrade, F.H. (1992). Radiación y temperatura determinan los rendimientos máximos de maíz, Bol, Téc, Nº 106 EEA INTA Balcarce.

• Barber, S.A. (1971). Effect of tillage practice on corn (*Zea Mays* L.) root distribution and morphology. Agron. J. 63: 724-726.

• Bedi, S. & Basra, A. S. (1993). Chilling injury in germinating seeds: basic mechanisms and agricultural implications. Seed Science Research 3: 219-229.

• Benjamini, Y. & Hocheberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistics Society B 57:289-300

• Bernardo, R. (2010). Mapping Quantitative Trait Loci. Capítulo 5. Breeding for Quantitative Trait in Plant. Ed. Bernardo, R.

• Bertin, P. & Gallais, A. (2001). Genetic variation for nitrogen use efficiency in a set of recombinant inbred lines II. QTL detection and coincidences. Maydica 46: 53–68.

• Blacklow, W.M. (1972) Influence of temperature on germination and elongation of the radicle and shoot of corn (*Zea mays* L.). Crop Sci. 12: 647-650.

Botta, G. & Gonzalez, M. (2012). Enfermedades fúngicas, bacterianas y abióticas del maíz.
 *En*: Eyherabide, G.H. (ed). Bases para el manejo del cultivo de Maíz. Ediciones INTA, Bs.As.
 pp. 25-56.

• Cal, J.P. & Obendorf, R.L. (1972). Imbibitional chilling injury in *Zea mays* L. altered by initial kernel moisture and maternal parent. Crop Sci 12: 369-373.

• Cassman, K.G.; Dobermann, A.; Walters, D.T. & Yang, H. (2003). Meeting cereal demand while protecting natural resources and improving environmental quality. Annu. Rev. Environ. Resource 28:315–58.

Cervigni, D.L.; Ortiz, J.P.; & Feingold, S.E., (2010). Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas. *En:* Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. & Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA, Bs. As. pp. 86-99.

• Chin, E.; Senior, M.L.; Shu, H. & Smith, J.S.C. (1996). Maize simple repetitive DNA sequence: abundance and allele variation. Genome 39: 866-873.

• Churchill, G.A. & Doerge, R.W. (1994). Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. Genetics, 138: 963-971.

Cirilo, A.G. (2004). Fecha de Siembra y Rendimiento en Maíz. Revista IDIA XXI: Cereales,
6: 122-127.

• Cirilo, A.G.; Andrade, F.; Maddonni, G.; Vega, C. & Valentinuz, O. (2012). Ecofisiología del Cultivo de Maíz. *En*: Eyherabide, G.H (ed). Bases para el manejo del cultivo de Maíz. Ediciones INTA, Bs.As. pp. 25-56.

• Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B. & Pang, E.C.K., (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, 142: 169-196.

• Cohn, M.A.; Obendorf, R.L. & Rytko, G.T. (1979). Relationship of stelar lesions to radicle growth in corn seedlings. Agronom. Journal 71: 954-958.

• Cooper, C.S. & MacDonald, P.W. (1970). Energetics of early seedling growth in corn (*Zea mays* L.). Crop Sci. 10: 136–139.

Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M. & Robledo,
 C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

• Doerge, R.W. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. Nat. Rev. Genet., 3: 43-52.

• Engels, C. (1994). Effect of root and shoot meristem temperature on shoot to root dry-matter partitioning and the internal concentrations of nitrogen and carbohydrates in maize and wheat. Annals of botany 73: 211-219.

• Evangelista de Menezes, C.C.; Sediyama, T; Ferreira da Silva, R. & Cardoso, A.A. (1997). Efeito da baixa temperatura e do grau de umidade das sementes na germinação e na emergencia das plántulas de milho (*Zea mays* L.). Revista Brasileira de Sementes 19(2): 185-191.

• FAO. (2003). Anuario. Los Granos alimentarios. Cap. Maíz.

• Ferreira, M.E. & Grattaapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. MA EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia. 220 p.

• Fesser, E.; Samoiloff, A.; Mroginski, E. & Eyherabide, G. (2012). Aptitud combinatoria y efectos recíprocos para la germinación a bajas temperaturas en maíz. XV Congreso Latinoamericano de Genética. Rosario, Arg. 253 p.

• Fischer, R.A. & Edmeades, G.O. (2010). Breeding and cereal yield progress. Crop Sci. 50: 85–98.

• Flavell, R.B.; Bennett, M.D.; Smith, J.B. & Smith, D.B. (1974) Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochem. Genet.12:257–269.

• Fracheboud, Y.; Jompuk, C.; Ribaut, J.M.; Stamp, P. & Leipner, J. (2004). Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. Plant Mol Biol 56: 241–253.

• Fracheboud, Y.; Ribaut, J.M.; Vargas, M.; Messmer, R. & Stamp, P. (2002). Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). J Exp Bot 53: 1967–1977.

• GBEP-FAO (2008). A review of the current state of bioenergy development in G8 +5 countries. Global Bioenergy Partnership Secretariat; Food and Agriculture Organization of the United Nations; Environment, Climate Change and Bioenergy Division. Rome, Italy, 302 p.

• Greaves, J.A. (1996). Improving suboptimal temperature tolerance in maize- the search for variation. J. of Experimental Botany 296: 307-323.

• Herner, R C. (1986). Germination under cold soil conditions. HortScience 21: 118-122.

• Huang, J.; Zhang, J.; Li, W.; Hu, W.; Duan, L.; Feng, Y.; Qiu, F. & Yue, B. (2013). Genome-wide Association Analysis of Ten Chilling Tolerance Indices at the Germination and Seedling Stages in Maize. J. of Integrative Plant Biol. 55(8): 735–744.

• Hund, A.; Fracheboud, Y.; Soldati, A.; Frascaroli, E.; Salvi, S. & Stamp, P. (2004). QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. Theor Appl Genet 109: 618–629.

• Jansen, R.C. & Stam, P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136: 1447-1455.

• Jompuk, C.; Fracheboud, Y.; Stamp, P. & Leipner, J. (2005). Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions. J Exp Bot 56: 1153–1163.

• Jugenheimer, R.W, (1988). Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo e introducción de semillas, Limusa, México, 841 p.

• Kleinhofs, A.; Kilian, A.; Saghai Maroof, M.; Biyashev, R.M.; Hayes, P.; Chen, F.Q.; Lapitan, N.; Fenwick, A. & Steffenson, B.J. (1993). A Molecular isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. Theor Appl Genet 86: 705-712.

• Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. Annals of Eugenics 12: 172-175.

• Kumar, L.S. (1999). DNA markers in plant improvement: An overview. Biotech. Advances 17: 143-182.

• Lander, E.S. & Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.

• Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M.; Lincoln, S.E. & Newburg, L. (1987). MAPMAKER: An integrated computer package for construction of primary linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

Lagercrantz, U.; Ellegren, H. & Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Res. 21: 1111–1115.

• Lee, E. A.; Staebler, M.A. & Tollenaar; M. (2002). Genetic Variation in Physiological Discriminators for Cold Tolerance Early Autotrophic Phase of Maize Development. Crop Sci 42: 1919-1929.

• Leipner, J.; Fracheboud, Y. & Stamp, P. (1999). Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. Environ. Exp. Bot. 42: 129–139.

• Leipner, J. & Stamp, P. (2009). Chilling stress in maize seedlings. *En*: Bennetzen, J.L., Hake, S.C. (eds) Handbook of Maize: It's Biology, pp. 291-310. Springer, Heidelberg.

• Li, H.B.; Kilian, A.; Zhou, M.X; Wenzl, P. & Huttner, E. (2010). Construction of a highdensity composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. Mol. Genet. Genomics 284:319-331.

• Litt, M. & Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 11: 397-401.

• Liu, X.; Guo, L.; You, J.; Liu, X.; He, Y.; Yuan, J.; Liu, G. & Feng, Z. (2010). Progress of segregation distortion in genetic mapping of plants. Research Journal of Agronomy4(4): 78-83

• Lu, H. Romero-Severson, J. & Bernardo, R. (2002). Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. Theor Appl Genet 105:622–628.

• Lyttle, T.W. (1991). Segregation distorters. Ann. Rv. Genet. 25: 511-557.

• Malosetti, M. & Van Berloo, R. (2007). Construcción de mapas genéticos y detección de QTLs en plantas. *En:* Danial, D.L. (ed). Curso sobre uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas. PREDUZA-WU. Quito, Ecuador. pp. 42-63.

Mandolino, C.I.; D'Andrea, K.E.; Olmos, S.E.; Otegui, M.E. & Eyherabide, G.H. (2013).
Mapeo de QTLs para la eficiencia de uso de nitrógeno en una población de RILs de maíz. VIII
Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología. RED BIO. Mar del Plata, Arg.

• Manly, K.F.; Cudmore, H.; Robert, J.R. & Meer, J.M. (2001). Map ManagerQTX, crossplatform software for genetic mapping. Mamm. Genome 12: 930–932.

• Marocco, A.; Lorenzoni, C. & Fracheboud, Y. (2005). Chilling stress in maize. Maydica 50:571–580.

• McGregor, C.E.; Lambert, C.A.; Greyling, M.M.; Louw, J.H. & Warnich, L. (2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPDs, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica 113: 135-144.

• Miedema, P. (1982). The effects of low temperature on *Zea mays. En:* Brady, N.C. (ed) Adv Agron 35. Academic, New York, pp 93–128.

• Morgante, M. & Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant breeding. The Plant J. 3: 175-182.

 Mroginski, E.; Eyherabide, G. & Toledo, M. (2010). Germinación de diferentes genotipos de maíz a bajas temperaturas. IX Congreso Nacional de Maíz, 17-19/11/2010, Rosario, Arg. pp. 347-349.

• Mroginski, E.; Samoiloff, A.; Fesser, E. & Eyherabide, G. (2012). Caracterización de líneas endocriadas de maíz por su comportamiento germinativo a baja temperatura. XV Congreso Latinoamericano de Genética. 28-31/10/2012. Rosario, Arg. 256 p.

• Nie, G.Y.; Long, S.P. & Baker, N.R. (1992). The effects of development at suboptimal growth temperatures on photosynthetic capacity and susceptibility to chilling-dependent photoinhibition in *Zea mays*. Physiol. Plantarum 85: 554-560.

• Olmos, S.; Schlatter, A.R.; Delucchi, C.; Ravera, M.; Negri, M.E.; Mandolino, C.; Mroginski, E. & Eyherabide, G.H. (2010). Estimación de la estructura genética en las líneas de maíz de INTA Pergamino mediante el programa STRUCTURE V, 2,3,3, IX Congreso Nacional de maíz simposio nacional de sorgo, Rosario. Arg.

• Padilla, J.M & Otegui, M.E. (2005). Coordination between leaf initiation and leaf appearance rates in field grown maize (*Zea mays* L.): genotypic differences in response to temperature. Annals of Botany, 96:997-1007.

Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N. & Carrera, A. (2004). Marcadores Moleculares. *En*:
 Echenique, V.; Rubinstein, C. & Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal.
 Ediciones INTA, Bs. As. pp. 61-68.

• Presterl, T.; Ouzunova, M.; Schmidt, W.; Möller, E.M.; Röber, F. K.; Knaak, C.; Ernst, K.; Westhoff, P. & Geiger, H.H. (2007). Quantitative trait loci for early plant vigour of maize grown in chilly environments. Theor Appl Genet 114: 1059–1070.

• Pritchard, J.K.; Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data, Genetics 155, 945–959.

• Revilla, P.; Malvar, R.A.; Cartea, M.E.; Butron, A. & Ordas, A. (2000). Inheritance of cold tolerance at emergence and during early season growth in maize. Crop Sci 40: 1579–1585.

• Ribaut, J.M.; Hoisington, D.A.; Deutsch, J.A.; Jiang, C. & Gonzalez-de-Leon, D. (1996). Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I. Flowering parameters and the anthesis silking interval. Theor Appl Genet 92: 905–914.

Rojas-Beltran, J.A. 2007. Tecnología de los marcadores moleculares. *En*: Danial, D.L. (ed.).
 Curso sobre uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas PREDUZA WU. Quito, Ecuador. pp. 20-33.

• Schuster, I. & Cruz, C.D. (2004). Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Viçosa, M.G. Editora UFV, 568 p. http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm.

• Stamp, P. (1984). Chilling tolerance of young plants demonstrated on the example of maize (*Zea mays* L.). Parey, Berlin.

• Stone, P.J.; Sorensen, I.B. & Jamieson, P.D. (1999). Effect of soil temperature on phenology, canopy development, biomass and yield of maize in a cool-temperature climate. Field Crops Res. 63:169–178.

• Tai, G.C.C.; Seabrook, J.E.A & Aziz, A.N. (2000). Linkage analysis of anther derived monoploids showing distorted segregation of molecular markers. Theor. Applied Genet 101: 126-130.

• Taylor, D.R & Ingvarsson, P.K. (2003). Common features of segregation distortion in plants and animals. Genetica 117: 27-35.

• Totis de Zeljkovich, L.E. (2012). Requerimientos agroclimáticos del cultivo de maíz. *En:* Eyherabide, G.H. (ed). Bases para el manejo del cultivo de Maíz. Ediciones INTA, Bs.As.

• Van Ooijen, J.W. (1999). LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. Heredity, 83: 613-624.

• Wang, S., Basten, C.J. & Zeng, Z.B., (2007). Windows QTL Cartographer V2.5. http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm.

• Van Ooijen, J.W., Boer, M.P., Jansen, R.C. & Maliepaard, C. (2002). MapQTL®, Software for the calculation of QTL positions on genetics maps. Versión 4.0: Plant Research International, Wageningen, the Netherlands. Programa computacional.

• Wang, G.; He, Q.Q.; Xu, Z.K. & Song, R.T. (2012). High segregation distortion in maize B73 x teosinte crosses. Genet. Mol. Res. 11 (1): 693-706.

• Wang, Z.; Weber, J.L.; Zhang, G. & Tanksley, S.D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88: 1–6.

• Weber, J.L. & May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 11(3): 388-396.

• Wicks, G.A., Cruchfield, A. & Burnside, O. (1994). Influence of wheat (*Triticum aestivum*) straw mulch and metolachlor on corn (*Zea Mays* L.) growth and yield. Weed Sci. 1: 141-147.

• Wu, Y.P.; Ko, P.Y.; Lee, W.C.; Wei, F.J. & Kuo, S.C. (2010). Comparative analyses of linkage maps and segregation distortion of two F2 populations derived from *japonica* crossed with *indica* rice. Hereditas 147:225-236.

• Xu, S. (2008). Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. Genetics 180: 2201-2208.

• Zeng, Z.B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1427-1468.

# RESÚMEN

En los últimos años ha adquirido importancia el mejoramiento para adaptación a diferentes tipos de estrés, entre ellos, las bajas temperaturas. Para una correcta estrategia de mejoramiento es necesario conocer cuáles son los caracteres de la planta que limitan el rendimiento con bajas temperaturas y cuál es el control genético de esos caracteres. En las últimas décadas, la detección de marcadores moleculares asociados con *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) ha facilitado el estudio de las bases genéticas de caracteres complejos. El objetivo de este trabajo fue detectar regiones cromosómicas asociadas a la tolerancia al frío durante la germinación y la etapa heterotrófica temprana en los cromosomas 1 y 5 del maíz.

Se analizaron fenotípicamente 136 familias F2:3 derivadas del cruzamiento entre dos líneas contrastante para la tolerancia al frío. Las mismas se incubaron en condiciones controladas bajo dos tratamientos: "Control": 24°C (oscuridad) durante 7 días; "Baja temperatura": siembra a 8°C (oscuridad), luego un aumento cada 7 días a 9°C, 10°C, 13°C y 14°C. Se encontraron diferencias significativas entre las familias F2:3 para la mayoría de las variables estudiadas.

Por otra parte, se realizó la caracterización molecular usando 23 SSRs polimórficos, de los 205 SSRs evaluados. El mapeo de QTL se realizó mediante el método de análisis de marcadores individuales. Se encontraron asociaciones significativas (p < 0,01) genotipo-fenotipo, destacándose umc1479, bnlg1287, umc1797 y umc1800, los cuales se relacionaron con las variables de peso de parte aérea y raíz en condiciones de baja temperatura, y el SSR phi128, que se asoció con el porcentaje de germinación en frío. Sería necesario mapear un mayor nº de microsatélites para realizar el mapeo de QTL por intervalo simple o compuesto y de este modo completar el análisis.

# ANEXO 1

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
1.00	bnlg149	F: 5' CATCCTCCAAAAGCACTACGT 3'
1,00		R: 5' CAGCTGTCCGACACTTATTCTGTA 3'
1.00	110.0	F: 5' CATCCAGTCATCGGTAATACGACA 3'
1,00	umc1106	R: 5' AACTGTTGCCTTCTTTTTCCCTTC 3'
1.01	1 1 1110	F: 5' GTGAGAATCCTTCAGCGGAG 3'
1,01	bnig1112	R: 5' CTGTGGCAGATGTGGTATGG 3'
1.01	1100	F: 5' CGTGTACCGCTCCTCTATAGTCGT 3'
1,01	umc11//	R: 5' AAGTGGCCGAATTCATCCTTTATT 3'
1.01	0157	F: 5' GACAACGGACGTCAACCATAGC 3'
1,01	umc2157	R: 5' ATCGAAGACCTCAAGGCAAAGTG 3'
		F: 5'ACTTGCTTGCCTGCCGTTAC 3'
1,01	phi056	R: 5' CGCACACCACTTCCCAGAA 3'
		F: 5' TGCTTCACATTCAGTCACCGTCAG 3'
1,01,	phi097	R: 5' CCACGACAGATGATTACCGACC 3'
		F: 5' TGCCGAGGCTTCTAGTAGACCAA 3'
1,02	umc1976	R: 5' CGCTATATCTATCCCGCAGCAAC 3'
		F: 5' CTCCTCGCAAGGATCTTCAC 3'
1,02	bnlg1429	R: 5' AGCACCGTTTCTCGTGAGAT 3'
	bnlg109	F: 5' GCCAGCTGATGTCTGATGAACAGCACA 3'
1,02		R: 5' GATCGGGCCAGATTTCTCAAGTCGTCA 3'
1,02	umc2225	F: 5' TCGGCTGACATAATAAAACCATAGC 3'
		R: 5' ATGCGAATTTTACCGGGTTTTT 3'
1,02	umc2226	F: 5' TGCTGTGCAGTTCTTGCTTCTTAC 3'
		R: 5' AGCTTCACGCTCTTCTAGACCAAA 3'
	bnlg1953	F: 5' CCTCGGAGCTCGATTTACAC 3'
1,02		R: 5' AACATTTAACCGCCGTCATC 3'
1,03		F: 5' ACTGCTGTTGGGGGTAGGG 3'
	phi339017	R: 5' GCAGCTTGAGCAGGAAGC 3'
		F. 5' GTAAAAGACGACGACATTCCG 3'
1,03	bnlg1484	R: 5' GACGTGCACTCCGTTTAACA 3'
		F: 5' TGCTGTCTGACGATCTCTCAAATC 3'
1,03	umc1514	R: 5' TGCCACCAAATAGACCATCTATCA 3'
		F: 5'AACGTACCATCCTTGTGCCTGTAT 3'
1,03	umc2096	R: 5' CATTATTAGTACGGAGCGCTGGTC 3'
		F: 5' CTGGCTCTTCAAGTGTAAAGGAGG 3'
1,03	umc1479	R: 5' GGCCTTTTTCTTAGCTTCCTCATC 3'
		F: 5' GTACAACGGAGGCATTCTCAAGTT 3'
1,03	umc1403	R: 5' TGTACATGGTGGTCTTGTTGAGGT 3'
		F: 5' AGCCTCCTGAGACCTCTCGATT 3'
1,03	umc1021	R: 5' ACTTCGCCACCTTACATTCTTGA 3'
	umc1880	F: 5' CGCATCCGCCTAGCTCTATACTAA 3'
1,03		R: 5' GCATCGAACAGCTGAGATTGTAGA 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
1.02	bnlg1866	F: 5' CCCAGCGCATGTCAACTCT 3'
1,03		R: 5' CCCCGGTAATTCAGTGGATA 3'
1.02	1 1 1 1 7 0	F: 5' GAAAGGCTCGCTAGTCGCTA 3'
1,03	bnlg1458	R: 5' AATTCCTATCGATCCTGGCC 3'
1.02		F: 5' CGCATATATACTTGTGCGCACTTT 3'
1,03	umc2397	R: 5' TATGTATGTTCGTGTGCCTGTGTG 3'
		F: 5' GATCCTAGCCTTGAAGGGGAACT 3'
1,03	umc1452	R: 5' AAGAGGAACCATTCTGCTATCGTG 3'
		F: 5' AGATTTGACTGCAAGAAAAGGCTG 3'
1,03	umc2097	R: 5' GTCCCTCGTCCTGCAAGATTC 3'
		F: 5' TGACGGACGTGGATCGCTTCAC 3'
1,03	phi001	R: 5' AGCAGGCAGCAGGTCAGCAGCG 3'
		F: 5' ACAAGGGCGTACCAACCAC 3'
1,03	bnlg2180	R: 5' TGACCAGAGGCTTCCATACC 3'
		F: 5' AGGCGACTTAGCTGCAGAAG 3'
1,03	bnlg2204	R: 5' CGACTTTCGGTTTGGAAAAG 3'
		F: 5' CACGTAATAATCCTTTTCCCCAGA 3'
1,03	umc1598	R: 5' TTTTCTGCAAATGCTCAGAATGAT 3'
		F: 5' AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG 3'
1,03	bnlg176	R: 5' CGCGCATCGCATGCTTATCCTA 3'
	umc1397	F: 5' GTTACACTTGCAGACAAACAACCG 3'
1,03		R: 5' GTCATGTGATCCGGGAGTAAATCT 3'
	umc2171	F: 5' ACATAATCCCTCGGTACAGGACAA 3'
1,03		R: 5' GCCCTTGTGTGTGTCTATTTAGGGTG 3'
1,03	umc2217	F: 5' AAGACCTGTTCGTCAACCATGTTC 3'
		R: 5' ATGTCCCATTTACCAAGGTCTGTG 3'
	bnlg1203	F: 5' GACCCGTCTCTCTTGAGTGC 3'
1,03		R: 5' GTCTGTCTGCACCCGTTTTT 3'
1,04	umc2227	F: 5' ACCTTGAGCGTGGAGTCGGT 3'
		R: 5' AGCTGAGCCTTCTCTTCTTGGCT 3'
		F: 5' TGCCACTCAAGCCTTCTTTT 3'
1,04	bnlg2238	R: 5' TTCTGATTGCAGTGCAGACC 3'
		F: 5' GAGAAGGGCGGGGAGGAATAAC 3'
1,04	umc2229	R: 5' CGAAGAGCACGATGTTGACG 3'
		F: 5' ACTTCCACTTCACCAGCCTTTTC 3'
1,04	umc1917	R: 5' GGAAAGAAGAGCCGCTTGGT 3'
		F: 5' GTCGGAGCACTCCAAGAC 3'
1,04	dup26	R: 5' CTTCTCGCTCATCAGCTTAAA 3'
		F: 5' ACACAAGCCGACCAAAAAAC 3'
1,04	bng1811	R: 5' GTAGTAGGAACGGGCGATGA 3'
		F: 5' CCGACTGACTCGAGCTAACC 3'
1,04	bnlg1016	R: 5' CCGTAACTTCCAAGAACCGA 3'
		F: 5' GAGGGATCATGGCTCTCTCC 3'
1,04	umc1770	R· 5' GTCCATCATCAGCCTGTCACC 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
1.04	1940	F: 5' TCCTTGTTGAAGATTTTATTTCTGCT 3'
1,04	umc1849	R: 5' GGCTTTAAGTGATGCTCAAACGTA 3'
1.04		F: 5' TAGCCAACAGTCCAACATTTTTCA 3'
1,04	umc1109	R: 5' CAGGCTAGAATAACATCCCGAAGA 3'
1.04	1 -1-2229	F: 5' TGCCACTCAAGCCTTCTTTT 3'
1,04	bnlg2238	R: 5' TTCTGATTGCAGTGCAGACC 3'
1.04		F: 5' CGGAGGAGTGGTTCTTGAAA 3'
1,04	bnlg2295	R: 5' GGTTAGTGAAAGGGTTGCCA 3'
1.04	1042	F: 5' AACTGCAGAGTCGCCTGATCC 3'
1,04	umc1243	R: 5' AAGCAGACTATGCTATGCTACGCC 3'
1.04	1144	F: 5' ATGGCCCACTCATCATATCTCTGT 3'
1,04	umc1144	R: 5' TGTGTTGATTAGCAGCGGATAAAA 3'
		F: 5' AGCTCTACCAAACACGAGCTTCAT 3'
1,04	umc2112	R: 5' CAAATGCAGAAAGATAACGCGAAT 3'
	-	F: 5' ATGCGGAGGGGTCTACTACACATA 3'
1,04	umc2124	R: 5' CTGTGTCTCACTGGAAATGACGAT 3'
		F: 5' GAAATGGCAGGGAAACTTGTTTAT 3'
1,04	umc2390	R: 5' AAGAGGCAAGCAAGTGTACAGTGA 3'
		F: 5' TTTTTCTTCTCACCATCACCTTCA 3'
1,04	umc1472	R: 5' TGGCTTCAAAGAAGAGGAAACATC 3'
	umc2025	F: 5' CGCCGTAGTATTTGGTAGCAGAAG 3'
1,05		R: 5' TCTACCGCTCCTTCGTCCAGTA 3'
	umc1734	F: 5' TTGTGCATTTTGCAGAAACTAGGA 3'
1,05		R: 5' AGTACTTGTCGGTGGAGACTGGAG 3'
	phi323152	F: 5' TCAGGGAGCTCACCTACTACGG 3'
1,05		R: 5' CACGACTGCACCGATTAGC 3'
		F: 5' TGAATGAGTGGCATTCAAAATCTG 3'
1.05	umc1395	R: 5' CAGATTGCATGTGTGAGTGTGTGT 3'
		F: 5' CATTCATCCACCATAAATATCCTGC 3'
1,05	umc2232	R: 5' CTAGATTGCCTCGGACCTGTAAGA 3'
		F: 5' TCTCTCTCACATGCACGCC 3'
1,05	bnlg1886	R: 5' TTTGATTTGGGGAACCAGAG 3'
		F: 5' ACACCACGCTCTACCTCCTCT 3'
1,05	umc2233	R: 5' TTATTTACAGAAACCATGGCGTGC 3'
		F: 5' TTCGGATGCATGTGTAACGT 3'
1,05	bnlg1884	R: 5' CGGAAGTCCCATCTGTTTGT 3'
		F: 5' CGCACGTCGGGAGAGAGGGAGA 3'
1,05	bnlg652	R: 5' GCCGCAAACATAGCCGCCAAAAAT 3'
		F: 5' GGGGCAAGGACTTGTCGGT 3'
1,06	bnlg421	R· 5' AGCCAGTTGCCCAGCATCT 3'
		F. 5' GCCACGCCTTCCATTATTAGAGTA 3'
1,06	umc2236	P. 5' CGGTACTGTTCTGGGATTCGTTT 3'
	-	
1,06	umc2234	
		K. J UACOUACIATAUAGOGGGATUAG 5

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
1,06	bnlg1273	F: 5' AAACACCAAACGTCACGTGG 3'
		R: 5' GGCGACGAGATACAGGATGT 3'
		F: 5' TACAAGGAAGGCAAGTTCATCCTC 3'
1,06	umc1812	R: 5' ATGCAGGTGACATTCATCATCATC 3'
		F: 5' CAGAGTCTGATAGTCCGAACCCAG 3'
1,06	umc1590	R: 5' GTAAAGCTCACAGCTTCCGACAG 3'
	umc1335	F: 5' ATGGCATGCATGTGTTTGTTTTAC 3'
1,06-1,07		R: 5' ACAGACGTCGCTAATTCCTGAAAG 3'
		F: 5' TTTAAACTGCCCATTCATCGAACT 3'
1,07	umc1499	R: 5' AAAGTCATGTTCAACCTCTAGGCG 3'
		F: 5'TGGTGAAGGGGAAGATGAAG 3'
1,07	bnlg1025	R: 5' CCGAGACGTGACTCCTAAGC 3'
		F: 5' CTCAGCTACAGGAGCGAAGAGG 3'
1,07	umc2237	R: 5' GTCACTGCACGATCCATCACAT 3'
		F: 5' CGAGAGGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGA 3'
1,07	umc2064	R: 5' AGTCGCTGAGTCTACGGTCCCTAC 3'
		F: 5' CACCTGCTCAAGCACCATCC 3'
1,07	umc2238	R: 5' TCATGGAGTACCACCATTTGATCC 3'
		F: 5' GAGAAACCATCGACCCTTCCTAAC 3'
1,07	umc1147	R: 5' TTCCTATGGTACAGTTCTCCCTCG 3'
	umc1356	F: 5' ATACATTTTTACGTCCACGCCG 3'
1,07		R: 5' CTAGGATAGTAGGAGTGCAGGGCA 3'
	umc1706	F: 5' ATCGAGAGGGGTAAATAAGGACGA 3'
1,07		R: 5' ACCAACCACGAGGCGATGTA 3'
1,07		F: 5' ACCGACCTAAGCTATGGGCT 3'
	bnlg1556	R: 5' CCGGTTATAAACACAGCCGT 3'
		F: 5' CTTCCCTCTCCCCATCTCCTTTCCAA 3'
1,07	bnlg615	R: 5' GCAACCTGTCCATTCTCACCAGAGGATT 3'
		F: 5' GTCAGGCGATACAACTACAAGCCT 3'
1,07	umc2387	R: 5' GCTGATCCGGTACACGAACG 3'
		F: 5' TGGTTATGTGCATGATTTTTCCTG 3'
1,07	umc1245	R: 5' CATGCGTCTGATCTTCAGAATGTT 3'
		F: 5' AGAACCTCCCGCTTGACGAC 3'
1,07	umc1358	R: 5' ACCTCAACCTCGACCTCTGCAT 3'
		F: 5' GTCGGAGGATGATCCCCTATCTAT 3'
1,07	umc1278	R: 5' TGCCATAGTACATGTCCGTCATTC 3'
		F: 5' ACGAGACTCCCTCCTCTCTCTC 3'
1,07	umc1661	R: 5' GGAGTAAACTGTTGAAAGGCCCAT 3'
		F: 5' TTACATGTACCCACATCCTTGCAG 3'
1,07	umc1833	R: 5' CAGGGATCTGGGAGTATCCTCTTT 3'
		F: 5' TCAATTTTGAGCTATCACTTTCCG 3'
1,07	umc1128	R: 5' ATTGGTTCCATTGGTTTTGTTGAT 3'
	umc1486	F: 5' CTTCCAGTTCCAGCCTATTGACAC 3'
1,07		R: 5' TTAAGATCTGGCTGGGAAGAAAGC 3'
	1	

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
1.07		F: 5' TCAGCTTTATCTCTACCCATTGCTTT 3'
1,07	umc1848	R: 5' TCCATCATCTCCCTCCAGACTTTA 3'
1.07	1:000	F: 5' CATGCAATCAATAACGATGGCGAGT 3'
1,07	piii002	R: 5' TTAGCGTAACCCTTCTCCAGTCAGC 3'
1.07	bnlg1564	F: 5' ACGGGAGAACAAAAGGAAGG 3'
1,07		R: 5' CTCTCCCTCACATCCGCC 3'
1.07	1 1 257	F: 5' TCGAGAGACGAGCGTTTGAATGCT 3'
1,07	bnig237	R: 5' GCTCTGAGGTTTTCATACGGGGTT 3'
1.08	dun12	F: 5' CAGGTACTACGTGCCGTG 3'
1,00	dup12	R: 5' CTAGAGACAAACGAGGCTAGG 3'
1.08		F: 5' CGGTCGATATAATCTTGGCTGATT 3'
1,00	unic2110	R: 5' GGCGCAGAGATCATTTGTTTAAT 3'
1.09	1-1-1044	F: 5' GACTCTCCAGTCTCCGTTGC 3'
1,08	bhig1044	R: 5' ACATGAAAACGAGCAATGCA 3'
1.00		F: 5' TAATGTGTCCATACGGTGGTGG 3'
1,08	umc1015	R: 5' AGCTGGCTAGTCTCAGGCACTC 3'
1.00	-1-:027	F: 5' CCCAGCTCCTGTTGTCGGCTCAGAC 3'
1,08	pn1057	R: 5' TCCAGATCCGCCGCACCTCACGTCA 3'
1.09	1:020	F: 5' ACCGTGTCTAATGTGTCCATACGG 3'
1,08	pn1039	R: 5' CGTTAGGAGCTGGCTAGTCTCA 3'
1.00	umc1306	F: 5' CGAAACAAAACACCCAGCAGTAGT 3'
1,09		R: 5' CCAGGATGAATAAATCGTATTGCC 3'
1.00	umc1715	F: 5' TTCATTGGGTCTCTAGCCAAGAAG 3'
1,09		R: 5' GGGGAGTCACAGATCTCATCAACT 3'
1.00	umc1082	F: 5' CCGACCATGCATAAGGTCTAGG 3'
1,09		R: 5' GCCTGCATAGAGAGGTGGTATGAT 3'
1,09	1208	F: 5' AGCTGAACAAAATAAACGGAACGA 3'
	umc1298	R: 5' AGGACAAGAAAAAGAAGAAGCACG 3'
1.00	h-1-1221	F: 5' TGGTGATAACTGTCAAGCGC 3'
1,09	Dhigissi	R: 5' TTGGGGCATTGGCCTATATA 3'
1.00	-1-:004	F: 5' AAAGAGGAGGAACGCGAAGGAC 3'
1,09	pn1094	R: 5' TCACATCCTGGCGGTCACCA 3'
1.00	2047	F: 5' GACAGACATTCCTCGCTACCTGAT 3'
1,09	umc2047	R: 5' CTGCTAGCTACCAAACATTCCGAT 3'
1.00	1510	F: 5' CTGCTCCTCCTCACCCCACT 3'
1,09	umc1512	R: 5' CCCGAGGATCTCGTAGTACTTGGT 3'
1.00	1411	F: 5' CGATAATGAAGATGAGCTCCGTG 3'
1,09	umc1411	R: 5' CTAGCCGGTTGTTGTTGCCT 3'
		F: 5' AGGTCCTGGCACTAAGAGCA 3'
1,09	bnlg1502	R: 5' AGAGGTGGTATGATCACCTGG 3'
	phi011	F: 5' TGTTGCTCGGTCACCATACC 3'
1,09		R: 5' GCACACACACAGGACGACAGT 3'
	bnlg100	F: 5' TGCACGCACGGGCACTGAAC 3'
1,09		R: 5' TAAGACATCTATGGCCACCGGAG 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
1.00	umc1184	F: 5' CTTCCTTACGTGTCACCGCTCT 3'
1,09		R: 5' GTGGAGTGATGTGATCGATGATG 3'
1.00	1 1 1720	F: 5' CAACCCGGATGTCTCAAGTT 3'
1,09	bilig1720	R: 5' TTCGATGCGTATGTACTCAGC 3'
1.00	hnla1269	F: 5' TCCACGGTGACTGTAGAACG 3'
1,09	bing1208	R: 5' CACTTCCCCCAGATCATTTG 3'
1.00	ab:055	F: 5' GAGATCGTGTGCCCGCACC 3'
1,09	piiloss	R: 5' TTCCTCCTGCTCCTCAGACGA 3'
1.00	uma1200	F: 5' CTGCTCACGCTCATCCTCCT 3'
1,09	unici 290	R: 5' AGAGATTCATCAGAGTGGCGATG 3'
1.00	uma1421	F: 5' GTTGCTGTCCCCGACGTAGTAG 3'
1,09	umc1451	R: 5' GTGAGAGTACCGAGATGGCTGAG 3'
1.00	h-1-400	F: 5' AGCTGTGACTGTGAAGGGAAAA 3'
1,09	bnig400	R: 5' CGTCACACCGCTGTTTCTTG 3'
1.10		F: 5' TATACCAGCATCAGGTCTCGTCG 3'
1,10	umc1885	R: 5' GTAGAGTGACCGTGCTGTAGCAGA 3'
1.10	-1:200707	F: 5' GCAACAAGATCCAGCCGAT 3'
1,10	piii308707	R: 5' GTCGCCCTCATATGACCTTC 3'
1.10		F: 5' GACCCCAAATCTCTCCTTCCTC 3'
1,10	umc1554	R: 5' TAGCTAAGCTTGTGCTTGCTCG 3'
1.10	umc2149	F: 5' TACATGCAAAGCTAGCTAGTCGGA 3'
1,10		R: 5' AGCAGCACCATCGTAATAAGCAC 3'
1.10	blng1347	F: 5' GTGGTCACGACGAAATCCTT 3'
1,10		R: 5' TTGCAATCACACAGGTGGTT 3'
1.10	umc2189	F: 5' CGTAAGTACAGTACACCAATGGGC 3'
1,10		R: 5' ACACCGACTACAAGCCTCTCAACT 3'
1,10	1726	F: 5' GATGAGGAAGAAAAGGGAAAAGGA 3'
	umc1/26	R: 5' AGACTCAACCCTAACCCTAATGGG 3'
1,11	phi120	F: 5' GACTCTCACGGCGAGGTATGA 3'
		R: 5' TGATGTCCCAGCTCTGAACTGAC 3'
1.11	1:064	F: 5' CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT 3'
1,11	pn1064	R: 5' ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC 3'
1.11	1.601	F: 5' GAGGACACTCGCAAAGTCGC 3'
1,11	umc1681	R: 5' GCCTTTGTGGGGTCAGGAGTAG 3'
	1552	F: 5' TGAATGGAAGAGAAGGGAAATCTG 3'
1,11	umc1553	R: 5' GCTCTGTACATCCTTAGCGACACA 3'
	1 1 504	F: 5' CGGCAGCTCCAGCACCGGCAT 3'
1,11	bnlg504	R: 5' AGTGTCCACATACCGCCACACACGTTT 3'
1 1 1		F: 5' TCTCTGACTATTCCACGAGCTCAA 3'
1,11	umc1500	R: 5' CTGGTGCGTGCTACAACTGTG 3'
1 11 1 12	1202	F: 5' TCAAGTGAAATGCATAGCTTGCTC 3'
1,11-1,12	umc1797	R: 5' ACTGTTGGTAAACCCTGCATGACT 3'
1,12	umc1819 -	F: 5' GCTGCTCTAAAATCATGCTGATAAAA 3'
		R: 5' TATTCAGCAATGTATTCCCCCTGT 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
5.00	bnlg1006	F: 5' GACCAGCGTGTTGATCCC 3'
5,00		R: 5' GGAGACCCCGACTCTCTCTC 3'
<b>7</b> 00		F: 5' AGATGAATGTTGGGGTCAACAAGT 3'
5,00	umc1416	R: 5' CTTGTCAGCCACAGAAGTGCC 3'
5.01		F: 5' TTTTAACTGTAAACCGGCCACATT 3'
5,01	umc1523	R: 5' AGAGTTAGATGACTGCAGTGGCTG 3'
		F: 5' TTTTCTTTCAAAAATATTCAGAAGC 3'
5,01	bnlg1382	R: 5' GCAGGATTTCATCGGTTGTT 3'
		F: 5' CACTGCTAAGCTGCTCCCTGTT 3'
5,01	umc1679	R: 5' TGCTAACTAACCCTGACCCTCTCA 3'
		F: 5' TAAGAACGACGAACGGTAACTG 3'
5,02	bnlg565	R: 5' GCTCACTGCACGCCAACAC 3'
		F: 5' GGCTTGTAGTTGGAGTGGTCGTAG 3'
5,02	umc1761	R: 5' AGCAGCTTCAGAGGAGGAAGAAG 3'
		F: 5' GAGGCCTCAAATCGCTCTCTG 3'
5,02	umc2132	R: 5' GGTCGTCAGTGAGCTGGTCC 3'
		F: 5' TGCTCTCACAAGATGGTGGA 3'
5,02	bnlg1879	R: 5' CCACAGGATAAAATCGGCTG 3'
		F: 5' GACCGCCCGGGACTGTAAGT 3'
5,02	bnlg105	R: 5' AGGAAAGAAGGTGACGCGCTTTTC 3'
	umc2140	F: 5' CTAGGGTTTGCCTCTTCCCTCTC 3'
5,03		R: 5' AGTCTAGAGGAAGTCGGAATTGGG 3'
	umc2161	F: 5' ACGGCACACAGATATTTCAGTTCA 3'
5,03		R: 5' AAGATCAGATTTGCTTGTGGGTGT 3'
5,03		F: 5' TATTGACGATAATGTTCCCGCTTT 3'
	umc1731	R: 5' GGTTATAGGATGACGAGACGGTTG 3'
5,03		F: 5' GGTGAGGTCGTACCGGAAGAG 3'
	umc1686	R: 5' GCAGCATCTTCTTTGTCGGC 3'
	phi109188	F: 5' AAGCTCAGAAGCCGGAGC 3'
5,03		R: 5' GGTCATCAAGCTCTCTGATCG 3'
		F: 5' CGGCTACGGAGGCGGTG 3'
5,03	phi008	R: 5' GATGGGCCCACACATCAGTC 3'
		F: 5' AACTACCGTCGAAGTGGTGG 3'
5,03	bnlg1902	R: 5' CGCCTCTCTCTGACTTGTTG 3'
		F: 5' GTCACATCCATGTAGTGCACG 3'
5,03	bnlg1700	R: 5' GGCACCCTTTTGAAACCTTT 3'
		F: 5' GCTCCAGGTCGGAGATGTGA 3'
5.03- 5.04	phi113	R: 5' CACAACACATCCAGTGACCAGAGT 3'
		F: 5' TTTACAATGCGCTATCCCTAGCTT 3'
5,04	umc1860	R: 5' ATGTTTGCCTACTAAAAGCCGACA 3'
		F: 5' GCCTAGACGTCATGGACAACG 3'
5,04	umc1575	R· 5' GAGTCGAGACTGCCGTCCTTC 3'
		F: 5' GCCTACCTGTTCTGTCTCG 3'
5,04	bnlg1287 ·	R· 5' TGTCCCATACCTCAACGTGA 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
5.04	umc1482	F: 5' GAACAAAGAATCACAACACGATGC 3'
5,04		R: 5' CAGGTTCTGAGGAAAGCAAGGTT 3'
5.04	umc1815	F: 5' ACATACAGGTCACAACTCACAGCG 3'
5,04		R: 5' GCTGCCTTCTTCCTTCTCTCT 3'
5.05		F: 5' AGCACACAGACAAGAGAGACAACG 3'
5,05	umc2164	R: 5' GACCGACAACAGAGATCGAGTACA 3'
5.05	1000	F: 5' TTATGGGTGCTGGTGATGTGTATC 3'
5,05	p-umc1800	R: 5' GAAAAGCAATCGCTTCTGAGAAAA 3'
5.05		F: 5' TTATTATTAACACCTGCCTGCGCT 3'
5,05	p-umc1853	R: 5' GCTAGCTAGGAAACATGGCTTGTC 3'
5.05	1000	F: 5' TTATGGGTGCTGGTGATGTGTATC 3'
5,05	umc1800	R: 5' GAAAAGCAATCGCTTCTGAGAAAA 3'
		F: 5' TCTTTTATTGTGCCCGTTGAGATT 3'
5,05	umc1155	R: 5' CCTGAGGGTGATTTGTCTGTCTCT 3'
		F: 5' ATGCATGCCTTGATAATGGAGAAC 3'
5,05	umc1722	R: 5' ACTCTCTTCCTTCCCGTGCTTTT 3'
		F: 5' CCTACTATGGTGTATGGTCAGGGG 3'
5,05	umc1502	R: 5' TGGTCGTTCTTGGTCTCTCTCTCT 3'
		F: 5' AACAAAGTGACCTGAAACTGGGAG 3'
5,05	umc2386	R: 5' GTAGTGCCCCTCTAAGTCCAGGAG 3'
	umc1687	F: 5' TGGGAAAGGTGAGAATATGTGTTTG 3'
5,05		R: 5' GCTGACGACAAATATTCGAGAACAA 3'
5.05	umc2086	F: 5' TGCCAGAGTTCTCGTTACCAA 3'
5,05		R: 5' CGAACAAAAACTTACAGATCCAACA 3'
5,05	umc2111	F: 5' CACGCAACCCACTCATCACTC 3'
		R: 5' CTCACCGCTCTGCTCTGCTATC 3'
5,05	0001	F: 5' TGAAATAATTCACAGCACTCC 3'
	mmc0081	R: 5' TGATAGCACAACACAGCTATG 3'
5.05	umc1264	F: 5' AGATAGCTGCACATGGAAACACTT 3'
5,05		R: 5' GACACTAGCCTGGAATCAGTTTCA 3'
	1:000505	F: 5' AGCTCGAGTACCTGCCGAG 3'
5,05	phi333597	R: 5' TGCATCTCTGAGACCATCACC 3'
		F: 5' CATGCATCAACGTAACTCCCT 3'
5,05	bnlg278	R: 5' CATGTCACGCGTTCCACTTG 3'
		F: 5' TTCGACATAGCAGACGAAACTCTG 3'
5,05	umc2026	R: 5' ACTGCACCCTAGTGTGATGTTCCT 3'
		F: 5' AGAAGAAGGTGGAGGTCCAAGACT 3'
5,05	umc2303	R: 5' CTGGTATCTGATCAGGGTGCG 3'
		F: 5' GGTATAATTTTGCAAGCAGAAAGGG 3'
5,05	umc1822	R: 5' GGTTTGCTCAGGAAGAGCATGT 3'
	_	F: 5' CTCTTTCTTTATTTGTTCCGTT 3'
5,05	mmc0282	R: 5' GGACTACACATCACCAGCA 3'
		F: 5' AAAAAGTTTTGCTAGTTCGGCGAT 3'
5,05	umc2304 -	R: 5' TGGGGACACATCCTTCAAAATTAC 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
5.05	bnlg1246	F: 5' CGCAGGCCGGGGAA 3'
5,05		R: 5' CCTGGCGCCCAACC 3'
5.05.5.06	1 1 1007	F: 5' TGGCGCGATTTTCTTCATAT 3'
5,05-5,06	bnig1237	R: 5' AAAGAGCAACCTTCAACGGA 3'
5.06	2072	F: 5' TGTATTCAGAACGGCTCGTCATAA 3'
5,06	umc2072	R: 5' GGACGGTTCCGGTTCTAAGATAAG 3'
5.0.0		F: 5' CCAGCCATGTCTTCTCGTTCTT 3'
5,06	umc1019	R: 5' AAACAAAGCACCATCAATTCGG 3'
5.0.0	2205	F: 5' CTCTGCCTGCCTTTATAAATCACC 3'
5,06	umc2305	R: 5' CTCCTCTTTCCCCTCCATTGTT 3'
<b>7</b> 0 c	220.5	F: 5' CCTTGTGCAGTGGAGTTAATGAAA 3'
5,06	umc2306	R: 5' GCTACCCATTGCTATGGTTTTCTG 3'
		F: 5' TGTTCGCCGTCTAGCCTGGATT 3'
5,06	phi101	R: 5' TCATCAGCAACGACGACTACTCC 3'
		F: 5' ACGACGAGACTCTGTTCTGGTTCT 3'
5,06	umc1941	R: 5' AGGAGGATTACGTCAATCTGTTCG 3'
		F: 5' TTAATAAAGGAGAGGGTGGGAACC 3'
5,06	umc1680	R: 5' GGGGCTTATATGTCCCTTGAACTC 3'
		F: 5' AATCTGCTGACTTGTCCGGTTGTC 3'
5,06	phi100	R: 5' CCATACATATCGGCCATGATGCTC 3'
	bnlg609	F: 5' GCTCGTTCTCGCCAGTGTGCCG 3'
5,06		R: 5' GGCCCGAGCCATCTCTGCTGC 3'
	umc1752	F: 5' ATCCTCCTCCATATTCTATCGCGT 3'
5,06		R: 5' GAAACAGAGCAGGAACCGGAG 3'
5,06		F: 5' GCACCTGCGAGACTAGG 3'
	mmc0481	R: 5' TGTTTGAGCCGTTCTAGACT 3'
5,06		F: 5' TACAAGTAAACACGCGCAGGAGTA 3'
	umc1524	R: 5' TGTTTGAGCGACTTACTTGACCTG 3'
	umc2216	F: 5' CTACATCCTCTTCTCTCTCCCCTCC 3'
5,06		R: 5' TCTGGATGTTCTCCAGGATGGT 3'
		F: 5' GAGAGGAGGTGTTGTTTGACACAC 3'
5,06	phi087	R: 5' ACAACCGGACAAGTCAGCAGATTG 3'
		F: 5' AGCAGAACGGCAAGGGCTACT 3'
5,06	phi085	R: 5' TTTGGCACACCACGACGA 3'
		F: 5' TTGCTCGGTATGAAGAAAATAGTCTTTCC 3'
5,07	phi128	R: 5' ATCTTGCAACTAGACTGAGGCAACCA 3'
		F: 5' CTCTTCACTCGCTTCTCCCAGA 3'
5,07	umc2198	R: 5' AGCCCAGAGAAGGGAAGCAG 3'
		F: 5' CATCATGAAGCAATGAAGCC 3'
5,07	bnlg1346	R: 5' CCGCGCCATTATCTAGTTGT 3'
	umc1792	F: 5' CATGGGACAGCAAGAGACACAG 3'
5,08		R: 5' ACCTTCATCACCTGCAACTACGAC 3'
		F: 5' ACACACAACAGAGCCTTTTGTTCA 3'
5,08	umc2143	R: 5' AAGAAAAGGACACCAAACCAAACA 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos
5.09	bnlg118	F: 5' CTTCCAGCCGCAACCCTC 3'
5,08		R: 5' CCAACAACGCGGACGTGA 3'
5.00	uma1920	F: 5' GTTGATTGGTTGATGTGGAAACAA 3'
5,09	umc1829	R: 5' CAGTTTGATGTTCATGGCTCTCTC 3'
5.00	umc2307	F: 5' GTCGACATCGTCTTCCCCAAG 3'
5,09		R: 5' GTAGGAAGCCACGTACGGCTC 3'
5.00	bnlg386	F: 5' CACCCTCCCTTTGCAGGTA 3'
5,09		R: 5' TGGTTTATCAGATAACGATTCAGC 3'
5.00	umc1153	F: 5' CAGCATCTATAGCTTGCTTGCATT 3'
5,09		R: 5' TGGGTTTTGTTTGTTTGTTTGTTG 3'
5.00	hala290	F: 5' GGTCACCCTCCCTTTGCAG 3'
5,09	Dnig389	R: 5' ATTGCCTACACAGTTTGATTGG 3'

# **ANEXO 2**

Histogramas de frecuencias relativas de los porcentajes de germinación, semillas con radículas y coleóptilos mayores a 0,5 cm y a 1 cm, obtenidos a los 21 (TD3), 28 (TD4) y 35 (TD5) días de incubación en frío.





Histogramas de frecuencias relativas de los porcentajes de germinación a los 7 días en tratamiento

Control.



# **ANEXO 3**

Histogramas de frecuencias relativas de semillas con radículas seminales, radículas abortadas y coleóptilos rotos obtenidos a los 21 (TD3), 28 (TD4) y 35 (TD5) días de incubación en frío.



# **ANEXO 4**

Histogramas de frecuencias relativas de peso húmedo y seco total e individual, de partes aéreas y raíces de las plántulas, al finalizar los experimentos en los tratamientos Control y Frío.

