

## Calidad fisiológica de semilla y desarrollo de plántulas de maíz a temperaturas bajas\*

### Physiological quality of the seed and maize seedlings development at low temperatures

Alfredo Josué Gámez-Vázquez<sup>1</sup>, Micaela De la O-Olán<sup>2§</sup>, Miguel Angel Avila-Perches<sup>1</sup>, Juan Virgen-Vargas<sup>2</sup>, Norma Angélica Ruiz-Torres<sup>3</sup>, Francisco Paul Gámez-Vázquez<sup>1</sup> y Ada Ascencio-Álvarez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5, Guanajuato. C. P. 38110, México. (gamez.josue@inifap.gob.mx; avila.miguel@inifap.gob.mx; gamez.francisco@inifap.gob.mx). <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Carretera Los Reyes-Textcoco, km 13.5, Coatlinchán, Textcoco, Estado de México, C. P. 56250. A.P. 307 y 10. (virgen.juan@inifap.gob.mx, sangerman.dora@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, C. P. 25315. (nruiz@uaaan.mx). <sup>4</sup>Universidad Tecnológica de la Mixteca, carretera a Acatlima km 2.5, Huajuapán de León, Oaxaca. C. P. 69000. (aascencioal@conacyt.mx). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: micad@colpos.mx.

## Resumen

La adaptación del cultivo de maíz a siembras tempranas requiere de mejorar su tolerancia a bajas temperaturas, en términos de capacidad de las semillas para germinar y generar plántulas que prosperen a tales temperaturas. El objetivo del presente trabajo fue identificar las variables que a nivel de semilla y plántula están involucrados en la tolerancia a bajas temperaturas de líneas e híbridos de maíz adaptados a los Valles Altos de México. Se evaluaron en condiciones de laboratorio e invernadero 17 materiales genéticos, incluidos un híbrido del trópico y una variedad sintética de condiciones templadas. Los genotipos se evaluaron en laboratorio en temperaturas de: 4, 8, 12 y 25 °C. Los materiales genéticos originarios de la zona de mayor altitud presentaron mejor tolerancia, altos porcentajes de germinación, peso seco de plúmula y radícula; además de mayor velocidad de emergencia. El peso seco de la radícula fue proporcionalmente menos afectada que la plúmula por bajas temperaturas. La respuesta de tolerancia a bajas temperaturas se indujo en los genotipos susceptibles al reducir de 8 a 4 °C la temperatura. Los resultados sugieren que la prueba fría con 8 °C durante 7 días previo a la inducción de la germinación puede considerarse como una prueba rápida para detectar tolerancia a bajas temperaturas.

## Abstract

The adaptation of maize to early plantings required improving their tolerance to low temperatures, in terms of the ability of the seeds to germinate and produce seedlings at such temperatures. The aim of this study was to identify the variables that seed and seedlings are involved in tolerance to low temperatures of lines and hybrids adapted to the high valleys of Mexico. Were evaluated, in the laboratory and greenhouse 17 genetic materials, including a hybrid of the tropics and a synthetic variety of temperate conditions. Genotypes were evaluated in the laboratory at temperatures of 4, 8, 12 and 25 °C. The genetic materials from the highest elevation area had a better tolerance, high germination rates, plumule dry weight and radicle; besides faster emergence. The dry weight of the radicle was proportionally less affected than the plumule by low temperatures. The response to low temperature tolerance was induced in susceptible genotypes to reduce from 8 to 4 °C temperature. The results suggest that, the cold test with 8 °C for 7 days before the induction germination can be used as a quick test of tolerance to low temperatures.

**Keywords:** *Zea mays* L., germination, plumule dry weight, tolerance.

\* Recibido: marzo de 2015  
Aceptado: agosto de 2015

**Palabras clave:** *Zea mays* L., germinación, peso seco plúmula, tolerancia.

## Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie de origen subtropical, sensible a bajas temperaturas, que puede morir con la exposición por cortos períodos de tiempo a temperaturas cercanas a 0 °C (Restrepo *et al.*, 2013). En México, durante los últimos 25 años, cerca de 260 mil hectáreas cultivadas con maíz son afectadas anualmente por bajas temperaturas y las entidades con mayor incidencia de este tipo de siniestros son: Chihuahua, Durango, Sonora, Baja California, Puebla, Oaxaca, Hidalgo, Tlaxcala, Zacatecas y Estado de México (CONAGUA, 2013), principalmente en altitudes superiores a los 2 200 metros. Las siembras tempranas de maíz en estos lugares requieren de genotipos tolerantes a bajas temperaturas durante la germinación y establecimiento de plántulas. La mayoría de los indicadores de tolerancia se han evaluado entre las fases de germinación y tercera hoja ligulada, por lo que es fundamental el vigor inicial para la expresión de variables importantes de clasificación, como: germinación, emergencia, supervivencia y acumulación de materia seca en plántula, evaluadas en temperaturas subóptimas (Aguilera *et al.*, 1999).

La temperatura es el principal factor que determina la adaptación de las especies a diferentes localidades dado que altera diversas funciones vitales. Entre las actividades afectadas están la velocidad de las reacciones químicas; los cambios de estado del agua (hielo-líquido-vapor), cambios en la estructura y actividad de las macro moléculas, las funciones asociadas a la membrana y la actividad enzimática.

Las plantas sometidas a bajas temperaturas crecen lentamente y se originan alteraciones en la composición de ácidos grasos, fluidez de membranas celulares, tasa de actividad metabólica (Nishida y Murata, 1996), pérdida de solutos celulares, reducido transporte a través del plasmalema, disfunción de la respiración, inducción de altos niveles de especies activas de oxígeno (EAO), ácido indolacético, ácido abscísico y oxidasas, además de modificaciones en la composición de las proteínas de las membranas celulares (Anderson *et al.*, 1994), especialmente en los puntos de crecimiento. Al elevarse el proceso de respiración, en presencia de luz y con la inducción del cierre de estomas, la producción de EAO puede provocar un daño fotooxidativo

## Introduction

Maize (*Zea mays* L.) is a species of subtropical origin, sensitive to low temperatures, which can die with exposure for short periods of time at temperatures near 0 °C (Restrepo *et al.*, 2013). In Mexico, for the past 25 years, nearly 260 000 hectares planted with maize are affected annually by low temperatures and States with the highest incidence of this type of disaster are: Chihuahua, Durango, Sonora, Baja California, Puebla, Oaxaca, Hidalgo, Tlaxcala, Zacatecas and the State of Mexico (CONAGUA, 2013), mainly above 2 200 meters of elevation. Early planting of maize in these places require low temperature tolerant genotypes during germination and seedling. Most indicators have been evaluated regarding tolerance between the phases of germination and third ligulate of leaf, so that the initial vigour is essential for the expression of important classification variables, such as germination, emergence, survival and dry matter accumulation in seedling, valued at suboptimal temperatures (Aguilera *et al.*, 1999).

Temperature is the main factor that determines the adaptation of species for different locations, since it alters several vital functions. The activities affected are the rate of chemical reactions; changing the state of water (ice-liquid-vapour), changes in the structure and activity of macro-molecules, the functions associated with the membrane and enzyme activity.

Plants under low temperatures grow slowly and alterations in fatty acid composition, fluidity of cell membranes, rate of metabolic activity (Nishida and Murata, 1996), loss of cell solutes, reduced transport arise through the plasmalemma, dysfunction breathing, inducing high levels of activated oxygen species (EAO), indoleacetic acid, abscisic acid and oxidases also change in the composition of proteins in cell membranes (Anderson *et al.*, 1994), especially at growing points. When raising the breathing process in the presence of light and inducing stomatal closure, EAO production can cause significant fotooxidative damage, accentuated in the maize' seedling epicotyl, increasing root/shoot relationship (Richner *et al.*, 1996).

The process of germination and seedling development, as all physiological processes are affected by temperature. This primarily affects the enzymatic activity required for the degradation of substances reservation. The most harmful effect of low temperatures with humidity occurs during the

importante que se acentúa en el epicotilo de plántulas de maíz, lo que incrementa la relación raíz/parte aérea (Richner *et al.*, 1996).

El proceso de germinación y desarrollo de las plántulas, como todos los procesos fisiológicos está afectado por la temperatura. Ésta afecta principalmente la actividad enzimática necesaria para la degradación de las sustancias de reservas. El mayor efecto nocivo de las bajas temperaturas con humedad se da durante la etapa de imbibición-activación enzimática de la semilla (entrada de agua a la semilla). El daño se conoce como “daño por imbibición en frío”, la entrada de agua fría a la semilla, produce daño en las membranas celulares, esto último más los exudados del contenido celular, facilita la entrada de hongos (Olivares *et al.*, 1990).

Los principales aspectos que influyen en la sensibilidad de los vegetales al frío son la especie, la edad, la historia previa y las condiciones ambientales. En general, las plántulas muy jóvenes, las semillas en germinación y las flores son las más afectadas por las bajas temperaturas, mientras que las semillas dormantes son las más resistentes. Habitualmente, las raíces son más sensibles que la parte aérea y los tallos más que las yemas (Sung y Amasino, 2004). Las bajas temperaturas son un factor importante que determina la distribución geográfica de las especies y de los cultivos. Los daños a los cultivos son cuantiosos, se estima que un descenso de 1 °C, en la temperatura promedio anual, provocaría una disminución de 40% en la cosecha mundial de arroz. La expectativa de utilizar cultivos sensibles a bajas temperaturas en regiones de clima frío se basa en las posibilidades de manipular las respuestas naturales de las plantas a esas temperaturas. En los últimos años se ha realizado esfuerzos para conocer la forma en que las plantas “sensen” el ambiente y responden a los cambios ambientales por la aplicación potencial de este conocimiento (Thomashow, 2001). En el transcurso de la evolución, las plantas adquirieron numerosos mecanismos de supervivencia relacionados con el frío. Para sobrevivir a este estrés, las plantas usan mecanismos de evasión y de tolerancia. La evasión consiste en minimizar la presencia del estrés; en cambio, la tolerancia es la capacidad de resistir las alteraciones que ocasiona el frío a través de mecanismos internos extremadamente complejos que están controlados por genes “gatillados” por las bajas temperaturas (Olivares *et al.*, 1990). Una de las estrategias de tolerancia es la aclimatación al frío, proceso por el cual las plantas aumentan su tolerancia al congelamiento después de ser expuestas a bajas temperaturas por un período de tiempo. Las señales

enzymatic swelling- activation of the seed (entry of water into the seed). This is known as "cold imbibition damage", the cold water inlet into the seed causes damage to the cell membranes, the latter plus the exudates of the cellular contents, facilitates the entry of fungi (Olivares *et al.*, 1990).

The main aspects that influence the sensitivity of plants to cold are the species, age, previous history and environmental conditions. In general, very young seedlings germinating seeds and flowers are the most affected by low temperatures, while the dormant seeds are the most resistant. Typically, the roots are more sensitive than the aerial parts and the stems more than the buds (Sung and Amasino, 2004) stems. Low temperatures are a major factor determining the geographical distribution of species and crops. Damages in the crops are quite substantial, it is estimated that a 1 °C drop in the annual average temperature would cause a 40% decrease in world rice harvest. The expectation of using sensitive crops at low temperatures in cold climate regions is based on the possibilities of manipulating the natural plant responses to these temperatures. In recent years there have been made efforts for learning how plants "sense" the environment and respond to environmental changes by the potential application of this knowledge (Thomashow, 2001). In the course of evolution, plants acquired numerous coping mechanisms related to the cold. To survive this stress, plants use avoidance mechanisms and tolerance. Evasion is to minimize the occurrence of stress; however, tolerance is the ability to resist changes caused by the cold through extremely internal complex mechanisms that are controlled by genes "triggered" by low temperatures (Olivares *et al.*, 1990). One of the strategies of tolerance is cold acclimation, the process by which the plants increase their tolerance to freezing after being exposed to low temperatures for a period of time. Environmental cues that trigger it are short days and a gradual decrease in temperature; plants are conditioned as the temperature drops in autumn, this requires energy and involves changes in gene expression that result in qualitative changes in the pattern of synthesized proteins (Amasino and Sung, 2004).

Generally, acclimated plants survive with more water frozen in their tissues; resistance to freezing depends on both, the ability of the extracellular spaces to control the volume of the crystal and the ability to resist protoplast dehydration. It has been observed that cold acclimation correlates with decreased osmotic potential and active photosynthesis. The degree of acclimatization achieved depends on the temperature at which the plant has been exposed (Örvar *et al.*, 2000).

ambientales que la desencadenan son días cortos y una disminución paulatina de la temperatura; las plantas se acondicionan a medida que la temperatura baja en otoño, esto requiere energía e involucra cambios en la expresión genética que se traducen en cambios cualitativos en el patrón de proteínas sintetizadas (Sung y Amasino, 2004).

En general, las plantas aclimatadas sobreviven con mayor cantidad de agua congelada en sus tejidos; la resistencia a la congelación depende, tanto de la capacidad de los espacios extracelulares para controlar el volumen del cristal como de la capacidad del protoplasto de resistir a la deshidratación. Se ha observado que la aclimatación al frío está correlacionada con una disminución del potencial osmótico y con una activa fotosíntesis. El grado de aclimatación alcanzado depende de las temperaturas a la que la planta ha estado expuesta (Örvar *et al.*, 2000).

La adaptación de las plantas a bajas temperaturas es una característica genética que no se manifiesta de forma consistente durante todo el ciclo de cultivo y se puede inducir a través del preacondicionamiento con temperaturas menores a 10 °C, fenómeno conocido como “aclimatación o respuesta de preacondicionamiento a bajas temperaturas” (Thomashow, 2001). La respuesta a bajas temperaturas ha sido estudiada comparando plántulas aclimatadas y no aclimatadas (Prasad, 1997; Madakadze *et al.*, 2003), o entrecruzando genotipos con diferente procedencia y tolerancia en varias fases del desarrollo. Sin embargo, esta tolerancia en líneas endogámicas de maíz aún no se define si es determinante o no el comportamiento de los híbridos que puede formar (Revilla *et al.*, 2000).

En el Valle de Toluca - Atlacomulco, la temperatura media anual de 12 °C, para las siembras tempranas de maíz (15 marzo - 20 abril) se requieren genotipos tolerantes a bajas temperaturas durante la fase inicial del desarrollo; donde la germinación y desarrollo inicial de plántulas permitan un ciclo mayor de cultivo y por lo tanto se reducen los riesgos debidos a la presencia de heladas tempranas al final del ciclo (septiembre), mayor aprovechamiento del periodo de precipitación pluvial y mayor rendimiento. El objetivo del presente trabajo fue clasificar los progenitores y cruza simples de H-52, H-68, por su tolerancia a bajas temperaturas e identificar las variables involucradas con el vigor inicial de semilla y plántulas en líneas e híbridos de maíz generados por el Campo Experimental Valle de Toluca, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

The adaptation of plants to low temperatures is a genetic trait that does not show consistently throughout the growing season and can be induced by preconditioning with temperatures below -10 °C, a phenomenon known as "acclimatization or pre response-conditioning to low temperature" (Thomashow, 2001). The response at low temperatures has been studied by comparing acclimated and non-acclimated seedlings (Prasad, 1997; Madakadze *et al.*, 2003) or by crosslinking genotypes with different origins and tolerance in several stages of development. However, this tolerance in inbred lines of maize has not been defined just yet, whether if it is determinant or not for the behaviour which can form hybrids (Revilla *et al.*, 2000).

In the Valley of Toluca-Atlacomulco, the average annual temperature of 12 °C, for early plantings of maize genotypes (15 March- 20 April) tolerant to low temperatures are required during the initial phase of development; where germination and early seedling development permit a higher crop cycle and therefore the risks due to the presence of early frosts at the end of the cycle (September), better use of the period of rainfall and higher yields are reduced. The aim of this study was to classify parents and single crosses H-52, H-68, for its tolerance to low temperatures and identify the variables involved with the initial seed vigour and seedling lines and maize hybrids generated by the Experimental Field Valley of Toluca, part of the National Research Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP).

## Materials and methods

Seeds of the M-43, M-44, M-60 and M-61 lines were used, the first two lines form the first H-52 hybrid of intermediate cycle and the last two the H-68 of early cycle. With each pair of parent lines, and in each case with the populations F1, F2, RC1 and RC2 (backcross to the female and male line, respectively) we formed a family. In addition to both families, 12 genotypes were included, three controls adapted to the Valley of Toluca-Atlacomulco (H-52, VS-46 and landrace), H-516 formed for dry tropical conditions and Synthetic-1 adapted to conditions of Bajío type; having a total of 17 genotypes. The seed is produced in the spring-summer agricultural cycle, 2005 in Metepec, State of Mexico. The genotypes developed for the Valley of Toluca-Atlacomulco were described and evaluated by María *et al.*, 2003).

## Materiales y métodos

Se utilizó semilla de las líneas M-43, M-44, M-60 y M-61 las dos primeras forman el híbrido H-52 de ciclo intermedio y las dos últimas al H-68, de ciclo precoz. Con cada par de líneas progenitoras, y en cada caso con las poblaciones  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$  y  $RC_2$  (retrocruza hacia la línea hembra y macho, respectivamente) se formó una familia. Además de ambas familias (12 genotipos) se incluyeron, tres testigos adaptados al Valle de Toluca - Atlacomulco (H-52, VS-46 y criollo), H-516 formado para condiciones de trópico seco y el Sintético-1 adaptado a condiciones tipo Bajío; teniendo en total 17 genotipos. La semilla se produjo en el ciclo agrícola primavera - verano 2005 en Metepec, Estado de México. Los genotipos desarrollados para el Valle de Toluca - Atlacomulco, fueron descritos y evaluados por (María *et al.*, 2003).

Se realizaron pruebas en laboratorio e invernadero, en instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). En laboratorio se evaluó la exposición de la semilla de los genotipos a temperaturas de: 4, 8 y 12 °C además de haber realizado la prueba de germinación a 25 °C. Para esto 100 semillas de cada genotipo fueron colocadas entre toallas de papel anchor húmedo (cuatro repeticiones de 25) y se enrollaron en forma de taco. En seguida se colocaron en cámaras calibradas a las temperaturas señaladas por un período de siete días. Posteriormente las semillas (tacos) se colocaron en una germinadora a 25 °C en ausencia de luz por seis días. Como testigo, las semillas fueron evaluadas en prueba de germinación estándar (ISTA, 2004), en cuatro repeticiones de 25 semillas. La evaluación se realizó siguiendo los criterios de la (ISTA, 2004), excepto que los conteos fueron al cuarto y sexto día. En este último además se midieron el peso seco de plúmula y radícula. El diseño experimental fue completamente al azar, con arreglo factorial 17 x 4. El modelo lineal utilizado fue:  $\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ .

En invernadero, se estableció un experimento para evaluar la velocidad de emergencia bajo condiciones de riego, utilizando como sustrato una mezcla de peat moss, perlita y vermiculita en una proporción 4:1:1 (v/v). La siembra se realizó en almacigo a una profundidad de 7 cm. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones, donde la unidad experimental fue de 25 semillas. Los datos se tomaron a partir del cuarto día después de la siembra, a las 11:00 h en cada caso, y se concluyó a los 13 días. El índice de velocidad de emergencia se estimó de acuerdo a (Maguire, 1962).

Laboratory and greenhouse tests were made in the facilities of the Antonio Narro Agrarian Autonomous University (UAAAN). In the laboratory was evaluated the exhibition of the seed at temperatures of 4, 8 and 12 °C as well as performing the germination test at 25 °C. In order to achieve this, we used 100 seeds of each genotype, placing them between wet anchor papers towels (four replicates of 25) folding them in rolls. Then they were placed in chambers calibrated at the temperatures indicated for a period of seven days. Subsequently, the seeds (the rolls) were placed in a germinating machine at 25 °C in darkness for six days. As a control, seeds were evaluated in standard germination test (ISTA, 2004), four repetitions of 25 seeds. The evaluation was performed according to the criteria of (ISTA, 2004), except that the counts were the fourth and sixth day. In the latter also the dry weight of plumule and radicle were measured. The experimental design was completely randomized, with factorial arrangement 17 x 4. The linear model used was:  $\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ .

In the greenhouse, an experiment was established to evaluate the speed of emergence under irrigated conditions, using as substrate a mixture of peat moss, perlite and vermiculite in a 4:1:1 (v/v). The sowing was done in a seedbed at a depth of 7 cm. The experimental design was completely randomized with four replications, where the experimental unit consisted of 25 seeds. Data were taken from the fourth day after planting, at 11:00 h in each case, and was completed in 13 days. The emergence speed index was estimated according to Maguire (1962).

The seed used in both experiments passed through the sieve of oblong holes of 5 x 19 mm and 7 mm round, but it was retained on the 6.35 mm sieve.

Statistical analysis. The analysis of variance was made for the factorial arrangement; principal component to explore the variation of genotypes and classification of the tolerance of genotypes (Table 1) and; the regression analysis between the genotypes and temperatures. The statistical analyses were performed using the procedures PROC GLM, PROC PRINCOMP and PROC REG (SAS, 1999), considering a fixed effects model.

## Results and discussion

In the principal component analysis (Figure 1) it was determined that, the first two components justify 75.2% of the variance, and allow classifying the genotypes for tolerance at low temperatures. In the distribution of genotypes

La semilla empleada en ambos experimentos fue la que pasó por la criba de perforaciones oblongas de 5 x 19 mm y redonda de 7 mm, pero que fue retenida en la criba de perforaciones redondas de 6.35 mm.

**Análisis estadístico.** Se hicieron análisis de varianza para el arreglo factorial; de componentes principales, para explorar la variación de los genotipos y clasificar la tolerancia de los genotipos (Cuadro 1); y análisis de regresión entre los genotipos y temperaturas. Los análisis estadísticos se hicieron con los procedimientos PROC GLM, PROC PRINCOMP y PROC REG (SAS, 2010), considerando un modelo de efectos fijos.

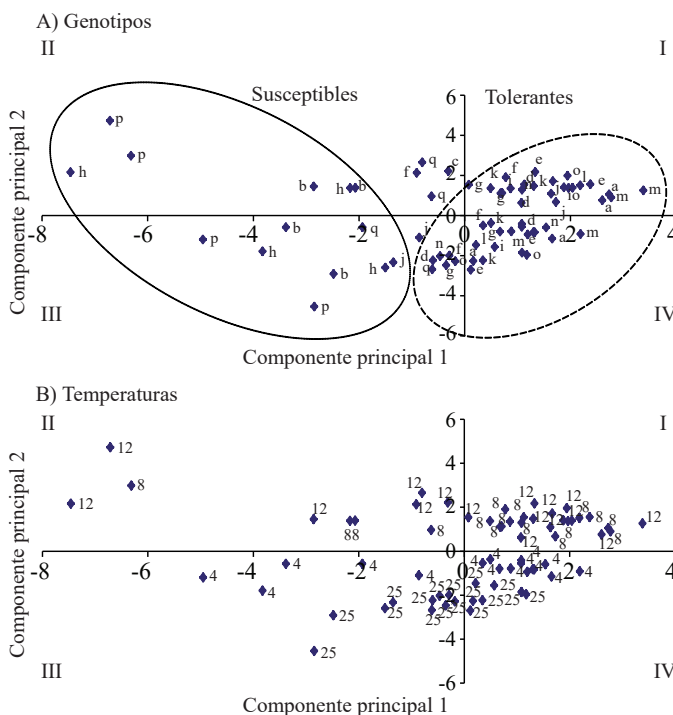
### Resultados y discusión

En el análisis de componentes principales (Figura 1) se determinó que los dos primeros componentes justifican el 75.2 % de la varianza, y permite clasificar a los genotipos por su tolerancia a bajas temperaturas. En la distribución de los genotipos (Figura 1A), se observa que H-516, M-44 y M-61 (genotipos p, b y h, respectivamente) forman el grupo de materiales susceptibles a bajas temperaturas. La susceptibilidad del H-516 se debe principalmente a que no fue seleccionado para tolerar temperaturas subóptimas, lo cual coincide con lo reportado por (Madakadze *et al.*, 2003), respecto a que la presión de selección ecofisiológica es determinante para la tolerancia a bajas temperaturas. Los grupos de los materiales tolerantes y susceptibles se pueden incluso separar en dos subgrupos bien definidos, situado uno de ellos en los cuadrantes III y IV (Figura 1B) y que agrupa a las temperaturas de 4 y 25 °C.

En tanto, las temperaturas correspondientes a los tratamientos de 8 y 12 °C se ubican en los cuadrantes I y II. Es decir, que las temperaturas de 12 y 8 °C presentan condiciones similares de estrés, por lo que si se desea realizar una prueba rápida, habría que elegir entre ambas posibilidades. La diferencia entre los dos grupos, es la alta frecuencia de semillas muertas, así como el mayor peso seco de plúmula, que se obtuvieron en los tratamientos de 8 y 12 °C.

Los materiales se clasificaron por su tolerancia a bajas temperaturas (primer componente principal), ubicando a los materiales de susceptibles a tolerantes, de izquierda a derecha en el eje de las abscisas (Figura 1A), quedando el testigo susceptible tropical (H-516, p), las líneas progenitoras

(Figure 1A) it shows that H-516, M-44 and M-61 (genotypes p, b and h, respectively) form the group of susceptible materials at low temperatures. The susceptibility of the H-516 is mainly because it was not selected to tolerate suboptimal temperatures, which coincides with that reported by Madakadze *et al.* (2003), about the pressure of ecophysiological selection is crucial for tolerance to low temperatures. Groups of tolerant and susceptible materials can even be separated into two distinct subgroups, one of them located in quadrants III and IV (Figure 1B), grouping the temperatures of 4 and 25 °C.



**Figura 1. Dispersión de los genotipos (A) y temperaturas (B) con base en dos componentes principales (75.2% de la varianza).** CP1= [germinación 4° y 6° día (+), peso seco de radícula (-), semillas muertas (-) y plántulas anormales al 6° día (-)]; CP2= [semillas muertas al 4° día (+), peso seco de plúmula (+), longitud de plúmula (+) y radícula (+)]. Genótipos: a= M-43; b= M-44; c= a x b, d= cF<sub>2</sub>; e= c x a; f= c x b; g= M-60; h= M-61; i= g x h; j= iF<sub>2</sub>; k= i x g; l= i x h; m= H-52; n= VS-46; o= Criollo; p= H-516; y q= Sintético-1.

**Figure 1. Dispersion of the genotypes (A) and temperatures (B) based on two major components (75.2% variance).** CP1= [germination 4th and 6th day (+), dry weight of radicle (-), dead seeds (-) and abnormal seedling to the 6th day (-)]; CP2= [dead seeds at day 4th day (+), dry weight of plumule (+), plumule length (+) and radicle (+)]. Genotypes: a= M-43; b= M-44; c= a x b, d= cF<sub>2</sub>; e= c x a; f= c x b; g= M-60; h= M-61; i= g x h; j= iF<sub>2</sub>; k= i x g; l= I x h; m= H-52; n= VS-46; o= landrace; p= H-516 and; q= synthetic-1.

macho (b y h), el testigo susceptible del Bajío (Sintético -1, q), las líneas progenitoras hembra (a y g), las retrocruzas (e, f, k y l), las poblaciones  $F_2$  (d y j) y finalmente los híbridos (c, i, n, o y m) y el testigo criollo; clasificados estos últimos como los más tolerantes a bajas temperaturas.

El análisis factorial de los experimentos desarrollados de laboratorio, detectó diferencias estadísticas ( $p \leq 0.01$ ) entre los ambientes de evaluación, los materiales genéticos y la interacción genotipo x ambiente; es decir, las temperaturas de evaluación (25, 12, 8 y 4 °C) fueron lo suficientemente contrastantes como para permitir que los genotipos manifestaran un comportamiento diferencial en cada una de las variables evaluadas.

En germinación se obtuvo una respuesta contrastante entre los genotipos seleccionados en Metepec y los testigos susceptibles del trópico y bajío (Figura 2A); la línea hembra M-43 presentó una respuesta similar en las cuatro temperaturas, superando estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) a todas las líneas, e incluso a la cruce simple M-43 x M-44. Ésta última cruce simple muestra una recuperación de la germinación a los 4 °C, que se podría atribuir a su mayor capacidad de inducir la respuesta de tolerancia, asociada probablemente con el comportamiento de su línea hembra (M-43), la cual mostró una tolerancia constitutiva a las bajas temperaturas. En contraste, H-516 mostró inicialmente una reducción de su germinación; recuperándose posteriormente, lo que puede estar asociado con una inducción de la tolerancia promovida por el tratamiento de 4 °C; sin embargo, no superó a la línea M-44, clasificada también como susceptible.

En el caso de los híbridos (H-516 y M43 x M44) existe una temperatura entre los 8 y 4 °C, que desencadena una respuesta de sobrevivencia a las bajas temperaturas, lo que coincide con lo reportado por Castro *et al.* (2008) quienes señalaron que la aclimatación a bajas temperaturas se logra con temperaturas menores a 10 °C. Este mismo fenómeno no es tan evidente con las líneas en cuestión, las cuales tienen una respuesta más uniforme, probablemente asociada al proceso de selección genético desarrollado en el Valle de Toluca, donde las bajas temperaturas son comunes.

En contraste en la segunda familia, formada con las líneas progenitoras de la cruce M60 x M61 (Figura 2B), la línea hembra M-60, fue superada por la cruce simple y por el testigo H-52, en la prueba de 8 °C, por lo que el vigor híbrido permitió una mayor respuesta que incluso el mejor progenitor. Como en el caso anterior, también se observa que

Meanwhile, the corresponding to the treatment of 8 and 12 °C temperatures are located within the quadrants I and II. That is, the temperatures of 12 and 8 °C have similar stress conditions, so if we want to perform a quick test, we would have to choose between the possibilities. The difference between the two groups is the high frequency of dead seeds, as well as the highest level of dry plumule, which were obtained in the treatment of 8 and 12 °C.

The materials are classified by their tolerance to low temperatures (first principal component), placing materials susceptible to tolerance, from left to right on the x-axis (Figure 1A), leaving the tropical susceptible control (H-516, p), male parental lines (b and h), the susceptible Bajío (Synthetic-1, q), female parental lines (a and g), backcrosses (e, f, k and l), the populations  $F_2$  (d and j) and finally the hybrids (c, i, n, o and m) and native control; the latter classified as more tolerant to low temperatures.

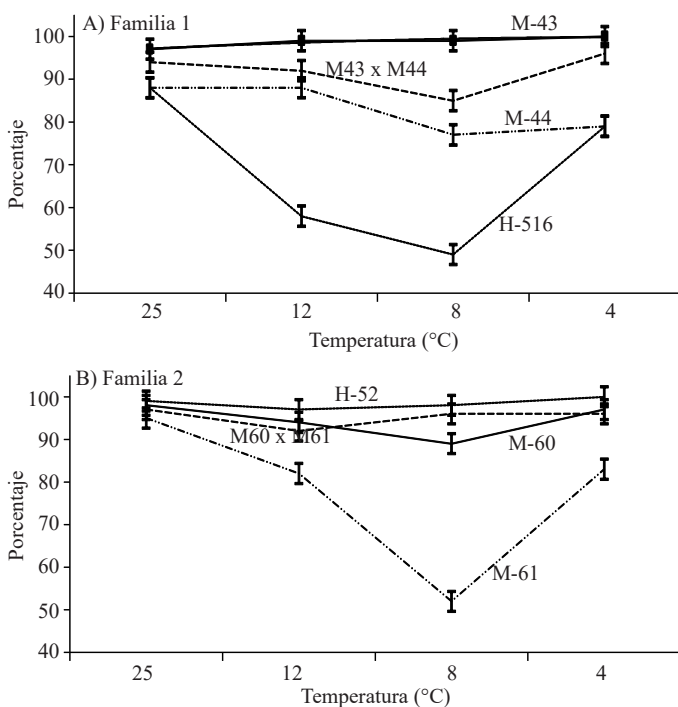
The factor analysis of developed laboratory experiments, detected statistical differences ( $p \leq 0.01$ ) between the environments evaluated the genetic materials and the genotype x environment interaction; i.e., temperatures of evaluation (25, 12, 8 and 4 °C) were contrasting enough to allow the genotypes to show a differential behaviour in each of the evaluated variables.

In germination, a contrasting response between selected genotypes in Metepec and susceptible checks and tropical shallows (Figure 2A) was obtained; M-43 female line had a similar response in the four temperatures, surpassing statistically (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) for all lines, and even the simplest crosses M-43 x M-44. The latter single cross shows recovery in germination at 4 °C, which could be attributed to the higher ability to induce tolerance response, probably associated with the behaviour of the female line (M-43), which showed a constitutive tolerance to low temperatures. In contrast, H-516 initially showed reduced germination; recovering later, which can be associated with induction of tolerance promoted by the treatment of 4 °C; however, it did not exceed the M-44 line, also classified as susceptible.

In the case of the hybrid (H-516 and M43 x M44) there is a temperature between 8 and 4 °C, which triggers a survival response to low temperatures, which coincides with that reported by Castro *et al.* (2008) who pointed out the acclimation to low temperatures is reached with temperatures below 10 °C. This same phenomenon is not so evident with the lines in question, which have a more uniform response, probably due to the genetic selection process developed in the Valley of Toluca, where low temperatures are common.

la línea macho (M61) fue el progenitor más susceptible a las bajas temperaturas, pues presentó los menores porcentajes de germinación en todas las pruebas con bajas temperaturas.

En el análisis de la respuesta a los tratamientos de temperatura subóptima de las dos familias, conformadas por sus híbridos y líneas progenitoras (Figura 2) destaca, en ambos casos, la expresión de la respuesta asociada al progenitor hembra, quien confiere la tolerancia a bajas temperaturas en la semilla de maíz, lo que coincide con (Revilla *et al.*, 2000 y Cano *et al.*, 2000) quienes asocian esta respuesta con la doble contribución materna determinada durante el proceso de la fecundación y sus implicaciones en la calidad y cantidad del endospermo de la semilla.



**Figura 2. Germinación (4<sup>to</sup> día) de líneas e híbridos a diferentes temperaturas.**

**Figure 2. Germination (4<sup>th</sup> day) of the lines and hybrids at different temperatures.**

En esta figura nuevamente se observa que la prueba fría a 8 °C permitió una mejor clasificación de los genotipos por su tolerancia a bajas temperaturas. Además de considerar que las diferencias en tolerancia a temperaturas subóptimas entre las líneas hembras M-43 y M-60, podrían asociarse con el nivel de precocidad de ambas, ya que M-43 es de ciclo intermedio y se seleccionó básicamente en siembras tempranas y M-60 es de ciclo precoz, por lo que fue seleccionada en posteriores fechas de siembra.

In contrast in the second family, formed with the parental lines of crosses M60 x M61 (Figure 2B), the female line M-60 was overcome by the simple crosses and the control H-52, in the test of 8 °C, so that the hybrid vigour allowed a higher response than even the best parent. As in the previous case also it shows that the male line (M61) was the progenitor more susceptible to low temperatures, as it presented the lowest percentages of germination in all tests at low temperatures.

In the analysis of the response to suboptimal treatment, the temperature of the families, formed by parental lines and their hybrids (Figure 2) stands out in both cases, the expression of the response associated with the female parent, who gives the tolerance to low temperatures in maize, which coincides with Revilla *et al.* (2000) and Cano *et al.* (2000) who associate this response with the double maternal response, determined during the process of fertilization and its implications for the quality and quantity endosperm of the seed.

This figure shows again that, the cold test at 8 °C allowed a better classification of genotypes for tolerance to low temperatures. Besides considering the differences in suboptimal temperatures tolerance among females M-43 and M-60 lines, they could be associated with the level of precocity of both, as M-43 is an intermediate cycle and was primarily selected on early plantings, since M-60 is of early cycle, which was selected after the planting dates.

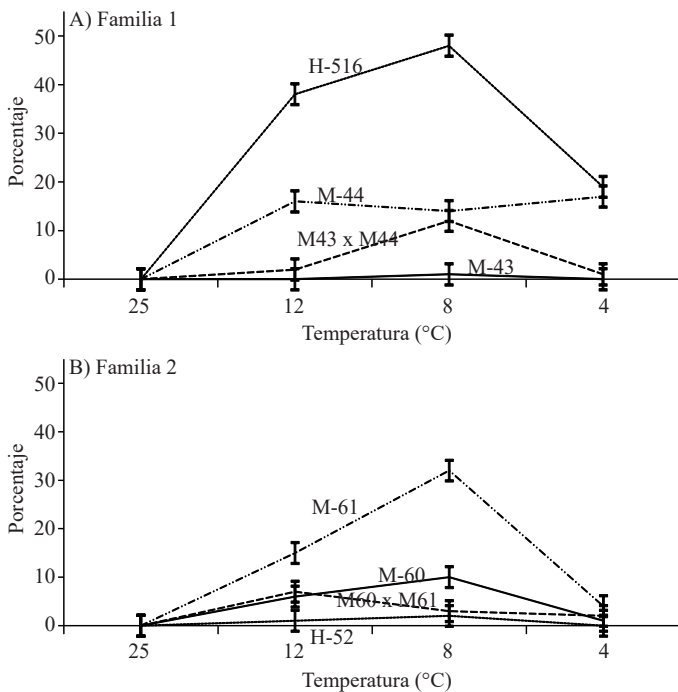
Low temperatures caused the reduction of germination (95 to 85%), as was reduced from 25 to 8 °C; which coincides with what was reported by Revilla *et al.*, (2000), who associated with low temperatures oxidative damage to membranes and cell death. Germination recovered when genetic materials were subjected to 4 °C, which Pastori *et al.* (2000), explained through the accumulation of antioxidant compounds. Furthermore, when comparing the assessment of days to germination (4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> day), there were no statistical differences with cold test at 12 and 8 °C; so the cold test with 8 °C could be a quick way to detect low temperature tolerance.

The number of dead seeds was the main variable increased by reducing the temperature at 8 °C (Figure 3), but at 4 °C was significantly reduced in susceptible materials. Important differences in this variable when evaluated were detected at 4 or 6 days of development in the germination chamber at temperatures no statistical assessment. Allowing assessing either term.



Las bajas temperaturas provocaron la reducción de la germinación (95 a 85%), conforme se redujo de 25 a 8 °C; lo que coincide con lo reportado por (Revilla *et al.*, 2000), quienes asocian las bajas temperaturas con daño oxidativo a las membranas y muerte celular. La germinación se recuperó cuando los materiales genéticos fueron sometidos a 4 °C, lo cual (Pastori *et al.*, 2000), explican a través de la acumulación de compuestos antioxidantes. Por otro lado, al comparar los días de evaluación de la germinación (4° y 6° día), no hubo diferencias estadísticas con la prueba fría a 12 y 8 °C; por lo que la prueba fría con 8 °C podría ser una forma rápida para detectar genotipos tolerantes a bajas temperaturas.

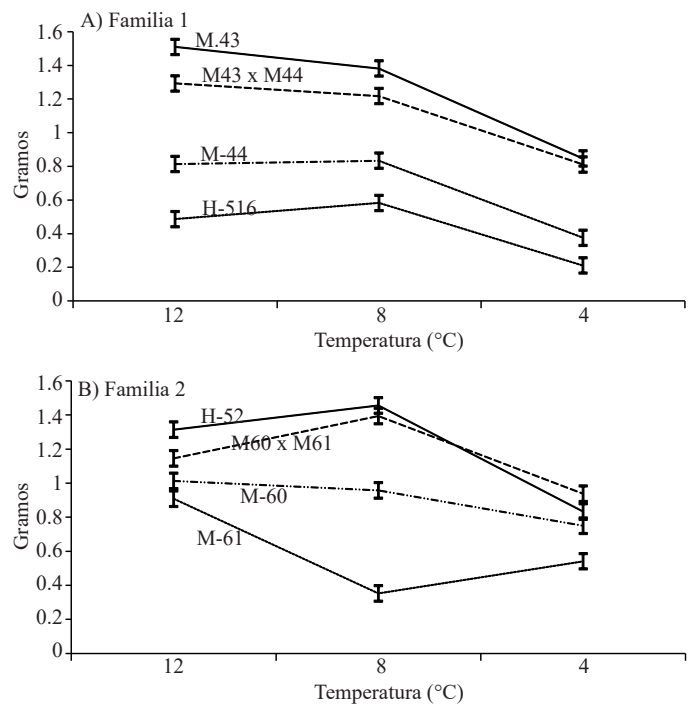
El número de semillas muertas fue la variable que principalmente se incrementó con la reducción de la temperatura hasta a 8 °C (Figura 3), pero a 4 °C se redujo significativamente en los materiales susceptibles. En esta variable no se detectaron diferencias estadísticas importantes al ser evaluada a los 4 ó 6 días de desarrollo en la cámara de germinación, a ninguna de las temperaturas de evaluación. Lo que permitiría evaluarla a uno u otro plazo.



**Figura 3. Semillas muertas de cada familias (A y B respectivamente) en diferentes temperaturas.**  
**Figure 3. Dead seeds on each family (A and B, respectively) at different temperatures.**

En cuanto a las variables, peso seco de plúmula y radícula el mayor efecto por bajas temperaturas se presentó en la reducción del peso seco de plúmula, especialmente cuando

As for the variables, dry weight of plumule and radicle, the highest effect on low-temperatures was presented in reducing the dry weight of plumule, especially when the temperature was lower than 8 °C (Figure 4). In this regard, Fryer *et al.* (1998) and Leipner *et al.* (1999) reported a reduced rate of metabolic activity at the plant for temperatures below the threshold. In both treatment, the variables 12 and 8 °C were statistically similar, (Tukey,  $p \leq 0.01$ ) even better than the treatment at 4 °C. The dry weight of the radicle was less affected than plumule in this sense, Martin and Dodd (2011), reported that this is the main cause of the root- aerial part ratio increases in plants grown at low temperatures.



**Figura 4. Peso seco de plúmula de las familias evaluadas a diferentes temperaturas.**  
**Figure 4. Dry Weight of plumule of the evaluated families at different temperatures.**

The emergence speed index (Figure 5) of the genotypes classified as tolerant to low temperatures M60 x M61 and M43 x M44, overcame their female parental lines, probably due to hybrid's vigour, with rates between 2.5 and 3. The susceptible materials H-516, M44 and M61 had the lowest rates (values between 1.1 and 2.3). The response to low temperatures of the adapted controls was similar to the H-52 as the control of higher vigour, followed by the VS-46 and the landrace from the high valleys (above 3.5 index), which are commercial materials that exceeded in vigour and adaptation to the single crosses and their parents. This behaviour could be associated with the expression of the response under field

la temperatura fue menor a 8 °C (Figura 4). Al respecto, (Fryer *et al.*, 1998; Leipner *et al.*, 1999) reportan una reducida tasa de actividad metabólica en la planta por temperaturas menores a la temperatura base. En ambas variables los tratamientos de 12 y 8 °C fueron similares, superando estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0.01$ ) al tratamiento de 4 °C. El peso seco de radícula fue menos afectado que el de plúmula, en este sentido (Martin y Dodd, 2011) reportan que esta es la causa principal de que se incremente la relación raíz - parte aérea en las plantas desarrolladas a bajas temperaturas.

El índice de velocidad de emergencia (Figura 5) de los genotipos clasificados como tolerantes a bajas temperaturas M60 x M61 y M43 x M44, superó a sus respectivas líneas progenitoras hembra debido probablemente al vigor híbrido, con índices entre 2.5 y 3.0. Los materiales susceptibles H-516, M44 y M61 presentaron los menores índices (valores entre 1.1 y 2.3). La respuesta de los testigos adaptados a bajas temperaturas fue similar al presentarse el H-52 como el testigo de mayor vigor, seguido del VS-46 y del criollo de valles altos (índices superiores a 3.5), los cuales son materiales comerciales que superaron en vigor y adaptación a las cruza simples y sus progenitores. Este comportamiento pudiera asociarse con la expresión de la respuesta bajo condiciones de campo, especialmente en las fases tempranas del establecimiento y desarrollo del cultivo, como lo señalan (Tiryaki y Andrews, 2001).

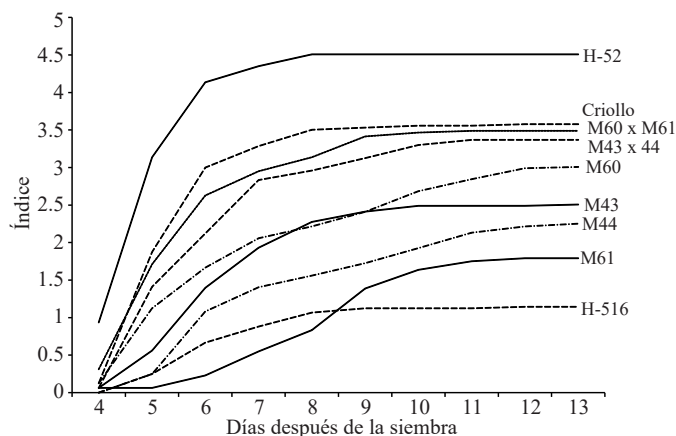
## Conclusiones

Los genotipos con mayor tolerancia a bajas temperaturas fueron las cruza simples (M-43 x M44 y M-60 x M-61) y líneas hembra M-43, y M-60, además de los testigos de valles altos: H-52, criollo local y VS-22. Las líneas macho M-44 y M-61 presentaron una tolerancia de intermedia a baja y en un tercer grupo se ubicaron los testigos: Sintético-1 y H-516, que son para condiciones tipo Bajío y Trópico.

Los genotipos tolerantes a bajas temperaturas presentan mayor germinación, peso seco de plúmula, peso seco de radícula e índice de velocidad de emergencia de plántulas.

El comportamiento superior de los materiales tolerantes fue similar a través de las diferentes temperaturas, probablemente debida a una respuesta constitutiva de los genes de tolerancia a bajas temperaturas.

conditions, especially in the early stages of establishment and development of the crop, as indicated by Tiryaki and Andrews (2001).



**Figura 5. Índice de velocidad de emergencia en genotipos de maíz evaluado en invernadero.**

**Figure 5. Emergence speed index on genotypes of maize evaluated in greenhouse.**

## Conclusions

The genotypes with the best tolerance to low temperatures were simple crosses (M-43 x M44 and M-60 x M-61) and female lines M-43 and M-60, in addition to the controls from the high valleys: H-52 landrace and VS-22. The male lines M-44 and M-61 exhibited a low and intermediate tolerance, in a third group were the controls: Synthetic-1 and H-516, which are for Bajío and Tropic standard conditions.

The low temperature tolerant genotypes presented higher germination, dry weight of plumule, dry weight of radicle and rate of seedling emergence speed.

The best behaviour of the tolerant materials was similar through different temperatures, probably due to a constitutive response of the genes tolerant to low temperatures.

The response to low temperature tolerance was induced in susceptible genotypes to reduce the temperature of the cold test from 8 at 4 °C.

The cold test in 8 °C allows classifying tolerant materials in a rapid test for laboratory evaluation that requires little time.

*End of the English version*



La respuesta de tolerancia a bajas temperaturas se indujo en los genotipos susceptibles al reducir la temperatura de la prueba fría de 8 a 4 °C.

La prueba fría con 8 °C permite clasificar materiales tolerantes en una prueba rápida de evaluación en laboratorio que requiere poco tiempo.

## Agradecimientos

Los autores(as) desean manifestar su agradecimiento y reconocimiento a INIFAP, CONACYT, UAAAN, e ICAMEX quienes financiaron este trabajo de investigación, así como al M. C. José Roberto A. Dorantes y M. C. Francisco Cárdenas R Sandra por su apoyo para el desarrollo del mismo.

## Literatura citada

- Aguilera, C.; Stirling, C. M. and Long, S. P. 1999. Genotypic variation within *Zea mays* for susceptibility to and rate of recovery from chill-induced photoinhibition of photosynthesis. *Physiology Plantarum*. 106:429-436.
- Anderson, M. D.; Prasad, T. K.; Martin, B. A. and Stewart, C. R. 1994. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. *Plant Physiology*. 105:331-339.
- Cano, R. P.; Ramírez, R. G.; Ortigón, P. J.; Esparza, M. J. H. y Rodríguez, H. S. 2000. Análisis dialéctico para vigor de semilla en melón. *Agrociencia*. 34(3):337-342.
- Castro, M. A.; Reyes, M. D.; Alberdi, M.; Jara, V. R.; Sanhueza, C.; Corcuera, L. J. and Bravo, A. L. 2008. Effects of low temperature acclimation on photosynthesis in three Chilean Proteaceae. *Rev. Chilena de Historia Natural* 81. 321-333 pp.
- Coordinación General del Servicio Meteorológico Nacional. 2013. Reporte anual. CONAGUA, México D. F.
- Fryer, M. J.; James, R. A.; Oxborough, K.; Blowers, D. A. and Baker, N. R. 1998. Relationship between CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron transport, and active O<sub>2</sub> metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol*. 116:571-580.
- International Seed Testing Association. 2004. International rules for seed testing. Bassersdorf Switzerland. 72 p.
- Leipner, J.; Fracheboud, Y. and Stamp, P. 1999. Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 42:129-139.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination: AID in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Madakadze, I. C.; Stewart, K. A.; Madakadze, R. M. and Smith, D. L. 2003. Base temperatures for seedling growth and their correlation with chilling sensitivity for warm season. *Crop Sci.* 43: 874-878.
- Maria, R. A.; Rojas, I.; Avila, P. M. A. y Gámez, V. A. J. 2003. Producción de maíz de temporal en el Estado de Tlaxcala. Folleto para productores Núm. 3. SAGARPA. INIFAP. México, Tlaxcala, Tlaxcala. 16 p.
- Martin, A. I. and Dodd, I. C. 2011. Root-to-shoot signalling when soil moisture is heterogeneous: increasing the proportion of root biomass in drying soil inhibits leaf growth and increases leaf ABA concentration. The Lancaster Environment Centre Lancaster University LA1 4YQ. United Kingdom.
- Nishida, I. and Murata, N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:541-568.
- Olivares, A.; Johnston, M. y Fernandez, G. 1990. Efecto de la temperatura en la germinación de siete especies de la pradera anual mediterránea y caracterización de su emergencia. *Simiente* 60:123-131.
- Örvar, B. L.; Sangwan, V.; Omann, F. and Dhindsa, R. S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant J.* 23:785-794.
- Pastori, G.; Foyer, C. H. and Molineaux, P. 2000. Low temperature-induced changes in the distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *J. Exp. Bot.* 51(342):107-113.
- Prasad, T. K. 1997. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol.* 114:1369-1376.
- Restrepo, H.; Gómez, M. I.; Garzón, A.; Manrique, L.; Alzate, F.; López, J. y Rodríguez, A. 2013. Respuesta bioquímica de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) a diferentes condiciones de temperaturas nocturnas. *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 7(2):252-262.
- Revilla, P.; Malvar R, A; Cartea M, E; Butrón, A. and Ordás, A. 2000. Inheritance of cold tolerance at emergence and during early Season growth in maize. *Crop Sci.* 40:1579-1585.
- Revilla, P.; Malvar, R. A.; Cartea, M. E. and Ordás, A. 1998. Identifying open-pollinated populations of field corn as sources of cold tolerance for improving sweet corn. *Euphytica* 101:239-247.
- Richter, B. D.; Baumgartner, J. V.; Powell, J. and Braun, D. P. 1996. A method for assessing hydrologic alteration within ecosystems. *Conservation Biol.* 10:1-12.
- Statistical Analysis System. 2010. SAS. Version 9.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
- Sung, S. and Amasino, R. M. 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology.* 7:4-10.
- Thomashow, M. F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots. *Plant Physiol.* 125:89-93.
- Tiryaki, I. and Andrews, D. J. 2001. Germination and seedling cold tolerance in sorghum: I. Evaluation of rapid screening methods. *Agron. J.* 93:1386-1391.