

**FENOTIPADO APLICADO A LA DETERMINACION DE LAS BASES MOLECULARES  
DEL COMPORTAMIENTO GERMINATIVO DEL MAÍZ A BAJAS TEMPERATURAS**

Trabajo Final de Grado  
del alumno

**GUSTAVO MARTIN SPANEBELLI BAINOTTI**

Este trabajo ha sido presentado como requisito  
para la obtención del título de

**Ingeniero Agrónomo**

Carrera

**UNNOBA**

*Reforma Universitaria*  
**Ingeniería Agronómica**

NOROESTE BUENOS AIRES

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

**FENOTIPADO APLICADO A LA DETERMINACION DE LAS BASES MOLECULARES  
DEL COMPORTAMIENTO GERMINATIVO DEL MAÍZ A BAJAS TEMPERATURAS**

Trabajo Final de Grado  
del alumno

**GUSTAVO MARTIN SPANEBELLI BAINOTTI**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Co-Director**

(Nombre y Apellido)  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

## **AGRADECIMIENTOS**

Especialmente a mis abuelos, María y Juan Carlos, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A mi familia que me acompaño siempre.

A mis amigos, los mejores del mundo.

A mis compañeros que compartieron conmigo esta maravillosa carrera

A mi directora Erika Mroginski, por su paciencia, dedicación y simpleza.

A la EEA Pergamino y a quienes trabajan en esta institución.

A la UNNOBA y a todos los que forman parte de esta gran universidad.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1 El maíz: Importancia y producción	3
1.2 Efecto de las temperaturas sub-óptimas	5
1.3 Efecto de las bajas temperaturas durante la germinación	6
1.4 Efecto de las bajas temperaturas sobre las membranas celulares	7
1.5 Mejoramiento genético en maíz	8
1.6 Antecedentes del grupo de trabajo	9
<b>2. HIPÓTESIS</b>	10
<b>3. OBJETIVOS</b>	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos específicos	10
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	11
4.1 Material vegetal	11
4.2 Descripción y conducción del experimento	11
4.3 Evaluación fenotípica	12
4.4 Determinación de la tolerancia relativa al estrés	13
4.5 Análisis estadístico	14
4.5.1 Comportamiento de los parentales	14
4.5.2 Variabilidad genotípica de la población	14
<b>5. RESULTADOS</b>	16
5.1 Comportamiento de las líneas parentales.	16
5.2 Evaluación fenotípica de la población	17
5.2.1 Variabilidad genotípica de la población y heredabilidad de los caracteres	20
5.2.2 Correlación de CE con las restantes variables evaluadas	25
5.2.3 Tolerancia relativa al estrés	26
<b>6. DISCUSIÓN</b>	30
6.1 Comportamiento de las líneas parentales	30
6.2 Efectividad del tratamiento aplicado	30
6.3 Variabilidad genotípica de la población y heredabilidad de los caracteres	31
6.4 Correlación de CE con las restantes variables evaluadas	32
6.5 Tolerancia relativa al estrés (ITR)	33
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	33
<b>8. RESUMEN</b>	35
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	37
<b>10. ANEXO</b>	42

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El maíz: Importancia y producción

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. La diversidad de ambientes bajo los cuales se cultiva el maíz, es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Habiéndose originado y evolucionado en la zona tropical como una planta de excelentes rendimientos, hoy en día se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile. La mayor parte del maíz es cultivado a altitudes medias, pero también se cultiva por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3.800 msnm (metros sobre el nivel del mar) en la cordillera de los Andes. Más aún, es importante destacar que el cultivo continúa expandiéndose hacia nuevas áreas y nuevos ambientes (Galinat, 1988).

El maíz es el primer cultivo del mundo en cuanto a su producción, seguido por el cultivo de trigo y en tercer lugar el de arroz (FAOSTAT, 2018). Su uso es muy variado, destacándose su utilización en alimentación humana y de animales y como fuente de un gran número de productos industriales (FAO, 2001). Además, en los últimos años, una parte importante de la producción está siendo derivada a la obtención de biocombustible como el etanol (GBEP-FAO, 2008).

Según el Consejo Internacional de Cereales (IGC, 2017), la producción mundial de maíz alcanzó un record de 1.079,2 millones de toneladas (tn) durante la campaña 2016/2017, un 10,9% más que en la campaña 2015/2016, en la cual se registraron 977 millones de tn. En Argentina, esa misma campaña, se sembraron 5,8 millones de hectáreas obteniéndose una producción de 38 millones de tn con un rendimiento promedio de 79,2 quintales por hectárea según informó la Bolsa de Comercio de Rosario (BCR, 2017). Con estas cifras, nuestro país mantiene el cuarto lugar en el ranking de los principales países productores de maíz, por detrás de Estados Unidos (363,7 millones de tn), China (223,9 millones de tn) y Brasil (76,4 millones de tn) (FAOSTAT, 2018).

Un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2002) prevé que para el año 2030, se necesitarán cada año mil millones de toneladas más de cereales para satisfacer la demanda mundial. Para poder hacer frente a una demanda creciente del cultivo, será necesario reducir las brechas de producción que hoy existen en relación a su rendimiento potencial (Cassman *et al.*, 2003; Fischer y Edmeades, 2010), principalmente optimizando la utilización de los recursos cuando estos sean escasos.

En la región maicera templada Argentina, comprendida entre los paralelos 31° y 40° latitud Sur y entre los meridianos 57° y 65° longitud Oeste, de la Pampa húmeda y subhúmeda, los niveles de radiación solar, los registros térmicos y la longitud del día varían marcadamente a lo largo del año. Un manejo posible para aumentar el potencial del cultivo, es modificar dichas variables ambientales por medio de la elección de la fecha de siembra (Cirilo, 2004). En dicha región, las siembras tempranas (mediados de septiembre) presentan los máximos potenciales de producción, siempre que no se presenten deficiencias hídricas y/o nutricionales y las condiciones sanitarias sean controladas (Andrade y Cirilo, 2000). Esto se debe a que permiten un mayor aprovechamiento de los recursos que serán destinados a la fijación de un mayor número de granos y a la producción de asimilados utilizados para el llenado de los mismos (Cirilo, 2004). No obstante, las siembras tempranas pueden hacer coincidir al cultivo con ambientes desfavorables para su implantación debido a temperaturas sub-óptimas que podrían causar daños a las semillas y plántulas.

La mejora de la tolerancia al frío permitiría implementar fechas de siembra más tempranas y, por lo tanto, escapar de la sequía, las plagas y las enfermedades del verano. La siembra temprana también daría lugar a períodos de vegetación más largos, que pueden utilizarse para una mayor acumulación de biomasa en el cultivo (Revilla *et al.*, 2016).

## 1.2 Efecto de las temperaturas sub-óptimas

El maíz es una planta originaria de clima tropical y por lo tanto es un cultivo sensible al frío, cuya temperatura óptima de crecimiento es alrededor de 30-34°C. Con la disminución de la temperatura por debajo de ese umbral, también se reduce el crecimiento de la planta, el cual se detiene entre 8-10°C pudiendo causar daños irreversibles en los tejidos y células si dicha exposición es prolongada (Miedema, 1982; Greaves, 1996; Marocco *et al.*, 2005). En este sentido, a pesar de la larga historia del cultivo en regiones templadas, esta especie, introducida en latitudes más altas, no ha adquirido resistencia sustancial al enfriamiento (Wilson, 1985), también denominado en inglés *chilling*.

El daño por enfriamiento (*chilling injury*) es un daño fisiológico que se produce cuando la temperatura se encuentra entre 5 y 15°C, pudiendo variar de acuerdo a la especie o cultivar. Las plantas pueden continuar creciendo y ser capaces de adaptarse para poder sobrevivir (Stamp *et al.*, 2005). Los efectos de las bajas temperaturas se manifiestan tanto sobre las funciones enzimáticas como sobre las propiedades de las membranas y se ponen en evidencia por la reducción de la fotosíntesis, del crecimiento, de la extensión de las hojas y por la absorción de agua y nutrientes (Miedema, 1982). Las temperaturas entre 0° y 10°C pueden también resultar en un desarrollo radical anormal y en la pérdida de turgencia (Aloni y Griffith, 1991).

Greaves (1996) considera estrés por temperaturas sub-óptimas a los procesos que llevan a una disminución del rendimiento potencial genético, producido por una reducción del crecimiento o por daños metabólicos en células y tejidos, causados por la exposición directa a temperaturas inferiores a los umbrales óptimos de los procesos bioquímicos y fisiológicos o del desarrollo morfológico.

El nivel de estrés inducido aumenta a medida que las temperaturas disminuyen por debajo de los 20°C. El grado de retraso del crecimiento, el disturbio metabólico y la lesión de los tejidos aumentan a medida que la temperatura disminuye por debajo de este

umbral térmico. No obstante, existe variabilidad genética respecto a la tolerancia/sensibilidad dentro del rango de temperaturas por debajo de 20°C (Greaves, 1996). Incluso se ha descrito variación genética para la tolerancia a las temperaturas de congelación (menor a 0°C) (Gardner *et al.*, 1987), aunque esta variación es probablemente limitada.

### **1.3 Efecto de las bajas temperaturas durante la germinación.**

Una de las etapas principales del desarrollo del cultivo es la germinación, que comienza con la imbibición de las semillas y culmina con la salida de la radícula. Durante la germinación, las semillas de muchas especies, especialmente las de origen tropical o subtropical, sufren daños por frío cuando se exponen a temperaturas bajas (pero no congelantes), lo que da como resultado un establecimiento de plántulas deficiente y una reducción del rendimiento (Herner, 1986; Markowski, 1989; Bedi y Singh, 1993). La sensibilidad al daño depende de varios factores tales como la especie y el cultivar, el contenido inicial de agua en la semilla, la temperatura a la cual la semilla es expuesta, la duración de la exposición al enfriamiento y el período durante el curso de la germinación en el cual ocurre la exposición al frío (Bedi y Singh, 1993).

Generalmente, la germinación de las semillas es mejor en un rango de temperaturas comprendido entre los 15 y 30°C (Bedi y Singh, 1993). Las semillas de plantas sensibles al frío no germinan a temperaturas inferiores a 10-15°C (Wolk y Herner, 1982; Ismail *et al.*, 1997) y por este parámetro pueden ser divididas en dos grupos principales (Markowski, 1988). Las semillas del primer grupo (representantes: *Solanaceae* y calabaza) no se dañan durante las imbibiciones a bajas temperaturas. Con el aumento de la temperatura, las semillas germinan normalmente, pero luego del inicio del crecimiento de la raíz, el tejido comienza a disminuir su grosor y posteriormente se necrosa, dañando la corteza de la raíz y deteniendo su crecimiento normal (Bradow, 1990; Jennings y Saltveit, 1994).

El segundo grupo incluye plantas cuyas semillas son particularmente sensibles a las bajas temperaturas durante su imbibición y no pueden germinar a bajas temperaturas: frijoles, soja, garbanzos, maíz y algodón (Gorecki *et al.*, 1990; Zemetra y Cuany, 1991). La baja temperatura durante el período inicial de imbibición interfiere en la calidad fisiológica de las semillas. Se sabe que el enfriamiento durante la imbibición de las semillas, causa anomalías en la raíz. En el maíz, la lesión por frío durante la imbibición se manifestó en aborto de la radícula y proliferación de raíces seminales (Cal y Obendorf, 1972). Se observó también que si la temperatura durante la imbibición se encuentra por debajo de los 10-12°C las semillas pueden no germinar (Cal y Obendorf, 1972; Herner, 1986; Evangelista de Menezes *et al.*, 1997).

#### **1.4 Efecto de las bajas temperaturas sobre las membranas celulares**

El mecanismo por el cual ocurren los daños por enfriamiento y, por consiguiente, la pérdida de calidad fisiológica, podría estar asociado a algún tipo de daño sufrido por las membranas celulares (Christiansen, 1967; Cal y Obendorf, 1972; Hope y Maamari, 1994). Se ha sugerido que la ruptura de la membrana celular durante la imbibición, conduce a la fuga de contenidos celulares de las semillas dañadas por las bajas temperaturas (Pollock y Toole, 1966).

La prueba de conductividad eléctrica permite medir la lixiviación de electrolitos de tejidos vegetales. Esta experiencia se basa en que el deterioro de las semillas y su pérdida de vigor están asociados a alteraciones de las membranas celulares, que implican un incremento de la salida de compuestos solubles (electrolitos) desde las semillas. Aunque para la realización de este ensayo existen diversos protocolos, es recomendable sumergir las semillas durante 24 horas en agua desionizada a 20 - 25°C y, a continuación, decantar el agua y medir su conductividad eléctrica. Una mayor conductividad indica una mayor presencia de iones (electrolitos), lo que se podría correlacionar con una menor

emergencia de plántulas (AOSA, 1983; Pérez García y Pita Villamil, 1999).

### **1.5 Mejoramiento genético en maíz**

El daño por frío es una adversidad frecuente durante la temporada de siembra en muchos países y regiones. La baja temperatura a comienzos de la primavera, podría causar el fracaso en la emergencia normal de las semillas de maíz. El bajo establecimiento de plántulas conduce a una disminución del rendimiento y calidad de las semillas por lo que es de interés para los programas de mejoramiento de maíz aumentar la tolerancia a las bajas temperaturas durante la etapa de germinación de las semillas (Hu *et al.*, 2016).

Se ha comprobado que existe variabilidad genética para caracteres asociados a la tolerancia a bajas temperaturas durante las etapas tempranas del desarrollo. Dichos caracteres están gobernados por genes de herencia cuantitativa compleja que presenta efectos aditivos, de dominancia, epistáticos y maternos (Aidun *et al.*, 1991).

Con el surgimiento de los marcadores moleculares, los caracteres cuantitativos se han podido estudiar mediante el análisis de QTL (Locus de Caracteres Cuantitativos o *Quantitative Trait Locus*, por sus siglas en inglés) que consiste en evaluar fenotípicamente una población segregante para el carácter de interés, caracterizarla genotípicamente mediante el empleo de marcadores moleculares y finalmente determinar asociaciones estadísticas entre el fenotipo observado y el genotipo (Collard *et al.*, 2005).

En maíz, se llevaron a cabo mapeos de QTL asociados a tolerancia al frío durante la etapa de plántula, como parámetros de fluorescencia de clorofila, verdor de hojas, área foliar, peso seco de tallo y contenido de nitrógeno en brotes (Fracheboud *et al.*, 2004; Jompuk *et al.*, 2005). Son pocos los estudios de QTL asociados a caracteres que se expresan durante la etapa de germinación del maíz bajo condiciones de estrés térmico (Huang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016; Revilla *et al.*, 2016). Estos estudios abrirán nuevas

posibilidades para conocer y mejorar la tolerancia al frío, ya sea mediante selección genómica o selección asistida por marcadores moleculares en los programas de mejoramiento de maíz.

## **1.6 Antecedentes del grupo de trabajo**

En trabajos previos realizados en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Estación Experimental Pergamino (INTA - EEA Pergamino), se puso 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). En un estudio posterior (Mroginski *et al.*, 2012) se caracterizaron 75 líneas endocriadas del programa de mejoramiento de maíz del INTA - EEA Pergamino, 6 líneas provenientes de Canadá y 1 población canadiense tolerante al frío (testigo). 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.

Asimismo, en estudios preliminares (Mroginski, comunicación personal), dichas líneas mostraron comportamiento germinativo diferencial cuando sus semillas fueron embebidas en condiciones de bajas temperaturas (5°C) y luego traspasadas a temperaturas normales para continuar su proceso germinativo. A partir del cruzamiento entre estas líneas se generó una población de mapeo de QTL constituida por 200 familias F2:4, la cual es evaluada en el presente trabajo, de acuerdo a los trabajos preliminares realizados (Mroginski, comunicación personal).

## **2. HIPÓTESIS**

Existe variabilidad genotípica, expresada en el fenotipo, en caracteres asociados al comportamiento germinativo de una población F<sub>2:4</sub> de maíz luego de un período de imbibición de las semillas a bajas temperaturas, que permitirían realizar estudios de mapeo de regiones genómicas asociadas a la tolerancia al frío durante la germinación.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Generar información fenotípica necesaria para el posterior estudio con marcadores moleculares, de caracteres determinantes del comportamiento germinativo del maíz a bajas temperaturas, con el fin de identificar regiones cromosómicas asociadas a los mismos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la variabilidad genotípica de una población segregante de familias F<sub>2:4</sub> en cuanto a su comportamiento germinativo en condiciones normales de incubación y luego de un período de imbibición de las semillas a bajas temperaturas.
- Determinar la correlación de los valores de Conductividad eléctrica con los demás caracteres relacionados con el comportamiento germinativo a bajas temperaturas.
- Evaluar la tolerancia relativa al estrés por bajas temperaturas de dichas familias F<sub>2:4</sub> y determinar genotipos con comportamiento contrastante para cada variable evaluada.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Material Vegetal**

El material genético empleado estuvo constituido por una población segregante de familias  $F_{2:4}$ . El proceso de obtención de las mismas fue el siguiente: Una población  $F_2$  fue obtenida a partir del cruzamiento entre dos líneas parentales endocriadas contrastantes para los caracteres fenotípicos a evaluar (LP3830 –tolerante al frío durante la germinación - x LP179 – susceptible-). Ambas líneas fueron desarrolladas y caracterizadas por el grupo de mejoramiento de maíz del INTA - EEA Pergamino. Cada una de las plantas de la  $F_2$  se autofecundó durante la campaña 2012/13 obteniéndose familias  $F_{2:3}$ . En la campaña 2013/14, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de semillas, se sembraron 25 plantas por familia y por parcela realizándose cruzamientos mediante polinización controlada, entre plantas de una misma parcela que posteriormente fueron cosechadas en masa obteniéndose las familias  $F_{2:4}$ . Esto permitió disponer de una cantidad adecuada de semillas genéticamente representativas de la descendencia de cada planta individual  $F_2$ .

### **4.2 Descripción y conducción del experimento**

Se evaluaron 204 familias  $F_{2:4}$  junto con los parentales bajo condiciones de incubación controladas. El experimento se llevó a cabo en el laboratorio del sector de Mejoramiento de maíz del INTA - EEA Pergamino. El diseño experimental utilizado fue un DBiCA (diseño en bloques incompletos aleatorizados) con 2 repeticiones. Para el mismo, se seleccionaron al azar 50 semillas por familia. Para el tratamiento en frío, las semillas se colocaron en toallas de papel humedecidas para lograr una correcta imbibición y luego fueron enrolladas y colocadas dentro de bolsas de polietileno transparentes durante 14 días a 5°C en oscuridad. Cumplido el plazo se procedió a colocar las semillas a una temperatura de 24°C para su germinación. De estas, 25 fueron seleccionadas al azar y colocadas en recipientes plásticos con agua destilada durante 20-24 hs. Luego de

cumplido el plazo se evaluó la concentración de electrolitos liberados durante la imbibición de las semillas mediante la medición de la conductividad eléctrica (**CE**) realizada con un conductímetro (mSiemen/cm), las restantes 25 semillas continuaron germinando durante 7 días. A este tratamiento se lo denomina de aquí en adelante Frío.

También se llevó a cabo un tratamiento en condiciones ambientales normales, denominado Control, embebiendo las semillas durante un día a 24°C y luego se las dejó germinar por 7 días en incubadora realizando las mismas mediciones que en el tratamiento en Frío.

### **4.3 Evaluación fenotípica**

Durante el periodo de germinación, que duró 7 días en incubadora a 24°C, las 25 semillas fueron destinadas a las siguientes determinaciones:

1. Porcentaje de semillas germinadas (número de semillas con radícula y/o coleóptilo mayor o igual a 0,1 cm x 100 / total de semillas sembradas, en %) (**%G**).
2. Porcentaje de semillas con radícula mayor o igual a 0,5 cm (número de semillas con radícula mayor o igual a 0,5 cm x 100 / total de semillas sembradas, en %) (**%R05**).
3. Porcentaje de semillas con coleóptilo mayor o igual a 0,5 cm (número de semillas con coleóptilo mayor o igual a 0,5 cm x 100 / total de semillas sembradas, en %) (**%C05**).

Al finalizar el experimento se llevaron a cabo las siguientes mediciones:

- Porcentaje final de plántulas normales (**%PLF**) (número de plántulas normales x 100 / total de semillas sembradas, en %).
- Peso húmedo de parte aérea y de raíz por planta individual (mg) (**PHPAi**, **PHRi**).

Luego de secar en estufa hasta peso constante, se registró el peso conjunto de

todas las plántulas normales, discriminando entre parte aérea y raíz. Los pesos por planta se obtuvieron mediante el cociente entre los pesos húmedos totales correspondientes y el número final de plantas normales.

- Peso seco de parte aérea y de raíz por planta individual (mg) (**PSPAi**, **PSRi**). Luego de secar en estufa hasta peso constante, se registro el peso conjunto de todas las plántulas normales, discriminando entre parte aérea y raíz. Los pesos secos por planta se obtuvieron mediante el cociente entre los pesos secos totales correspondientes y el número final de plantas normales.
- Índice de germinación (**IG**, en días). Se obtuvo como:  $IG = (\sum (\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en el día } x \text{ días desde el traspaso a } 25^\circ\text{C})) / (\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas a los 7 días})$ .
- Índice de aparición de radículas de 0,5 cm (**IR05**, en días). Se obtuvo como:  $IR05 = (\sum (\text{n}^\circ \text{ de semillas con radícula de 0,5 cm en el día } x \text{ días desde el traspaso a } 25^\circ\text{C})) / (\text{n}^\circ \text{ de semillas con radícula de 0,5 cm a los 7 días})$ .
- Índice de aparición de coleóptilos de 0,5 cm (**IC05**, en días). Se obtuvo como:  $IC05 = (\sum (\text{n}^\circ \text{ de semillas con coleóptilo de 0,5 cm en el día } x \text{ días desde el traspaso a } 25^\circ\text{C})) / (\text{n}^\circ \text{ de semillas con coleóptilo de 0,5 cm a los 7 días})$ .

#### 4.4 Determinación de la tolerancia relativa al estrés

Se calculó la tolerancia relativa al estrés, siguiendo la fórmula propuesta por Udovenko (1976):

$$ITR = F/C$$

dónde: ITR: índice de tolerancia relativa para cada una de las variables medidas, F: media en el tratamiento Frío, C: media en Control, para la variable en cuestión.

## 4.5 Análisis estadístico

### 4.5.1 Comportamiento de los parentales

Las comparaciones de medias entre los genotipos parentales se realizaron mediante el test de diferencias de medias LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ).

### 4.5.2 Variabilidad genotípica de la población

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2010). Previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) ajustando el siguiente modelo considerando con efectos fijos a tratamientos y genotipos y con efectos aleatorios a bloques y bloques incompletos (bolsas):

$$Y_{ijkm} = \mu + G_i + T_j + G \times T_{ij} + B_{k(j)} + I_{m(k)} + e_{ijkm}$$

donde:

$Y_{ijkm}$  = Valor promedio del i-ésimo genotipo obtenido en el j-ésimo tratamiento, en el k-ésimo bloque y en el m-ésimo bloque incompleto (bolsa),

$\mu$  = Efecto de la media general,

$G_i$  = Efecto del i-ésimo genotipo ( $i=1$  a 204);

$T_j$  = Efecto del j-ésimo tratamiento ( $j=$ Frío, Control);

$B_{k(j)}$  = Efecto del k-ésimo bloque ( $k=1, 2$ ) dentro de cada tratamiento;

$I_{m(k)}$  = Efecto de la m-ésima bolsa (o bloque incompleto) dentro de cada bloque ( $m=1$  a 35);

$e_{ijkm}$  = error aleatorio.

Para analizar la variabilidad genotípica de la población en cada ambiente de incubación por separado y en cuanto a su tolerancia relativa al estrés (ITR) por bajas temperaturas durante la germinación se realizó el análisis de varianza ajustando el siguiente modelo considerando con efectos fijos a genotipos y con efectos aleatorios a bloques y bloques incompletos (bolsas):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + B_j + I_{k(j)} + e_{ijk}$$

donde:

$Y_{ijk}$  = Valor promedio del i-ésimo genotipo obtenido en el j-ésimo bloque y en el k-ésimo bloque incompleto (bolsa),

$\mu$  = Efecto de la media general,

$G_i$  = Efecto del i-ésimo genotipo (i=1 a 204);

$B_j$  = Efecto del j-ésimo bloque (j=1, 2);

$I_{k(j)}$  = Efecto de la k-ésima bolsa (o bloque incompleto) dentro de cada bloque (k=1 a 35);

$e_{ijk}$  = error aleatorio.

Se computaron las correlaciones fenotípicas de Pearson ( $r$ ) entre la CE (Conductividad Eléctrica) y las diferentes variables evaluadas.

Para cada uno de los caracteres evaluados se estimó la heredabilidad en sentido amplio para cada ambiente de incubación por separado, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$H = Vg / (Vg + Ve)$$

donde  $Vg$  es la Varianza genotípica, calculada como la varianza entre las familias  $F_{2:4}$  y  $Ve$  es la Varianza ambiental, calculada como el promedio de las varianzas de ambos parentales (Kearsey y Pooni, 1996).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Comportamiento de las líneas parentales**

Los valores de las medias y desvíos estándar para las variables estudiadas registrados en los parentales (LP179 y LP3830), en los tratamientos Frío y Control se presentan en la tabla 1.

Ambos parentales se comportaron de manera similar tanto en el tratamiento Frío como Control, presentando valores que no difirieron significativamente ( $p > 0,05$ ) en la mayoría de las variables estudiadas. En el tratamiento Frío, solo se observaron diferencias significativas entre los parentales para las siguientes variables: CE, IG, PHPAi y PSPAi. El parental LP179 presentó menores valores de conductividad eléctrica, respecto al parental LP3830 (0,05 y 0,07 mSiemen/cm, respectivamente). Así mismo, LP179 logró una mayor velocidad de germinación, obteniendo un valor promedio de IG de 1,30 días comparado al valor obtenido por LP3830 de IG=1,57 días. Para las variables correspondientes a los pesos de la parte aérea (PHPAi y PSPAi), LP179 se destacó, obteniendo los mayores pesos.

**Tabla 1:** Medias  $\pm$  Desvíos estándar (D.E.) que presentaron los parentales LP179 y LP3830 en dos repeticiones para los tratamientos Frío (a) y Control (b). Letras diferentes indican diferencias significativas (alfa=0,05).

a)		FRIO				
Variable	LP179		LP3830			
	Media	$\pm$ D.E.	Media	$\pm$ D.E.		
<b>CE</b>	0,05	$\pm$ 0,01	a	0,07	$\pm$ 0,01	b
<b>IG</b>	1,30	$\pm$ 0,36	a	1,57	$\pm$ 0,46	b
<b>IR05</b>	1,92	$\pm$ 0,29	a	1,81	$\pm$ 0,63	a
<b>IC05</b>	3,38	$\pm$ 1,02	a	4,00	$\pm$ 1,28	a
<b>PHPAi</b>	260,61	$\pm$ 47,25	a	188,17	$\pm$ 24,47	b
<b>PHRi</b>	133,33	$\pm$ 20,87	a	127,78	$\pm$ 32,42	a
<b>PSPAi</b>	17,03	$\pm$ 6,92	a	13,91	$\pm$ 3,30	b
<b>PSRi</b>	12,33	$\pm$ 4,79	a	10,73	$\pm$ 2,66	a
<b>%PLF</b>	87,10	$\pm$ 0,10	a	92,80	$\pm$ 0,05	a
<b>%G</b>	89,50	$\pm$ 0,09	a	93,20	$\pm$ 0,06	a
<b>%R05</b>	89,10	$\pm$ 0,09	a	90,80	$\pm$ 0,08	a
<b>%C05</b>	71,00	$\pm$ 0,26	a	57,60	$\pm$ 0,36	a

b)		CONTROL				
Variable	LP179		LP3830			
	Media	$\pm$ D.E.	Media	$\pm$ D.E.		
<b>CE</b>	0,05	$\pm$ 0,02	a	0,06	$\pm$ 0,01	a
<b>IG</b>	2,20	$\pm$ 0,36	a	2,02	$\pm$ 0,02	a
<b>IR05</b>	2,71	$\pm$ 0,58	a	2,42	$\pm$ 0,18	a
<b>IC05</b>	4,88	$\pm$ 0,99	a	5,20	$\pm$ 0,69	a
<b>PHPAi</b>	288,25	$\pm$ 23,56	a	180,78	$\pm$ 40,47	b
<b>PHRi</b>	197,85	$\pm$ 20,52	a	159,40	$\pm$ 61,65	a
<b>PSPAi</b>	16,61	$\pm$ 2,45	a	11,33	$\pm$ 3,75	a
<b>PSRi</b>	13,54	$\pm$ 3,47	a	11,44	$\pm$ 5,32	a
<b>%PLF</b>	98,40	$\pm$ 0,02	a	98,40	$\pm$ 0,03	a
<b>%G</b>	98,40	$\pm$ 0,02	a	99,20	$\pm$ 0,03	a
<b>%R05</b>	92,10	$\pm$ 0,09	a	98,40	$\pm$ 0,03	a
<b>%C05</b>	36,30	$\pm$ 0,32	a	27,40	$\pm$ 0,22	a

Variables: CE: conductividad eléctrica; IG, IR05, IC05: Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5; PHPAi y PSPAi: Peso húmedo y seco de parte aérea individual; PHRi y PSRi: Peso húmedo y seco de raíz individual; %PLF: Porcentaje final de plántulas normales; %G, %R05, %C05: Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm.

## 5.2 Evaluación fenotípica de la población

En la tabla 2 se presentan las medidas estadísticas descriptivas obtenidas para todas las variables analizadas en la población  $F_{2:4}$  bajo estudio, en las condiciones de

incubación Frío (tabla 2a) y Control (tabla 2b). La distribución de frecuencia de los datos fenotípicos obtenidos a partir de las familias  $F_{2:4}$  en Frío y Control se presentan en la figura 1 (a y b, respectivamente).

**Tabla 2:** Resumen de medidas estadísticas para cada variable en el experimento de incubación Frío (a) y Control (b): Número de familias evaluadas en las dos repeticiones (n); Medias de las familias  $F_{2:4} \pm$  Desvío estándar (D.E.); Coeficiente de variación (CV); Valor mínimo (Mín); Valor máximo (Máx); Coeficientes de Asimetría y Kurtosis; valor de probabilidad (pvalor) del ANOVA; heredabilidad (H).

**a) Frío:**

Variable	n	Media	±	D.E.	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	ANOVA (pvalor)	H
CE	402	0,07	±	0,02	22,77	0,04	0,13	0,97	1,12	<0,0001	0,59
IG	407	2,11	±	0,54	25,45	1,04	4,89	1,33	3,81	<0,0001	0,63
IR05	407	2,69	±	0,59	21,88	1,68	5,63	1,51	3,53	<0,0001	0,67
IC05	407	4,39	±	1,02	23,14	2,21	6,00	0,14	-1,18	<0,0001	0,49
PHPAi	407	217,65	±	54,68	25,12	80,80	388,07	0,17	-0,12	<0,0001	0,62
PHRi	406	150,00	±	38,83	25,89	48,84	287,09	0,41	-0,05	<0,0001	0,35
PSPAi	405	12,68	±	4,33	34,16	0,23	25,52	0,35	-0,22	<0,0001	0,72
PSRi	407	10,64	±	3,36	31,57	3,19	23,98	0,93	1,16	<0,0001	0,51
%PLF	407	75,90	±	0,20	26,53	0,12	1,00	-0,93	0,14	<0,0001	0,63
%G	407	73,30	±	0,22	29,65	0,08	1,00	-0,83	-0,08	<0,0001	0,57
%R05	407	69,00	±	0,23	33,27	0,04	1,00	-0,70	-0,32	<0,0001	0,52
%C05	407	40,30	±	0,29	70,93	0,00	1,00	0,22	-1,12	<0,0001	0,42

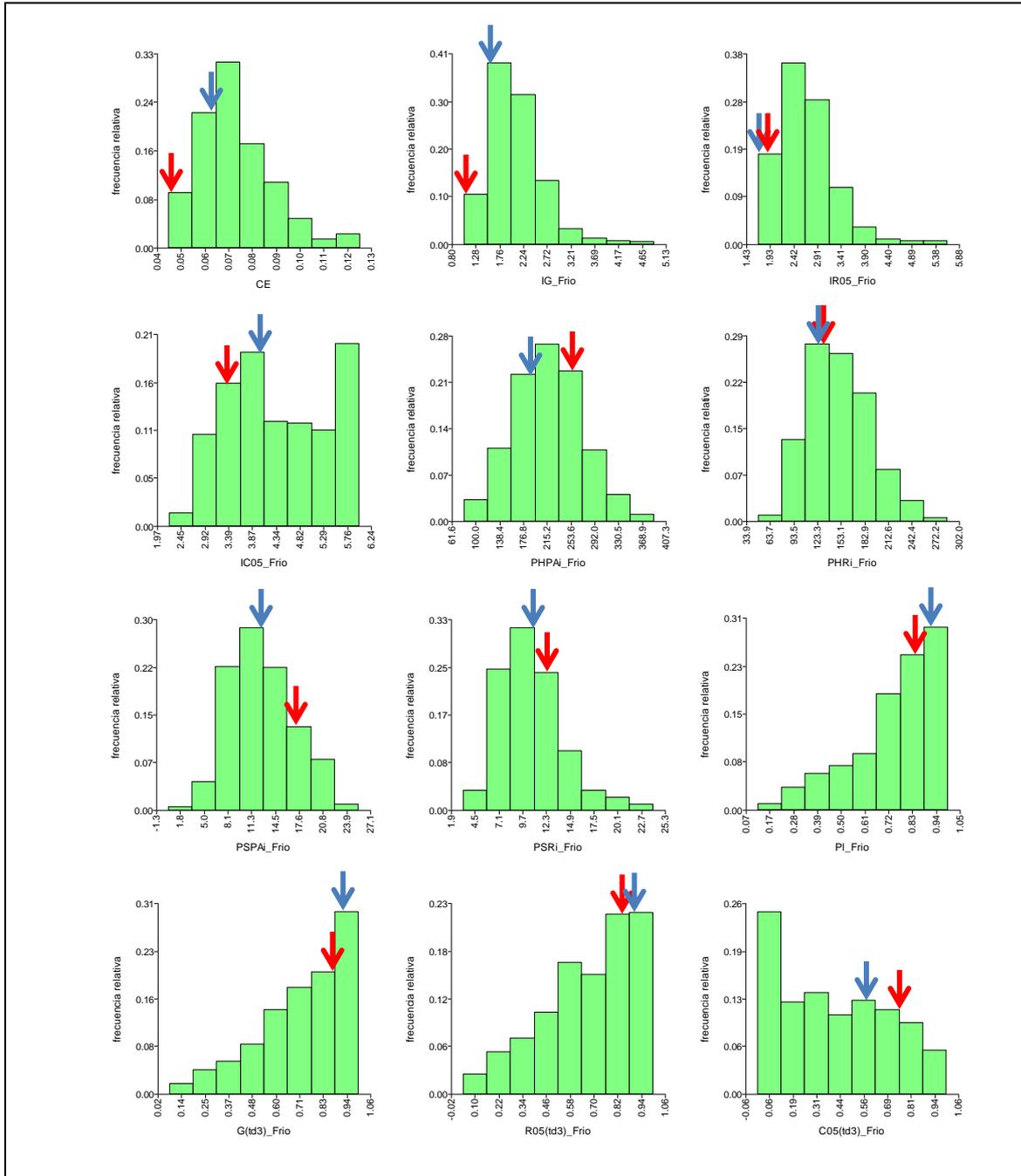
**b) Control:**

Variable	n	Media	±	D.E.	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	ANOVA (pvalor)	H
CE	401	0,06	±	0,01	22,71	0,03	0,12	1,49	3,43	<0,0001	0,54
IG	406	2,11	±	0,27	13,01	1,24	3,44	1,06	4,02	<0,0001	0,66
IR05	405	2,45	±	0,37	15,24	1,88	3,96	1,28	2,01	<0,0001	0,64
IC05	406	4,45	±	0,81	18,08	2,63	6,00	0,02	-0,91	<0,0001	0,57
PHPAi	406	259,89	±	56,07	21,58	98,21	422,73	0,03	-0,24	<0,0001	0,33
PHRi	406	198,30	±	49,16	24,79	69,05	349,32	0,00	-0,45	<0,0001	0,17
PSPAi	406	15,31	±	5,52	36,06	5,28	33,06	0,34	-0,57	<0,0001	0,39
PSRi	406	14,14	±	5,13	36,31	4,04	31,68	0,48	-0,13	<0,0001	0,38
%PLF	406	94,50	±	0,07	7,42	0,50	1,04	-2,14	6,48	<0,0001	0,36
%G	405	95,20	±	0,06	6,53	0,64	1,00	-1,89	4,32	0,0011	0,36
%R05	406	93,00	±	0,09	9,66	0,32	1,00	-2,57	9,54	<0,0001	0,62
%C05	406	48,90	±	0,26	52,22	0,00	1,00	-0,02	-0,96	<0,0001	0,57

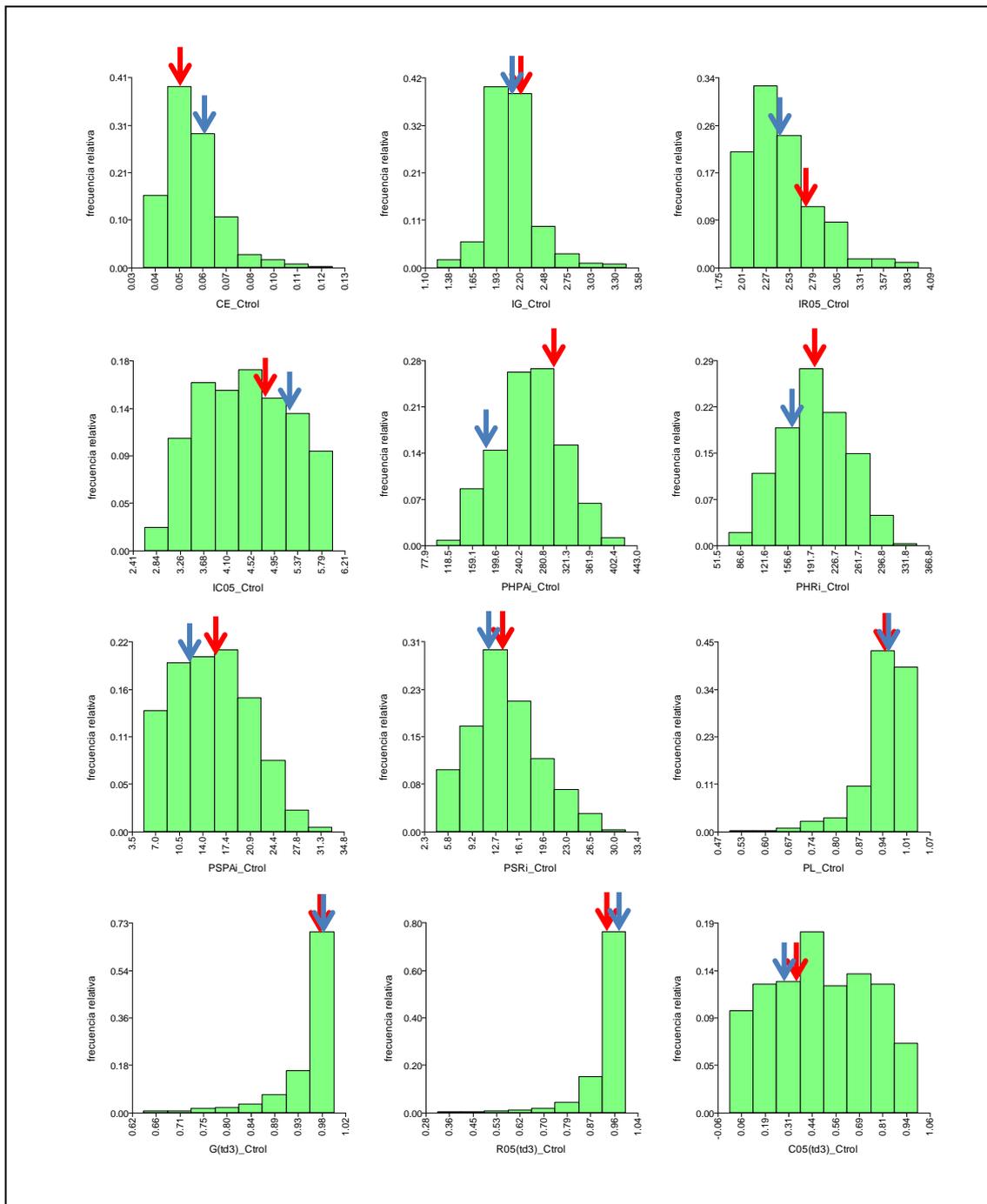
Variables: CE: conductividad eléctrica; IG, IR05, IC05: Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5; PHPAi y PSPAi: Peso húmedo y seco de parte aérea individual; PHRi y PSRi: Peso húmedo y seco de raíz individual; %PLF: Porcentaje final de plántulas normales; %G, %R05, %C05: Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm.

**Figura 1:** Gráficos de histogramas de frecuencia relativa para las variables estudiadas en la población  $F_{2:4}$  bajo las distintas condiciones de incubación: a) Frío; b) Control; c) Índice de Tolerancia relativo (ITR). Con la Flecha roja se indica el parental LP179 y con la azul LP3830.

**a) Frío**



## b) Control



### 5.2.1 Variabilidad genética de la población y heredabilidad de los caracteres

La normalidad de los datos fue confirmada para algunas de las variables por medio de la prueba de Shapiro-Wilks modificado. En la tabla 3 se especifica cuáles variables requirieron ser transformadas previo al análisis de la varianza (valores del estadístico de Shapiro Wilks ( $W^*$ ) menores a 0,97), ya sea aplicando logaritmo en base diez (LOG10) o,

en el caso de las variables expresadas en proporciones (%PLF, %G, %R05 y %C05), empleando una transformación angular (arco seno de la raíz de la proporción) (ASEN). En los casos en que el valor de probabilidad del estadístico fue menor que 0,0001 los datos se consideraron normales en base a los gráficos de *Q-Qplot* y residuos *versus* predichos (Anexo 1).

**Tabla 3:** Test de normalidad de Shapiro-Wilks para las variables estudiadas en el análisis combinado y particionado por incubación (Frío y Control). Se observan los valores del estadístico de Shapiro-Wilks ( $W^*$ ), valores de probabilidad ( $p$ ) y la transformación aplicada a la variable.

Variable	Combinado		Frío		Control		Transformación
	$W^*$	$p$	$W^*$	$p$	$W^*$	$p$	
CE	0,93	<0,0001	0,94	<0,0001	0,90	<0,0001	Log10
IG	0,91	<0,0001	0,93	<0,0001	0,93	<0,0001	Log10
IR05	0,87	<0,0001	0,89	<0,0001	0,90	<0,0001	Log10
IC05	0,96	<0,0001	0,93	<0,0001	0,97	<0,0001	Log10
PHPAi	0,99	0,1770	0,99	0,3922	0,99	0,6813	-
PHRi	0,98	<0,0001	0,98	<0,0001	0,99	0,2005	-
PSPAi	0,97	<0,0001	0,98	<0,0001	0,97	<0,0001	-
PSRi	0,97	<0,0001	0,97	<0,0001	0,97	<0,0001	-
%PLF	0,79	<0,0001	0,90	<0,0001	0,76	<0,0001	ASEN
%G	0,78	<0,0001	0,91	<0,0001	0,76	<0,0001	ASEN
%R05	0,82	<0,0001	0,93	<0,0001	0,74	<0,0001	ASEN
%C05	0,96	<0,0001	0,93	<0,0001	0,96	<0,0001	ASEN

Variables: CE: conductividad eléctrica; IG, IR05, IC05: Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5; PHPAi y PSPAi: Peso húmedo y seco de parte aérea individual; PHRi y PSRi: Peso húmedo y seco de raíz individual; %PLF: Porcentaje final de plántulas normales; %G, %R05, %C05: Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm.

En el análisis de varianza combinado, la interacción Genotipo x Tratamiento (GxT) fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ) en la mayoría de las variables. Para PHRi el efecto de interacción GxT fue significativo ( $p < 0,05$ ) y PSRi no evidenció efecto de interacción (tabla 4).

El tratamiento de incubación presentó efectos altamente significativos ( $p < 0,01$ ) para las variables CE, PSRi, %PLF, %G y %R05, mientras que no afectó significativamente los pesos de la parte aérea (PHPAi y PSPAi), el peso húmedo de la raíz (PHRi) ni la velocidad

de germinación y de aparición de radículas o coleoptilos (IG, IR05 y IC05) (tabla 4).

**Tabla 4:** Análisis de varianza para todas las variables. Se presentan los valores de probabilidad (*p*valor) para las fuentes de variación Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo x Tratamiento (GxT).

Variable	Fuente de variación		
	Genotipo	Tratamiento	GxT
CE	<0,0001	<0,0001	<0,0001
IG	<0,0001	0,1417	<0,0001
IR05	<0,0001	0,0709	<0,0001
IC05	<0,0001	0,8628	<0,0001
PHPAi	<0,0001	0,1725	<0,0001
PHRi	<0,0001	0,0516	0,0110
PSPAi	<0,0001	0,1993	0,0011
PSRi	<0,0001	0,0036	0,6359
%PLF	<0,0001	<0,0001	<0,0001
%G	<0,0001	<0,0001	<0,0001
%R05	<0,0001	<0,0001	<0,0001
%C05	<0,0001	0,5256	<0,0001

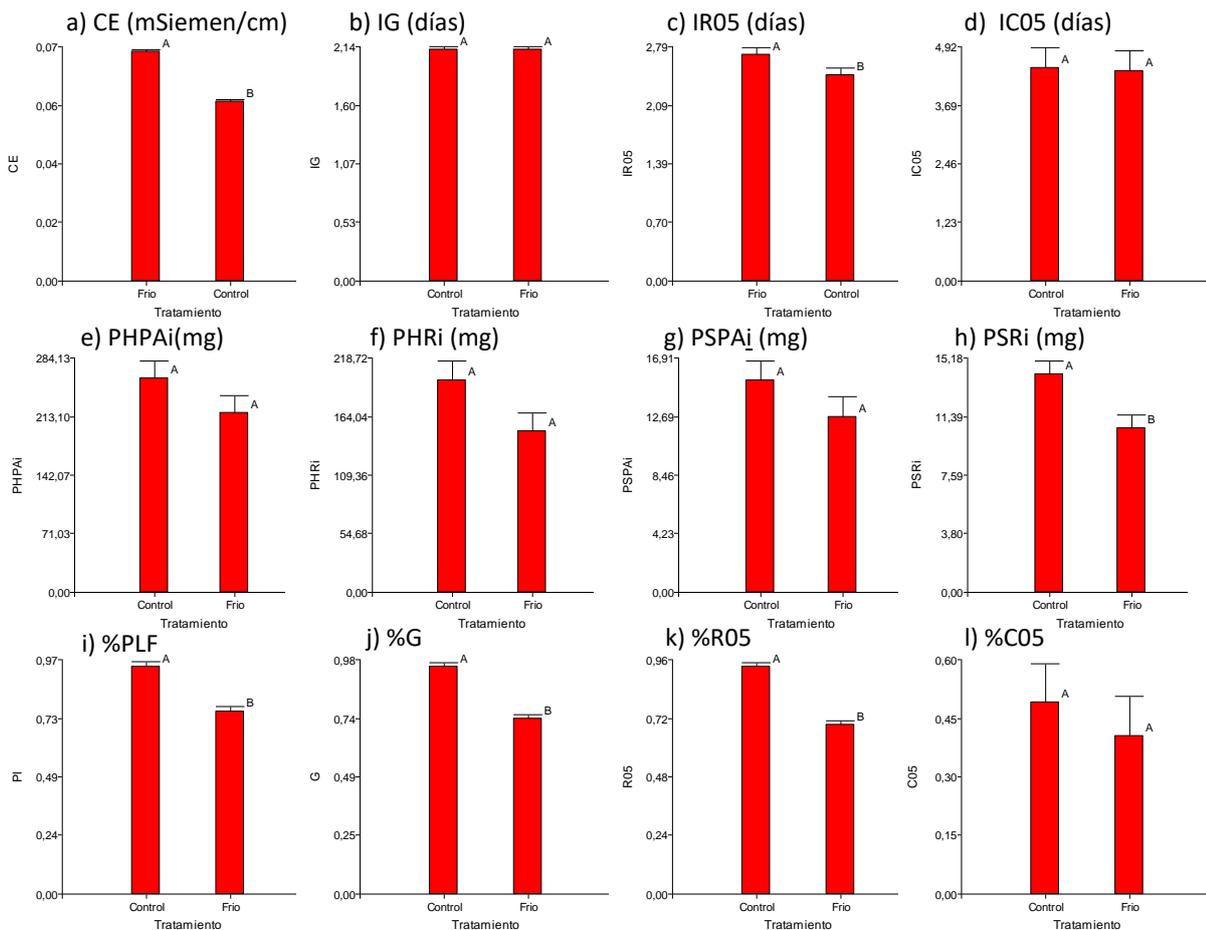
*Variables:* CE: conductividad eléctrica; IG, IR05, IC05: Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5; PHPAi y PSPAi: Peso húmedo y seco de parte aérea individual; PHRi y PSRi: Peso húmedo y seco de raíz individual; %PLF: Porcentaje final de plántulas normales; %G, %R05, %C05: Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm.

Para comprobar que el tratamiento de frío aplicado fue eficiente en la generación del estrés esperado se realizó la comparación de medias por tratamiento (LSD Fisher). Cuando las semillas fueron embebidas en frío se observó una mayor pérdida de electrolitos (mayor CE) (figura 2-a), menores porcentajes de germinación (%G y %R05) y de plantas logradas (%PLF) (figuras 2-i, 2-j y 2-k), sin embargo ni el tamaño de las plantas ni la velocidad de germinación (IG) difirieron.

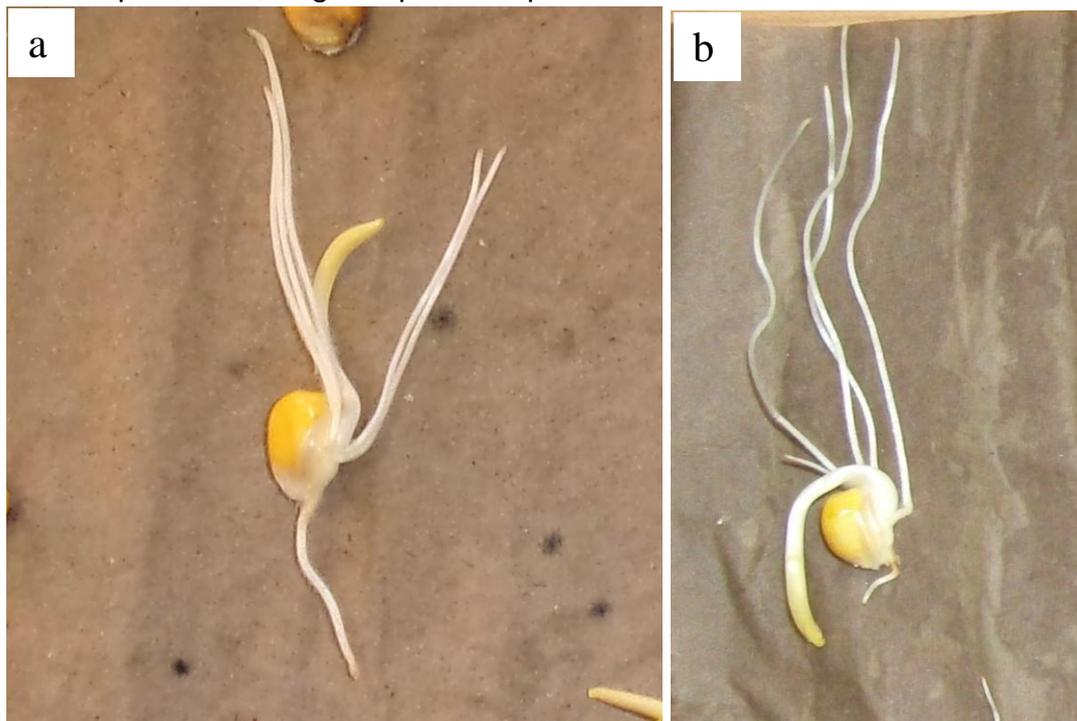
En cuanto al desarrollo radicular, el frío disminuyó significativamente el %R05 (figura 2-k), retardó levemente la elongación de las mismas (mayor IR05) (figura 2-c) y disminuyó levemente el peso húmedo ( $p=0,0516$ ) y en forma significativa el peso seco de las raíces ( $p < 0,01$ ) (figura 1-h). Asimismo, pudo observarse que el tratamiento Frío causó la

reducción del tamaño de la raíz primaria o su aborto, aumentado el número de raíces seminales. Como ejemplo, en la figura 3 se observan estos síntomas para los genotipos 179 (a) y 311 (b).

**Figura 2:** Valores medios de las variables medidas en el tratamiento Frío y Control: a) CE: conductividad eléctrica; b) IG: Índice de germinación; c) IR05: Índice de aparición de semillas con radícula de 0,5 cm; d) IC05: Índice de aparición de semillas con coleóptilo de 0,5 cm; e) PHPAi: Peso húmedo de parte aérea individual; f) PHRi: Peso húmedo de raíz individual; g) PSPAi: Peso seco de parte aérea individual; h) PSRi: Peso seco de raíz individual; i) PLF: Proporción final de plántulas normales; j) G: Proporción de semillas germinadas; k) R05: Proporción de semillas con radícula mayor o igual a 0,5 cm; l) C05: Proporción de semillas con coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3:** imágenes obtenidas durante la realización de los ensayos de imbibición. a: genotipo susceptible 179; b: genotipo susceptible 311.



Dado que, en el análisis combinado las interacciones GxT fueron significativas en casi todos los casos, se procedió al análisis de varianza en cada tratamiento por separado. De esta forma se buscó obtener un rango de genotipos diferente para cada tratamiento de incubación en particular. El análisis de la varianza por tratamiento reveló la existencia de diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre genotipos para todas las variables estudiadas tanto en condiciones de Frío (tabla 2a) como Control (tabla 2b).

La heredabilidad en sentido amplio (H) (tabla 2) se clasificó como: alta (mayor a 60%), moderada (entre 30 y 60%) y baja (menor a 30%) (Robinson *et al.*, 1949). La mayoría de los caracteres presentaron heredabilidad moderada en ambas condiciones de incubación. En el tratamiento Frío las variables que presentaron H alta fueron: IG, IR05, PHPAi, PSPAi y %PLF. En el tratamiento Control fueron las variables IG, IR05 y %R05 las que mostraron valores de heredabilidad alta.

## 5.2.2 Correlación de CE con las restantes variables evaluadas

El análisis de correlación a través de los coeficientes de Pearson (r) demostró que existe una correlación negativa significativa ( $p < 0,001$ ) de CE con la mayoría de las variables en condiciones de incubación en frío (tabla 5), de las cuales se destacan el %PLF, %G y %R05. Los índices IG e IR05 se correlacionaron positivamente con CE y de manera significativa. Las variables IC05 y PSRi no presentaron correlación significativa con CE. Al aumentar CE, y por ende la pérdida de solutos por parte de las semillas, disminuyó la velocidad de germinación (mayores IG e IR05) y los porcentajes de semillas germinadas y plantas finales logradas (%PLF, %G y %R05).

En condiciones de incubación Control, la mayoría de las variables no presentaron correlaciones significativas con CE, con excepción de %PLF, %G, %R05 las cuales se correlacionaron negativa y significativamente (tabla 5) mostrando valores de correlación menor que en el tratamiento Frío.

**Tabla 5:** Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los valores de Conductividad eléctrica (CE) y las restantes variables, registradas en Frío y Control. Valor de probabilidad correspondiente al coeficiente (p-valor).

Variable	Frío			Control		
	r	p-valor		r	p-valor	
IG	0,21	< 0,001	***	-0,03	0,588	ns
IR05	0,24	< 0,001	***	0,02	0,684	ns
IC05	0,06	0,208	ns	-0,07	0,177	ns
PHPAi	-0,1	0,042	*	-0,01	0,838	ns
PHRi	-0,15	0,003	**	0,01	0,84	ns
PSPAi	-0,24	< 0,001	***	0,03	0,537	ns
PSRi	-0,09	0,076	ns	0,08	0,112	ns
%PLF	<b>-0,47</b>	< 0,001	***	-0,38	< 0,001	***
%G	<b>-0,45</b>	< 0,001	***	-0,32	< 0,001	***
%R05	<b>-0,44</b>	< 0,001	***	-0,28	< 0,001	***
%C05	-0,21	< 0,001	***	0,02	0,638	ns

Variables: CE: conductividad eléctrica; IG, IR05, IC05: Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5; PHPAi y PSPAi: Peso húmedo y seco de parte aérea individual; PHRi y PSRi: Peso húmedo y seco de raíz individual; %PLF: Porcentaje final de plántulas normales; %G, %R05, %C05: Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm.

### 5.2.3 Tolerancia relativa al estrés

Cuando se analizaron los ITR, el ANOVA evidenció diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los genotipos para todos los caracteres, excepto para el peso húmedo y seco de la raíz (tabla 6). La heredabilidad en sentido amplio de los índices fue moderada para la mayoría de los caracteres. Solo los pesos húmedos presentaron H bajas, mientras que el PSPAi mostró alta H (0,77).

El empleo de los ITR permite obtener un valor que nos muestra fácilmente cuales variables se vieron mayormente afectadas en el tratamiento Frío respecto a los valores obtenidos en el Control. Cuando el valor del índice supera a 1 indicaría que el promedio del carácter evaluado fue superior en las condiciones de incubación del tratamiento Frío con respecto al Control. Lo contrario sucede si el índice es inferior a 1. Valores cercanos a 1 indicarían que ambos promedios fueron similares.

La población presentó valores promedios de ITR mayores a 1 para las variables CE y IR05, iguales o cercanos a 1 para IG e IC05, e inferiores a 1 para los pesos y los porcentajes de germinación (%G y %R05). El rango de variación de los ITR para todas las variables se encontró entre 0 y 3 indicando que existieron genotipos para los cuales las bajas temperaturas durante la imbibición de las semillas fueron perjudiciales, benéficas o no tuvieron efecto (figura 4).

**Tabla 6:** Resumen de medidas estadísticas de los Índices de tolerancia relativos (ITR) calculados para cada una de las variables. Número de familias evaluadas en las dos repeticiones (n); Medias de las familias  $F_{2,4} \pm$  Desvío estándar (D.E.); Coeficiente de variación (CV); Valor mínimo (Mín); Valor máximo (Máx); Coeficientes de Asimetría y Kurtosis; valor de probabilidad (pvalor) del ANOVA; heredabilidad (H).

Variable	n	Media	± D.E.	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	ANOVA (pvalor)	H
CE	401	1,31	± 0,29	21,73	0,51	2,47	0,46	0,81	0,0027	0,52
IG	406	1,01	± 0,27	26,82	0,50	2,56	1,28	3,59	<0,0001	0,53
IR05	405	1,12	± 0,27	24,16	0,55	2,66	1,33	4,02	<0,0001	0,52
IC05	406	1,01	± 0,27	26,62	0,38	2,00	0,77	0,49	0,0002	0,50
PHPAi	406	0,86	± 0,21	24,46	0,33	1,98	0,89	2,83	0,0001	0,27
PHRi	406	0,79	± 0,28	35,19	0,00	3,29	2,68	17,88	0,0615	0,09
PSPAi	406	0,90	± 0,35	38,42	0,00	1,94	0,33	-0,06	0,0187	0,77
PSRi	406	0,83	± 0,36	43,82	0,21	2,79	1,89	4,60	0,1178	0,48
%PLF	406	0,81	± 0,22	27,75	0,13	1,60	-0,48	0,59	<0,0001	0,58
%G	405	0,77	± 0,23	30,07	0,08	1,27	-0,73	-0,12	<0,0001	0,58
%R05	406	0,75	± 0,27	35,77	0,04	2,38	0,15	2,98	<0,0001	0,56
%C05	397	1,20	± 1,80	149,77	0,00	24,00	6,53	67,46	0,0002	0,65

Variables: CE: conductividad eléctrica; IG, IR05, IC05: Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5; PHPAi y PSPAi: Peso húmedo y seco de parte aérea individual; PHRi y PSRi: Peso húmedo y seco de raíz individual; %PLF: Porcentaje final de plántulas normales; %G, %R05, %C05: Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm.

**Figura 4:** Desviación del Índice de tolerancia relativa (ITR) con respecto al promedio de la población para las variables: Conductividad eléctrica (CE), Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5 (IG, IR05 y IC05); Peso húmedo y seco de parte aérea individual (PHPAi y PSPAi); Porcentaje final de plántulas normales (%PLF); Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm (%G, %R05, %C05). Se presentan los individuos con comportamiento extremo para cada variable: Con azul los 10 genotipos más tolerantes y con rojo los 10 más susceptibles.

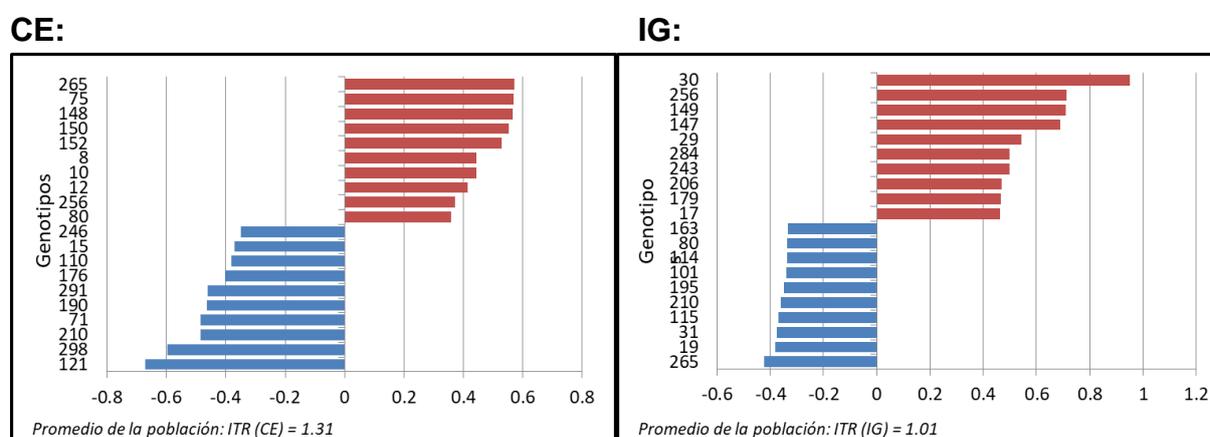
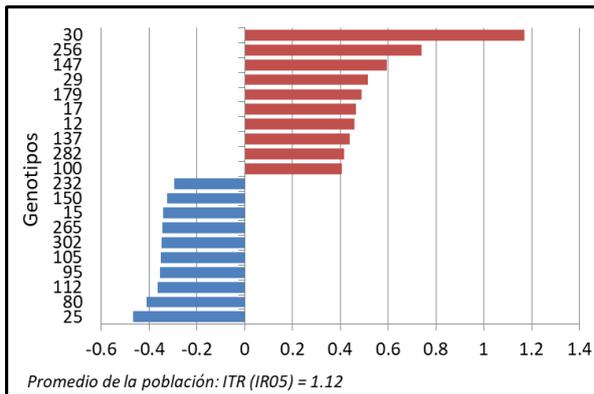
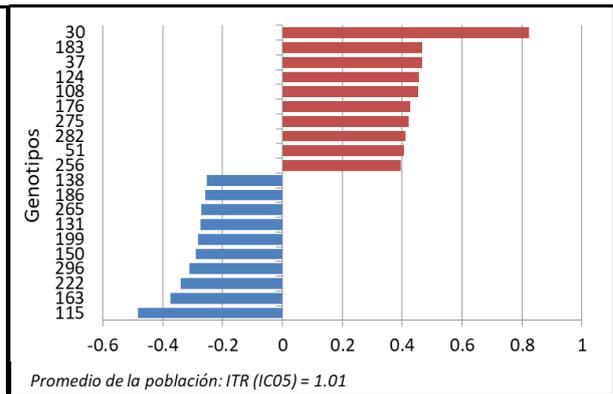


Figura 4: Continuación.

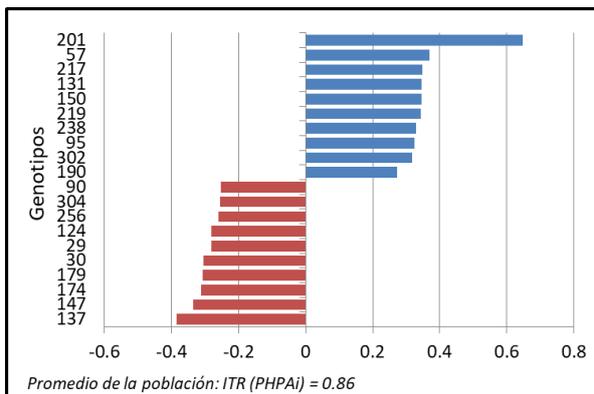
**IR05:**



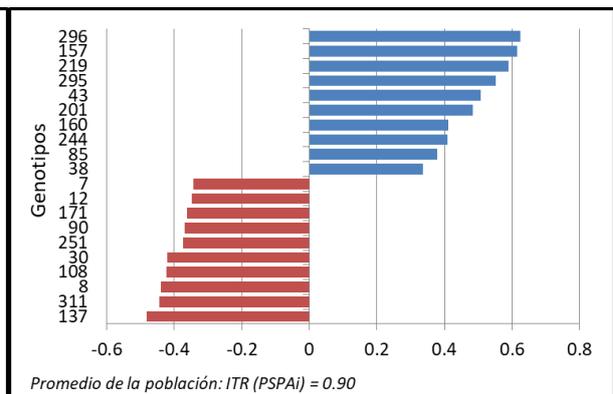
**IC05:**



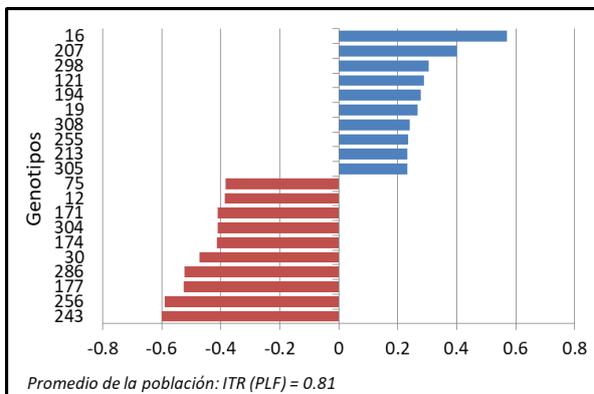
**PHPAi:**



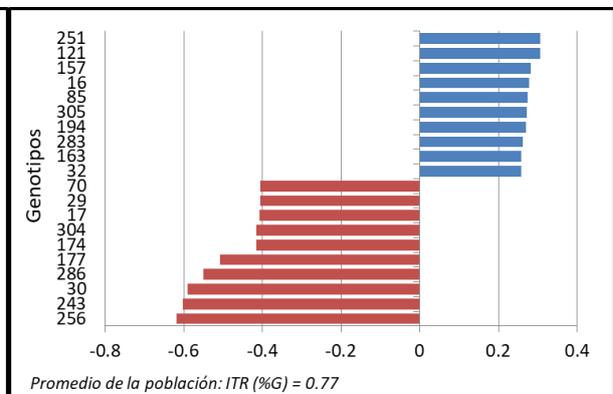
**PSPAi:**



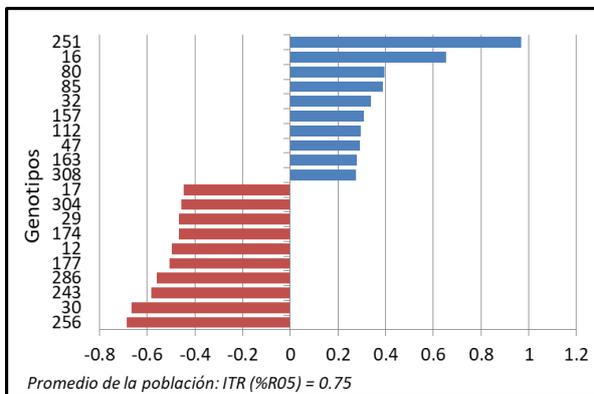
**%PLF:**



**%G:**



**%R05:**



## **6. DISCUSIÓN**

### **6.1 Comportamiento de las líneas parentales**

En el presente trabajo ambos parentales se comportaron de manera similar tanto en el tratamiento Frío como Control, presentando valores que no difirieron significativamente ( $p > 0,05$ ) en la mayoría de las variables estudiadas. De acuerdo a trabajos preliminares (Mroginski, comunicación personal) se esperaba que ambos parentales difirieran en cuanto al porcentaje de semillas germinadas y de plantas normales logradas en el tratamiento Frío. A pesar de que las condiciones de incubación fueron las mismas que en los trabajos preliminares, esto no se observó en el presente trabajo. Podrían existir otras variables fisiológicas o ambientales (condiciones ambientales en el momento de maduración de las semillas, humedad inicial de las mismas, entre otros) que no se han tenido en cuenta y que estén afectando el comportamiento germinativo. Debería ampliarse el estudio para poder contestar estos interrogantes.

La línea LP179 exhibió plántulas con mayor peso de la parte aérea (PHPAi y PSPAi), en ambas condiciones de imbibición de las semillas. El mayor tamaño de plántula que presentó dicha línea coincide con trabajos previos (Mroginski, comunicación personal) donde mostró un mayor tamaño de plántula cuando la germinación ocurrió bajo condiciones normales de incubación. En este trabajo si bien la imbibición de las semillas fue a bajas temperaturas, el proceso germinativo y crecimiento posterior ocurrió a temperaturas normales y por ello las plántulas de LP179 presentaron mayor tamaño que LP3830.

### **6.2 Efectividad del tratamiento aplicado**

El daño por enfriamiento durante la imbibición de las semillas se expresa como menor viabilidad y menor vigor de las semillas expuestas al frío, menor crecimiento de las plántulas, y en algunos casos se observa aborto de radículas y proliferación de raíces

seminales (Bedi y Basra, 1993).

En el presente trabajo, cuando las semillas fueron embebidas en frío se observó una mayor pérdida de electrolitos (mayor CE), lo que podría indicar que la integridad de las membranas celulares fue afectada. Asimismo tanto los porcentajes de germinación como de plantas logradas fueron significativamente menores en el tratamiento Frío (%PLF, %G y %R05), sin embargo ni el tamaño de las plantas ni la velocidad de germinación (IG, IR05) y de aparición de coleoptilos (IC05) difirieron. Estos resultados sugieren que el tratamiento Frío afectó la viabilidad de las semillas y su vigor, pero no el crecimiento posterior de las plántulas sobrevivientes.

En cuanto al crecimiento de la raíz, el frío retardó la elongación de las mismas y afectó el %R05, también disminuyó levemente el peso húmedo ( $p=0,0516$ ) y en forma significativa al peso seco de las raíces ( $p < 0,01$ ). Otros autores analizaron el crecimiento de las raíces bajo condiciones de Frío y encontraron que el tamaño de las raíces era menor y menos ramificado bajo estas condiciones (Hund *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2016). En el presente trabajo pudo observarse que el tratamiento causó la reducción del tamaño de la raíz primaria o su aborto en los genotipos más susceptibles, aumentado el número de raíces seminales, en concordancia con lo encontrado por Cal y Obedorf (1972).

### **6.3 Variabilidad genotípica de la población y heredabilidad de los caracteres**

El Análisis de varianza por tratamiento de incubación permitió detectar diferencias significativas ( $p>0,001$ ) entre genotipos para todas las variables estudiadas. Dado que los parentales no presentaron diferencias significativas y presentaron buen comportamiento tanto en frío como en control, ambos podrían estar aportando alelos positivos, es decir que favorecen la expresión del carácter, en distintos *loci* y que segregan en la población.

La existencia de variabilidad genotípica para el carácter de interés es uno de los requisitos para el posterior análisis de QTL. La población F<sub>2:4</sub> de maíz presentó

segregación para los caracteres analizados y evidenció diferencias genotípicas significativas, por lo que podría ser empleada para explorar las bases genéticas de dichos caracteres mediante un análisis de QTL. Sin embargo debe tenerse en cuenta que las variables asociadas al comportamiento germinativo luego de un período de imbibición de las semillas a bajas temperaturas serían aquellas que presentaron una respuesta diferencial en la población ante el tratamiento de incubación aplicado (CE, PSRi, %PLF, %G y %R05).

Para un análisis de QTL se requiere que el carácter bajo estudio sea heredable, lo que implica que las variaciones fenotípicas deben estar mayormente explicadas por variaciones genotípicas y en menor medida por variaciones relacionadas con el ambiente (Kearsey y Pooni, 1996). Los valores moderados y altos de H obtenidos en este trabajo confirman la utilidad de los datos fenotípicos, obtenidos bajo incubación en frío, para ser empleados, conjuntamente con marcadores moleculares, en la localización de regiones genómicas asociadas al carácter en cuestión.

#### **6.4 Correlación de CE con las restantes variables evaluadas**

Se ha comprobado que la disrupción de las membranas celulares está implicada en la sensibilidad a bajas temperaturas de las semillas al germinar (AOSA, 1983; Pérez García y Pita Villamil, 1999). En este trabajo se observaron evidencias de menor integridad de las membranas durante la imbibición de las semillas en Frío, dado que la CE y, por ende la pérdida de electrolitos, fue mayor a 5°C. Asimismo, la correlación significativa entre CE y la mayoría de las variables estudiadas en Frío sugiere que la menor integridad de las membranas celulares podría estar implicada en posibles trastornos fisiológicos provocando disminución de la viabilidad y de la capacidad de germinación de las semillas.

La CE podría ser un atributo útil a medir para evaluar la sensibilidad de los genotipos a las bajas temperaturas teniendo en cuenta la sencillez y rapidez de la técnica.

## **6.5 Tolerancia relativa al estrés (ITR)**

Los índices de tolerancia al frío (relación entre el desempeño de rasgos morfológicos medidos en condiciones de estrés y su desempeño en condiciones normales) se utilizaron generalmente para la evaluación de tolerancia al estrés en estudios de mejoramiento genético (Miedema, 1982; Frascaroli y Landi, 2013; Huang *et al.* 2013). Sin embargo, gran parte de los estudios sobre mapeo y detección de QTL asociados a la tolerancia a bajas temperaturas emplearon registros de variables medidas bajo las condiciones de estrés para evaluar el comportamiento de los genotipos (Fracheboud *et al.*, 2004; Jompuk *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 20016) y son pocos los trabajos que emplearon índices relacionando el desempeño observado bajo estrés con el control. Huang *et al.* (2013) evaluaron diez índices de tolerancia para rasgos de germinación y crecimiento de las plántulas en condiciones de estrés por enfriamiento y control y detectaron polimorfismos de marcadores moleculares asociados a la tolerancia al frío, logrando eliminar los efectos del desempeño para el rasgo correspondiente en las condiciones de control.

En este trabajo se evaluó una población segregante de familias  $F_{2:4}$  tanto en condiciones de incubación control como en frío, obteniéndose los índices de tolerancia correspondientes a cada carácter. Los mismos evidenciaron diferencias significativas entre los genotipos y presentaron valores de H moderados, demostrando su utilidad para el posterior análisis de QTL. Cabe destacar que en la bibliografía no existen antecedentes de estudios de QTL asociados a la tolerancia a bajas temperaturas durante la imbibición de las semillas.

## **7. CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten concluir que existe variabilidad genotípica, expresada en el fenotipo, en caracteres asociados al comportamiento germinativo de la población  $F_{2:4}$  de maíz bajo estudio, luego de un

período de imbibición de las semillas a baja temperatura (5°C) y a una temperatura control (24°C). Se pudo confirmar la utilidad de los datos fenotípicos para explorar las bases genéticas detrás de dichos caracteres mediante un análisis de QTL.

El tratamiento de frío aplicado durante la imbibición de las semillas, afectó su viabilidad y vigor, pero no el crecimiento posterior de las plántulas sobrevivientes.

La medición de la conductividad eléctrica podría ser un atributo útil para evaluar la sensibilidad de los genotipos a las bajas temperaturas. La misma se correlacionó con la mayoría de las variables en condiciones de incubación en frío.

Los índices de tolerancia relativa presentaron amplios rangos de variación evidenciando la presencia de genotipos a los cuales el tratamiento Frío afectó negativamente, favoreció o no ejerció influencia sobre el rasgo evaluado. Estos datos son prometedores para ser utilizados en la identificación de regiones cromosómicas asociadas a los mismos.

El fenotipado realizado en el presente trabajo es un paso requerido para los análisis de QTL. Un posterior estudio de asociación estadística entre los datos fenotípicos y moleculares permitirá la detección de marcadores asociados con *loci* de caracteres cuantitativos facilitando el estudio de las bases genéticas de caracteres complejos, como lo es la tolerancia al frío. El uso de marcadores ligados a caracteres de interés podría beneficiar los programas de mejoramiento mediante la selección asistida por marcadores moleculares.

## 8. RESUMEN

En el mundo, la producción de maíz se realiza en amplias condiciones climáticas que afectan tanto su desarrollo como al rendimiento. Una de las variables climáticas que determinan el establecimiento de este cultivo es la temperatura, la cual puede causar daños a la semilla si las mismas se presentan por debajo de determinados valores.

El daño por enfriamiento, o también llamado *chilling injury*, es un daño fisiológico que se produce cuando las temperaturas se encuentran entre 5 y 15 °C, variando de acuerdo a cada especie, pudiendo afectar la estructura de las membranas celulares de las semillas, al proceso fotosintético o disminuir el crecimiento y extensión de las hojas o también afectar la absorción de agua y nutrientes.

Con el objetivo de generar información fenotípica de caracteres determinantes del comportamiento germinativo del maíz a bajas temperaturas, para el posterior estudio con marcadores moleculares e identificación de regiones cromosómicas asociadas a los mismos, se evaluó una población segregante de familias  $F_{2:4}$  luego de un período de imbibición de las semillas a 5°C.

El objetivo de este trabajo fue generar información fenotípica de caracteres determinantes del comportamiento germinativo del maíz a bajas temperaturas, para el posterior estudio con marcadores moleculares e identificación de regiones cromosómicas asociadas a los mismos. Para ello se evaluó una población segregante de familias  $F_{2:4}$  luego de un período de imbibición de las semillas a 5°C comparando su comportamiento con el obtenido en condiciones normales de incubación (24°C). Las variables medidas fueron: CE (conductividad eléctrica); IG, IR05, IC05 (Índices de germinación y de aparición de semillas con radícula o coleoptilo de 0,5 cm); PHPAi, PSPAi, PHRi y PSRi (Pesos húmedo y seco por planta, de la parte aérea y de la raíz); %G, %R05 y %C05 (Porcentajes de semillas germinadas y con radícula o coleoptilo mayor o igual a 0,5 cm) y %PLF (Porcentaje final de plántulas normales).

El tratamiento de frío aplicado durante la imbibición de las semillas afectó la viabilidad de las mismas y su vigor, pero no el crecimiento posterior de las plántulas sobrevivientes.

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre genotipos para todas las variables estudiadas tanto en condiciones de Frío como Control, como así también para los índices de tolerancia relativa (excepto PHRi y PSRi). La mayoría de los caracteres y sus ITR presentaron heredabilidad moderada en ambas condiciones de incubación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten concluir que existe variabilidad genotípica, expresada en el fenotipo, en caracteres asociados al comportamiento germinativo de la población  $F_{2:4}$  de maíz bajo estudio, luego de un período de imbibición de las semillas a baja temperatura ( $5^{\circ}\text{C}$ ) y a una temperatura control ( $24^{\circ}\text{C}$ ), pudiendo confirmar la utilidad de los datos fenotípicos para explorar las bases genéticas detrás de dichos caracteres mediante un análisis de QTL.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aidun, V.L.; Migus, W.N. y Hamilton, R.I. 1991. Use of Inbreds seedling cold tolerance to predict hybrid cold tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Can. J. of Plant Sci.* 71: 663-667.
- Aloni, R. y Griffith, M. 1991. Functional xylem anatomy in root-shoot junctions of six cereal species. *Planta.* 184(1):123-129.
- Andrade, F.H. y Cirilo, A.G. 2000. Fecha de siembra y rendimiento de los cultivos. En: F.H. Andrade y V.O. Sadras (Eds.) Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja., INTA Ediciones. Bs. As, Argentina. p. 135-154.
- AOSA 1983. ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution N° 32, East Lansing, USA. p. 89.
- BCR, 2017. Bolsa de Comercio de Rosario (en línea). Consultado en noviembre de 2017. Disponible en: <https://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx>
- Bedi, S. y Singh Basra. A. 1993. Chilling injury in germinating seeds: basic mechanisms and agricultural implications. *Seed Science Research.* 3: 219-229.
- Bradow, J. M. 1990. Chilling sensitivity of photosynthetic oil-seedlings. 2. Cucurbitaceae // *Journal of Experimental Botany.* vol. 41, No. 233, p. 1595–1600.
- Cal, J.P. y Obedorf, 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. y Yang, H. 2003. Meeting cereal demand while protecting natural resources and improving environmental quality. *Annu. Rev. Environ. Resource* 28: 58-315.
- Christiansen, M.N. 1967. Periods of sensitivity to chilling in germinating cotton. *Plant Physiology, Minneapolis.* 42 (3): 431-433.
- Cirilo, A.G. 2004. Fecha de Siembra y Rendimiento en Maíz. *Revista IDIA XXI: Cereales,* 6: 122-127.

- Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B. y 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.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Evangelista de Menezes, C. C.; Sedyama, T; Ferreira da Silva, R. y Cardoso, A.A. 1997. Efeito da baixa temperatura e do grau de umidade das sementes na germinação e na emergencia das plantulas de milho (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 19(2): 185-191.
- FAO. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción (en línea). Consultado en diciembre de 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc>.
- FAO. 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030 (en línea). Consultado en diciembre de 2017. Disponible en: [http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm#](http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm#/)
- FAOSTAT. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division (en línea). Consultado en enero de 2018. Disponible en: <http://www.faostat3.fao.org/>
- Fischer, R.A. y Edmeades, G.O. 2010. Breeding and cereal yield progress. *Crop Sci*. 50: 85–98.
- Fracheboud, Y.; Jompuk, C.; Ribaut, J. M.; Stamp, P. y Leipner, J. 2004. Genetic analysis of cold tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Mol. Biol*. 56: 241–253.
- Frascaroli, E. y Landi, P. 2013. Divergent selection in a maize population for germination at low temperature in controlled environment: study of the direct response, of the trait inheritance and of correlated responses in the field. *Theor Appl Genet* 126: 733–746.

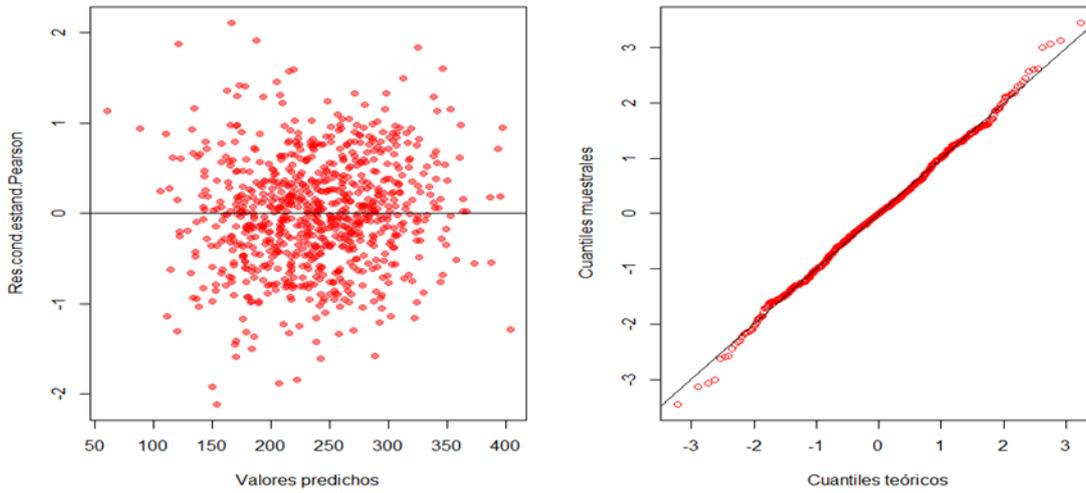
- Galinat, W.C. 1988. The origin of corn. En: G.F. Sprague y J.W. Dudley (Eds). Corn and corn improvement, 3rd ed. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy. p. 1-31.
- Gardner, C.O.; Thomas-Compton, M.A.; Glocken, T.L., Eichelberger, K.D. 1987. Selection for cold and freeze tolerance in corn: evaluations of original and selected populations. Proceedings of the 42nd Annual Corn and Sorghum Research Conference, 126-40.
- 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.
- Gorecki, R.J.; Fordonski G.; Bieniaszewski, T. y Jacunski, K. 1990. Comparative studies on chilling sensitivity in some legume seeds. *Acta Physiologiae Plantarum*. 12(2): 149–158.
- Greaves, J. A. 1996. REVIEW ARTICLE. Improving suboptimal temperature tolerance in maize the search for variation. *Journal of Experimental Botany*, 47(296): 307-323.
- Herner, R.C. 1986. Germination under cold soil conditions. *HortScience* 21: 118-122.
- Hope, H.J. y Maamari, R. 1994. Measurement of maize cold tolerance during germination. *Seed Science and Technology*, Zürich. 22(1): 69-77.
- Hu, S.; Lübberstedt, T.; Zhao, G y Lee, M. 2016. QTL Mapping of Low-Temperature Germination Ability in the Maize IBM Syn4 RIL Population. *PLoS ONE* 11(3): e0152795. doi:10.1371/journal.
- Huang, J.; Zhang, J.; Li, W.; Hu, W.; Duan, L.; Feng, Y.; Qiu, F. y Yue, B. 2013. Genome wide association analysis of 10 chilling tolerance indices at the germination and seedling stages in maize. *J. Integr. Plant Biol.* 55(8), 735–744.
- Hund, A.; Fracheboud, Y.; Soldati, A.; Frascaroli, E.; Salvi, S. y Stamp P. 2004. QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theor Appl Genet* 109: 618–629.

- IGC. 2017. Concejo Internacional de Cereales (en línea). Consultado en enero de 2018.  
Disponible en: <https://www.igc.int/es/>
- Ismail, A.M.; Hall, A.E. y Close, T.J. 1997. Chilling tolerance during emergence of cowpea associated with a dehydrin and slow electrolyte leakage. *Crop Science*. 37(4): 1270–1277.
- Jennings, P. y Salveit, M.E. 1994. Temperature and chemical shocks induce chilling tolerance in germinating *Cucumis sativus* (cv. Poinsett 76) seeds. *Physiol. Plant*. 91:703-707.
- Jompuk, C.; Fracheboud, Y.; Stamp, P. y 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.
- Kearsey, M. y Pooni, H. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. London, Chapman y Hall. 1996.
- Markowski A. 1988. Sensitivity of different species of field crops to chilling temperature. II. Germination, growth and injuries of seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 10(3): 275–283.
- Markowski, A. 1989. Sensitivity of different species of field crops to chilling temperature. I. Interaction of initial seed moisture and imbibition temperature. *Acta Physiologiae Plantarum* 10: 265-274.
- Marocco, A.; Lorenzoni, C. y Fracheboud, Y. 2005. Chilling stress in maize. *Maydica* 50: 571–580.
- Miedema, P. 1982. The effects of low temperature on *Zea mays*. En: Brady, N.C. (ed) *Adv. Agron* 35. Academic, New York, EEUU. p. 93–128.
- Mroginski, E.; Eyhérabide, G. y Toledo, M. 2010. Germinación de diferentes genotipos de maíz a bajas temperaturas. En Ferrer, M. (Presidente) IX Congreso Nacional de Maíz, Rosario, Arg. p. 347-349.

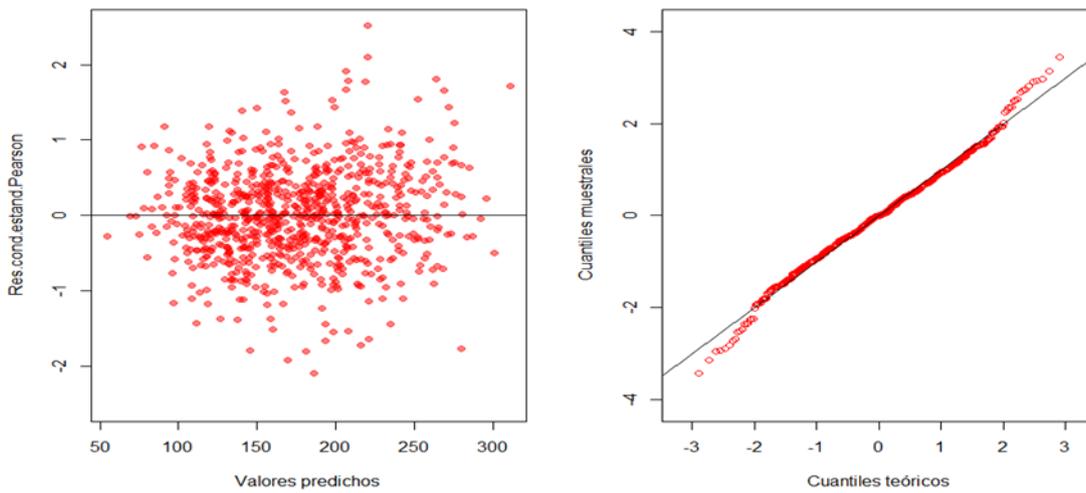
- Mroginski, E.; Samoiloff, A.; Fesser, E. y Eyhérbide, G. 2012. Caracterización de líneas endocriadas de maíz por su comportamiento germinativo a baja temperatura. *Journal of Basic y Applied Genetics*. Suppl. Vol XXIII (1): 256.
- Pérez García, F. y Pita Villamil, J.M. 1999. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid. ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. Seed vigor testing. 2112: 16.
- Pollock, B.M. y Toole, V.K. 1966. Imbibition period as the critical temperature sensitive stage in germination of lima bean seeds. *Plant Physiology*. Vol. 41, p. 221-229.
- Revilla, P.; Rodríguez, V. M; Ordás, A. 2016. Association mapping for cold tolerance in two large maize inbred panels. *BMC Plant Biology* 16:127. DOI 10.1186/s12870-016-0816-2.
- Robinson, H. F.; Comstock, R.E. y Harey, P.H. 1949. Estimates of heretability and degree of dominance in corn. *Agronomy Journal* 41:353-359.
- SEVILLA, R. 2005. Magnitud e impacto potencial en la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Caso Maíz. 49-5.
- Stamp, P.; Leipner, J.; Jompuk, C.; Fracheboud, Y. 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.
- Udovenko. 1976. Métodos de evaluación de la resistencia de plantas a los factores adversos del medio. Editorial Kolos, Leningrado, Unión Soviética. 318 pp.
- Wilson, J.M. 1985. The economic importance of chilling injury. *Outlook on Agriculture*. Vol. 14, p. 197–204.
- Wolk, W.D. y Herner, R.C. 1982. Chilling injury of germinating seeds and seedlings. *HortScience*. 17: 169-173.
- Zemetra, R.S. y Cuany, R.L. 1991. Variation among inbreds for seed response to low temperatures in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 36: 17-23.

10. **Anexo 1:** Gráficos de *Q-Qplot* y residuos *versus* predichos del análisis combinado.

Variable: Peso húmedo de la parte aérea por planta.

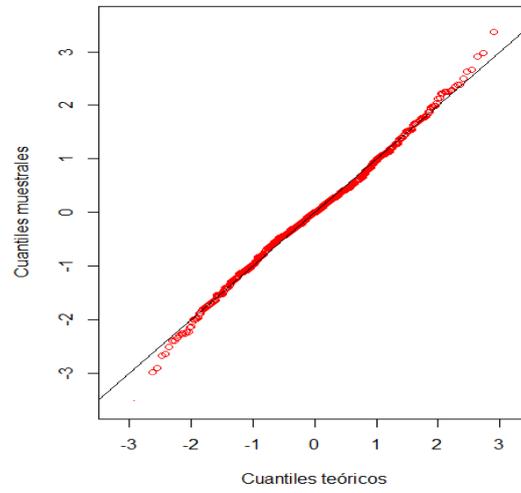
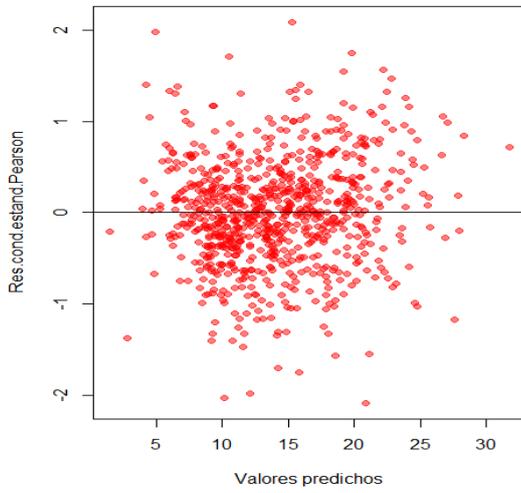


Variable: Peso húmedo radicular por planta.





Variable: Peso seco de la parte aérea por planta.



Variable: Peso seco radicular por planta.

