

**TOLERANCIA A FRÍO EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL
DESARROLLO EN ARROZ: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA
DE GERMOPLASMA DE ORIGEN DIVERSO Y VARIACIÓN
ALÉLICA EN GENES CANDIDATOS**

María Inés Pachecoy

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para
optar al Título de
MAGISTER SCIENTIAE en Producción Vegetal

Programa de Posgrado en Ciencias Agrarias
Facultad De Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Mar Del Plata

Balcarce, Argentina

7 de octubre de 2011

**TOLERANCIA A FRÍO EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL
DESARROLLO EN ARROZ: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA
DE GERMOPLASMA DE ORIGEN DIVERSO Y VARIACIÓN
ALÉLICA EN GENES CANDIDATOS**

María Inés Pachecoy

.....

Directora de Tesis Ing. Agr., Dra. Ana Clara Pontaroli

.....

Co-Director de Tesis Ing. Agr. (M.Sc.) Raúl Rodríguez

**TOLERANCIA A FRÍO EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL
DESARROLLO EN ARROZ: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA
DE GERMOPLASMA DE ORIGEN DIVERSO Y VARIACIÓN
ALÉLICA EN GENES CANDIDATOS**

María Inés Pachecoy

Aprobada por:

.....

Dra. Ana Ma. Castro

.....

Dr. Miguel A. Di Renzo

.....

Dr. Ricardo W. Masuelli

A mis padres,

Por darme las herramientas para construir mi futuro...

A mis abuelos,

Por enseñarme, con el ejemplo, a amar la naturaleza....

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres y hermanos, por tanta paciencia y cariño.

A Ana Clara, por tantas horas dedicadas, el acompañamiento permanente y la gran dedicación.

Al Ing Alfredo Marín, por el apoyo constante para mi formación.

Al excelente grupo humano del proyecto Arroz, por tanta ayuda desinteresada.

A la EEA INTA Corrientes, por la oportunidad de realizar el posgrado.

A la Dra. Laura Giménez y al Lic. Armando Taié, por la ayuda en el análisis estadístico y el apoyo permanente.

A Mara y a todo el grupo de trigo de la EEA INTA Balcarce, por la ayuda y por hacerme sentir una integrante más.

A Sandra, Walter y al hermoso grupo que forma el posgrado.

A Roxana y Florencia, por permitirme compartir mucho más que una casa.

A Silvina y Mauricio, por ser mi familia en Balcarce y por compartir conmigo a Gaspar y su alegría cotidiana.

A Veronica e Ivana por la hermosa amistad y tantos momentos compartidos.

A Ayelen, Federico y Ernesto por estar siempre.

A mis grandes amigos y compañeros de oficina, Cecilia, Marianela y Pablo, por la hermosa compañía de cada día.

A mi familia, en especial a Susana, Florencia y Tatiana, por estar siempre presentes.

A mis queridas amigas Carolina, Constanza, Geraldine y María M. por estar cerca aún a la distancia.

Y a todos mis nuevos amigos por hacer de los años en Balcarce, un tiempo hermoso...

A todos, muchas gracias....

ÍNDICE

Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras.....	x
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
Abreviaturas y siglas.....	xiv
1. Introducción.....	1
2. Materiales y Métodos.....	10
2.1. Material vegetal.....	10
2.2. Evaluación fenotípica.....	11
2.2.1. Estadio de plántula.....	11
2.2.2. Germinación de semillas.....	12
2.3. Evaluación genotípica.....	13
2.3.1. Extracción de ADN.....	13
2.3.2. Diseño de iniciadores	14
2.3.3. Amplificación de fragmentos por PCR.....	16
2.3.4. Separación y visualización de fragmentos amplificados.....	17
2.3.5. Purificación de fragmentos amplificados.....	18
2.3.6. Secuenciación.....	18
2.3.7. Detección de polimorfismos.....	19
2.4. Análisis estadístico.....	19
3. Resultados.....	21
3.1. Evaluación fenotípica.....	21
3.1.1. Estadio de plántula.....	21
3.1.2. Germinación.....	25
3.1.3. Análisis conjunto plántula-germinación.....	26
3.2. Evaluación genotípica.....	28
3.2.1. Extracción de ADN.....	28
3.2.2. Amplificación de fragmentos por PCR	28
3.2.3. Purificación de fragmentos amplificados.....	30
3.2.4. Secuenciación.....	31
3.2.5. Alineamientos y detección de polimorfismos.....	33
4. Discusión.....	38
5. Conclusiones.....	44
6. Bibliografía.....	45
7. Apéndice.....	54
Tabla I. Lista de líneas endocriadas utilizadas, genealogía, programa en que fue realizado el cruzamiento y cruzamiento.....	53

Tabla II. Análisis de la varianza para la tolerancia a frío en el estadio de plántula.....	59
Tabla III. Prueba de Hotelling para las diferencias significativas entre grupos de tolerancia a frío en el estadio de plántula.....	59
Tabla IV. Análisis de la varianza para la tolerancia a frío en el estadio de germinación.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de arroz en la República Argentina en las campañas 2007/08, 08/09 y 09/10. Provincias productoras, superficie sembrada, superficie cosechada y rendimientos promedio.....	1
Tabla 2. QTLs asociados a la tolerancia a frío en estadios tempranos del desarrollo en arroz.....	8
Tabla 3. Escala de IRRI para la evaluación de plántulas por tolerancia a frío.....	12
Tabla 4. Características de los iniciadores diseñados.....	15
Tabla 5. Vectores medios (constituidos por cuatro valores correspondientes a las cuatro fechas de observación) de cada uno de los cuatro grupos de tolerancia a frío obtenidos a partir del análisis de conglomerados.....	23
Tabla 6. Matriz de correlación entre las cuatro fechas de observación de la respuesta a frío.....	23
Tabla 7. Genotipos seleccionados para la evaluación genotípica y testigos de evaluación de tolerancia a frío en plántula. Grupo resultante del análisis de conglomerados al que pertenecen, subespecie de origen, vector medio de respuesta a frío en plántula para cada genotipo y valor promedio y desvío estándar de cada grupo.....	24
Tabla 8. Porcentaje de germinación promedio para cada uno de los cuatro grupos obtenidos a partir del análisis de conglomerados.....	26
Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson entre el valor de ABCPE (respuesta en plántula) y el porcentaje de germinación.....	27
Tabla 10. Ubicación de las líneas seleccionados para el análisis genotípico en los grupos formados a partir de los análisis de conglomerados realizados con los resultados de las evaluaciones en los estadios de geminación y plántula.....	27
Tabla 11. Detalle de las amplificaciones logradas con los diez pares de iniciadores diseñados, en los diez genotipos en estudio.....	28
Tabla 12. Combinación de genotipos e iniciadores enviados a secuenciar y secuencias con dos copias consideradas de buena calidad, finalmente alineadas.....	32
Tabla 13. Número de SNPs e indels detectados en los fragmentos de los genes <i>OsGSTZ1</i> , <i>OsGSTZ2</i> y <i>OsCDPK13</i> en algunos de las líneas en estudio.	35

Tabla 14. SNPs detectados en los tres genes en estudio para los genotipos analizados, separados en tolerantes y susceptibles a frío en plántula.....	36
Tabla 15 Indels detectados en los genes en estudio para los genotipos analizados.	37
Tabla 16. Descripción de los cambios producidos por los SNPs 9 y 13 en el gen <i>OsGSTZ2</i> . Variación en la secuencia de ADN, posición de la sustitución en el codón, tipo de mutación y su efecto y tipo de aminoácido resultante.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a). Temperaturas mínimas y máximas medias anuales para la provincia de Corrientes. (b). Distribución actual de las fechas de siembra y cosecha.....	3
Figura 2. Temperaturas mínimas medias históricas para los meses de agosto y setiembre en la provincia de Corrientes.....	4
Figura 3. Variación de la radiación, medida en calorías/cm ² /día, a través del año en la provincia de Corrientes.....	4
Figura 4. Esquema de los genes analizados.....	16
Figura 5. A: Número de líneas por categoría de la escala de severidad de IRRI (1996). Testigos tolerantes en plántula. Testigos susceptibles en plántula. B y C: Testigos tolerante 115 y susceptible 119 respectivamente, en la fecha final de evaluación.....	21
Figura 6. Efecto promedio de la temperatura a través del tiempo en función de los síntomas evaluados con la escala de severidad de síntomas de IRRI (1996).....	22
Figura 7. Dendrograma del agrupamiento de los genotipos en el análisis de conglomerados por tolerancia a bajas temperaturas en el estadio de plántula.....	22
Figura 8. Evolución de la severidad de síntomas según la escala del IRRI (1996) en los cuatro grupos a través del tiempo (valores promedio).....	23
Figura 9. Ordenamiento de 116 líneas de arroz según su respuesta en la evaluación fenotípica en el estadio de plántula según la escala de severidad de síntomas de IRRI (1996).....	24
Figura 10. Número de líneas por categoría de porcentaje de germinación en frío.....	25
Figura 11. Dendrograma del agrupamiento de los genotipos en el análisis de conglomerados por tolerancia a bajas temperaturas en germinación....	26
Figura 12. Reacciones de amplificación realizadas con los diez pares de iniciadores en estudio.....	30
Figura 13. Ejemplo de control del proceso de purificación mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% para los genotipos 15 y 86 en los diez fragmentos en estudio.....	31
Figura 14. Cuantificación de ADN de las primeras muestras enviadas para su secuenciación.....	31

Figura 15. Resultados de secuenciación. Ejemplo de cromatogramas de diferente calidad para tres genotipos.....	32
Figura 16. Resultado del alineamiento realizado utilizando el software MEGA para el tercer fragmento del gen <i>OsGSTZ2</i> (P6).....	33
Figura 17. Detección de polimorfismos. a: SNP detectado en un alineamiento de secuencias para el fragmento P4 con los genotipos 15, 86, 95, 103, 104, 112, 114, 115, 119 y 120. b: Visualización de los cromatogramas correspondientes a los genotipos 103, 104, 112 y 119 para dicho polimorfismo.....	34

RESUMEN

El arroz es una especie de clima templado-subtropical a subtropical susceptible a bajas temperaturas durante las etapas iniciales del desarrollo. Si bien en el mundo existen materiales tolerantes, actualmente no se dispone de materiales de este tipo adaptados a la región arrocería argentina, con los que se podría adelantar la fecha de siembra, hacer coincidir la floración con el momento de máxima radiación solar y aumentar el rendimiento.

Ya se ha realizado el mapeo de la tolerancia a bajas temperaturas al estado de plántula en poblaciones segregantes y el mapeo fino de un QTL asociado al carácter. A su vez se han propuesto varios genes candidatos, entre ellos *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13*.

En el presente trabajo se caracterizó fenotípicamente un grupo de líneas endocriadas de arroz y se analizó la variación alélica en los tres genes candidatos mencionados. Se determinó la supervivencia de plántulas y el porcentaje de germinación de 116 líneas de origen diverso (incluidos testigos tolerantes y susceptibles y líneas avanzadas del programa de mejoramiento de la EEA Corrientes-INTA) en condiciones controladas de bajas temperaturas. Como resultado, los testigos empleados tuvieron una respuesta acorde a lo esperado. Además, tanto en el estadio de plántula como en la germinación se detectaron líneas de comportamiento similar a los testigos, intermedio entre testigos tolerantes y susceptibles y más extremo, pero no se halló correlación entre ambos estadios.

Para analizar la variación alélica se seleccionaron las diez líneas con respuesta más contrastante para el carácter (cinco susceptibles y cinco tolerantes) y se amplificó la región codificante con iniciadores específicos. Posteriormente se secuenciaron los productos de PCR y se analizaron las secuencias obtenidas.

Para cada uno de los fragmentos se alinearon las secuencias obtenidas con las correspondientes secuencias de referencia (ADN genómico y ADNc de arroz en bases de datos públicas). Se analizó la densidad de polimorfismos de nucleótido simple ("SNPs") e inserciones/delecciones ("indels"), y se encontró un total de 34 polimorfismos en los tres genes (28 SNPs y seis indels). Ocho SNPs y un indel separaron a las líneas según su fenotipo. Dos de los SNPs se localizaron en exones, uno se detectó en la región no traducida 3', y los restantes SNPs y el indel se hallaron en intrones. Para los SNPs hallados en exones se determinó la ubicación de la base polimórfica en el codón y se realizó la traducción de la región codificante a proteína para determinar el tipo de cambio producido. Únicamente uno de los SNPs (A>G), ubicado en el gen *OsGSTZ2*, resultó en un cambio de aminoácido (Ile>Val). La presencia de este SNP en las líneas analizadas indicaría una asociación del alelo G con la sensibilidad a bajas temperaturas. No obstante, debería verificarse si dicha asociación se mantiene en un mayor número de genotipos.

Los resultados del presente estudio indican que se cuenta con amplia variabilidad para la tolerancia a frío en estadios tempranos del desarrollo en líneas de arroz adaptadas a condiciones locales, aunque es necesario determinar si la respuesta observada en condiciones controladas es reproducible a campo.

Palabras clave: tolerancia a frío, plántula, germinación, genes candidatos

ABSTRACT

Rice is a crop from tropical and subtropical areas, susceptible to low temperatures during early growth stages. Whereas there are genetic materials with cold tolerance, these have been developed for other conditions than those occurring in Argentina's rice growing area, or their grain type is not suitable for the local market. If such locally adapted varieties were available, growers could anticipate sowing date, make flowering time coincide with the moment of maximum solar radiation and increase yields.

Mapping of tolerance to low temperatures at the seedling stage in segregant populations and fine mapping of a QTL associated with the trait have been achieved recently. In turn, several candidate genes have been proposed, including *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13*.

In this work, a group of rice inbred lines was phenotypically characterized, and allelic variation in the three candidate genes mentioned above was analyzed in a subset of such materials. Seedling survival and germination percentage of 116 materials of diverse origin (including tolerant and susceptible controls and advanced lines from EEA Corrientes-INTA's breeding program) were determined under controlled, low-temperature conditions. As a result, those materials used as controls responded to cold as expected. In addition, materials with behavior similar to controls, intermediate between susceptible and tolerant controls and more extreme than controls were detected at both seedling stages and, germination but no correlation was found between stages.

Those genetic materials with the most contrasting response to cold (five tolerant and five susceptible materials) were selected to analyze allelic variation at candidate genes. The coding region of genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* was amplified by PCR using specific primers. Subsequently, PCR products were sequenced and the sequences obtained were analyzed.

Sequences were aligned with rice genomic DNA and full cDNA sequences, available in public databases. Density of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and of insertions/deletions ("indels") was assessed, and a total of 34 polymorphisms was found in the three genes (28 SNPs and six indels). Seven SNPs and an indel separated genetic materials by their phenotype (susceptible or tolerant). Two of these SNPs were located in exons, one SNP was found in the 3' UTR region and the remaining SNPs and the indel were found in introns. The location of the polymorphic base in the codon was determined for the SNPs found in exons, and the translated sequence was inspected for aminoacid changes. Only one of the SNPs (A> G) located in gene *OsGSTZ2* resulted in an aminoacid change (Ile> Val). Apparently, the presence of this SNP in the materials studied indicates an association of the G allele with sensitivity to low temperatures, although this should be examined in a larger number of genotypes.

The results of the present study indicate that wide variability for cold tolerance at early growth stages in rice is available in advanced breeding materials that are adapted to local growing conditions. However, whether the response observed under a controlled environment is reproducible in field conditions remains to be ascertained.

Keywords: cold tolerance, seedling, germination, candidate genes

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad

BILs: líneas introgresadas por retrocruza (backcross introgression lines)

CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FLAR: Fondo Latinoamericano para el Arroz de Riego

indel: inserción/delección

IRRI: International Rice Research Institute

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

QTL: loci de caracteres cuantitativos (quantitative trait loci)

RILs: líneas endocriadas recombinantes (recombinant inbred lines)

SNP: polimorfismo de nucleótido simple (single nucleotide polymorphism)

TBE: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM

TE: Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes dado que constituye la base de la dieta de más de la mitad de la población mundial (FAO, 2004). Se cultivan anualmente alrededor de 154 millones de hectáreas, lo que representa aproximadamente el 11% de las tierras cultivables del mundo (Khush, 2005; FAO, 2010). El arroz se cultiva en todos los continentes, excepto en la Antártida (Mackill; Lei, 1997), a partir de 53° N y hasta 40° S (Lu; Chang, 1980, Fujino *et al.*, 2011).

En América del Sur se siembran cerca de 1,4 millones de hectáreas de arroz. Brasil cuenta con un millón de hectáreas en Rio Grande do Sul, donde se produce el 60% del total de la producción brasileña (7 millones de toneladas por año). En Chile se cultivan unas 30.000 ha de arroz; mientras que tanto en Uruguay como en Argentina se cultivan aproximadamente 200.000 ha, lo que representa una producción de 1,4 y 1,3 millones de toneladas anuales, respectivamente (SIIA, 2009).

En Argentina la producción de arroz está concentrada en la región del litoral, principalmente en las provincias de Entre Ríos y Corrientes, que representan, respectivamente, 41 y 40% de la superficie sembrada total; el 19% restante se reparte entre Santa Fe, Formosa y Chaco (Tabla 1; MAGyP, 2010).

Tabla 1. Producción de arroz en la República Argentina en los ciclos agrícolas 2007/08, 2008/09 y 2009/10. Provincias productoras, superficie sembrada, superficie cosechada y rendimientos promedio.

Provincia	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Rendimiento (kg*ha ⁻¹)	Producción (tn)
Chaco	6333	6333	5900	37350
Corrientes	80451	77098	6253	482468
Entre Rios	83383	81240	6941	558762
Formosa	6090	5990	5900	35110
Santa Fe	26660	26443	6045	159827
Argentina	20297	197104	6208	1273517

Fuente: MAGyP

Debido a que el arroz es una especie de clima templado-subtropical a subtropical, uno de los principales factores limitantes para su producción en gran parte de las zonas mencionadas es la ocurrencia de bajas temperaturas durante la estación de crecimiento. Esto se ve agravado por el hecho de que los cultivares más difundidos en

dichas zonas son de la subespecie *indica*, que exhibe más sensibilidad a las bajas temperaturas que los de la subespecie *japonica* (Glaszman *et al.*, 1990; Mackill; Lei, 1997; Baruah *et al.*, 2009; Kim; Tai, 2011). Los cultivares del primer tipo son, sin embargo, los que reúnen las características deseables de calidad y tipo de grano para el consumo local.

Las bajas temperaturas pueden afectar el crecimiento y desarrollo del cultivo desde la germinación hasta el llenado de los granos, reduciendo marcadamente el rendimiento (Yoshida *et al.*, 1996; Mackill *et al.*, 1997; Nakagahra *et al.*, 1997). En particular, la germinación, el establecimiento de plántulas, la diferenciación de los primordios florales (inicio del estadio reproductivo) y el llenado de granos son los momentos de mayor riesgo de daño por frío (Ye *et al.*, 2009). Contrariamente a algunas especies que, a pesar de ser sensibles a bajas temperaturas, pueden aclimatarse e incrementar su tolerancia a éstas luego de ser expuestas a temperaturas intermedias (Moynihan *et al.*, 1995) el arroz carece de esta capacidad de aclimatación (Sato, 2001).

Los síntomas de daño por exposición a bajas temperaturas incluyen baja germinación, baja síntesis de clorofila en la plúmula, necrosis del tejido radicular, retraso de crecimiento, amarillamiento de hojas, pobre emergencia de la panícula, retraso en la antesis, esterilidad e inhibición del llenado de los granos (Kaneda; Beachell, 1974; Vergara, 1976; Mackill; Lei, 1997; Jiang *et al.*, 2008; Kim; Tai, 2011).

Las temperaturas óptimas para los diferentes estadios de desarrollo oscilan entre 20 y 35 °C para la germinación, 25 y 30 °C para la emergencia y establecimiento de plántula, 30 y 33 °C para la antesis y 20 y 25 °C para la maduración del grano (Yoshida, 1981; FAO, 2003; Sharifi, 2010).

En el caso de la germinación, ésta se inicia cuando la latencia de la semilla se ha roto, absorbe agua suficiente y se expone a una temperatura que oscila aproximadamente entre 10 y 40 °C (Yoshida, 1981). La temperatura afecta tanto la activación de esta etapa como el crecimiento posterior, haciéndola más prolongada cuando es baja (Yoshida, 1981; FAO, 2003; Sharifi, 2010). Yoshida (1981) señala que se alcanza entre un 90 y 97 % de germinación en dos días con temperaturas de incubación entre 27 y 37 °C, pero por encima o por debajo de este rango el porcentaje se reduce considerablemente. Cuando la incubación se extiende a seis días la germinación llega al 90 % o más con temperaturas entre 15 y 37 °C. En este sentido Know *et al.* (1996) determinaron que con temperaturas inferiores a 12,3 °C no se

produce la germinación de las semillas y que el porcentaje de emergencia aumenta significativamente hasta 25 °C.

Durante la primera semana de crecimiento post-germinación, el arroz es muy sensible a la temperatura. Entre 22 y 31 °C, la tasa de crecimiento aumenta linealmente a medida que la temperatura aumenta, en tanto que se ve afectada negativamente por debajo de 22 °C (Yoshida, 1981). La influencia de la temperatura sobre la tasa de crecimiento es menor después de esta primera semana. La temperatura crítica mínima para la expansión de hojas en las semanas iniciales del cultivo es de 7 a 16 °C, y de 12 a 16 °C para el crecimiento radicular, dependiendo de la variedad, la calidad de la semilla y el manejo (Nishiyama, 1977).

Como se mencionó previamente, una fracción importante de la producción nacional de arroz proviene de la provincia de Corrientes. De acuerdo a la clasificación climática de Köppen, el clima de esta provincia es “subtropical húmedo sin estación seca, con temperaturas del mes más frío entre 0 y 18 °C”. En las Figuras 1 y 2 se grafican las temperaturas mínimas y máximas medias anuales y las temperaturas mínimas medias históricas para los meses de agosto y setiembre en la provincia de Corrientes. En la actualidad el grueso de la siembra se concentra en el mes de octubre y la cosecha en febrero-marzo, por lo que no habría problemas de daño por bajas temperaturas.

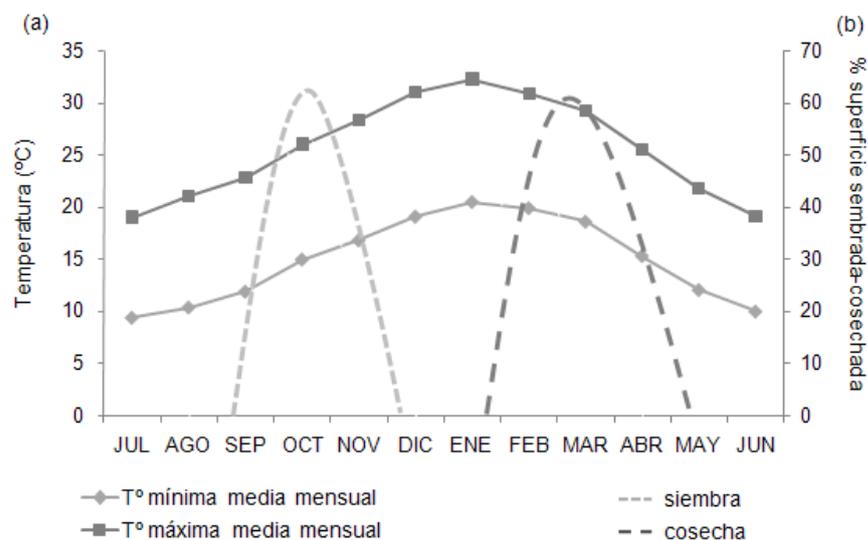


Figura 1. (a). Temperaturas mínimas y máximas medias anuales para la provincia de Corrientes. **(b).** Distribución actual de las fechas de siembra y cosecha (promedio de los últimos 40 años; Fuente: SMN – EEA INTA Corrientes).

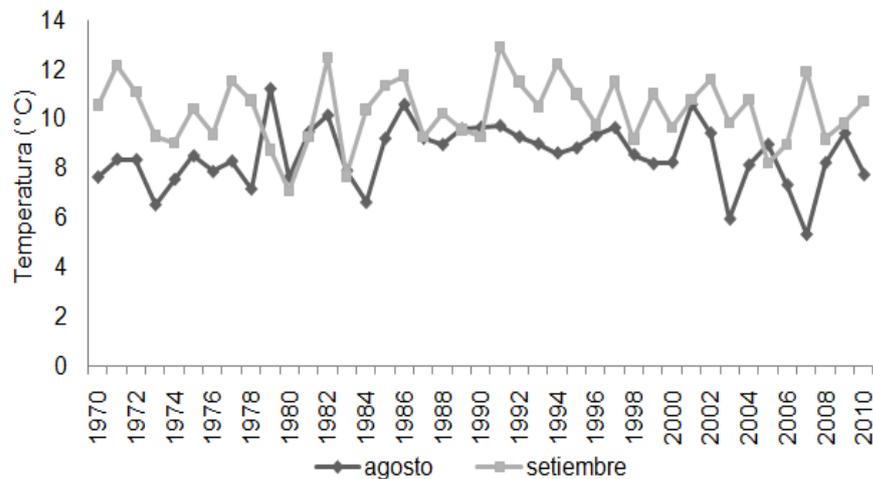


Figura 2. Temperaturas mínimas medias históricas para los meses de agosto y setiembre en la provincia de Corrientes (Fuente: SMN).

En arroz, el rendimiento en grano se maximiza cuando se hace coincidir la floración, etapa crítica de determinación del rendimiento en este cultivo, con el período de máxima oferta de radiación solar (Evans; De Datta, 1979; Akita, 1989; Islam; Morison, 1992; Okawa *et al.*, 2003). Esto puede conseguirse adelantando la época de siembra; para ello, sin embargo, muchas veces se debe sembrar con temperaturas de suelo bajas, lo que afecta el establecimiento y desarrollo del cultivo. Si, por el contrario, la fecha de siembra se demora a la espera de mejores condiciones ambientales para la emergencia, no se hace coincidir la floración con el período de máxima oferta de radiación (Figura 3). En consecuencia, para las variedades actualmente difundidas, el período óptimo de siembra es muy corto y aumenta el riesgo de siembras tardías.

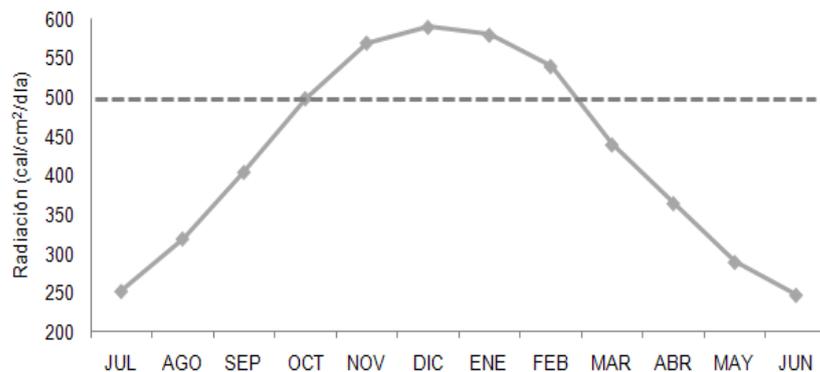


Figura 3. Variación de la radiación, medida en calorías/cm²/día, a través del año en la provincia de Corrientes (Fuente: EEA INTA Corrientes).

Una estrategia importante para incrementar la productividad de los cultivos es minimizando las pérdidas debidas a estreses bióticos y abióticos, mediante el desarrollo de variedades de buen comportamiento o resistentes a estos factores adversos (Boyer, 1982; Khush, 1999; Jena; Mackill, 2008).

Desarrollar cultivares de arroz con mayor tolerancia al frío en los estadios de plántula y desarrollo reproductivo tendría un gran impacto en el cultivo (Andaya; Tai, 2006). En este sentido, se sabe que existe variabilidad genética para estos caracteres en arroz; de hecho se cuenta con cultivares tolerantes y susceptibles, con los cuales se puede establecer un patrón de comparación. Los cultivares tolerantes actualmente disponibles, sin embargo, provienen del extranjero, han sido seleccionados para ambientes diferentes al de Corrientes y frecuentemente son del tipo *japonica*, es decir, de grano corto, en tanto que aquellos cultivados en la región son de grano largo (tipo *indica*).

Las evaluaciones de la tolerancia a frío en los programas de mejoramiento genético generalmente se basan en observaciones visuales en condiciones naturales de campo. Este tipo de evaluación está sujeta a la interacción genotipo/ambiente y a variaciones diarias o azarosas a lo largo de la temporada de cultivo y a través de los años (Andaya; Mackill, 2003) lo que torna el proceso lento, ineficiente y sujeto a la ocurrencia de condiciones ambientales aptas para el tamizado. En particular, la intensidad del tratamiento de frío empleado, la duración de la exposición y la evaluación de la recuperación son importantes para una estimación efectiva de la tolerancia a bajas temperaturas (Lou *et al.*, 2007), lo que puede predecirse y ajustarse solamente si se trabaja en condiciones controladas.

En este sentido se han desarrollado numerosas metodologías para la determinación de la tolerancia a bajas temperaturas, como análisis de fluorescencia de clorofila (Sthapit *et al.*, 1998), medición de enzimas de barrido de oxígeno (Saruyama; Tanida, 1995), determinación de la concentración de ácido abscísico o poliaminas (Lee *et al.*, 1993, 1995, 2007), medición del crecimiento de la radícula (Saltveit, 2001) o del vigor de las plántulas (Redoña; Mackill, 1996), y cuantificación (1) de la fuga de electrolitos (Bertin *et al.* 1996; Morsy *et al.* 2005), (2) del nivel de antioxidantes/peroxidación lipídica (Huang; Guo, 2005; Guo *et al.* 2006.; Morsy *et al.* 2007) y (3) de azúcares (Morsy *et al.*, 2007). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios se evaluaron relativamente pocos genotipos. En un número importante de estudios se han realizado pruebas de supervivencia al frío con diferentes temperaturas en las etapas iniciales (Bertin *et al.*, 1996; Andaya; Mackill, 2003; Andaya; Tai, 2006; Lou *et al.*, 2007). En

estos y otros estudios, la evaluación visual después de la exposición directa a las bajas temperaturas ha sido el método más comúnmente utilizado para la evaluación de la tolerancia a frío en plántulas de arroz (Bertin *et al.*, 1996; Kim; Tai, 2011).

Por lo general, sólo un parámetro se utiliza para evaluar la tolerancia a frío en arroz en los estadios de germinación (porcentaje de germinación) (Miura *et al.*, 2001; Fujino *et al.*, 2004, 2008; Sharifi, 2010) y en espiga embuchada (fertilidad) (Satake; Hayase, 1970; Saito *et al.*, 1995, 2001, 2003, 2010; Farrel *et al.*, 2006; Kuroki *et al.*, 2007; Mori, 2011). En cambio, en el estadio de plántula participan muchas características a evaluar, como el enrollamiento, decoloración o amarillamiento de hojas, retraso en el crecimiento, marchitamiento y muerte de plántulas, entre otros (Lou *et al.*, 2007).

Kim y Tai (2011) cuantificaron los cambios fisiológicos y bioquímicos producidos en plántulas de arroz evaluadas a 9 °C constantes y los compararon con los resultados obtenidos a partir de evaluaciones visuales para este mismo tratamiento. En la evaluación fenotípica utilizaron la escala de severidad de síntomas del IRRI (1996) y los parámetros fisiológicos y bioquímicos medidos para la comparación fueron fuga de electrolitos, contenido de prolina, niveles de malondialdehído y contenidos de ácido ascórbico y glutatión. Encontraron una fuerte correlación positiva entre la evaluación visual y las variables fisiológicas estudiadas, principalmente la fuga de electrolitos. La utilización de escalas de evaluación visual representa una gran ventaja práctica en evaluaciones que involucran un gran número de materiales, si bien implica la necesidad de un entrenamiento adecuado.

Muchos de los tratamientos aplicados para inducir estrés por frío emplean temperaturas constantes, como 4 °C (Zhan *et al.*, 2005), 5 °C (Nagamine, 1991; Abbasi *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2009), 6 °C (Jiang *et al.*, 2008), 9 °C (Andaya; Mackill, 2003; Andaya; Tai, 2006; Kim; Tai, 2011), 10 °C (Zhang *et al.*, 2005), 12 °C (Han *et al.*, 2005), 13 °C (Cruz; Milach, 2004) y 15 °C (Yoshida *et al.*, 1996) para las evaluaciones en el estadio de plántula, mientras que para las evaluaciones en germinación las temperaturas más comúnmente utilizadas son 12 °C (Corredor *et al.*, 2007), 13 °C (Cruz *et al.*, 2006), 14 °C (Wang *et al.*, 2009), y 15 °C (Miura *et al.*, 2001; Fujino *et al.*, 2004). Otros estudios, en cambio, utilizan temperaturas variables entre el día y la noche, tales como 10/6 °C (Qian *et al.*, 2000; Lou *et al.*, 2007), 25/9 °C (Andaya *et al.*, 2003, 2007), 12/10 °C (Ji *et al.*, 2010).

No sólo el ajuste de temperatura difiere entre trabajos, sino también la duración del estrés por frío y, de realizarse, la evaluación de la recuperación. Por ejemplo, Qu *et al.* (2003) midieron los efectos el quinto día del período de recuperación después de tres

días de tratamiento, en tanto que Jiang *et al.* (2008) midieron los efectos a los siete días de finalizado el tratamiento luego de una aclimatación gradual a 25 °C. Por otra parte, algunos autores realizan las evaluaciones durante el tratamiento. Tal es el caso de Andaya y Mackill (2003), que evaluaron la aparición de marchitamiento y necrosis como respuesta a frío al quinto día de tratamiento, mientras que Andaya y Tai (2006) evaluaron estos mismos síntomas a los 8, 10, 12 y 14 días de tratamiento; el mismo protocolo fue utilizado por Kim y Tai en 2011.

Si bien contar con un método de evaluación de la tolerancia a frío en condiciones controladas representa una ventaja respecto de la evaluación a campo, su utilización en el tamizado de un gran número de individuos está sujeta a la disponibilidad de equipamiento y espacio adecuados para generar dichas condiciones. Estos obstáculos podrían sortearse si se contara con marcadores moleculares para realizar selección asistida.

De las dos subespecies principales de *O. sativa*, *indica* y *japonica*, la mayor parte del arroz cultivado en regiones templadas es del tipo *japonica*, que en general posee mayor tolerancia al frío que el del tipo *indica* (Glaszmann *et al.*, 1990; Mackill; Lei, 1997; Baruah *et al.* 2009). También se observan respuestas diferenciales a frío dentro de las subespecies. Sin embargo la mayoría de los estudios genéticos han involucrado poblaciones de mapeo derivadas de cruzamientos *indica* x *japonica*. Yang *et al.* (2005), Lou *et al.* (2007), Ji *et al.* (2010) utilizaron haploides duplicados, y Andaya y Mackill (2003), Andaya y Tai (2006), Jiang *et al.* (2008), Wang *et al.* (2009) y Kim y Tai (2011) emplearon líneas endocriadas recombinantes (RILs) de cruzamientos entre una variedad susceptible a frío de la ssp. *indica* y una tolerante de la ssp. *japonica*. En tanto Baruah *et al.* (2009) y Sharifi (2010) emplearon, respectivamente, 68 y 57 líneas y cultivares de origen diverso buscando reunir un amplio espectro de variabilidad genética.

El análisis genético de la tolerancia a frío en el estadio de plántula en arroz ha resultado en la identificación de un número importante de *loci* de caracteres cuantitativos o QTLs (*Quantitative Trait Loc*) asociados al carácter (Tabla 2).

Tabla 2. QTLs asociados a la tolerancia a frío en estadios tempranos del desarrollo en arroz. Referencia bibliográfica, tipo de población y cruzamiento empleado, número de individuos analizados, número de QTLs detectados y cromosomas en los que fueron encontrados.

Referencia	Tipo de población	Cruzamiento	N° de individuos	Estadio y temperatura	N° de QTLs detectados	Ubicación cromosómica
Qian <i>et al.</i> (2000)	DH	JX17(J) x ZYQ8(I)	Ne	Plántula, 4 °C	4	Cr. 1,2,3,4
Misawa <i>et al.</i> (2000)	F ₂ - F ₃	Hokuriku 142(I) x Hyogo-Kitanishiki(J)	69	Plántula, 4 °C	5	Cr. 1,3,9,11
Kim <i>et al.</i> (2000)	F ₂	Dular (cs) x Toyohatamochi(ct)	94	Plántula	1	Cr. 5
Miura <i>et al.</i> (2001)	BILs	Nippombare(J) x Kasalath(I)	98	Germinación, 15 °C	5	Cr. 2,4,5,11
Andaya y Mackill (2003)	RILs	M202(J) x IR50(I)	191	Plántula, 9 °C	11	Cr. 1,3,4,6,8,10,11,12
Fujino <i>et al.</i> (2004)	BILs	Italica Livorno(J) x Hayamasari(J)	122	Germinación	3	Cr. 3,4
Yang <i>et al.</i> (2005)	DH	Azucena x IR64	Ne	Plántula	17	ne
Zhang <i>et al.</i> (2005)	RILs	Lemont(J) x Teqing(I)	269	Plántula, 10 °C	3	Cr. 3,7,11
Luo <i>et al.</i> (2007)	DH	AAV002863(J) x Zhenshan97B(I)	193	Plántula, 6/10 °C	5	Cr. 1,2,8
Fujino <i>et al.</i> (2008)	F ₂	Italica Livorno(J) x Hayamasari(J)	256	Germinación	1	Cr. 3
Jiang <i>et al.</i> (2008)	RILs	Asominori(J) x IR24(I)	71	Plántula	3	Cr. 1,5,6
Wang <i>et al.</i> (2009)	RILs	IR28(I) x Daguandao(J)	227	Germinación	7	Cr. 4,6,9
Ji <i>et al.</i> (2010)	DH	TN(I) x Chunjiang 06(J)	120	Plúmula, plántula, 4 °C	5	Cr. 1,2,4,10,11

Referencias: DH= haploides duplicados; BILs=líneas endocriadas por retrocruza; RILs= líneas endocriadas recombinantes; J=*japonica*; I=*indica*; cs= cultivar susceptible; ct= cultivar tolerante; ne= no especificado; Cr= cromosoma, F₂= filial 2; F₃= filial 3.

En una etapa posterior al mapeo de QTLs, se han empleado estrategias de mapeo fino y análisis de genes candidatos relacionados con la tolerancia al frío en estado vegetativo en arroz. Así, Andaya y Mackill (2003) desarrollaron una población de RILs derivadas del cruzamiento entre la variedad tolerante M202 (*japonica*) y la susceptible IR50 (*indica*) para determinar las bases de las diferencias en la tolerancia a bajas temperaturas entre las dos principales subespecies del arroz cultivado. A partir de este trabajo, Andaya y Tai (2006) saturaron la región genómica en la que Andaya y Mackill (2003) habían detectado el QTL designado como *qCTS12*, que confiere tolerancia al marchitamiento y necrosis inducidos por frío y fue responsable del 40% de la variación fenotípica para este carácter en la población utilizada en ambos estudios. En base a la información disponible tras la secuenciación y anotación completa del genoma de

arroz (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) Andaya y Tai (2006) identificaron la secuencia correspondiente a dicho QTL, y señalaron dos genes presentes en esa región, *OsGSTZ1* y *OsGSTZ2*, como candidatos de tolerancia a bajas temperaturas. Ambos genes pertenecen a la familia de aquellos que codifican glutathion-S-transferasas, enzimas involucradas en respuestas a estreses abióticos. Asimismo, Takesawa *et al.* (2002) observaron un incremento en la tolerancia al estrés por baja temperatura durante la germinación y crecimiento de plántulas de arroz cuando sobreexpresaron el gen *OsGSTZ1*. Algo similar fue realizado por Abbasi *et al.* (2004) quienes sobreexpresaron el gen *OsCDPK13* (que codifica una kinasa) y lo asociaron con la tolerancia a bajas temperaturas al encontrar en estas líneas una mayor tolerancia de estrés por frío en comparación con los controles, evidenciada por mayor supervivencia y tasa de recuperación cuando fueron expuestas a una temperatura favorable para el crecimiento después del tratamiento. Por otra parte, la expresión de *OsCDPK13* fue mayor en las variedades de arroz tolerantes a frío que en las variedades susceptibles.

Si bien, como se expuso previamente, se dispone de información sobre el control genético de la tolerancia a bajas temperaturas en estadios tempranos del desarrollo en arroz, no se conoce el comportamiento del material del programa de mejoramiento genético de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Corrientes para dicho carácter.

Por consiguiente, los objetivos del presente trabajo fueron (1) caracterizar el comportamiento de 120 líneas endocriadas de arroz de la EEA INTA Corrientes, de origen diverso, frente a bajas temperaturas en condiciones controladas en estadios tempranos del desarrollo, con el fin de determinar la magnitud de la variabilidad disponible para el mejoramiento genético del carácter a nivel regional; y (2) determinar la variación alélica de los genes candidatos *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* en algunas de dichas líneas y la asociación entre el comportamiento frente a bajas temperaturas y el genotipo de la planta, con vistas a la futura generación de marcadores moleculares para realizar selección asistida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para las evaluaciones fenotípicas se utilizaron 120 líneas endocriadas de arroz pertenecientes a la EEA INTA Corrientes (F_6 , F_7 y variedades comerciales (Tabla I, Apéndice)). Entre estas líneas se incluyeron seis cultivares de comportamiento conocido frente a bajas temperaturas al estado de plántula, dos susceptibles: Oryzica 1 y FL05383-1P-11-1P-2P-M, en adelante “119” y “120”, y cuatro tolerantes: Quilla 158502 / 166002 / 132703, y CT6748-8-CA-17, denominados en adelante “104”, “105”, “107” y “115”.

Actualmente, estas 120 líneas forman parte de diferentes proyectos de mejoramiento genético de la EEA INTA Corrientes y se escogieron por presentar buenas características para la zona, pero nunca se evaluó su respuesta a frío ni fueron seleccionadas por este carácter.

En el ciclo agrícola 2007/08 se realizó la multiplicación a campo de todas las líneas para obtener semilla en óptimas condiciones de sanidad y de la misma edad.

Para el análisis genotípico se trabajó con las 10 líneas de respuesta más contrastante en la evaluación fenotípica en el estadio de plántula. Las líneas seleccionadas como susceptibles fueron FL06136-7M-6-4-1P, FL05481-7P-10-2P-2P-M, FL04459-6M-21P-4M-2-1, denominados en adelante como “15”, “86” y “95” respectivamente, y los dos testigos susceptibles 119 y 120. Las líneas seleccionadas como tolerantes fueron Drew, Zafiro, Quilla 145601, en adelante “103”, “112” y “114” y los testigos tolerantes 104 y 115. También se tuvo en cuenta para la elección de estas líneas que las mismas no tuvieran ninguna relación de parentesco entre sí, para evitar la ocurrencia de asociaciones espurias (falsos positivos) al momento de establecer la asociación entre la variación alélica y el fenotipo.

2.2. Evaluación fenotípica

2.2.1. Estadio de plántula

Para la evaluación de las plántulas por tolerancia a frío se condujo un ensayo en una cámara fría en la EEA INTA Corrientes siguiendo la metodología descrita por Andaya y Tai (2006). Para esto se colocaron cinco plántulas por línea, al estado de tres hojas, en una cámara fría (STH – 020, Sanshu Sangyo Co. Ltd) a 9 °C constantes y fotoperíodo de 12 h, suministrado por dos campanas de luces ubicadas a 50 cm de altura sobre las plántulas y cada una de ellas con cinco tubos fluorescentes (Phillips TLD 36W/840NG Super 84GG Eco Master), con una irradiación superior a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El diseño utilizado para el ensayo fue en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Por una cuestión de espacio, se sembró una repetición a la vez. Para cada repetición se sembraron aproximadamente 20 semillas de cada una de las líneas en bandejas al aire libre. Posteriormente se realizó el trasplante de aquellas cinco plántulas en estado de tres hojas que presentaron mejor aspecto y mayor uniformidad dentro de cada una de las líneas. Las plántulas fueron transferidas a los recipientes definitivos (bandejas de poliestireno expandido con celdas individuales) en que ingresaron a la cámara fría.

Los tratamientos estuvieron constituidos por las 120 líneas y el factor de bloqueo fue la fecha de siembra. Se consideró como unidad experimental a cinco celdas consecutivas con plántulas de una misma línea. Al ingresar a la cámara los recipientes con las plántulas se colocaron dentro de bandejas metálicas, con aproximadamente 3 cm de agua, para garantizar humedad constante. La ubicación de las cinco plántulas en las bandejas, como así también la ubicación de éstas dentro de la cámara, se realizó al azar.

Se evaluó la reacción de las plántulas a los 8, 10, 12 y 14 días desde el ingreso a la cámara. Las líneas fueron clasificadas en categorías de acuerdo a su grado de tolerancia a frío, utilizando una escala visual de severidad de síntomas (clorosis, retardo en el crecimiento y necrosis) de 1 (tolerante) a 9 (susceptible) descrita en el sistema estándar de evaluación para arroz de IRRI (International Rice Research Institute, 1996; Tabla 3).

Tabla 3. Escala de IRRI para la evaluación de plántulas por tolerancia a frío.

Valor	Características de las plántulas
1	Plántulas verde oscuro, tasa de crecimiento normal.
3	Plántulas verde claro, ligeramente atrofiadas, leve retraso en el crecimiento.
5	Plántulas amarillentas, moderadamente atrofiadas, retraso en el crecimiento.
7	Plántulas marrones, severamente atrofiadas, retraso de crecimiento.
9	Plántulas muertas.

2.2.2. Germinación de semillas

Para este experimento se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Los tratamientos estuvieron constituidos por las 120 líneas, el factor de bloqueo fue la ubicación dentro de la cámara fría y la unidad experimental consistió en una lámina de papel con 30 semillas de cada material.

Se utilizó el protocolo de evaluación y selección por tolerancia a frío en germinación propuesto por el Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR; Corredor *et al.* 2007). Para ello se seleccionaron las mejores semillas en cuanto a tamaño, homogeneidad y sanidad. Las semillas se desinfectaron superficialmente con una solución de 2,25% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se sembraron 30 semillas de cada una de las líneas en papeles esterilizados y humedecidos con una solución fungicida (Benlate 2 ppm), distribuyéndolas homogéneamente para evitar la formación de grupos. Los papeles con las semillas se ubicaron aleatoriamente en grupos de a 10 líneas dentro de bandejas descartables que se envolvieron con papel "film" para evitar la deshidratación. Las bandejas fueron colocadas en una cámara fría regulada a 12 °C. En cada bandeja se colocó además, junto con las líneas a evaluar, una muestra de 20 semillas del testigo tolerante 107 y otra del testigo susceptible 119. Se realizaron observaciones periódicas de la evolución de las líneas y a los 26 días se determinó el porcentaje de germinación, considerándose germinadas a aquellas semillas cuyos coleótilos tenían 4 mm o más.

Paralelamente a este ensayo se determinó el poder germinativo de todas las líneas. Con este valor se calculó un índice (I) según la siguiente ecuación:

$$I = \text{SGF} * 100 / (\text{PG} * n / 100)$$

donde SGF= número de semillas germinadas en frío, PG= poder germinativo y n= número de semillas evaluadas. Este índice se utilizó para ajustar los resultados obtenidos en la evaluación.

Fue necesario realizar dos ensayos para poder evaluar la tolerancia a frío en germinación ya que en un primer momento éste se realizó en la EEA INTA Corrientes pero, por problemas técnicos de la cámara, debió repetirse. La segunda experiencia se realizó en la Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA Balcarce – Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP).

2.3. Evaluación genotípica

2.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Haymes (1996) con algunas modificaciones. Para ello se extrajeron aproximadamente 50 mg de tejido fresco de la región apical de hojas jóvenes de cada una de las líneas. El tejido extraído se colocó en microtubos estériles de 1,5 ml, que se introdujeron en nitrógeno líquido. Luego, el tejido congelado fue pulverizado con un taladro eléctrico con mecha plástica. Inmediatamente se resuspendió el polvo obtenido en 300 µl de “buffer” de extracción (100 mM Tris-HCl 1M, 20mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,4% β-mercaptoetanol y 2% CTAB). Se agitó la mezcla durante algunos segundos utilizando un vortex, hasta que todo el material entró en contacto con el buffer. Las muestras fueron posteriormente incubadas en un baño termostático a 65 °C durante 60 a 90 minutos. Una vez a temperatura ambiente, se agregó a cada tubo 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v). Luego de agitarse suavemente, los tubos se centrifugaron 10 minutos a máxima velocidad (13.000 rpm) en una microcentrífuga y a continuación se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1,5 ml. El ADN fue precipitado agregando 500 µl de etanol:acetato de sodio 3M (19,8:1, v/v). Luego de una incubación a -20 °C hasta el día siguiente, las muestras fueron centrifugadas nuevamente durante 10 minutos a 13.000 rpm para luego descartar el líquido sobrenadante. El “pellet” obtenido se lavó agregando 300 µl de etanol 70% y se efectuó una nueva centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos luego de la cual se descartó nuevamente el sobrenadante. Las muestras de ADN así obtenidas se secaron dejando los tubos durante 2-3 horas a temperatura ambiente, bajo flujo laminar. Posteriormente el ADN fue resuspendido con 200 µl de buffer TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M) más 1 µl de enzima ARNasa (10

mg.ml⁻¹), se mantuvo durante 8 h a temperatura ambiente y luego se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización. La cuantificación del ADN se realizó con un espectrofotómetro (BIO-RAD SmartSpec™ 3000). Se estableció la concentración en función de la absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancia obtenida a 260 nm *versus* a 280 nm se utilizó como parámetro para conocer la calidad del ADN.

El ADN también fue cuantificado mediante electroforesis en geles de 0,7% de agarosa común en buffer TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) 1X en una cuba horizontal con el mismo buffer durante alrededor de una hora, utilizando un voltaje aproximado de 80 V. En la corrida se incluyó un marcador de peso molecular para estimar la concentración de ADN de las muestras por comparación.

Se llevaron a una concentración de 100 ng ul⁻¹ aquellas muestras con concentraciones de ADN superiores a este valor.

2.3.2. Diseño de iniciadores

A partir de la secuencia de ADN genómico de arroz, disponible en bases de datos públicas (Genbank) se diseñaron iniciadores para amplificar por PCR la región codificante de los genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* (Andaya; Tai, 2006) y *OsCDPK13* (Abbasi *et al.*, 2004).

A fin de poder realizar la posterior secuenciación de los genes, y por ser éstos de gran tamaño (3544 pb, 3163 pb y 4430 pb respectivamente), se los dividió en fragmentos de aproximadamente 1000 pb. Para el diseño de los iniciadores se utilizó la herramienta *Primer-BLAST* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que utiliza el programa Primer3 para el diseño de los iniciadores para PCR y luego los somete a una búsqueda en la base de datos de secuencias seleccionada utilizando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.*, 1990), con el fin de verificar que no amplifican otro fragmento que el deseado. En este caso se utilizó como blanco de la búsqueda a la secuencia del genoma completo de *Oryza sativa* (ssp. *indica* y *japonica*).

Se estableció que los iniciadores debían reunir las siguientes condiciones: 1) longitud entre 17 y 28 nucleótidos, 2) contenido de G-C entre 40 y 60%, 3) preferentemente, terminación del extremo 3' en G, C, GC ó CG, 4) temperatura de fusión entre 55 y 80 °C, 5) terminaciones 3' no complementarias, para evitar la formación de dímeros, 6) sin secuencias auto-complementarias, para evitar la formación de estructuras secundarias. Con estas condiciones se diseñaron diez pares

de iniciadores: tres para el gen *OsGSTZ1*, tres para el gen *OsGSTZ2* y cuatro para el gen *OsCDPK13* (Tabla 4, Figura 4).

Tabla 4. Características de los iniciadores diseñados. Detalle de la división de los genes y designación de cada fragmento, denominación empleada para los iniciadores, secuencia 5'-3', cantidad de bases, temperatura de fusión ($T^{\circ}m$) y porcentaje de G-C (%GC). Las letras F y R al final de la denominación indican si el iniciador está en la posición "forward" o "reverse" de la secuencia.

Gen	Fragmentos			Iniciadores				
	Número	Designación	Tamaño (pb)	Denominación	Secuencia (5'-3')	Nº de bases	$T^{\circ}m$	%GC
<i>OsGSTZ1</i>	1	P1	1314	Os200(3)R1F	ATGAGCTCGTGCTCCTACAGGG	22	60,7	59
				Os200(2)R1R	TCCCCATCTACTAATGCTGGCA	24	59,9	50
	2	P2	936	Os200(2)R2F	TGCCAGCATTAGTAGATGGGGA	22	57,9	50
				Os200(2)R2R	CTGCGACATCCTTCCAGAAGTT	22	57,2	50
	3	P3	1081	Os200(2)R3F	AACTTCTGGAAGGATGTCGCAG	22	57,2	50
				Os200(2)R3R	TCCCTAGGTAAGGACTGG	24	57,9	50
<i>OsGSTZ2</i>	1	P4	1126	Os300(2)R1F	AAGCCAATCCTGTACGGTGCCT	22	61,1	54,5
				Os300(2)R1R	CACCAATGCAATGGCGAGAGAG	23	59,8	52,1
	2	P5	1085	Os300(2)R2F	TCTGACTCTCTCGCCATTGCAT	22	58,4	50
				Os300(2)R2R	TTGAACTTCGTCGCCAGTAGCA	22	58,3	50
	3	P6	857	Os300(2)R3F	ATGCTACTGGGACGAAAGTTCA	22	58,1	50
				Os300(2)R3R	GTGACTGAGCACTTGAGTTGAG	23	58	52,1
<i>OsCDPK13</i>	1	P7	1263	Os700(2)R1F	CGCGAGGTCTCGTAAGTCCAT	22	60,8	59
				Os700(4)R1R	CACCGCTTGCCATCCTCATAG	22	60,1	59
	2	P8	1012	Os700(2)R2F	AAGCGCAAGCTCATACCAAGG	22	60,5	54,5
				Os700(2)R2R	CTTCAAACGCTCCGAAGGGCAA	22	60,3	54,5
	3	P9	1039	Os700(2)R3F	GTTTGAAGGCCCATGAAGTGCT	24	57,9	45,8
				Os700(2)R3R	AGGTGCTCCTCACGTTCTATCT	24	58,3	50
4	P10	1308	Os700(4)R4F	GCTGAGCGCTTTTTCAGAGGAGG	22	60,8	61,3	
			Os700(2)R4R	CTAGGCGGCCTTGCAACTACAT	22	59,6	54,5	

Utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versión 4.0.2. (<http://www.megasoftware.net>, Tamura *et al.*, 2007) se alinearon las secuencias de los tres genes para las dos subespecies de arroz cultivado, *indica* y *japonica*, junto con las secuencias de los iniciadores, y se seleccionaron aquellos iniciadores ubicados en exones. Para el fragmento 4 del gen *OsCDPK13* fue necesario diseñar un iniciador "forward" degenerado (Os700(4)R4F) ya que el mismo presentaba una diferencia en una de las bases (T por C) entre las secuencias de *indica* y *japonica*. En la Figura 4 se muestra la estructura de los tres genes en estudio y la ubicación de los iniciadores.

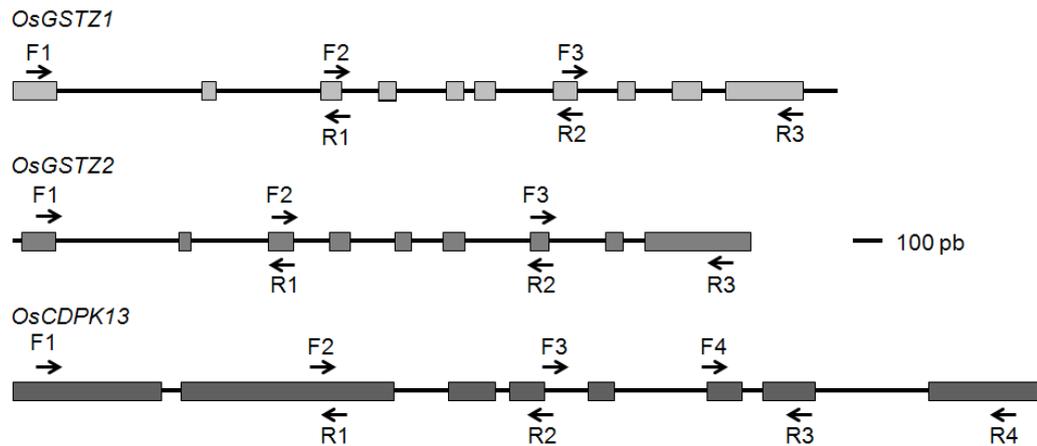


Figura 4. Esquema de los genes analizados. Los iniciadores se indican con flechas; F: "forward", R: "reverse". Los números indican el fragmento abarcado por cada par de iniciadores. Las cajas llenas representan a los exones.

2.3.3. Amplificación de fragmentos por PCR

Fue necesario poner a punto la técnica de PCR, ya que los iniciadores fueron diseñados para este experimento en particular, por lo que no se conocían las condiciones óptimas para la correcta amplificación de los fragmentos.

Para ajustar las condiciones de reacción se probaron distintas concentraciones de dNTPs y "buffers" de reacción. Finalmente, la reacción de amplificación utilizada consistió en 11,05 μl de agua ultrapura, 6,25 μl de buffer de reacción 5X GoTaq® (Promega), 1 μl de dNTPs (25 mM), 0,25 μl de los iniciadores "forward" y "reverse" (preparados a una concentración de 100 $\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), 1 U (0,2 μl) de GoTaq® ADN Polimerasa (Promega), y 1 μl de la muestra de ADN, para obtener un volumen final de 20 μl por reacción. Las mezclas de reacción se prepararon siempre sobre hielo molido, habiendo mantenido también en hielo los reactivos.

Para determinar las condiciones óptimas de los ciclos de reacción, el primer punto a establecer fue la temperatura de "annealing" (apareamiento de los iniciadores al templado) adecuada para cada uno de los diez pares de iniciadores. Para esto se compararon distintas temperaturas para un mismo par, teniendo en cuenta tanto la temperatura de fusión de los mismos como así también que la temperatura utilizada no fuera menor a 50 °C (para evitar apareamientos inespecíficos) ni mayor a 60 °C. Finalmente, se seleccionó esta última como temperatura de trabajo para todos los pares de iniciadores. Paralelamente se evaluaron diferentes tiempos de extensión, y se decidió trabajar finalmente con una extensión de 1 min 30 seg.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en dos termocicladores, Eppendorf® Mastercycler y MJ Research® PTC-100TM, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C (3 min), 35 ciclos de: 94 °C (30 seg), 60 °C (30 seg) y 72 °C (1 min 30 seg), y extensión final a 72 °C (5 min); las muestras se mantuvieron a 10 °C hasta extraerlas del termociclador.

En algunos casos se utilizó una variante en la técnica de PCR llamada “touchdown”. Esta técnica se emplea cuando se desconoce la secuencia exacta de los extremos de la secuencia a amplificar y se asume que puede existir alguna base desapareada en el alineamiento iniciador-secuencia. Se busca reducir la aparición de fragmentos inespecíficos (“artefactos”) partiendo de una temperatura de “annealing” elevada en los primeros ciclos de la PCR y bajándola gradualmente a medida que la reacción progresa. En los casos en que se aplicó esta opción, el programa empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C (3 min), un ciclo de desnaturalización a 94 °C (30 seg), “annealing” a 60 °C (30 seg) y extensión a 72 °C (1 min 30 seg), luego nueve ciclos durante los cuales se mantuvieron las temperaturas de desnaturalización y extensión pero la temperatura de “annealing” fue bajando 0,8 °C por ciclo hasta llegar a 52 °C, y 24 ciclos más de: 94 °C (30 seg), 52 °C (30 seg) y 72 °C (1 min 30 seg), con una extensión final a 72 °C (5 min). Al igual que en el caso anterior las muestras se mantuvieron a 10 °C hasta extraerlas del termociclador. Una vez obtenido el producto, este se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2.3.4. Separación y visualización de fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% en “buffer” TBE 1X, sembrando 5 µl de reacción junto a un marcador de peso molecular de 100 pb (CienMarker, 50 ng. µl⁻¹, Biodynamics). La electroforesis se realizó a 90 V durante aproximadamente 45 minutos.

Para la tinción del DNA se incluyó GelRed™ (Biotium) directamente a los geles fundidos antes de que se solidificaran, a una concentración de 0,01 µl ml⁻¹. La visualización se realizó con luz UV en un transiluminador ImageQuant 400 (GE Healthcare®) y la imagen resultante se capturó con el “software” del equipo (ImageQuant Capture). En algunos casos se determinó la cantidad de ADN presente en las bandas a partir de la imagen digitalizada utilizando el “software” ImageQuant TL (versión 2005). Este “software” permite realizar la cuantificación mediante el cálculo de

la intensidad de las distintas bandas y su comparación con el patrón del marcador de peso molecular usado, con bandas de concentración conocida.

Se controló que el tamaño de banda del producto de amplificación coincidiera aproximadamente con el esperado para cada juego de iniciadores y que el control negativo no amplificara.

2.3.5. Purificación de fragmentos amplificados

Los productos de PCR pueden contener restos de nucleótidos y de oligonucleótidos que afectan negativamente la calidad de la secuenciación, por lo que es necesario llevar a cabo un paso de purificación de estos productos, previo a la secuenciación.

Asimismo, en algunas amplificaciones se observó la aparición de bandas no correspondientes al tamaño esperado, por lo que fue necesario aislar el fragmento de interés mediante electroforesis en gel de agarosa y su purificación antes de remitirlo para su secuenciación.

Tanto para la purificación de productos de PCR como de bandas de agarosa se utilizó el kit de extracción "Silica Bead DNA Gel Extraction Kit #K0513" (Fermentas), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante.

2.3.6. Secuenciación

Las secuenciaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Agrobiotecnología de la EEA INTA Balcarce, que dispone de un secuenciador automático MegaBACE (Amersham, Biosciences) de 16 capilares capaz de obtener secuencias de hasta 700 nucleótidos, y en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del CNIA- INTA Castelar, que cuenta con un secuenciador automático de capilares modelo ABI3130XL (Applied Biosystems).

En todos los casos se enviaron 10 μl de reacción de PCR purificada (a una concentración de ADN de aproximadamente $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) y 10 μl de cada uno de los iniciadores a una concentración de 3 μM .

La reacción de secuenciación utilizada fue la siguiente: 4 μl de "premix" de secuenciación (BigDye®), 0,5 μl de los iniciadores "forward" y "reverse", de 1 a 5 μl de ADN (dependiendo de la concentración del mismo en la muestra) y agua hasta completar un volumen final de 10 μl . Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador

térmico MJ Research PTC-100TM, con el siguiente programa: 35 ciclos de: 95 °C (20 seg), 50 °C (15 seg) y 60 °C (1 min), finalizando a 16 °C (5 min).

A fin de comprobar el buen funcionamiento del equipo en cada corrida de secuenciación se incluyó una muestra control. Para confirmar la detección de polimorfismos, todas las muestras se secuenciaron por duplicado a partir de reacciones independientes.

2.3.7. Detección de polimorfismos

Para el análisis de las secuencias se utilizó el software BioEdit (version 5.0.6). Visualmente se determinaron las zonas de mejor calidad de secuencia, descartándose aquellas que presentaban cromatogramas con picos poco claros o algún tipo de interferencia en la lectura. Con las secuencias resultantes se realizaron los alineamientos de las secuencias obtenidas para cada fragmento.

Para la detección de polimorfismos se alinearon las secuencias genómicas y las regiones codificantes de los tres genes candidatos en estudio para las dos subespecies de arroz cultivado, *japonica* e *indica*, extraídas de Genbank. A estas secuencias alineadas se agregaron las obtenidas en la secuenciación. Los alineamientos mencionados se realizaron con el software MEGA versión 4.0.2.

2.4. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos a partir de las observaciones realizadas en el estadio de plántula fueron analizados estadísticamente con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 1999), con la opción de análisis de mediciones repetidas en el tiempo¹. A partir de la información lograda en la evaluación fenotípica se generó una matriz de datos utilizando el valor promedio de las cinco plántulas observadas de cada genotipo y de los tres bloques para las cuatro fechas y se generó, para cada material, un vector de datos con cuatro valores. Con esta matriz se realizó un análisis multivariado (Peña, 2002) de conglomerados utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2010),

¹ $y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \beta_i * \tau_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$

donde β : bloque; τ : tratamiento; γ : fecha; ϵ : error experimental

$i=1, 2, 3$

$j= 1, \dots, 116$

$k=1, \dots, 5$

utilizando la distancia euclídea. Se establecieron arbitrariamente cuatro grupos de líneas según su comportamiento frente a bajas temperaturas.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el ensayo de germinación se utilizó el procedimiento GLM del SAS. Posteriormente se realizó un análisis multivariado utilizando como variable el porcentaje de semillas germinadas con coleoptilos de longitud igual o mayor a 4 mm (corregido por el poder germinativo utilizando el índice I) y, como criterio de clasificación, a las líneas. También en este caso se utilizó la distancia euclídea y se establecieron arbitrariamente cuatro grupos.

Posteriormente se realizó el análisis conjunto de los estadios germinación y plántula. Para poder realizar este análisis, los vectores de cada genotipo correspondientes al análisis de plántulas se transformaron en valores escalares utilizando la fórmula de cálculo del “área bajo la curva de progreso de la enfermedad” (ABCPE)². Empleando este valor y el porcentaje de germinación (corregido) se calculó el coeficiente de correlación de Pearson³.

²ABCPE = $\sum_{i=1}^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] (t_{i+1} - t_i)$; donde Y_i es el valor en la escala de IRRI correspondiente a la i -ésima evaluación; t_i es el tiempo en la i -ésima observación y n el número de evaluaciones.

³ Coeficiente de correlación de Pearson: $r = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X * \sigma_Y}$

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación fenotípica

3.1.1. Estadio de plántula

Se logró obtener plántulas en excelente estado para realizar la evaluación en cámara fría en la EEA INTA Corrientes para la gran mayoría de las líneas. Los genotipos 106, 108, 113 y 118 fueron eliminados del ensayo por presentar problemas de sanidad.

El crecimiento en bandejas al aire libre fue adecuado y el trasplante posterior a los recipientes definitivos no tuvo mayor efecto sobre las plántulas, dado que las mismas se recuperaron completamente a los pocos días de realizado.

Durante la primera evaluación (bloque 1) se presentaron problemas de cortes de energía eléctrica en la EEA Corrientes, lo que produjo aumentos leves de temperatura, de corta duración, dentro de la cámara.

Como resultado del análisis de varianza, tanto el efecto de bloques (fechas de siembra) como de tratamientos (líneas) fueron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$; Tabla II, Apéndice). Los testigos tolerantes y los susceptibles tuvieron, en la fecha final de evaluación, un valor promedio en la escala de IRRI de 1,7 y 7,7 respectivamente, en concordancia con lo esperado. Se detectaron además líneas de comportamiento intermedio entre ambos, de igual comportamiento que los testigos y algunos de comportamiento más extremo (Figura 5).

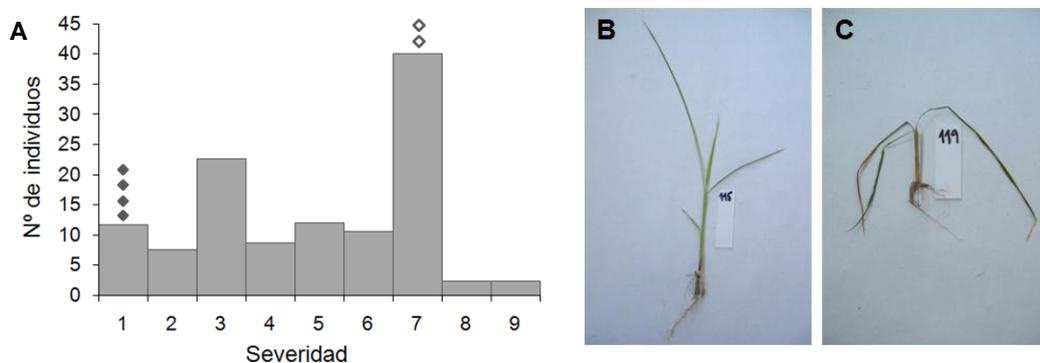


Figura 5. A: Número de líneas por categoría de la escala de severidad de IRRI (1996). ♦ Testigos tolerantes en plántula. ♦ Testigos susceptibles en plántula. **B y C:** Testigos tolerante 115 y susceptible 119 respectivamente, en la fecha final de evaluación.

Se observó un marcado efecto de la temperatura y una tendencia general al aumento en la severidad de síntomas a través del tiempo, como se ve en la Figura 6.

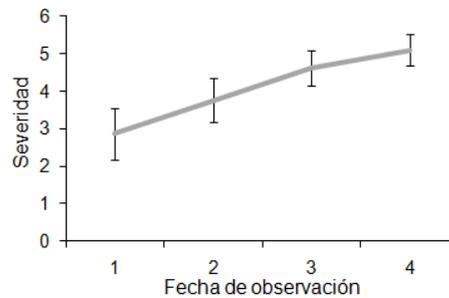


Figura 6. Efecto promedio de la temperatura a través del tiempo en función de los síntomas evaluados con la escala de severidad de síntomas de IRRI (1996). Las barras verticales representan el error estandar.

Se generó una matriz de datos utilizando el valor promedio de las cinco plántulas observadas de cada línea, para las cuatro fechas en los tres bloques. Con dicha matriz se construyeron vectores de datos con cuatro valores (correspondientes a las cuatro fechas de observación), y luego se realizó un análisis multivariado de conglomerados, para el que se definieron previamente cuatro grupos según su tolerancia a frío (Figura 7).

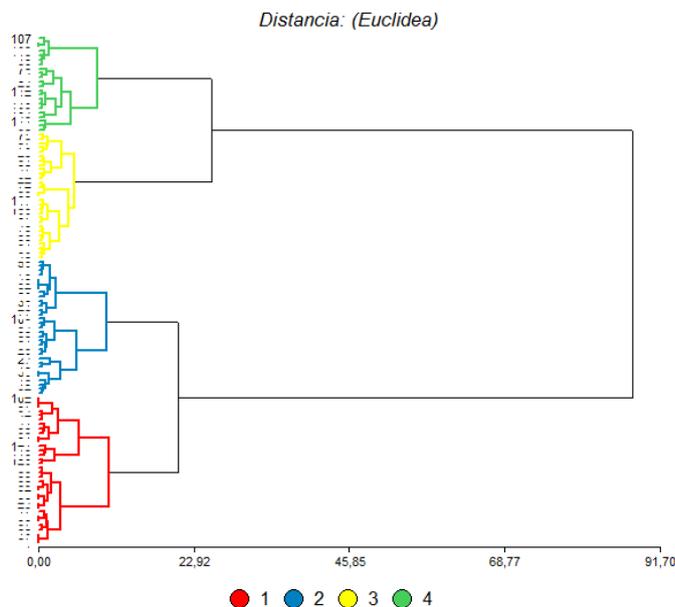


Figura 7. Dendrograma del agrupamiento de los genotipos en el análisis de conglomerados por tolerancia a bajas temperaturas en el estadio de plántula. 1, 2, 3 y 4 representan los cuatro grupos de respuesta a frío.

En la Tabla 5 se muestran los vectores medios para cada uno de los cuatro grupos de tolerancia a frío, y en la Tabla 6 se presenta la matriz de correlación entre las

fechas de observación para dichos vectores, que corrobora la validez de la vectorización.

Tabla 5. Vectores medios (constituidos por cuatro valores correspondientes a las cuatro fechas de observación) de cada uno de los cuatro grupos de tolerancia a frío obtenidos a partir del análisis de conglomerados.

Grupo	Vector medio			
	Fecha 1	Fecha 2	Fecha 3	Fecha 4
1	4,16	5,47	6,10	6,24
2	2,89	4,08	5,47	5,84
3	2,03	2,89	4,08	5,05
4	1,82	2,03	2,58	2,70

Tabla 6. Matriz de correlación entre las cuatro fechas de observación de la respuesta a frío.

	Fecha 1	Fecha 2	Fecha 3	Fecha 4
Fecha 1	1			
Fecha 2	0,98	1		
Fecha 3	0,90	0,96	1	
Fecha 4	0,78	0,88	0,97	1

Con la información de los vectores medios por grupo se estableció la tendencia general de cada grupo a través del tiempo y se definió al grupo 1 como susceptible, al grupo 4 como tolerante y a los grupos 2 y 3 como de respuesta intermedia (Tabla III, Apéndice). Se observó un aumento de la severidad de los síntomas a través del tiempo en los cuatro grupos, aunque en distinta magnitud (Figura 8).

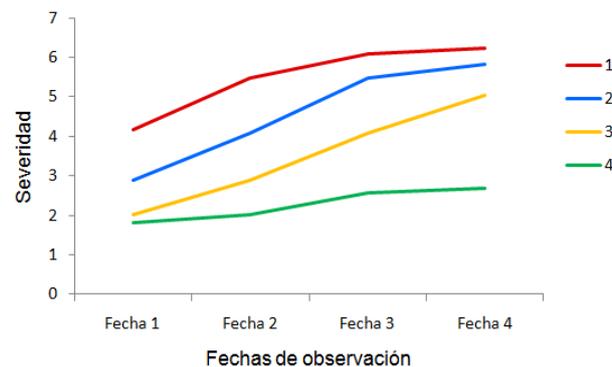


Figura 8. Evolución de la severidad de síntomas según la escala del IRRI (1996) en los cuatro grupos a través del tiempo (valores promedio). Grupos de tolerancia a frío: 1 (susceptible), 2 y 3 (intermedios), 4 (tolerante).

Para realizar el análisis de la variación alélica se seleccionaron las 10 líneas que mostraron las respuestas más contrastantes en la evaluación y que al mismo tiempo

no tenían relación de parentesco. Las líneas seleccionadas como tolerantes fueron 103, 104, 112, 114 y 115, y las seleccionadas como susceptibles fueron 15, 86, 95, 119 y 120 (Tabla 7).

Tabla 7. Genotipos seleccionados para la evaluación genotípica y testigos de evaluación de tolerancia a frío en plántula. Grupo resultante del análisis de conglomerados al que pertenecen, subespecie de origen, vector medio de respuesta a frío en plántula para cada genotipo y valor promedio y desvío estándar de cada grupo.

Genotipo	Grupo	Subespecie	Valor escala de IRR1				Promedio grupo
			Fecha 1	Fecha 2	Fecha 3	Fecha 4	
15	1 (S)	<i>J^{*l}</i>	2,9	4,1	6,7	7,7	6 ±1,4
86	1 (S)	<i>l</i>	3,9	5,3	6,1	7	
95	1 (S)	<i>J^{*l}</i>	5,1	5,8	6,1	6,5	
119	1 (S)	<i>l</i>	6,2	6,7	7	7,7	
120	1 (S)	<i>l</i>	4,1	6,6	7,4	7,8	
103	4 (T)	<i>Jt</i>	1,3	1,3	1,9	2,1	1,9±0,8
104	4 (T)	<i>J</i>	1,7	2,3	2,3	2,3	
105	4 (T)	<i>J</i>	1	1,1	1,4	1,8	
107	4 (T)	<i>J</i>	1	1	1	1,1	
112	4 (T)	<i>J</i>	1,9	2,4	2,6	2,6	
114	4 (T)	<i>J</i>	2,9	3,2	3,6	3,6	
115	4 (T)	<i>J^{*l}</i>	1,1	1,2	1,3	1,5	

l: indica *J*: japonica *Jt*: japonica tropical *J^{*l}*: japonica x indica T: tolerante S: susceptible

Testigos

En la Figura 9 se observa que la diferencia en la respuesta a frío entre genotipos de tipo *indica* y de tipo *japonica* es muy marcada. En cambio, se detectan respuestas contrastantes dentro del grupo de líneas provenientes de cruzamientos *japonica* x *indica*.

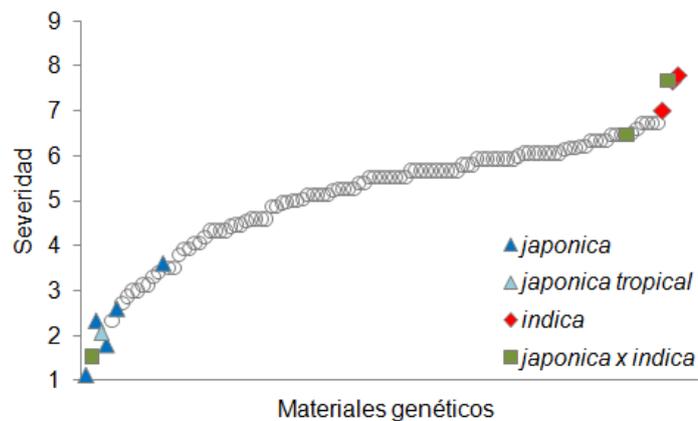


Figura 9. Ordenamiento de 116 líneas endocriadas de arroz según su respuesta en la evaluación fenotípica en el estadio de plántula según la escala de severidad de síntomas de IRR1 (1996). Los símbolos en colores representan a las líneas seleccionadas y testigos (con distinto color según el origen); los círculos vacíos representan a las líneas restantes.

3.1.2. Germinación

En un primer momento la evaluación por tolerancia a frío en germinación se realizó en la EEA INTA Corrientes pero, por problemas técnicos de la cámara, debió repetirse. La segunda experiencia se realizó en la Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA Balcarce – Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP), sin problemas en esta oportunidad.

Se determinó el porcentaje de germinación de cada genotipo al final del ensayo, considerándose germinadas aquellas semillas con coleótilos de 4 mm de longitud o más. Los porcentajes de germinación se corrigieron con los valores de poder germinativo de cada material utilizando el índice I. Estos valores fueron los empleados en el análisis.

Como resultado del análisis de varianza, el efecto de tratamientos (líneas) fue estadísticamente significativo ($p < 0,0001$; Tabla IV, Apéndice). Más del 50% de las líneas no germinó a la temperatura evaluada, aunque se encontraron algunas con buen comportamiento. No se contó con testigos especialmente seleccionados para este estadio. Sin embargo, las líneas utilizadas como testigos susceptibles en plántula no germinaron mientras que la respuesta de las tolerantes fue variable, aunque siempre buena (Figura 10).

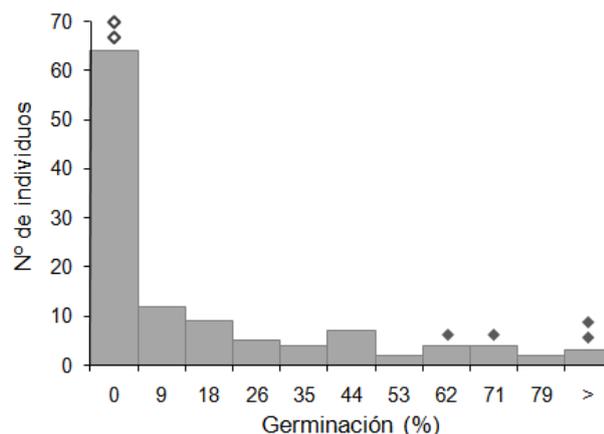


Figura 10. Número de líneas por categoría de porcentaje de germinación en frío. ♦ Testigos tolerantes en plántula; ♦ Testigos susceptibles en plántula.

Con los datos de porcentaje de germinación (corregido) obtenidos se realizó un análisis estadístico de conglomerados (Figura 11). Siguiendo una metodología similar a la utilizada para el análisis de la tolerancia a frío en el estadio de plántula, para cada

uno de estos grupos se determinaron los valores medios (Tabla 8). Se definió al grupo 1 como el correspondiente a las líneas susceptibles y al 4 como el grupo con mejor respuesta. Los grupos 2 y 3 mostraron respuestas intermedias.

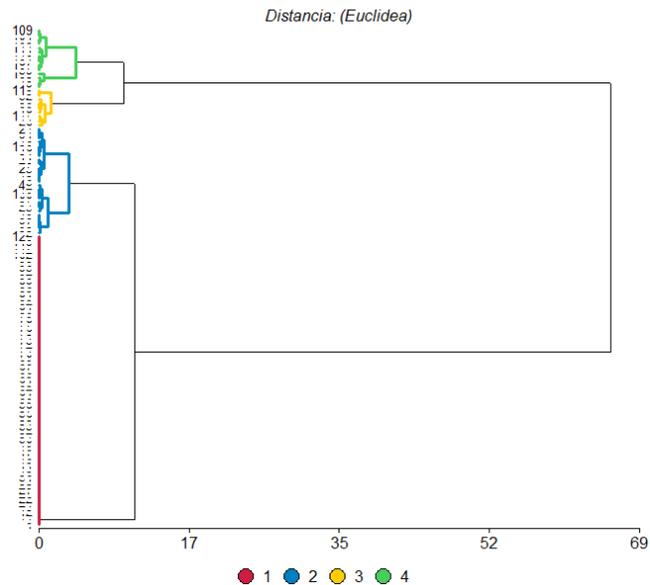


Figura 11. Dendrograma del agrupamiento de los genotipos en el análisis de conglomerados por tolerancia a bajas temperaturas en germinación. Grupos de tolerancia a frío: 1 (susceptible), 2 y 3 (intermedios), 4 (tolerante).

Tabla 8. Porcentaje de germinación promedio para cada uno de los cuatro grupos obtenidos a partir del análisis de conglomerados.

Grupo	Germinación (%)
1	0
2	10
3	39
4	69

3.1.1. Análisis conjunto plántula-germinación

Se realizó un análisis de correlación entre los datos obtenidos en la evaluación en el estadio de plántula y aquellos resultantes de la etapa de germinación. No se encontró correlación ($r = -0,11$) entre las respuestas obtenidas en estos dos estadios analizados (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson entre el valor de ABCPE (respuesta en plántula) y el % de germinación.

	Germinación	Plántula
Germinación	1	0,25 ^b
Plántula	-0,11 ^a	1

a: coeficiente de correlación; b: valor p

Se determinó la ubicación de los diez genotipos que habían sido seleccionados para el análisis genotípico (es decir, aquellos más contrastantes en el estadio de plántula) en los grupos generados a partir del análisis de conglomerados de la respuesta a frío en la etapa de germinación (Tabla 10).

Tabla 10. Ubicación de las líneas seleccionadas para el análisis genotípico en los grupos formados a partir de los análisis de conglomerados realizados con los resultados de las evaluaciones en los estadios de germinación y plántula.

Respuesta a frío en plántula	Genotipo	Grupo	
		Germinación	Plántula
Susceptibles	15	2	1
	86	1	1
	95	2	1
	119	1	1
	120	1	1
Tolerantes	103	4	4
	104	4	4
	112	1	4
	114	4	4
	115	3	4
	105	4	4
	107	4	4

Referencias: 1 susceptibles, 4 tolerantes, 2 y 3 comportamiento intermedio.

■ Testigos tolerantes y susceptibles en el estadio de plántula.

3.2. Evaluación genotípica

3.2.1. Extracción de ADN

La extracción fue exitosa para las 116 líneas, dado que se obtuvo ADN en cantidad suficiente y de buena calidad en todos los casos. La concentración de ADN obtenida osciló entre 39,6 y 237,4 ng ul⁻¹.

3.2.2. Amplificación de fragmentos por PCR

Se comenzó poniendo a punto las reacciones de PCR ya que se desconocían las condiciones óptimas para la correcta amplificación de cada uno de los diez pares de iniciadores empleados. Inicialmente se trabajó sólo con los genotipos 15, 114 y 115. Se probaron distintas concentraciones de reactivos y condiciones de reacción, y en algunos casos fue necesario rediseñar iniciadores hasta determinar las condiciones de trabajo óptimas.

Ocho de los diez pares de iniciadores utilizados permitieron obtener amplificaciones exitosas en todos los genotipos en estudio. Para el genotipo 95 no se logró la amplificación del fragmento 2 del gen *OsGSTZ1* ni del fragmento 1 del gen *OsGSTZ2* (Tabla 11).

Tabla 11. Detalle de las amplificaciones logradas con los diez pares de iniciadores diseñados, en los 10 genotipos en estudio.

Gen	Fragmento	Genotipos									
		15	86	95	103	104	112	114	115	119	120
<i>OsGSTZ1</i>	P1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	P2	x	x	0	x	x	x	x	x	x	x
	P3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>OsGSTZ2</i>	P4	x	x	0	x	x	x	x	x	x	x
	P5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	P6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>OsCDPK13</i>	P7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	P8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	P9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	P10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

x: amplificación positiva; 0: sin amplificación

La cantidad de producto de PCR obtenido fue muy variable entre pares de iniciadores y al mismo tiempo también hubo diferencias en este aspecto entre genotipos para un mismo fragmento.

En todos los casos se sembró para la corrida electroforética, junto a las muestras en evaluación, un control negativo que consistió en la misma mezcla de reacción empleada con las muestras pero sin ADN, lo que permitió controlar que no se produjeran falsos positivos y errores en la interpretación por contaminación de alguno de los reactivos empleados. Se agregó además en algunos casos una muestra extra (denominada N) a la corrida, correspondiente a la variedad Nipponbare. Esta variedad intentó usarse como control positivo, ya que los iniciadores se diseñaron en base a su secuencia genómica, depositada en Genbank. Dado que se disponía solamente de unas pocas semillas, y que no se logró que germinaran, se extrajo ADN a partir de la semilla remanente empleando un método diferente de extracción. Si bien se esperaba obtener productos de PCR a partir de este genotipo, la muestra no amplificó en ningún caso, probablemente debido a problemas de calidad del ADN (Figura 12).

Para el fragmento número uno del gen *OsGSTZ1* (P1) se observó en todos los genotipos una banda nítida del tamaño esperado (~1310 pb) y una segunda banda, menos intensa, de menor peso molecular. Para el segundo fragmento de este gen (P2) se observó una banda única de aproximadamente 930 pb como se esperaba, pero en este caso la intensidad de las mismas varió entre genotipos. Para la amplificación del fragmento número tres (P3) fue necesario cambiar la alícuota de trabajo de los iniciadores, ya que aparentemente la que se venía empleando para las distintas pruebas se había degradado y no se había observado amplificación en ningún genotipo. Realizada esta modificación, todos presentaron una banda única del tamaño esperado (~1080 pb) a excepción del genotipo 95, que no amplificó.

En el primer fragmento del gen *OsGSTZ2* (P4) se observó la banda de interés (~1120 pb) con distinta intensidad según el genotipo, y también la presencia de una segunda banda de menor peso molecular (Figura 12). En el segundo fragmento de este gen (P5) la amplificación fue exitosa con todos los genotipos, con bandas de tamaño esperado (~1080 pb) aunque de menor intensidad que para el resto de los iniciadores. Asimismo, para este fragmento se observó la presencia de una segunda banda muy tenue y de menor peso molecular. Para el tercer fragmento de este gen (P6) las bandas obtenidas fueron del peso esperado (~850 pb) y presentaron una gran cantidad de ADN en todos los casos.

Se obtuvo buena amplificación para los cuatro fragmentos del gen *OsCDPK13*. Para el cuarto fragmento de este gen (P10) se observó la presencia de la banda de interés (~1300 pb) y de una segunda banda de menor peso molecular.

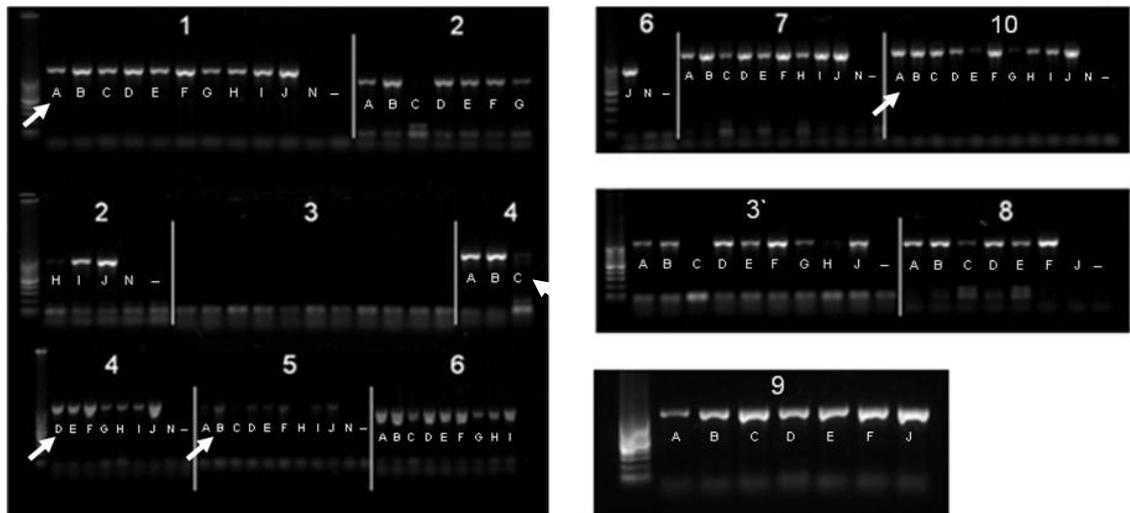


Figura 12. Reacciones de amplificación realizadas con los diez pares de iniciadores en estudio. **1, 2 y 3** muestran los resultados para los tres fragmentos del gen *OsGSTZ1*, **3'** corresponde a la repetición del tercer fragmento de este gen con una nueva alícuota de iniciadores. **4, 5 y 6** muestran las amplificaciones para los tres fragmentos del gen *OsGSTZ2*. En **7, 8, 9 y 10** se muestran los resultados para los cuatro fragmentos del gen *OsCDPK13*. Las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J representan a los genotipos 15, 86, 95, 103, 104, 112, 114, 115, 119 y 120 respectivamente, N corresponde a un genotipo diferente de los evaluados y (-) al control negativo de la reacción. Las flechas blancas señalan bandas de menor peso molecular al esperado.

3.2.3. Purificación de fragmentos amplificados

A fin de poder aislar las bandas de interés para su posterior secuenciación, se realizó la purificación de bandas de geles de agarosa en aquellos casos en que se observó más de una banda. Asimismo, los productos de PCR pueden contener restos de nucleótidos y de oligonucleótidos que afectan negativamente la secuenciación por lo que también fue necesario llevar a cabo un paso de purificación de estos productos.

La purificación fue exitosa en todos los casos (Figura 13). Cuando el proceso se realizó a partir de los geles de agarosa se eliminaron de las muestras los dímeros de iniciadores y las bandas de tamaño diferente al esperado ya que se trabajó solamente con la banda de interés. La pérdida de ADN propia del proceso de purificación fue mayor cuando ésta se realizó a partir del corte de bandas de los geles de agarosa. Como en algunos casos la cantidad inicial de ADN era baja fue necesario repetir la reacción de PCR y el procedimiento completo para obtener el volumen necesario para

la secuenciación. No fue posible repetir la reacción de PCR para el segundo fragmento del gen *OsGSTZ1* (P2) con el genotipo 115, ni para los dos primeros fragmentos del gen *OsGSTZ2* (P4 y P5 respectivamente) con el genotipo 95, así como tampoco lograron re-amplificarse el tercer y cuarto fragmento del gen *OsCDPK13* (P9 y P10) para los genotipos 115 y 104, respectivamente.



Figura 13. Ejemplo de control del proceso de purificación mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% para los genotipos 15 y 86 en los diez fragmentos en estudio. Los números corresponden a los distintos fragmentos de los tres genes. Se puede confirmar que el peso de las bandas es el correcto en cada fragmento.

3.2.4. Secuenciación

Para la secuenciación se envió a los laboratorios de la EEA Balcarce e INTA Castelar el ADN purificado directamente a partir de reacciones de PCR o de geles de agarosa, y 10 µl de cada uno de los iniciadores junto con las especificaciones de los mismos. En algunos casos la concentración del ADN enviada fue inferior a la recomendada (Figura 14).

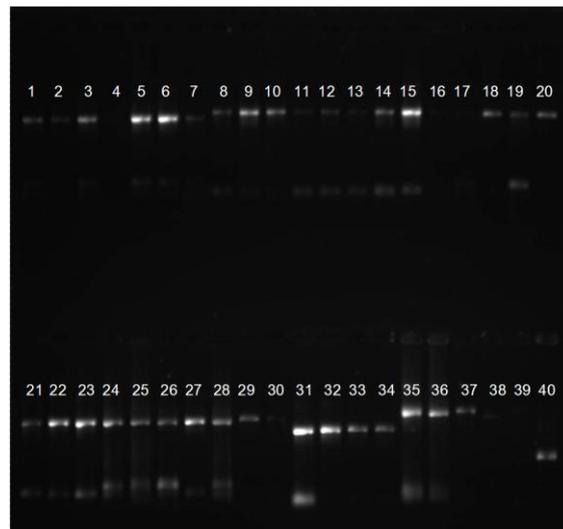


Figura 14. Cuantificación de ADN de las primeras muestras enviadas para su secuenciación. La calle 40 corresponde al control de cantidad de ADN. **1 a 7** muestran las amplificaciones de los genotipos 15, 86, 95, 103, 104, 112 y 114 para el fragmento P2; **8 a 15:** genotipos 86, 95, 103, 104, 112, 114, 119 y 120 para P3; **16 a 21:** 86, 95, 103, 112, 114 y 115 para P8; **22 a 28:** 86, 95, 104, 112, 114, 119 y 120 para P9; **29 y 30:** 114 y 115 para P5; **31 a 34:** 112, 114, 119, 120 para P6; **35 y 36:** 112 y 114 para P7 y **37 a 39:** 115 para P1, P4 y P10.

La secuenciación se realizó por duplicado para confirmar los resultados obtenidos. La calidad de las secuencias logradas fue muy variable y no siempre buena, por lo que se decidió continuar trabajando únicamente con aquellos fragmentos que contaran con dos cromatogramas de lectura clara, con picos de fluorescencia únicos (Tabla 12).

Tabla 12. Combinación de genotipos e iniciadores enviados a secuenciar y secuencias con dos copias consideradas de buena calidad, finalmente alineadas.

Gen	Fragmento	Genotipos									
		15	86	95	103	104	112	114	115	119	120
OsGSTZ1	P1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	P2	X	X	0	X	X	X	X	0	X	X
	P3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OsGSTZ2	P4	X	X	0	X	X	X	X	X	X	X
	P5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	P6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OsCDPK13	P7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	P8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	P9	X	X	X	X	X	X	X	0	X	X
	P10	X	X	X	X	0	X	X	X	X	X

Referencias: x: muestras enviadas a secuenciar; 0: muestras sin enviar; fragmento con dos muestras independientes de buena calidad

La longitud de las secuencias fue muy variable entre las muestras, logrando en algunos casos cubrir el fragmento completo y en otros solamente una parte del mismo. En todos los casos se descartaron los extremos de baja calidad para cada secuencia.

No se pudo asociar la mala calidad de algunas muestras a ningún factor particular como presencia de dímeros de iniciadores, cantidad de ADN, proceso de purificación o calidad de la reacción de secuenciación (Figura 15).

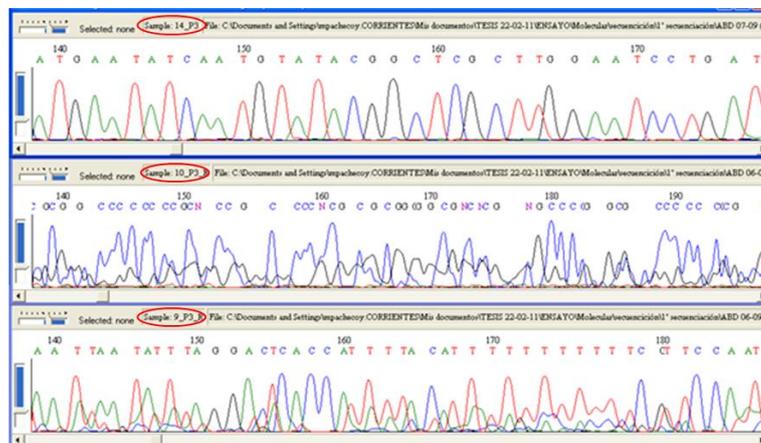


Figura 15. Resultados de secuenciación. Ejemplo de cromatogramas de diferente calidad para tres genotipos (119, 103 y 95, de las muestras 14, 10 y 9 respectivamente en la Figura 14) de un mismo fragmento (P3). En los tres casos la cantidad de ADN en las muestras fue similar

3.2.5. Alineamientos y detección de polimorfismos

Para cada uno de los fragmentos de los tres genes de interés se alinearon las secuencias obtenidas junto con las correspondientes secuencias genómicas y regiones codificantes de las dos subespecies cultivadas de arroz, *japonica* e *indica*. Además se posicionó a los iniciadores para cada fragmento. El número de individuos analizados para cada fragmento fue variable (Tabla 12) al igual que la longitud de secuencia obtenida para los distintos genotipos estudiados (Figura 16).

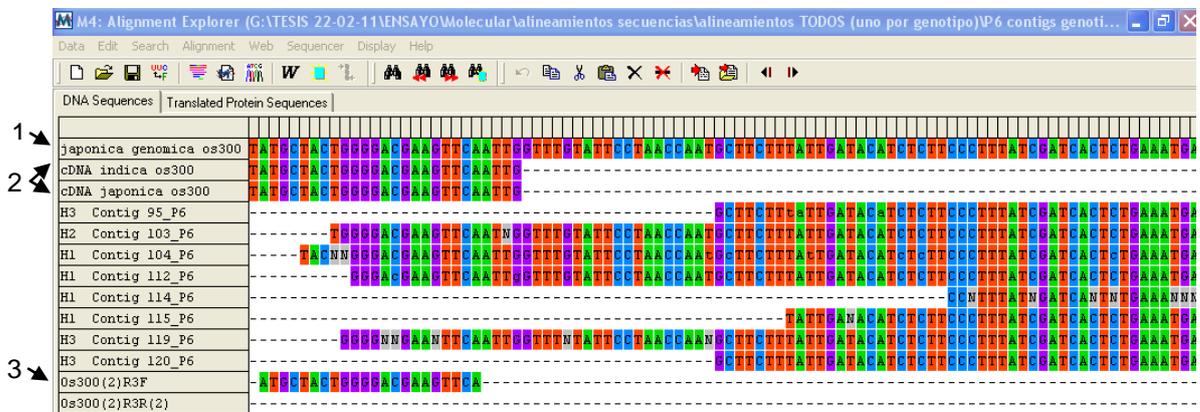


Figura 16. Resultado del alineamiento realizado utilizando el software MEGA para el tercer fragmento del gen *OsGSTZ2* (P6). Puede observarse que no todas las secuencias comienzan en la misma posición. **1** señala la secuencia de ADN genómico empleada como referencia para los alineamientos y **2** las secuencias codificantes de *Oryza sativa* ssp *indica* y *japonica* respectivamente. **3** muestra la ubicación del iniciador “forward” correspondiente al fragmento P6.

En cada fragmento estudiado se examinaron las zonas secuenciadas comunes a los genotipos evaluados en cada caso y se analizó la densidad de polimorfismos de nucleótido simple (“Single Nucleotide Polymorphisms” o SNPs) e inserciones/delecciones (“indels”). Las variaciones de secuencia detectadas con el software MEGA se corroboraron mediante la observación de los picos de fluorescencia en los cromatogramas correspondientes. Se consideraron polimórficos sólo aquellos sitios de lectura clara, con picos sin interferencias o “ruido” (Figura 17).

Se encontró un total de 34 regiones polimórficas en los tres genes: diez de ellas en el gen *OsGSTZ1*, nueve en *OsGSTZ2* y 16 en *OsCDPK13*. Se determinó la ubicación de los polimorfismos encontrados en intrones y exones (Tabla 13).

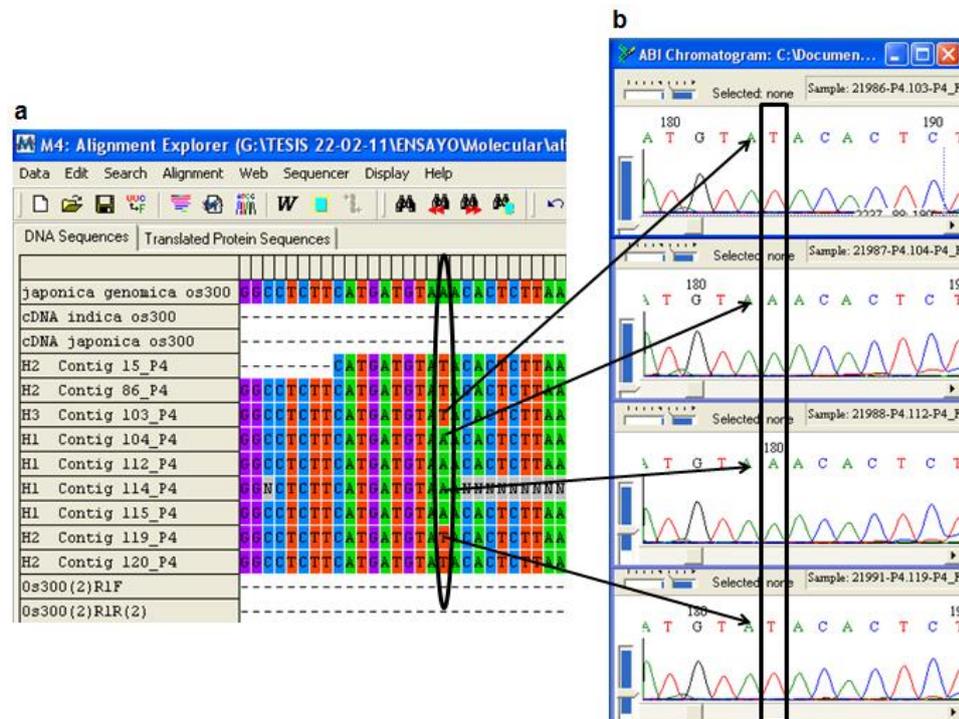


Figura 17. Detección de polimorfismos. **a:** SNP detectado en un alineamiento de secuencias para el fragmento P4 con los genotipos 15, 86, 95, 103, 104, 112, 114, 115, 119 y 120. **b:** Visualización de los cromatogramas correspondientes a los genotipos 103, 104, 112 y 119 para dicho polimorfismo.

Se hallaron en los tres genes 28 SNPs y 6 indels (Tablas 14 y 15). Entre los polimorfismos identificados se encontraron 8 SNPs (denominados 9, 11, 12, 13, 15, 19, 27 y 28 en la Tabla 14) que separaron a las líneas en susceptibles y tolerantes al igual que un indel (denominado 4 en la Tabla 15). Dos de los mencionados SNPs se localizaron en exones (SNPs 9 y 13), uno se ubicó en la región no traducida 3' (SNP 28) y tanto los SNPs restantes como el indel se localizaron en intrones.

Tabla 13. Número de SNPs e indels detectados en los fragmentos de los genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* en algunos de las líneas en estudio. Entre paréntesis se indica la densidad de SNPs e indels en cada región secuenciada.

Gen	Fragmento			Longitud del fragmento secuenciado			N° individuos analizados	SNPs		Indels	
	Número	Designación	Longitud	Total	Intrón	Exón		Intrón	Exón	Intrón	Exón
<i>OsGSTZ1</i>	1	P1	1314	1210	1167	43	7	2 (1/22)	0	0	0
	2	P2	936	481	351	130	2	1	0	2 (1/176)	0
	3	P3	1081	971	541	430	7	3 (1/180)	1	0	0
<i>OsGSTZ2</i>	1	P4	1126	1026	922	104	9	1	1	0	0
	2	P5	1085	895	693	202	3	3 (1/231)	1	0	0
	3	P6	857	849	431	418	8	2 (1/213)	1	0	0
<i>OsCDPK13</i>	1	P7	1263	1034	108	926	3	0	2 (1/463)	0	1
	2	P8	1012	965	364	601	9	1 (1/364)	0	1	0
	3	P9	1039	841	518	323	5	5 (1/104)	2 (1/162)	2 (1/259)	0
	4	P10	1308	1160	581	579	3	1	1	0	0

Tabla 14. SNPs detectados en los tres genes en estudio para los genotipos analizados, separados en tolerantes y susceptibles a frío en plántula. Los números en la parte superior de la tabla identifican los diferentes SNPs encontrados. Para cada uno de ellos, diferencias en color indican bases distintas.

		SNPs																												
Genotipos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Susceptibles	15			T					T	G								A	T									T	A	
	86			T	G	C	C	G	T	G	T	C	A	G				G	A	T								T	A	
	95				G	C	T	G							G	G	T			T	A	C	G	T	C	T	G			
	119	C	G		G	C	C	G	T	G					G	G	T			T	G	A	A	C	T	C	G			
	120	C	G		A	T	C	G	T	G					G	G	T			T	G	A	A	C	C	C	G			
Tolerantes	103	A	G		G	T	C	G	T	A					G	T	T			A										
	104	C	A		G	C	T	G	A	A					A	T	A			A	A	C	G	T	C	T	G			
	112	C	G		G	C	T	A	A	A					A	T	A			A	A	C	G	T	C	T	T			
	114	C	G						A	A	G	T	G	A	A	T	A			A	A	A								
	115	C	G						A	A	G	T	G	A	A	T	A				A							C	G	
		I	I	I	I	I	I	E	I	E	I	I	I	E	I	I	E	E	E	I	I	I	I	I	I	I	E	E	I	utr 3'
		OsGSTZ1							OsGSTZ2									OsCDPK13												

I: intrón; E: exón; ■ sin dato; utr 3': región no traducida 3'

Tabla 15. Indels detectados en los genes en estudio para los genotipos analizados. Los números en la parte superior identifican los diferentes indels encontrados. Diferencias en color indican presencia o ausencia del indel. No se detectaron indels en el gen *OsGSTZ2*.

Genotipos		Indels					
		1	2	3	4	5	6
Susceptibles	15	T	C				
	86	-	C	TATGCCAGCT	-		
	95			TATGCCAGCT	-	T	T
	119			TATGCCAGCT	C	-	-
	120			TATGCCAGCT		-	-
Tolerantes	103			-	-		
	104			-	-	T	-
	112			-	-	-	-
	114			-	-		
	115			-	-		
		I	I	I	E	I	I
		<i>OsGSTZ1</i>			<i>OsCDPK13</i>		

I: intrón; E: exón; ■ sin dato.

Para el caso de los SNPs detectados en exones, se determinó la ubicación de la base polimórfica en el triplete de nucleótidos (codón) y se realizó la traducción de la región de ADN codificante a proteína a fin de determinar el tipo de cambio producido.

El SNP 9 corresponde a un cambio de adenina por guanina (A>G) en la tercera posición del codón que codifica el aminoácido treonina (ACU, ACC, ACA, ACG). En la treonina esta posición es cuatro veces degenerada ya que todas las sustituciones de nucleótidos en este lugar son sinónimas, es decir, no varían el aminoácido.

El SNP 13 corresponde también a un cambio A>G, pero en este caso en la primera base de un codón (ATA en la secuencia de referencia de *O. sativa ssp. japonica* en Genbank). Este codón codifica el aminoácido isoleucina, en tanto que el codón GTA codifica el aminoácido valina, de propiedades similares (Tabla 16).

Tabla 16. Descripción de los cambios producidos por los SNPs 9 y 13 en el gen *OsGSTZ2*. Variación en la secuencia de ADN, posición de la sustitución en el codón, tipo de mutación y su efecto y tipo de aminoácido resultante.

SNP	Secuencias	Mutación			Aminoácido	Tipo
		Posición	Tipo	Efecto		
9	AACAGAT	3º	Transición	Silenciosa	Treonina	Polar
	AACGGAT				Treonina	Polar
13	AACATAG	1º	Transición	Sin efecto	Isoleucina	Apolar
	AACGTAG				Valina	Apolar

4. DISCUSIÓN

A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados en el mundo para la evaluación de la tolerancia a frío en estadios tempranos del desarrollo en arroz, los resultados obtenidos son difíciles de comparar debido a las diferencias en las metodologías de evaluación empleadas y a la complejidad de los síntomas causados por este estrés. En el presente trabajo se utilizaron 116 líneas endocriadas de origen diverso y se empleó el método de evaluación propuesto por Andaya y Tai (2006) para la evaluación en el estadio de plántula. Las principales razones de la elección de este protocolo de evaluación residieron en que el mismo demostró una gran efectividad en la clasificación de los materiales, además de que fue el método que permitió realizar el mapeo fino de un QTL y la consecuente identificación de los genes candidatos estudiados en este trabajo. Más aún, Kim y Tai (2011) realizaron la comparación de esta metodología de evaluación visual con la determinación de una serie de variables fisiológicas asociadas a la respuesta a frío y hallaron una fuerte correlación positiva entre ambos, lo que otorga validez a la metodología empleada. La posibilidad de evaluar la capacidad de recuperación de las líneas en una etapa posterior al tratamiento de bajas temperaturas, lo que según Lou *et al.* (2007) es un indicador importante de la tolerancia al frío, se vio limitada por la falta de equipamiento adecuado para tal fin.

En algunas líneas se observaron síntomas de daño por frío en plántula desde la primera fecha de observación. Los síntomas visuales que aparecieron en primer lugar fueron enrollamiento de hojas y leve pérdida de la coloración, al igual que lo observado por Lou *et al.* (2007). Avanzadas las observaciones, marchitamiento y necrosis fueron los síntomas visuales predominantes, tal como describieron Andaya y Mackill (2003), Andaya y Tai (2006) y Kim y Tai (2011) en experimentos similares al llevado a cabo en este trabajo.

Los testigos tolerantes y los susceptibles tuvieron, en la fecha final de evaluación, un valor promedio en la escala de IRRI (1996; Tabla 3) de 1,7 ($\pm 0,5$) y 7,7 ($\pm 0,05$) respectivamente. Estos valores son muy similares a los encontrados por Andaya y Mackill (2003) y Andaya y Tai (2006, 2007) en los testigos M202 e IR50. Esto indica que la elección de los testigos empleados en el presente trabajo fue acertada.

La susceptibilidad de los genotipos 119 y 120 (testigos susceptibles) fue evidente ya que los mismos presentaron valores en la escala de IRRI superiores a 5 (baja tolerancia) desde la primera fecha de observación (a los 8 días), mientras que los

testigos tolerantes se mantuvieron en valores inferiores a 3 hasta el final de la evaluación.

En este estudio se detectaron materiales genéticos en todos los niveles de la escala de severidad de síntomas de IRRI, incluyendo líneas de comportamiento más extremo que los testigos. Esto pone de manifiesto la existencia de una amplia variabilidad para la tolerancia a frío en plántula en el programa de mejoramiento genético de la EEA Corrientes, al menos bajo las condiciones experimentales utilizadas en el trabajo.

También se detectó variabilidad en la respuesta de las líneas en estudio en la etapa de germinación de semillas, si bien su magnitud fue menor a la observada en el estadio de plántula. Las líneas utilizadas como testigos susceptibles en plántula no germinaron cuando se expusieron a bajas temperaturas, mientras que la respuesta de los testigos tolerantes en plántula fue variable, aunque siempre buena (> 60% de germinación). Esta asociación positiva entre las respuestas observadas en ambas etapas de evaluación para los testigos no se extendió en general al resto de las líneas evaluadas. En arroz se ha observado un amplio rango de variación en cuanto a la tolerancia a bajas temperaturas en diferentes estadios de desarrollo (IRRI, 1979; Mackill; Lei, 1997; Zhang *et al.*, 2005). La falta de correlación encontrada entre los estadios de germinación y plántula concuerda con lo hallado por Zhang *et al.* (2005) y Jiang *et al.* (2008). Al igual que muchas otras características relacionadas con distintos tipos de estrés, la tolerancia al frío es regulada por el estado de desarrollo de la planta, por lo que las bases genéticas para este carácter pueden diferir, al menos en parte, entre los distintos estadios (Andaya; Mackill, 2003; Baruah *et al.*, 2009). Es decir, la tolerancia a frío en un estadio no estaría necesariamente correlacionada con la de un estadio diferente (Fooland; Lin, 2001).

Las líneas empleadas como testigos y las seleccionadas para la evaluación genotípica mostraron, en general, una respuesta en la tolerancia a frío en plántula que se relacionó con la subespecie a la que pertenecen (Tabla 7). Esto concuerda con lo expresado por Kato *et al.* (1928) y posteriormente confirmado por numerosos autores (Kaneda; Beachell, 1973; Glaszman *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992; Ni *et al.*, 2002; Andaya; Mackill, 2003; Garris *et al.*, 2005; Andaya; Tai, 2006, 2007; Cai *et al.*, 2007; Vaughan *et al.*, 2008; Ikehashi, 2009; Kim; Tai, 2011), quienes detectaron que la tolerancia a frío difiere marcadamente entre materiales cultivados del tipo *indica* y aquellos del tipo *japonica*. Los genotipos provenientes de cruzamientos *indica* x *japonica* no mostraron un patrón definido de respuesta (Tabla 7).

Dentro del grupo de las líneas consideradas tolerantes se encontró un genotipo *japonica tropical* (*Jt*). Si bien las variedades del tipo *japonica tropical* muestran generalmente una respuesta intermedia entre las de tipo *japonica templada* e *indica* (Garris *et al.*, 2005), Mackill y Lei (1997) no encontraron diferencias apreciables en cuanto a la tolerancia al frío en el estadio de plántula entre genotipos del tipo *japonica tropical* y *templada*. A pesar de su asociación con ambientes tropicales, las variedades *japonica tropical* poseen muchas de las características relativas a la adaptación a bajas temperaturas de las de tipo templado (Mackill; Lei, 1997). En este mismo sentido, Kim y Tai (2011) realizaron una comparación de varios parámetros de tolerancia a frío en materiales tipo *indica*, *japonica tropical* y *japonica templada* y determinaron que, en este estadio, la respuesta es esencialmente la misma en los dos subgrupos del tipo *japonica*. Muchos trabajos sostienen que las diferencias entre *indica* y *japonica* también se manifiestan en la etapa de germinación. Así, varios estudios (Glaszman *et al.*, 1990; Cruz; Milach, 1999, 2004; Baruah *et al.*, 2009) indican que la germinación a bajas temperaturas es menor en las variedades de tipo *indica* que en las de tipo *japonica*.

Entre las líneas seleccionadas para el análisis genotípico y los testigos de tolerancia en plántula, los porcentajes de germinación más altos los presentaron los genotipos de origen *japonica*, mientras que los de origen *indica* no germinaron o lo hicieron en muy bajo porcentaje. Los genotipos provenientes de cruzamientos *japonica* x *indica* presentaron una respuesta intermedia. El genotipo 112, tipo *japonica*, se comportó de manera opuesta (Tabla 10) al resto de las líneas del mismo origen, ya que tuvo 0% de germinación. Esto podría deberse a que entre los genotipos de esta subespecie se encuentran materiales menos tolerantes en esta etapa, tal como lo demuestran Fujino *et al.* (2004) quienes evaluaron 122 BILs provenientes del cruzamiento de dos materiales tipo *japonica* y encontraron como resultado valores de germinación entre 0 y 100%.

En el presente estudio se realizó la secuenciación de fragmentos de los genes candidatos *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* en las líneas seleccionadas como más contrastantes para la tolerancia a frío en el estadio de plántula, con el fin de analizar su variación alélica y determinar el grado de asociación de esta variación con el fenotipo.

Se identificaron polimorfismos (tanto SNPs como indels) en los tres genes analizados. La densidad de SNPs encontrados en cada uno de ellos varió ligeramente. Se detectaron 2,6, 3,2 y 3 SNPs por kb para los genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y

OsCDPK13 respectivamente. Estos valores son superiores a los encontrados por Feltus *et al.* (2004) y McNally *et al.* (2009) (1,7 SNPs por kb), quienes compararon, respectivamente, la secuencia del genoma completo de Nipponbare (*japonica*) con la del cultivar 93-11 de tipo *indica*, y marcadores distribuidos en todo el genoma de 20 cultivares de arroz. Por otra parte, los valores de densidad de SNPs hallados en el presente trabajo son levemente inferiores al reportado por Ebana *et al.* (2010) quienes detectaron 4,87 SNPs por kb a nivel del genoma completo en 140 genotipos de origen diverso. Por otra parte, la densidad de indels detectada en el presente estudio fue 0,75, 0 y 1 indel por kb para los genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* respectivamente. En promedio, lo observado es similar a lo informado por Ebana *et al.* (2010).

Las diferencias en la densidad de SNPs reportadas en los estudios mencionados y en este trabajo pueden tener diverso origen. En general, la densidad de SNPs es mayor en regiones intergénicas que en regiones génicas, por lo que variará según se trate de estudios a nivel del genoma completo o concentrados en regiones codificantes. A su vez, el número de líneas utilizadas en el análisis y su diversidad de origen ejercen influencia en los valores obtenidos. Adicionalmente, en el presente análisis se utilizó un método de inspección de secuencias muy minucioso, y el criterio para la identificación de polimorfismos fue estricto. Debido a esto, muchos polimorfismos aparentes fueron descartados, por lo que pudo haberse subestimado la densidad real de los mismos.

Del total de polimorfismos detectados en el presente estudio (34), nueve (26,5%) separaron a las diez líneas según su respuesta en la evaluación fenotípica. Los únicos polimorfismos detectados en exones fueron dos del tipo SNP y se encontraron en el gen *OsGSTZ2*. En ambos casos la mutación fue A>G, pero solamente uno de ellos - en la base 295 - resultó en un cambio de aminoácido (SNP 13, Tabla 14). Este SNP concuerda con el publicado por Kim *et al.* (2011) quienes afirman que la distribución de este SNP en varios genotipos de arroz se asocia significativamente con la sensibilidad a bajas temperaturas en el estadio de plántula.

Entre las líneas analizadas en el presente trabajo, el alelo G se encontró en una línea susceptible, mientras que la forma A se presentó en dos de las líneas consideradas tolerantes. Kim *et al.* (2011) demostraron que este único cambio de aminoácidos (de isoleucina (Ile⁹⁹) a valina (Val⁹⁹) en la enzima GST, codificada por el gen *OsGSTZ2*) causa una reducción significativa en su actividad catalítica con sustratos conocidos y que el alelo G de este SNP parece estar fuertemente asociado a

la sensibilidad a frío en plántula en arroz, independientemente de la subespecie. Estos resultados son consistentes con trabajos previos que implican a *OsGSTZ2* en la tolerancia al frío en plántulas de arroz (Takesawa *et al.*, 2002; Andaya; Tai, 2006). El otro SNP detectado en este gen y ubicado en un exón no resultó en una variación en la secuencia de aminoácidos (SNP 9 en Tabla 14). Sin embargo, no se descarta que este tipo de sustitución “silente” tenga algún efecto. De hecho, Kimchi-Sarfaty *et al.* (2007) demostraron que este tipo de mutación silente puede alterar la especificidad de la interacción enzima-sustrato.

Un tercer SNP ubicado en la región no traducida 3' del gen *OsCDPK13* separó las líneas en tolerantes y susceptibles. En base a la evidencia presentada por Gandikota *et al.* (2007), quienes demostraron que mutaciones en esta región que involucran sitios de reconocimiento de microARNs pueden alterar la regulación génica, debería realizarse un análisis más detallado de este cambio para establecer si está relacionado con la respuesta a frío.

El resto de los polimorfismos que separaron a las líneas según su fenotipo (un indel y cinco SNPs) se ubicaron en intrones. El indel y un SNP se detectaron en el gen *OsCDPK13*, en tanto que los restantes SNPs se encontraron en el gen *OsGSTZ2*. Aunque en este trabajo no se analizó el efecto de las mutaciones en intrones, es conocido que las mismas pueden afectar la escisión de intrones y, por ende, la estructura del ARNm maduro y su traducción a proteína (Simpson *et al.*, 1996).

Si bien en este trabajo se halló asociación entre la respuesta a frío en plántula y la variación alélica en los genes candidatos para dicho carácter, la misma está circunscripta a unas pocas líneas. Para determinar la existencia de una relación consistente entre el genotipo y el fenotipo sería necesario hacer extensivo el análisis molecular al resto de las líneas evaluadas. Si esta relación se verificara, se dispondría directamente de marcadores perfectos para realizar selección asistida.

La tolerancia a bajas temperaturas en estadios tempranos del desarrollo se ha vuelto un objetivo importante en los programas de mejoramiento genético de arroz en Argentina, ya que es conocida la susceptibilidad de las variedades sembradas localmente y esto limita la posibilidad de maximizar el aprovechamiento de recursos ambientales que se traduciría en mayores rendimientos. Se sabe que para el arroz cultivado, los materiales de tipo *japonica* son los que presentan mejor respuesta a frío. Sin embargo, incorporar este carácter en germoplasma adaptado a las condiciones locales, del tipo *indica*, a partir de cruzamientos con genotipos del tipo *japonica*, implica el arrastre de caracteres indeseables por ligamiento. Por ello, es

especialmente relevante que en el presente trabajo se hayan identificado potenciales fuentes de tolerancia a frío entre las líneas avanzadas del programa de mejoramiento genético, dado que éstas ya han sido seleccionadas por su rendimiento, tipo agronómico y características de calidad para el mercado local.

La evaluación de la tolerancia a frío en condiciones de campo es lenta y dificultosa, ya que está sujeta a la ocurrencia de condiciones ambientales adecuadas para efectuar la selección del material. A partir de este trabajo se cuenta con información novedosa sobre la respuesta de líneas locales de arroz al estrés por bajas temperaturas en estadios iniciales, si bien resta validar a campo los resultados obtenidos en condiciones controladas. Si se confirmara que el buen comportamiento observado en algunas líneas avanzadas del programa de mejoramiento se mantiene en condiciones de campo, se podría lograr rápidamente la obtención de cultivares tolerantes.

5. CONCLUSIONES

- Se cuenta con amplia variabilidad para la tolerancia a bajas temperaturas en estadios tempranos del desarrollo entre las líneas avanzadas del programa de mejoramiento genético de arroz de la EEA INTA Corrientes, si bien resta establecer la asociación entre dicha variabilidad, detectada bajo condiciones controladas, y el comportamiento de las líneas en el campo.
- La tolerancia a bajas temperaturas está controlada genéticamente, al menos en parte, de manera independiente en cada uno de los estadios evaluados (germinación y plántula).
- Existe variación alélica para los tres genes candidatos evaluados en este estudio, al menos en las líneas utilizadas.
- Dicha variación alélica está asociada con el fenotipo de las líneas evaluadas.
- A partir de este trabajo se cuenta con herramientas para generar estrategias de selección en el proceso de mejoramiento genético de la tolerancia a frío en estadios tempranos del desarrollo del cultivo de arroz a nivel local.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABBASI, F.; ONODERA, H.; TOKI, S.; TANAKA, H.; KOMATSU, S.** 2004. *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Molecular Biology*. 55: 541–552.
- AKITA, S.** 1989. Improving yield potential in tropical rice. En: IRRI Progress in irrigated rice research; pp. 41-73.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J.** 1990. "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular. Biology*. 215:403-410.
- ANDAYA, V.C.; MACKILL, D.J.** 2003. Mapping of QTL associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *Journal of Experimental Botany*. 54:2579–2585.
- ANDAYA, V.C.; TAI, T.H.** 2006. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:467–475.
- ANDAYA, V.C.; TAI, T.H.** 2007. Fine mapping of the *qCTS4* locus associated with seedling cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*. 20:349–358.
- BARUAH, A.; ISHIGO-OKA, N.; ADACHI, M.; OGUMA, Y.; TOKIZONO, Y.; ONISHI, K.; SANO, Y.** 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica* 165:459–470.
- BERTIN P.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J.** 1996. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica* 89, 201-210.
- BOYER, J.S.** 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218:443–448.
- CAI, X.X.; LIU, J.; QIU, Y.Q.; ZHAO, W.; SONG, Z.P.; LU, B-R.** 2007. Differentiation of *Indica–Japonica* rice revealed by insertion/deletion (InDel) fragments obtained from the comparative genomic study of DNA sequences between 93–11 (*Indica*) and Nipponbare (*Japonica*). *Frontiers of Biology in China*. 2(3):291–6.
- Companhia Nacional de Abastecimento de Brasil (CONAB).** 2009. Bases de datos estadísticos. [en línea] <<http://www.conab.gov.br>> [consulta: 30-10-10]
- CORREDOR, E; CRUZ, M; BERRÍO L.** 2007. Fitomejoramiento. Actividades sobresalientes 2006-2007; Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR), Colombia; 82 p.

- CRUZ, R.P. da; MILACH, S.C.K.** 1999. Variabilidad genética em arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) para tolerância ao frio durante a germinação. *Genetics and Molecular Biology*, 22 Suppl 699 p.
- CRUZ, R.P. da; MILACH, S.C.K.** 2004. Cold tolerance at the germination stage of rice: Methods of evaluation and characterization of genotypes. *Scientia Agricola*. 61:1–8.
- CRUZ, R.P. da; KOTHE MILACH, S.C.; FEDERIZZI L.C.** 2006. Inheritance of rice cold tolerance at the germination stage. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 314–320.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W.** InfoStat versión 2010 [CD-ROM]. Software estadístico, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- EBANA, K.; YONEMARU, J.; FUKUOKA, S.; IWATA, H.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; NAGASAKI, H.; YANO, M.** 2010. Genetic structure revealed by a whole-genome single-nucleotide polymorphism survey of diverse accessions of cultivated Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 60: 390–397.
- EVANS, L.T.; DE DATTA, S.K.** 1979. The relation between irradiance and grain yield of irrigated rice in the tropics, as influenced by cultivar, nitrogen fertilizer application and month of planting. *Field Crops Research*. 2:1-17.
- FARRELL, T.C.; FOX, K.M.; WILLIAMS, R.L.; FUKAI, S.** 2006. Genotypic variation for cold tolerance during reproductive development in rice: Screening with cold air and cold water. *Field Crops Research* 98:178–194.
- FELTUS, F.A.; WAN, J.; SCHULZE, S.R.; ESTILL, J.C.; JIANG, N.; PATERSON, A.H.** 2004. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Research*. 14: 1812–1819.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2003. Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz. Comisión Internacional del Arroz. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO; Roma, 73 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2004. Año Internacional del Arroz. [en línea] <http://www.fao.org/rice2004/es/index_es.htm> [consulta: 15 enero 2011].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2010. Rice Market Monitor. [en línea] <<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/ricemarket-monitor-rmm/en/>> [consulta: 18 enero 2011].

- FOOLAD, M.R.; LIN, G.Y.** 2001. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Euphytica* 122, 105–111.
- FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H.; SATO, T.; KIUCHI, H.; NONOUE, Y.; TAKEUCHI, Y.; ANDO, T.; LIN, S.Y.; YANO, M.** 2004. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 108:794-799.
- FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H.; MATSUDA, Y.; SUGIMOTO, K.; ONO, K.; YANO, M.** 2008. Molecular identification of a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice. *PNAS* 105(34):12623–12628.
- FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H.** 2011. Origins of functional nucleotide polymorphisms in a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice. *Plant Molecular Biology*. 75:1–10.
- GANDIKOTA, M.; BIRKENBIHL, R.; HÖHMANN, S.; CARDON, G.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P.** 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*. 49 (4):683-693.
- GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; McCOUCH, S.** 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169:1631–1638.
- GLASZMANN, J.C.; KAW, R.N.; KHUSH, G.S.** 1990. Genetic divergence among cold tolerant rices (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 45:95–104.
- GUO, Z.; OU, W.; LU, S.; ZHONG, Q.** 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44:828–836.
- HALL, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- HAN, L.; QIAO, Y.; CAO, G.; ZHANG, Y.; AN, Y.; YE, J.; KOH, H.** 2004. QTLs analysis of cold tolerance during early growth period for rice. *Rice Science* 11:245–250
- HAYMES, K. M.** 1996. *Mini-prep method suitable for a plant breeding program*. *Plant Molecular Biology*., Rep 14 (3), 280-284.
- HUANG, M.; GUO, Z.** 2005. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum*. 49:81–84.
- IKEHASHI, H.** 2009. Why are There *Indica* Type and *Japonica* Type in Rice? History of the Studies and a View for Origin of Two Types. *Rice Science*.16(1): 1–13.

- International Rice Research Institute (IRRI).** 1996. Standard evaluation system for rice, 4th edition. The International Network for Genetic Evaluation of Rice (INGER), the International Rice Testing program (IRTP), Philippines; 52 p.
- ISLAM, M.S.; MORISON, J.I.L.** 1992. Influence of solar radiation and temperature on irrigated rice grain in Bangladesh. *Field Crops Research*. 30 pp. 13–28.
- JENA K.K.; MACKILL D.J.** 2008. Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. *Crop Science*. 48:1266-1276.
- JI, Z.; ZENG, Y.; ZENG, D.; MA, L.; LI, X.; LIU, B.; YANG, C.** 2010. QTL for rice cold tolerance identified at plumule and 3-leaf-seedling stage using qtlnetwork software. *Rice Science*. 17(4).
- JIANG, L.; XUN, M.M.; WANG, J.L.; WAN, J.M.** 2008. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. *Journal of Cereal Science*. 48: 173–179.
- KANEDA, C.; BEACHELL, H.M.** 1974. Response of *indica-japonica* rice hybrids to low temperatures. *SABRAO J* 6:17–32.
- KATO, S.; KOSAKA, H.; HARA, S.** 1928. On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of hybrid plants. *Gakugeizasshi* 3: 132–147.
- KHUSH, G.S.** 1999. Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome*. 42:646–655.
- KHUSH, G.S.** 2005. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*. 59:1–6.
- KIM, K.M.; SOHN, J.K.; CHUNG, I.K.** 2000. Analysis of OTP8511 RAPD fragments closely linked with cold sensitivity at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Cell*. 10:382–385.
- KIM, S-I.; TAI, T.H.** 2011. Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. *Euphytica*. 178(3):437-447.
- KIM, S-I.; ANDAYA, V.C.; TAI T.H.** 2011. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring Ile99Val mutation in the multifunctional glutathione transferase isozyme GSTZ2. *Biochemical Journal*. 435: 373–380.
- KIMCHI-SARFATY, C.; OH, J.; KIM, I-W; SAUNA, Z.E.; CALCAGNO, A.M.; AMBUDKAR, S.; GOTTESMAN, M.M.** 2007. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 315:525-527.

- KUROKI, M.; SAITO, K.; MATSUBA, S.; YOKOGAMI, N.; SHIMIZU, H.; ANDO, I.; SATO, Y.** 2007. A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. *Theoretical and Applied Genetics* 115:593–600
- KWON, Y.W.; KIM, D.S.; PARK, S.W.** 1966. Effect of soil temperature on the emergence-speed of rice and barnyard grasses under dry direct-seeding conditions. *Korean Journal of Crop Science*. 2:81-87.
- LEE, T.M.; LUR, H.S.; CHU, C.** 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L) seedlings. Endogenous abscisic acid levels. *Plant, Cell and Environment* 16, 481-490.
- LEE, T.M., LUR HS, CHU C** .1995. Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Science* 35:502–508.
- LEE, T.M.** 2007. Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Science* 122:111–117
- LOU, Q.; CHEN, L.; SUN, Z.; XING, Y.; LI, J.; XU, X.; MEI, H.; LUO.** 2007. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 158:87–94
- LU, J.J.; CHANG, T.T.** 1980. Rice in its temporal and spatial perspectives. In: Luh BS (ed) *Rice: production and utilization*. s.l. pp 1–74
- MACKILL, D.J.; LEI, X.M.** 1997. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. *Crop Science* 37:1340–1346
- MAGyP.** 2009. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. [en línea] <<http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/index.php>> [consulta: 18 noviembre 2010]
- MCNALLY, K.L.; CHILDS, K.L.; BOHNERT, R.; DAVIDSON, R.M.; ZHAO, K.; ULAT, V.J.; ZELLER, G.; CLARK, R.M.; HOEN, D.R.; BUREAU, T.E.** 2009. Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12273–12278.
- MISAWA, S.; MORI, N.; TAKUMI, S.** 2000. Mapping of QTLs for low-temperature response in seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Research Communications*. 28:33–40.
- MIURA, K.; LIN, S.; YANO, M.; NAGAMINE, T.** 2001. Mapping quantitative trait loci controlling low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 51: 293-299.

- MORI, M.; ONISHI, K.; TOKIZONO, Y.; SHINADA, H.; YOSHIMURA, T.; NUMAO, Y.; MIURA, H.; SATO, T.** 2011. Detection of a novel quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage derived from a tropical japonica rice variety Silewah. *Breeding Science* 61: 61–68.
- MORSY, M.R.; ALMUTAIRI, A.M.; GIBBONS, J.; YUN, S.J.; DE LOS REYES, B.G.** 2005. The *OsLti6* genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene* 344:171–180.
- MORSY, M.R.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.; HOFFMAN, L.; MCD. STEWART, J.** 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 164:157–167.
- MOYNIHAN, M.R.; ORDENTLICH, A.; RASKIN, L.** 1995. Chilling-Induced heat evolution in plants. *Plant Physiology*. 108: 995-999
- NAGAMINE T.** 1991. Genic control of tolerance to chilling injury at seedling stage in rice. *Japanese Journal of Breeding* 41, 35-40.
- NAKAGAHRA, M.; OKUNO, K.; VAUGHAN, D.** 1997. Rice genetic resources: history, conservation, investigative characterization and use in Japan. *Plant Molecular Biology*. 35:69–77.
- NISHIYAMA, I.** 1977. Decrease in germination activity of rice seeds due to excessive desiccation in storage. *Japanese Journal of Crop Science*. 46:111-118.
- OKAWA, S.; MAKINO A.; MAE, T.** 2003. Effect of irradiance on the partitioning of assimilated carbon during the early phase of grain filling in rice. *Annals of Botany* 92(3):357-364.
- PEÑA, D.** 2002. *Análisis de datos multivariantes*, España, Mc Graw Hill, 539 p
- QIAN, Q.; ZENG, D.L.; HE, P.** 2000. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between *indica* and *japonica* rice. *Chinese Science Bulletin*. 145(5):448–453.
- QU, T.T.; CHEN, L.Y.; ZHANG, Z.H.** 2003. Molecular mapping of genes conferring cold tolerance at seedling stage using doubled haploid lines from an *indica* x *japonica* cross in rice. *Journal of Wuhan Botanical Research*. 21:385–389.
- REDOÑA, E.D.; MACKILL, D.J.** 1996. Genetic variation for seedling vigour traits in rice. *Crop Science*. 36, 285-290.

- SAITO, K.; MIURA, K.; NAGANO, K.; HAYANO-SAITO, Y.; SAITO, A.; ARAKI, H.; KATO, A.** 1995. Chromosomal location of quantitative loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breeding Science*. 45:337–340.
- SAITO, K.; MIURA, K.; NAGANO, K.; HAYANO-SAITO, Y.; ARAKI, H.; KATO, A.** 2001. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theoretical and Applied Genetics*. 103:862–868.
- SAITO, K.; MIURA, K.; HAYANO-SAITO, Y.; KATO, A.** 2003. Analysis of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage of rice. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 37:1-5.
- SAITO, K.; HAYANO-SAITO, Y.; KUROKI, M.; SATO, Y.** 2010. Map-based cloning of the rice cold tolerance gene *Ctb1*. *Plant Science*. 179:97–102.
- SALTVEIT, M.E.** 2001. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Biology and Technology*. 21:169-177.
- SARUYAMA, H.; TANIDA, M.** 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low-temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 109:105-113.
- SAS.** 1999. Statistical Analysis System. SAS/STAT®. Procedures Guide, Version 8.0. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- SATAKE T., HAYASE H.** 1970. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. V. Estimation of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan*. 39:468–473.
- SATO, Y.; MURAKAMI, T.; FUNATSUKI, H.; MATSUBA, S.; TANIDA, M.; SARUYAMA, H.** 2001. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany*. 52:145–151.
- SHARIFI, P.** 2010. Evaluation on Sixty-eight Rice Germplasms in Cold Tolerance at Germination Stage. *Rice Science* 17(1): 77–81.
- SIMPSON, C.G.; CLARK, G.; DAVIDSON, D.; SMITH, P.; BROWN, W.S.** 1996. Mutation of putative branchpoint consensus sequences in plant introns reduces splicing efficiency. *The Plant Journal*. 9 (3):369-380.
- Sistema Integrado de Información Agropecuaria (SIIA).** 2009. Series y estadísticas. [en línea] <<http://www.sii.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>> [consulta: 18 noviembre 2010].

- STHAPIT, B.R.; WITCOMBE, J.R.** 1998. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule green-ing. *Crop Science*. 38:660–665
- TAKESAWA, T.; ITO, M.; KANZAKI, H.; KAMEYA, N.; NAKAMURA, I.** 2002. Over-expression of glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. *Molecular Breeding*. 9:93–101.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- United States Department of Agriculture (USDA)**, Bases de datos estadísticos del USDA. <www.nass.usda.gov> [consulta: 30-10-10]
- VAUGHAN, D.A.; LU, B-R.; TOMOOKA, N.** 2008. Was Asian Rice (*Oryza sativa*) Domesticated More Than Once?. *Rice* 1:16–24.
- VERGARA, B.S.** 1976. Physiological and morphological adaptability of rice varieties to climate. In: Institute International Rice Research (ed) *Climate and rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. pp. 67-86.
- WANG, Z.; WANG, J.; WANG, F.; BAO, Y.; WU, Y.; ZHANG, H.** 2009. Genetic Control of Germination Ability under Cold Stress in Rice. *Rice Science* 16(3): 173–180
- YANG, Y.X.; PATHAK, P.K.; ZHU, J.** 2005. Age-specific mapping of QTL associated with cold tolerance for seedling weight in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)*. 31(2):131–138.
- YE, C.; FUKAI, S.; GODWIN, I.; REINKE, R.; SNELL, P.; SCHILLER, J.; BASNAYAKE, J.** 2009. Cold tolerance in rice varieties at different growth stages. *Crop & Pasture Science*. 60:1–11.
- YOSHIDA, S.** 1981. *Fundamentals of rice crop science*. International Rice Research Institute (IRRI). Los Baños. Laguna, Philipines; 269 p.
- YOSHIDA, R.; KANNO, A.; SATO, T.; KAMEYA, T.** 1996. Cool temperature-induced chlorosis in rice plants. *Plant Physiology*. 110:997-1005.
- ZHAN, Q.C.; ZHU, K.Y.; CHEN, Z.W.** 2005. Studies on the QTL for cold tolerance related characters of rice seedling by molecular markers. *Hybrid Rice* 20(1):50–55.
- ZHANG, Q. F.; MAROOF, M. A. S.; LU, T. Y.; SHEN, B. Z.** 1992 Genetic diversity and differentiation of *Indica* and *Japonica* rice detected by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 495–499.

ZHANG, Z.Z.; SU, L.; LI, W.; CHEN, W.; ZHU, Y. 2005. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 168:527–534.

APÉNDICE

Tabla I. Lista de líneas utilizadas, genealogía, programa en que fue realizado el cruzamiento y cruzamiento.

MATERIAL	GENEALOGIA	PROGRAMA	CRUZAMIENTO
1	FL06000-5M-14-3-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04216-CA-4P/FL03199-24P-6-1P-1P-M//IRGA2422-11-11V-2V-1-A-M
2	FL06000-5M-17-2-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04216-CA-4P/FL03199-24P-6-1P-1P-M//IRGA2422-11-11V-2V-1-A-M
3	FL06004-4M-2-1-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04239-CA-13P/FL03188-7P-5-4P-1P-M//IRGA2422-11-11V-2V-1-A-M
4	FL06009-2M-2-2-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-30/FL03157-10P-6-2P-2P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
5	FL06009-2M-8-3-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-30/FL03157-10P-6-2P-2P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
6	FL06014-3M-1-1-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-30/FL03160-6P-9-2P-2P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
7	FL06032-4M-4-3-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04216-CA-4P/FL03199-24P-6-1P-1P-M//FL03191-5P-13-3P-1P-M-1P
8	FL06034-2M-2-5-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-30/FL03199-24P-6-1P-1P-M//IRGA2553-1-3V-2-B-2-M
9	FL06035-4M-5-1-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16819-CA-41/FL03199-24P-6-1P-1P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
10	FL06094-3M-3-2-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-30/FL03194-13P-8-2P-1P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
11	FL06098-4M-8-2-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-6/FL03188-7P-5-4P-1P-M//IRGA2553-1-3V-2-B-2-M
12	FL06100-6M-11-1-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04239-CA-13P/FL03186-1P-11-2P-1P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
13	FL06100-6M-11-2-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04239-CA-13P/FL03186-1P-11-2P-1P-M//IRGA2515-2-1V-1-M
14	FL06135-9M-2-2-1P	FLAR-TEMPLADO	FL04239-CA-13P/FL03199-24P-6-1P-1P-M//FL03191-5P-13-3P-1P-M-1P
15	FL06136-7M-6-4-1P	FLAR-TEMPLADO	CT16814-CA-30/FL03148-3P-4-2P-2P-M//FL03191-5P-13-3P-1P-M-1P
16	FL04337-18M-11P-4M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	UA99-96/UA99-113//IRGA 417
17	FL04414-2M-8P-5M-4P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00482-5P-2-1P-M/FL00306-31P-3-2P-M//FL00306-31P-3-2P-M
18	FL04429-5M-5P-5M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00482-5P-2-1P-M/FL00306-36P-2-3P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
19	FL04429-5M-6P-4M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00482-5P-2-1P-M/FL00306-36P-2-3P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
20	FL04429-5M-8P-5M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00482-5P-2-1P-M/FL00306-36P-2-3P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
21	FL04457-4M-4P-3M-4P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/FL00236-4P-2-1P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
22	FL04457-4M-19P-4M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/FL00236-4P-2-1P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
23	FL04460-5M-26P-3M-4P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00306-31P-3-2P-M
24	FL04465-4M-8P-4M-5P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/FL00447-35P-4-2P-M//FL00482-5P-2-1P-M
25	FL04512-19M-3P-4M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/FL00236-4P-2-1P-M//FL00482-5P-2-1P-M

MATERIAL	GENEALOGIA	PROGRAMA	CRUZAMIENTO
26	FL04512-19M-12P-4M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/FL00236-4P-2-1P-M//FL00482-5P-2-1P-M
27	FL04512-19M-26P-5M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/FL00236-4P-2-1P-M//FL00482-5P-2-1P-M
28	FL04512-19M-34P-5M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/FL00236-4P-2-1P-M//FL00482-5P-2-1P-M
29	FL04518-7M-6P-4M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
30	FL04518-7M-21P-5M-3P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
31	FL04518-7M-32P-6M-3P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
32	FL04518-7M-33P-5M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
33	FL04534-5M-7P-5M-7P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
34	FL04534-5M-14P-5M-4P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
35	FL04540-2M-4P-5M-3P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/FL00447-35P-4-2P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
36	FL04540-2M-7P-4M-3P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/FL00447-35P-4-2P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
37	FL04540-2M-13P-6M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/FL00447-35P-4-2P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
38	FL04540-2M-20P-6M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/FL00447-35P-4-2P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
39	FL04489-12M-9P-5M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	CT6746-4-1-CA-3/FL00447-35P-4-2P-M//FL00482-5P-2-1P-M
40	FL04489-12M-31P-4M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	CT6746-4-1-CA-3/FL00447-35P-4-2P-M//FL00482-5P-2-1P-M
41	FL04530-3M-8P-4M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
42	CT 15679-17-2-7-2-2-3-M	CIAT	
43	FL04574-1P-5-1P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/CT6543-28-6I-1I-2I//FL00871-1P-5-1P-M-M
44	FL04578-12P-4-2P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/CT6543-28-6I-1I-2I//FL02066-4P-1-1P-M
45	FL04582-4P-5-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/CARIBE 8//FL02066-4P-1-1P-M
46	FL04582-7P-13-2P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/CARIBE 8//FL02066-4P-1-1P-M
47	FL04584-9P-3-1P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/CARIBE 8//FL02856-2P-6-5P-M
48	FL04585-2P-6-3P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/FEDEARROZ 50//CNAX5013-13-2-2-4-B
49	FL04585-2P-13-2P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/FEDEARROZ 50//CNAX5013-13-2-2-4-B
50	FL04585-10P-5-2P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/FEDEARROZ 50//CNAX5013-13-2-2-4-B
51	FL04588-1P-1-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/FEDEARROZ 50//FL00595-19P-8-1P-M-M
52	FL04588-14P-10-3P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/FEDEARROZ 50//FL00595-19P-8-1P-M-M
53	FL04588-15P-1-3P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8163-9-4-4/FEDEARROZ 50//FL00595-19P-8-1P-M-M

MATERIAL	GENEALOGIA	PROGRAMA	CRUZAMIENTO
54	FL04648-6P-7-3P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT10308-27-3-1P-4-3-2P/FEDEARROZ 50//FL02066-4P-1-1P-M
55	FL04674-3P-8-3P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT11032-2-4-3T-3P-3P-1/FEDEARROZ 50//FL02337-11P-2-1P-M
56	FL04684-1P-3-2P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT11408-6-F4-1P-3/FEDEARROZ 50//FL02066-4P-1-1P-M
57	FL04815-3P-7-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	FL00596-54P-12-3P-M/PANAMA 1048//FL02082-1P-1-3P-M
58	FL04837-8P-1-3P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT9162-12-6-2-2-1/PANAMA 1048//FL00595-19P-8-1P-M-M
59	FL04867-2P-7-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	FL00147-8P-6-15P-M/SPRLR 84184-9-5-2-13//FL02173-3P-6-5P-M
60	FL04867-3P-3-1P-3P-M	FLAR-TROPICO	FL00147-8P-6-15P-M/SPRLR 84184-9-5-2-13//FL02173-3P-6-5P-M
61	FL03157-10P-6-2P-2P-M	FLAR-TROPICO	P 3050-F4-52/IR21015-72-3-3-3-1//CT9748-13-2-1-M-M-1-1
62	FL03160-6P-9-2P-2P-M	FLAR-TROPICO	ORYZICA 1/IR21015-72-3-3-3-1//CT10310-15-3-2P-4-3
63	FL03187-15P-3-3P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00595-12P-1-1P-M
64	FL03191-5P-13-3P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/CT6543-28-6I-1I-2I//FL00593-6P-1-3P-M
65	FL03191-5P-17-3P-3P-M-1P	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/CT6543-28-6I-1I-2I//FL00593-6P-1-3P-M
66	FL05371-2P-2-2P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8222-7-6-2P-1X/FSR214-M-5-1-1//FL03323-5P-15-3P-M
67	FL05372-7P-4-2P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT8222-7-6-2P-1X/FSR214-M-5-1-1//FL03375-3P-2-3P-4P
68	FL05447-3P-5-3P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/CT10166-16-1-2P-1-3//FL03197-15P-10-1P-4P
69	FL05463-1P-4-1P-3P-M	FLAR-TROPICO	CT8008-16-31-3P-M/FB100-10-1-1-M//FL03197-15P-10-1P-4P
70	FL05482-8P-4-2P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT10166-16-1-2P-1-3/LV200-1-1-1-M//FL03188-7P-5-4P-M
71	FL05516-8P-3-5P-1P-M	FLAR-TROPICO	IRGA234-21-5-6-1/CT10166-16-1-2P-1-3//FL03186-1P-4-2P-4P
72	FL05516-8P-5-3P-2P-M	FLAR-TROPICO	IRGA234-21-5-6-1/CT10166-16-1-2P-1-3//FL03186-1P-4-2P-4P
73	FL05564-8P-1-2P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT11030-1-2-2T-1P-1P-3-1X/FSR214-M-5-1-1//FL03197-15P-10-1P-4P
74	FL05598-5P-3-1P-1P-M	FLAR-TROPICO	CT11032-2-4-3T-3P-3P-1-1X/IRGA234-21-5-6-1//FL03198-9P-7-1P-4P
75	FL05601-6P-2-2P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT11032-2-4-3T-3P-3P-1-1X/FSR214-M-5-1-1//FL03186-1P-4-2P-4P
76	FL05602-12P-3-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT11032-2-4-3T-3P-3P-1-1X/FSR214-M-5-1-1//FL03191-7P-8-2P-4P
77	FL05679-5P-1-3P-3P-M	FLAR-TROPICO	IRGA234-21-5-6-1/FB100-10-1-1-M//FL03323-5P-15-3P-M
78	FL05679-7P-1-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	IRGA234-21-5-6-1/FB100-10-1-1-M//FL03323-5P-15-3P-M
79	FL04540-2M-10P-5M-1	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/FL00447-35P-4-2P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
80	FL04540-2M-23P-5M-1	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/FL00447-35P-4-2P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
81	FL04534-5M-8P-4M-3P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00236-4P-2-1P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//CT10308-27-3-1P-4-3-2P

MATERIAL	GENEALOGIA	PROGRAMA	CRUZAMIENTO
82	FL04345-13M-5P-4M-1P-M	FLAR-TEMPLADO	ORYZICA YACU 9/ZHE 733//IRGA 417
83	FL05383-1P-8-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8222-7-6-2P-1X/FB100-10-1-1-M//FL03186-1P-4-2P-4P
84	FL05383-1P-8-4P-M	FLAR-TROPICO	CT8222-7-6-2P-1X/FB100-10-1-1-M//FL03186-1P-4-2P-4P
85	FL05394-3P-5-2P-M	FLAR-TROPICO	CT9506-28-3-3P-M-1-M/FSR214-M-5-1-1//FL03198-9P-7-1P-4P
86	FL05481-7P-10-2P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT10166-16-1-2P-1-3/LV200-1-1-1-M//FL03186-1P-4-2P-4P
87	FL04429-5M-15P-5M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00482-5P-2-1P-M/FL00306-36P-2-3P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
88	FL04518-7M-6P-4M-3	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
89	FL04489-12M-1P-6M-2	FLAR-TEMPLADO	CT6746-4-1-CA-3/FL00447-35P-4-2P-M//FL00482-5P-2-1P-M
90	FL04435-4M-20P-4M-1	FLAR-TEMPLADO	FL00482-5P-2-1P-M/FL00236-4P-2-1P-M//CT10308-27-3-1P-4-3-2P
91	FL04459-6M-21P-4M-1	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
92	FL04459-6M-21P-4M-1-1P	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
93	FL04459-6M-21P-4M-1-2P	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
94	FL04459-6M-21P-4M-2-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
95	FL04459-6M-21P-4M-2-1	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
96	FL04459-6M-21P-4M-2-2	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
97	FL04459-6M-21P-4M-2-3	FLAR-TEMPLADO	FL00306-31P-3-2P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
98	FL04518-7M-6P-4M-3	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
99	FL04518-7M-33P-5M-2P-M	FLAR-TEMPLADO	FL00306-36P-2-3P-M/CT10308-27-3-1P-4-3-2P//FL00482-5P-2-1P-M
100	FL05077-3M-14-M	FLAR-TEMPLADO	L 3000/QUILLA 173201//Perla
101	INIA 14-Va2	URUGUAY	
102	Cuaro	URUGUAY	
103	Drew	URUGUAY	
104	Quila 158502	CHILE	
105	Quila 166002	CHILE	
106	Quila 154907	CHILE	
107	Quila 132703	CHILE	
108	Quila 154905	CHILE	
109	Quila 154705	CHILE	

MATERIAL	GENEALOGIA	PROGRAMA	CRUZAMIENTO
110	Diamante	CHILE	AGOSTANO/P6/BLUE ROSE/RB2/BALILLA
111	Ranila 23	CHILE	
112	Zafiro	CHILE	
113	Ambar	CHILE	
114	Quilla 145601	CHILE	
115	CT6748-8-CA-17	CIAT	LEMONT/QUILLA 651101//DIAMANTE
116	FL00482-5P-2-1P-M	FLAR-COSTA RICA	CT10166-16-1-2P-1-3/CT11008-12-3-1M-4P-4//ECIA 38-2-4-2-5-6
117	Irga 417	IRGA	NEW REX/IR19743-25-2-2//BR IRGA 409
118	Quilla 66304	CHILE	
119	Oryzica 1	CIAT	P 1429-8-9M-2-1B-5 :P 1223//P 1225
120	FL05383-1P-11-1P-2P-M	FLAR-TROPICO	CT8222-7-6-2P-1X/FB100-10-1-1-M//FL03186-1P-4-2P-4P

Tabla II. Análisis de la varianza para la tolerancia a frío en el estadio de plántula

Efecto	Num DF	Den DF	F	Pr > F
bloque	2	6334	1482,83	<0,0001
tratamiento	115	6334	5,86	<0,0001
bloque*tratamiento	230	6334	18,67	<0,0001

Tabla III. Prueba de Hotelling para diferencias significativas entre grupos de tolerancia a frío en el estadio de plántula.

Grupo	Fecha 1	Fecha 2	Fecha 3	Fecha 4	
4	1,82	2,03	2,58	2,70	A
3	2,03	2,89	4,08	5,05	B
2	2,89	4,08	5,47	5,84	C
1	4,16	5,47	6,10	6,24	D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla IV. Análisis de la varianza para la tolerancia a frío en el estadio de germinación.

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	Pr > F
bloque	2	756,5652	378,2826	2,12	0,1227
tratamiento	115	192143,67	1670,8145	9,35	<0,0001