

PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PEROXIDASAS, ESTERASAS, POLIFENOLOXIDASAS Y DAÑO FOLIAR EN PLÁNTULAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) SOMETIDAS A ESTRÉS DE BAJAS TEMPERATURAS

Sandra H. Díaz✉, R. Morejón, Elena López, Noraida Pérez y R. Castro

ABSTRACT. This work was developed at Plant Genetics and Breeding Laboratory from the National Institute of Agricultural Sciences in 2002, with the objective to find electrophoretic polymorphic bands that can be used as markers to select rice genotypes with cold tolerance. The effect of different temperature treatments was studied (0, 5, 10, 15 and 20°C) on rice seedlings 25 days after germinating Dodo and IR-837, resistant and susceptible varieties, respectively, which grew under controlled conditions (25°C). The extraction was carried out at three different moments and the isoenzymatic esterase, peroxidase and polyphenoloxidase systems were studied, as well as leaf damage measured by membrane permeability. Results indicated that immediately after having applied temperature stress, the most significant changes took place in the electrophoretic patterns and it was detected that the most sensitive system to temperature changes was polyphenoloxidases. When reducing temperatures, leaf damage percentage of resistant and susceptible varieties increased gradually and abruptly, respectively.

Key words: rice, *Oryza sativa*, cold tolerance, varieties, genetic markers

RESUMEN. El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas en el 2002, con el objetivo de detectar perfiles electroforéticos polimórficos, que puedan ser utilizados como marcadores para asistir la selección de genotipos de arroz tolerantes al frío. Se estudió el efecto de diferentes tratamientos de temperatura (0, 5, 10, 15 y 20°C) sobre plántulas de arroz con 25 días de germinadas de las variedades Dodo e IR-837 resistente y susceptible, respectivamente, las cuales crecieron en condiciones controladas (25°C). La extracción se realizó en tres momentos y se estudiaron los sistemas isoenzimáticos esterasas, peroxidasas y polifenoloxidasas, así como se evaluó el daño foliar medido por la permeabilidad de membrana. Los resultados indicaron que inmediatamente después de aplicado el estrés de temperatura, se producen los cambios más significativos en los patrones electroforéticos y se detectó que el sistema más sensible a los cambios de temperatura es el de polifenoloxidasas. Con el descenso de las temperaturas se incrementa gradual y bruscamente el porcentaje de daño foliar de las variedades resistente y susceptible, respectivamente.

Palabras clave: arroz, *Oryza sativa*, tolerancia al frío, variedades, marcadores genéticos

INTRODUCCIÓN

El uso de marcadores morfoagronómicos y bioquímicos para el estudio de la diversidad genética en plantas, es una práctica común; las isoenzimas han probado su utilidad para la certificación de las variantes genéticas obtenidas (1, 2, 3, 4).

Numerosas han sido las isoenzimas utilizadas en los estudios de caracterización bioquímica, debido a su alto nivel de polimorfismo y generalmente se han obtenido buenos resultados; tal es el caso de las peroxidasas, fosfatasa ácida, esterasas, superóxido dismutasa, polifenoloxidasas y proteínas totales, entre otras (5, 6, 7).

Durante los procesos de crecimiento y desarrollo, muchas plantas presentan drásticos cambios en su expresión enzimática. El uso de las isoenzimas como marcadores está bien probado y sus variantes definidas genéticamente han evidenciado su importancia en la evaluación de la variabilidad genética en algunos cultivos como arroz, cebada, maíz, frijol, papa, trigo, soya, tomate, entre otros (8, 9, 10).

La falta de resistencia a las bajas temperaturas de las variedades de arroz hace que, en sentido general, en el mundo se reduzca considerablemente el rendimiento, así como el período de siembra y, por tanto, el área total en muchas regiones productoras de arroz. Es por ello que resulta de suma importancia en los programas de mejoramiento del cultivo, poder contar con marcadores que puedan ser usados para asistir la selección y permitan identificar genotipos con alto grado de adaptabilidad al frío.

Ms.C. Sandra Díaz, Ms.C. R. Morejón y Ms.C. R. Castro, Investigadores Agregados; Noraida Pérez, Investigador Auxiliar de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Elena López, Especialista de la Estación de Alevinaje, San Cristóbal, Pinar del Río.

✉ shdiaz@inca.edu.cu

Cuba no presenta condiciones invernales severas; sin embargo, durante los meses de diciembre a febrero las temperaturas suelen presentar un comportamiento inestable con la llegada de los frentes fríos. Entre los efectos de las bajas temperaturas se encuentran la reducción del porcentaje de germinación y el establecimiento de las plántulas en el campo, el amarillamiento de las hojas, así como la reducción de la altura y el alargamiento del ciclo vegetativo, si la incidencia ocurre en los primeros estadios de desarrollo (germinación-ahijamiento). Además, pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas de arroz por limitar varios procesos, incluidos la absorción de los nutrientes y el desarrollo de los órganos (11).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se realizó la presente investigación, con el objetivo de buscar bandas polimórficas en los sistemas peroxidasas, esterasas y polifenoloxidasas, que puedan ser utilizados como marcadores en la selección de genotipos de arroz tolerantes a las bajas temperaturas, además de determinar el porcentaje de daño foliar medido por la permeabilidad de membrana.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas en el 2002 y para su desarrollo se tomaron plantas con 25 días de germinadas de los cultivares Dodo e IR 837, resistente y susceptible al frío, respectivamente, las cuales crecieron en condiciones controladas a 25°C con fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad y humedad relativa de 85 %.

Se probó el efecto de diferentes tratamientos de temperatura (0, 5, 10, 15 y 20°C) durante 45 minutos y se estudiaron los sistemas isoenzimáticos esterasas, peroxidasas y polifenoloxidasas.

La extracción se realizó en tres momentos:

- M1-Inmediatamente después de aplicado el estrés
- M2-Al cabo de las 24 horas
- M3-Después de 10 días.

Para los análisis electroforéticos de isoenzimas, se utilizó material fresco y la preparación de los extractos se realizó tomando muestras de dos gramos de tejido foliar, que fueron macerados en un mortero, a los cuales se les añadieron 15 gotas de solución de sacarosa al 20 %, que se filtraron en tela de gasa doble.

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) utilizando un gel de separación a una concentración de 8.5 %, con *buffer* de corrida Tris-Glicina 0.04 M de pH 8.3 y gel concentrador de 4 % en cámara de electroforesis vertical *Mighty Small II* de *Pharmacia Biotech* y en sistema de *buffers* discontinuos para las isoenzimas peroxidasas, esterasas y polifenoloxidasas.

El tiempo de corrida en cada caso estuvo determinado por el desplazamiento de la banda de Kolrhauch hasta

aproximadamente 6 cm del inicio. Se utilizó, en todos los casos, una intensidad de corriente constante de 20 mA. Las tinciones de las bandas se realizaron de acuerdo con los sistemas isoenzimáticos analizados (6). Con los resultados se confeccionaron los zimogramas y los fenotipos isoenzimáticos de cada genotipo fueron establecidos sobre la base del número y la posición de cada banda.

Se conformaron tres muestras para cada tratamiento en los diferentes momentos y a cada una de ellas se le realizaron las determinaciones por triplicado.

Se determinó la permeabilidad de la membrana celular por conductimetría, siguiendo la técnica descrita (12), donde las muestras de tejido de cada tratamiento fueron lavadas previamente cuatro veces con agua destilada para eliminar los iones externos y posteriormente medir el flujo de electrolitos de los diferentes tratamientos de estrés aplicados y el control en un conductímetro chino DD-IIA. En la fase final se sometió el tejido a muerte total, autoclaveando a 1.5 Kg/cm² durante diez minutos, para luego medir la conductividad final. El daño total de la membrana celular para cada tratamiento en estudio fue calculado a partir de la fórmula propuesta por Sullivan (13).

$$\text{Daño (\%)} = \frac{1 - \left(\frac{T1}{T2}\right)}{1 - \left(\frac{C1}{C2}\right)}$$

donde:

T: Conductividad de los tratamientos

C: Conductividad de los controles

1 y 2: Lectura previa y posterior al tratamiento de muerte total, respectivamente.

Los datos de las evaluaciones efectuadas por este método se sometieron a Análisis de Varianza de Clasificación Simple por variedad y se docimaron por pruebas de Duncan las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos en estudio. Asimismo, se realizó la comparación de medias entre los dos genotipos por temperatura.

RESULTADOS

En el zimograma de las isoenzimas peroxidasas para la variedad Dodo (Figura 1), se constató que en el primer momento (M1) a la temperatura de 0°C disminuyó la intensidad de la banda dos, desaparecieron las bandas tres y cinco y aparece la banda cuatro, a diferencia del resto de las temperaturas y los otros momentos. En el caso del segundo momento (M2), no se apreciaron diferencias entre las temperaturas y para el tercer momento (M3) solo se observa la disminución de la intensidad de la banda dos desde 0 hasta 10°C.

Las isoenzimas son de expresión génica y, por lo tanto, dependen del tipo de tejido y su desarrollo, por lo que la ausencia de bandas en los diferentes patrones isoenzimáticos, no solo se debe a las necesidades de esas enzimas en los diferentes tejidos, sino además a la

comigración de proteínas y a la diferencia de zonas geográficas, pues a pesar de que la mayoría no son influidas por el ambiente, los patrones electroforéticos de unos pocos sistemas entre los que se incluyen Prx, Est, Aps, Sod, Cat y otros, pueden ser modificados por factores bióticos y abióticos, de manera tal que en esas condiciones se altere el funcionamiento de los genes que codifican para esas enzimas (5).

Cabe significar que la tolerancia al frío es de naturaleza genética y, por tanto, un carácter varietal; además, una variedad puede ser muy sensible en determinadas etapas de su desarrollo y, en cambio, bastante tolerante en otros. Se conoce que cuando la temperatura desciende de cierto nivel, llamado crítico, se reduce la intensidad de procesos fisiológicos, tales como la respiración, fotosíntesis, absorción radicular y translocación de sustancias orgánicas hacia el grano. Cada etapa, o incluso cada estado fenológico, posee un intervalo de temperaturas óptimas y dos temperaturas críticas, las cuales una vez rebasadas, la planta se resiste en mayor o menor grado según su duración (14).

Algunos autores han observado un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxidodismutasa y peroxidasa, y una disminución del contenido de malondialdehído, un producto de la peroxidación lipídica de las membranas en plantas de arroz sometidas a estrés de bajas temperaturas, así como una respuesta positiva cuando estas fueron tratadas con homobrasinólida, lo que significó un sistema radical más vigoroso y una masa seca de tallos más hojas superior (15).

La Figura 2 muestra el zimograma de las isoenzimas peroxidadas para la variedad IR-837. En ella se advierte en M1 la ausencia de la banda seis únicamente a la temperatura de 20°C; de igual forma, la banda cinco no se presenta a temperaturas de 0 y 5°C, mientras que, por el

contrario, la banda tres solo se presenta en estas temperaturas; además, a 0°C la banda cuatro es de menor intensidad y aparece la banda dos.

Para M2 a 20°C se ausenta la banda cinco. Para las temperaturas de 0 y 5°C, a diferencia del resto, no se presenta la banda cuatro; sin embargo, para estas temperaturas se aprecia la banda tres con menor y mayor intensidad, respectivamente.

En el tercer momento (M3) se mantiene el patrón de control para las diferentes temperaturas. Se aprecia una respuesta diferenciada para los diferentes momentos, tanto en la variedad resistente como susceptible al estrés de temperatura; en algunos casos disminuye la actividad de la enzima, lo que se observa como bandas menos gruesas que el resto y, además, hay inducción de nuevas bandas ante este estrés ambiental en ambos casos.

Se han hecho estudios sobre el efecto de temperaturas bajas en la planta de arroz, principalmente al punto de congelación; sin embargo, se presenta una interrogante a temperaturas por encima de este entre 10 y 21°C, rango en el que los cambios bioquímicos ocurridos en la planta de arroz no han sido bien estudiados. Por otra parte, se ha informado que las temperaturas críticas para la planta de arroz están generalmente por debajo de 20°C y superiores a 30°C y varían de acuerdo con el estado de desarrollo de la planta. Estas cambian con la variedad, el tiempo de duración de la temperatura crítica, los cambios diurnos y nocturnos y el estado fisiológico de las plantas (16).

Otros investigadores han encontrado que las variedades resistentes al frío, gradualmente recuperan las funciones inhibidas por las bajas temperaturas después de la normalización de estas; sin embargo, en las variedades susceptibles, el daño irreversible de las raíces causado por el frío, inhibe la absorción de agua por las raíces (17).

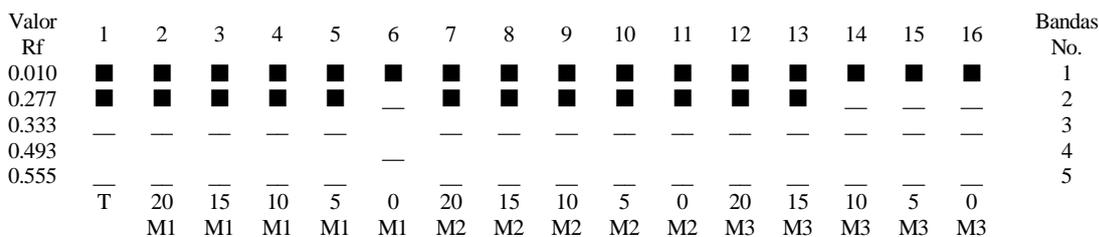


Figura 1. Zimograma de peroxidadas para los tres momentos estudiados (var. Dodo)

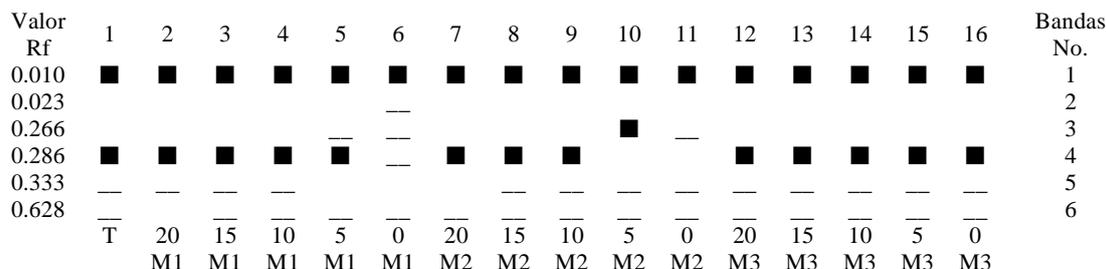


Figura 2. Zimograma de peroxidadas para los tres momentos estudiados (var. IR-837)

En el zimograma de las isoenzimas esterasas de la variedad Dodo (Figura 3), no se encontraron diferencias para el segundo y tercer momentos (M2 y M3) y se mantuvo el patrón de control para todas las temperaturas. Las divergencias aparecen en el primer momento (M1) y radica en una disminución de la intensidad de la banda uno y la aparición de la banda tres en las temperaturas de 0 a 15°C.

Estos resultados pueden estar relacionados con el hecho de que el arroz expuesto a temperaturas bajas durante el estado de plántula, puede sufrir un estancamiento en su crecimiento, debido a la disminución de las reacciones químicas y procesos físicos, pero este fenómeno puede ser reversible, por cuanto la planta se recupera cuando se presentan condiciones favorables de temperatura. Esto justifica que no hayan modificaciones en los patrones de bandas en M2 y M3.

En otras investigaciones se destaca la importancia de las isoenzimas sobre la diferenciación de ecotipos de arroz, observándose diferencias en el comportamiento de las bandas de isoenzimas esterasas a bajas temperaturas y su posible relación con la resistencia a tal temperatura e incluso la formación de la clorofila (18). En este sentido, se debe señalar que las enzimas esterasas están constituidas por un grupo complejo de proteínas asociadas con proteínas intracelulares específicas (5) y el gran número de bandas esterasas encontrado en hojas jóvenes indica que este sistema juega un papel vital en la fotosíntesis (19).

Asimismo, en el zimograma de esterasas de la variedad susceptible IR-837-20-1 (Figura 4), se puede observar que tampoco para el segundo y tercer momentos (M2 y M3), existieron diferencias en el patrón de bandas para las diferentes temperaturas; entretanto, para el pri-

mer momento (M1) a los 10 y 15°C aparece la banda tres muy intensa y desaparece la banda cuatro, a diferencia tanto del resto de los momentos como de los diferentes tratamientos de temperatura, mientras que la banda siete también se ausenta a 0 y 5°C.

También se han estudiado los efectos del frío sobre variedades índicas, japónicas y especies silvestres de arroz respecto a las características fisiológicas tales como la fotosíntesis, respiración de la raíz, absorción de agua y los cambios en la fracción soluble de proteína de la hoja, cuando las plantas fueron tratadas a temperaturas de 5°C; las características fisiológicas antes mencionadas fueron examinadas después de la normalización de la temperatura y encontraron que la recuperación de la fotosíntesis en plantas de arroz incluidas las silvestres, según los síntomas asociados con el frío, estuvo estrechamente correlacionada con la absorción de agua por las raíces y los patrones de cambio de la fracción soluble de proteína de la hoja. Por consiguiente, la inhibición de la fotosíntesis fue confirmada tanto mediante la supresión de la absorción de agua por la raíz como por un desorden en el metabolismo de las proteínas de la hoja (17).

La clorosis, retardo en la síntesis de proteínas y acumulación de aminoácidos libres y amidas, desnaturalización de proteínas, acumulación de azúcar y almidón, fueron también anomalías observadas bajo el efecto de las bajas temperaturas, con diferencias varietales en el grado de cada anomalía. Esto puede ser justificable, ya que además de las propiedades morfoanatómicas de las hojas, las propiedades de la membrana y enzimáticas posiblemente tengan relación con la diferenciación de la termosensibilidad en arroz (18).

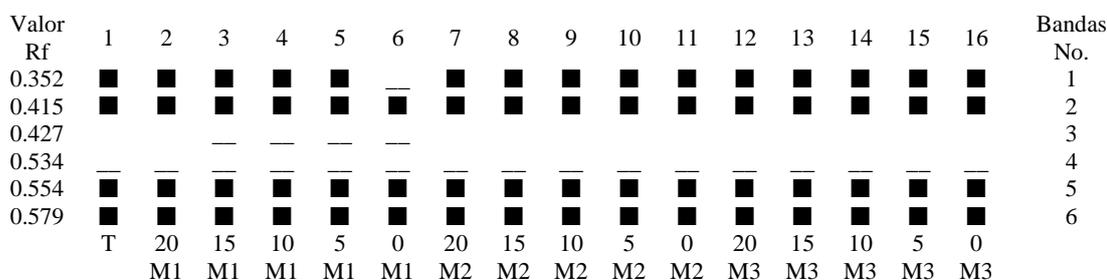


Figura 3. Zimograma de esterasas para los tres momentos estudiados (var. Dodo)

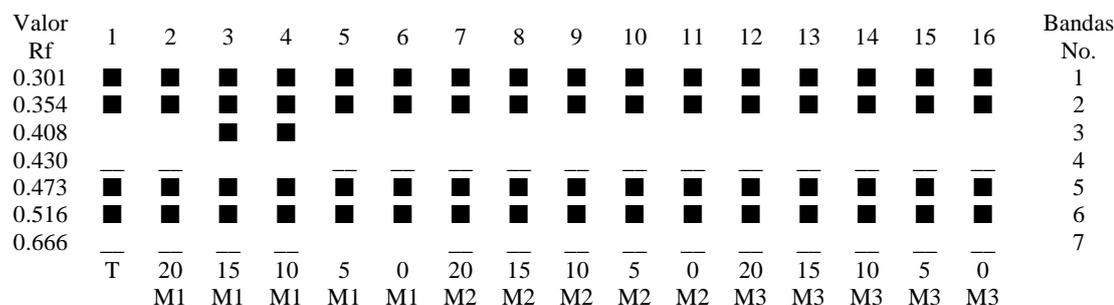


Figura 4. Zimograma de esterasas para los tres momentos estudiados (var. IR-837)

La Figura 5 muestra el zimograma de polifenoloxidasas de la variedad Dodo, en el que se aprecia que inmediatamente después de aplicado el estrés (M1), la banda tres está ausente para todos los tratamientos (0-20 °C) y se observa una disminución de la intensidad de la banda uno de 0 a 10 °C. A diferencia de esto, en el segundo y tercer momentos (M2 y M3), no se observan diferencias entre los tratamientos de temperatura empleados.

Las características de tolerancia son potenciales; no es posible descubrirlas en condiciones óptimas de crecimiento y se evidencian solo cuando actúan sobre la planta los factores adversos del medio. Al respecto, cabe recordar que la tolerancia a los diferentes agentes estresantes, se encuentra conferida por caracteres expresados en los cuatro niveles de organización: desarrollo, estructural, fisiológico y metabólico (20).

Existen evidencias de marcadas diferencias varietales en la relación entre la fotosíntesis neta y la temperatura entre los cultivares de arroz. En este sentido, algunos investigadores han observado que la fotosíntesis neta fue suprimida, acompañada de una reducción de la transpiración, inmediatamente después que las plantas fueron colocadas a 5°C. La fotosíntesis fue recobrada 24 horas después del tratamiento.

Otros resultados muestran que la disminución de la tasa fotosintética debido a los tratamientos de bajas temperaturas, estuvo relacionada con la acumulación de glucosa y almidón, contenidos de clorofila y nitrógeno (17).

De igual forma, los resultados del zimograma de polifenoloxidasas para la variedad IR-837-20-1 se pueden observar en la Figura 6.

En ella se detectan en el primer momento (M1) cambios en la intensidad de las bandas dos y tres; también para el segundo momento (M2), se evidencian cambios en la intensidad de las bandas dos y tres, y además la banda cinco solo aparece a las temperaturas de 0 y 5°C,

mientras que la banda seis está presente únicamente a 0°C. Al analizar el tercer momento (M3), no se encontraron diferencias entre las temperaturas y está presente la banda seis en todos los tratamientos, o sea, desde 0 hasta 20°C.

En experimentos realizados en Japón, donde las plantas fueron sometidas a bajas temperaturas por el día y la noche, se observó la respuesta de la fotosíntesis y transpiración en estas condiciones, variedades índicas disminuyeron su tasa fotosintética, mientras que el decrecimiento en japónicas no fue severo. Al mismo tiempo, disminuyó en las índicas el índice de transpiración, indicando el cierre de los estomas. Los resultados mostrados sugieren la posibilidad de que el balance hídrico esté también involucrado en la sensibilidad de las variedades de arroz a las bajas temperaturas (21).

De manera general, se debe señalar que en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, las plantas superiores son capaces de activar o inhibir la expresión de genes específicos o acumulación de un grupo de proteínas como las inducidas por el estrés, las cuales podrían ser utilizadas en los programas de mejoramiento genético. *Porcentaje de daño foliar medido por la permeabilidad de membrana.* En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos al analizar el grado de termoestabilidad de la membrana por conductimetría.

Tabla I. Análisis de varianza para el porcentaje de daño foliar medido por la permeabilidad de membrana

Temperatura (°C)	Medias var. Dodo	Medias var. IR-837
	Resistente	Susceptible
20	0.704 a	2.570 a
15	4.220 ab	15.460 b
10	7.616 b	15.770 b
5	14.510 c	16.660 b
0	16.605 c	17.375 b
F	27.007***	12.510***
ESx	1.1415	1.6371

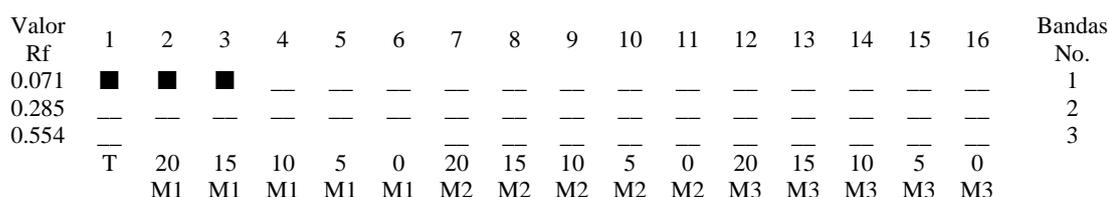


Figura 5. Zimograma de polifenoloxidasas para los tres momentos estudiados (var.Dodo)

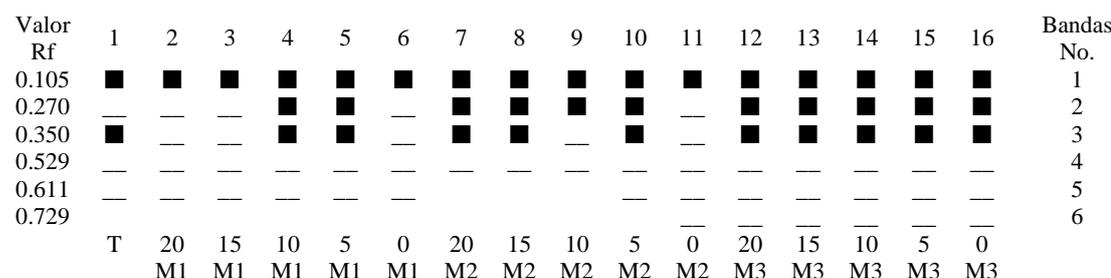


Figura 6. Zimograma de polifenoloxidasas para los tres momentos estudiados (var. IR-837)

Se encontraron diferencias significativas del porcentaje de daño foliar para las diferentes temperaturas, observándose para la variedad resistente un aumento gradual del porcentaje de daño según descende la temperatura, mientras que en la variedad susceptible, el aumento de este indicador a partir de 15°C es muy brusco, tomando valores similares a los que alcanza la variedad resistente a 5°C.

Como puede apreciarse en la variedad IR-837, el daño foliar es severo en todos los tratamientos de temperatura excepto para 20°C. En este sentido, se conoce que las propiedades morfoanatómicas de las hojas tienen un importante papel en la sensibilidad y resistencia de las variedades de arroz a las bajas temperaturas a través de la regulación del balance hídrico. También se han informado las diferencias de la estructura de las hojas entre las variedades índicas y japónicas, y que son especialmente marcadas en el estado de plántula. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la adaptabilidad de índicas y japónicas a las altas y bajas temperaturas (22).

Es importante resaltar que los tratamientos de frío a 20, 5 y 0°C mostraron valores muy parecidos entre las dos variedades, a diferencia de lo que ocurre a las temperaturas de 15 y 10°C, en las que se observan, sin dudas, diferencias apreciables en cuanto al flujo de electrolitos que tiene lugar después de ser dañadas las membranas de las células por el frío, siendo mayor el daño en la variedad IR-837.

Esta respuesta se aprecia mejor en la Figura 7, donde también se reflejaron los resultados de la prueba de comparación de medias por temperaturas, en la que se observa que solo a los 15 y 10°C los dos genotipos difieren estadísticamente. También se ha informado que este método es bastante sensible, al detectar diferencias en el flujo de electrolitos de las hojas, provocados por tratamientos de temperaturas que difieren en solo 5°C (12).

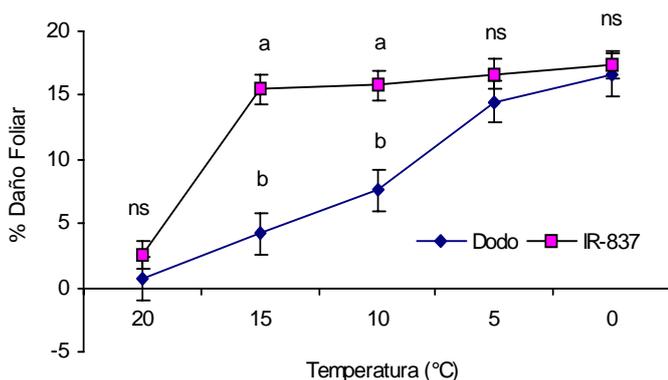


Figura 7. Porcentaje de área foliar afectada en ambos cultivares (en cada punto se representa la media \pm ES)

El método de conductimetría ha sido ampliamente utilizado con éxito para diversos fines, desde que se empleó por primera vez en estudios de este tipo por Sullivan (1972), entre los que se encuentran evaluar el

efecto del estrés salino en variedades de caña de azúcar (23) y el establecimiento de un método eficiente para evaluar la tolerancia al calor en tomate (12).

Se puede decir que el momento de extracción de muestra que brindó una información más clara y mayor utilidad en todos los casos fue el M1. En el caso de los otros momentos, pueden no apreciarse diferencias entre los tratamientos o ser de difícil interpretación en relación con la posible influencia al estrés de frío, en el caso de haberla.

Por otra parte, el sistema peroxidasa no resultó de interés como marcador bioquímico relacionado con la resistencia a este factor abiótico, ya que los cambios se observan a 0°C, una temperatura que no es frecuente en Cuba y además se detectó que el sistema más sensible a los cambios de temperatura es el de polifenoxidasas, ya que a los 20°C, se puede observar la desaparición de una de las bandas. Asimismo, resulta interesante la coincidencia de que a 15°C ocurran cambios en el patrón esterasas con la aparición de una nueva banda y que también se aprecien cambios en el porcentaje de daño foliar medido por la permeabilidad de membrana, lo cual pudiera interpretarse como una respuesta a este tipo de estrés, por lo que sugerimos la utilización de estas técnicas como posibles marcadores bioquímicos.

REFERENCIAS

1. Fuentes, J. L. /et al./ Caracterización de la diversidad genética inducida por radiaciones ionizantes en genotipos de arroz con diferentes fuentes citoplasmáticas. Memorias, En: Encuentro Internacional de Arroz. (1:1998:La Habana), p. 197-199.
2. Alvarez, A. /et al./ Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 21, no. 4, p. 39-44.
3. Florido, M. /et al./ Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon* spp). *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p:61-69.
4. Camejo, D. /et al./ Changes induced by high temperatures in photosynthesis and antioxidant response on two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p. 33-37.
5. Florido, M. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfobioquímicas y tolerancia al calor [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 1999, 87 p.
6. Díaz, S. H. Caracterización morfoagronómica y genético-bioquímica de 19 accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.) [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2000, 98 p.
7. Rodríguez, Y. /et al./ Polimorfismo bioquímico de siete especies de hongos micorrizógenos arbusculares inoculados en sorgo. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 25-28.

8. Cevallos, A. M. Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café (Coffea spp.), mediante el uso de marcadores morfológicos y moleculares [Tesis de Doctorado]; INCA, 2000.
9. Florido, M. /et al./ Patrones electroforéticos de peroxidases, catalasas, superóxido, dismutasas y proteínas totales en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) sometidas a estrés de temperaturas. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 45-48.
10. Lara, R. M. /et al./ Isoenzymatic análisis for detecting *in vitro* variability and/or stability of economically important crops. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 3, p. 39-47.
11. Hasegawa, T. H. Effect of low water temperature on growth and nitrogen uptake in paddy rice. *Crop Science*, 1998, p. 67-68.
12. Florido, M. /et al./ Establecimiento de un método eficiente para evaluar la tolerancia al calor en tomate (*Lycopersicon* spp.). *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 69-73.
13. García, A. /et al./ Estabilidad de la membrana y contenido de proteínas totales en callos de arroz sometidos a estrés hídrico. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 17-20.
14. Aguilar, M. Cultivo del arroz en el sur de España. Centro de Investigación e Información Agraria, Sevilla, España, 2001, 189 p.
15. Chen, S. N. /et al./ The effect of a compound inducing cold resistance and homobrassinolide on the chilling resistance of plateau rice. *Acta Botanica Yunnanica*, 1997, vol. 19, no. 2, p. 184-190.
16. Vargas, J. P. El arroz y su medio ambiente. En: *Arroz: Investigación y Producción*. Colombia, CIAT, Ed. XYZ, 1985, p. 19-43.
17. Matsuo, T. /et al./ Science of the Rice Plant Physiology. Japan, Food and Agriculture Policy Research Center, 1995, vol. 2, 1240 p.
18. Tsunoda, S. y Takahashi, N. Biology of Rice. Japan, Ed. Japan Sci. Soc. Press, 1999, p. 89-115.
19. Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soja (*Glycine max* (L) Merrill) [Tesis de Doctorado]; Universidad de La Habana, 1986.
20. González, L.M. /et al./ Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 27-37.
21. Kishitani, S. y Tsunoda, S. *Photosynthetica*, 1974, vol. 8., p. 161-167.
22. Vergara, B. S. Climate and Rice. Philippines, IRRI, 1976, p. 67-86.
23. Schmidty, A. y González, V. Medición de la conductividad eléctrica en discos de hojas y estudio morfoanatómico de callos de cuatro variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) bajo condiciones de estrés salino. Memorias, En: Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal (3:1998:La Habana), 345 p.

Recibido: 18 de junio de 2004
Aceptado: 17 de marzo de 2005

Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

Las Oligosacarinas reguladoras de los mecanismos de defensa, del desarrollo y la diferenciación de las plantas

Coordinador: Ms.C. Humberto Izquierdo Oviedo
Ms.C. Alejandro Falcón
Fecha: agosto
Duración: 40 horas

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 86-3773
Fax: (53) (64) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu