

IDENTIFICACIÓN DE QTLs ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA DURANTE LA GERMINACIÓN BAJO FRÍO EN ARROZ (*Oryza sativa* L)

Mariano Durand¹; Wyss Beatriz², Rodríguez Andrés³, Colazo José⁴, Maiale Santiago⁵.

Palabras claves: arroz, bajas temperaturas, germinación, enzimas.

Introducción

En arroz (*Oryza sativa* L.) la temperatura de germinación óptima se encuentra entre 20 y 35°C, siendo la mínima 10°C y la máxima 45°C (Yoshida, 1981). Debido a esto, cuando las plantas son sometidas a temperaturas por debajo del rango óptimo, la germinación y la elongación declinan rápidamente. En Argentina, extensas áreas arroceras se encuentran sometidas a bajas temperaturas al inicio de la temporada de crecimiento, con temperaturas mínimas que promedian los 13°C (Livore, 2006).

Por otro lado, el potencial lumínico en la Provincia de Entre Ríos es suficiente para lograr altos rendimientos, pero las bajas temperaturas obligan a demorar la fecha de siembra con el consiguiente menor aprovechamiento de la radiación (Quinteros, 2009). La capacidad de tolerar bajas temperaturas, tanto en la germinación como en los estadios vegetativos tempranos, es una característica muy considerada en los programas de mejoramiento.

En el proceso de germinación cobra especial relevancia la degradación de almidón a azúcares simples para alimentar al vástago o las raíces. Las enzimas que participan son principalmente las amilasas, cuyos niveles aumentan desde las 24 horas de imbibición (Basuchaudhuri, 2014), siendo afectadas por las bajas temperaturas (Shaw y Chuang, 1982). En un trabajo anterior, se estudiaron las enzimas amilolíticas y la tolerancia a bajas temperaturas en genotipos de uso local (Maiale et al. 2024). Se midió la actividad de las amilasas y azúcares totales remanentes en el grano y el largo del coleóptilo a 14 días (LongCol14) como índice de tolerancia. El análisis de correlación mostró asociación entre LongCol14 y todos los parámetros con excepción de la alfa amilasa, con un r de Pearson de 0,5042 para azúcares totales. En base a estos resultados, se planteó como objetivo identificar regiones genómicas y genes involucrados en la degradación del almidón en condiciones de bajas temperaturas.

Materiales y Métodos

Se utilizó el panel de diversidad 1 (RDP-1), genotificado por Mc. Couch et al. (2016). Las evaluaciones se realizaron sobre un total de 220 accesiones, que comprendían 118 pertenecientes a la subespecie Japónica, distribuida en 68 japónica templado (TEJ), 35 japónica tropical (TRJ), 9 aromáticas (ARO) y 6 Admix Japónica, junto con 102 accesiones de la subespecie Indica que comprendían 52 Aus (AUS), 45 indica (IND), y 5 Admix Indicas. Las semillas se sembraron en cámara de crecimiento a 15°C y el tiempo óptimo de medición se estableció en 5 días después de la siembra (DDS). Se midieron variables relacionadas con la actividad amilolítica, incluyendo actividad de α -amilasa, β -amilasa, actividad diastásica total (DT) y azúcares totales (AT) equivalente a maltosa remanente.

Para este trabajo se consideró únicamente la variable azúcares totales (AT), debido a su correlación significativa con la longitud del coleóptilo a 14 DDS bajo condiciones de frío, establecida en un estudio previo (Maiale et al., 2024). Los azúcares totales remanente en el grano se determinaron mediante la reacción con ácido 3,5- dinitrosalicílico, según describe Liu et al (2018).

¹ Ing. Agr., INTA, Ruta provincial n 39, km 143.5, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, durand.mariano@inta.gob.ar

² Bioq. CONICET, beatriz.wyss@intech.gov.ar

³ Dr., CONICET, andresrodriguez@intech.gov.ar

⁴ Lic., INTA, colazo.jose@inta.gob.ar

⁵ Dr., CONICET, smaiale@intech.gov.ar

La comparación entre subpoblaciones se efectuó mediante análisis de varianza (ANOVA). El análisis de asociación genómica se realizó utilizando el programa TASSEL 5.2.96 (BRADBURY et al., 2007). Se utilizó el genotipado de 700K y fue filtrado con un MAF < 5%. Luego, se realizó una matriz de estructura de población mediante el análisis PCA con 5 componentes y una matriz de parentesco kinship (K). Posteriormente se corrió un modelo lineal mixto (MLM). La identificación de QTLs se realizó siguiendo el criterio propuesto por Shakiba et al. (2017), considerando regiones genómicas de 200 kb que contuvieran al menos tres SNPs con valores de p significativos menores a 10^{-4} . La búsqueda de genes asociados a los QTLs se realizó utilizando la base de datos de MSU (www.rice.uga.edu).

Resultados y Discusión

Se observó una diferencia significativa en los niveles de azúcares totales (AT) entre las subespecies japónica e índica (Figura 1). Las accesiones japónicas presentaron mayores concentraciones promedio de AT que las índicas, lo que sugiere una posible base genética diferenciada para la acumulación de azúcares durante la germinación. La subespecie japónica ha sido consistentemente reportada como más tolerante al frío en comparación con la índica (Wang et al., 2016; Shakiba et al., 2017; Shimoyama et al., 2020; Thapa ET AL., 2020). Esto se debe, en parte, a la selección artificial realizada durante la domesticación en regiones templadas, lo que favoreció la adaptación a climas fríos.

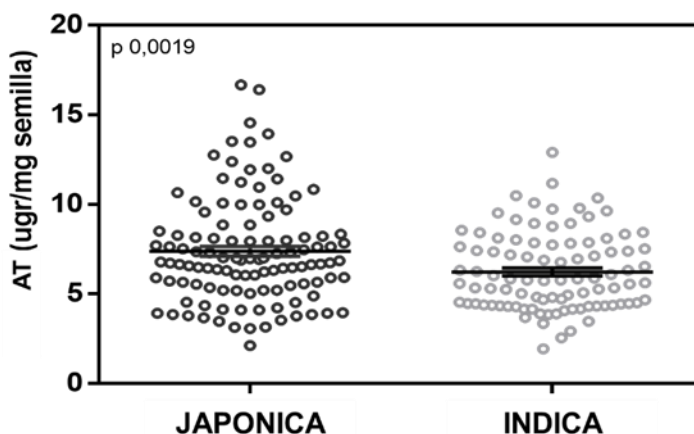


Figura 1. Comparación de Azúcares Totales (AT) entre accesiones Japónica e Índica del Panel de Diversidad.

La figura 2 muestra el Manhattan Plot y el gráfico de Cuantiles correspondientes para la variable AT. Se observaron SNPs por encima del umbral de significancia ($-\log_{10}(p) \geq 4$) distribuidos en todos los cromosomas. Sin embargo, aplicando el criterio de agrupamiento propuesto por Shakiba et al. (2017) para la delimitación de QTLs, se localizaron cuatro QTLs en total: tres en el cromosoma 8 y uno en el cromosoma 9.

Los cuatro QTLs fueron denominados qMalRem-a, qMalRem-b y qMalRem-c en el cromosoma 8, y qMalRem-d en el cromosoma 9 (tabla 1). En total, se identificaron 262 genes, de los cuales 76 tienen función asignada. En el QTL qMalRem-c se concentró la mayor cantidad de genes (110 en total), mientras que qMalRem-d mostró la proporción más alta de genes con función conocida (47%).

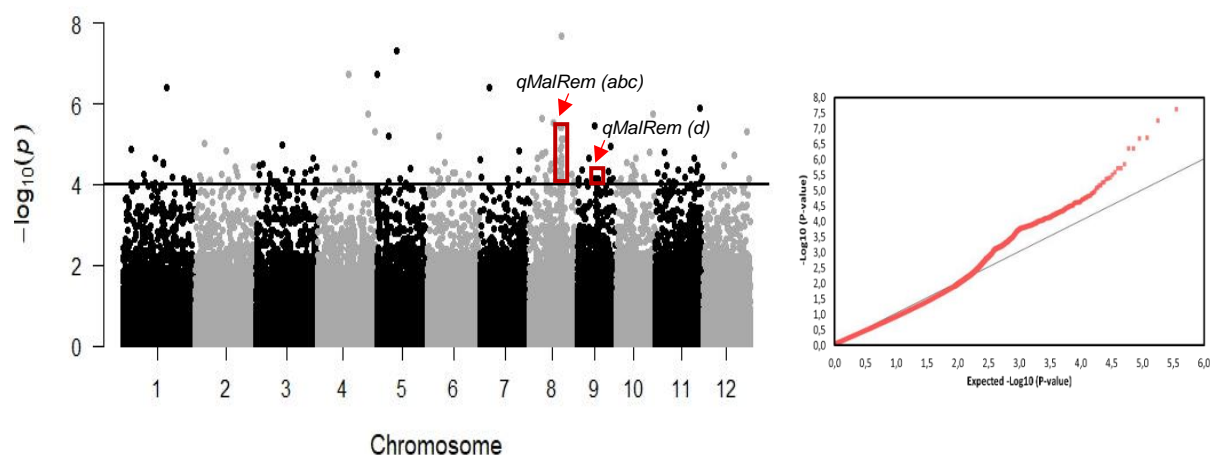


Figura 2. Manhattan plot (izquierda) y Q-Q plot (derecha) del análisis de asociación para la variable azúcares totales (AT). En el Manhattan plot el eje X muestra las coordenadas genómicas y el eje Y es el valor p del logaritmo negativo de cada SNP.

Tabla 1: QTLs identificados mediante GWAS asociados a la acumulación de azúcares totales.

QTL	CHR	Posición (Mb)	Total de Genes	Genes con función
qMalRem-a	8	7,24 - 7,59	50	9
qMalRem-b	8	15,32 - 15,57	34	9
qMalRem-c	8	18,28 - 19,04	110	26
qMalRem-d	9	11,60 - 12,00	68	32

Tabla 2. Genes con función conocida dentro de las regiones QTL, asociados a estrés abiótico.

QTL	Gen	Función
qMalRem-a	LOC_Os08g12680	zinc finger LSD1 subclass family
	LOC_Os08g12750	serine/threonine-protein kinase HT1
	LOC_Os08g12760	YT521-B, putative
	LOC_Os08g12780	chloroplast envelope membrane protein
qMalRem-b	LOC_Os08g25310	phosphatidylinositol transfer
	LOC_Os08g25570	histone deacetylase
qMalRem-c	LOC_Os08g29770	endoglucanase, putative
	LOC_Os08g29910	prenyltransferase, putative
	LOC_Os08g30520	LTG4 and LTG5 gen
qMalRem-d	LOC_Os09g19820	aminopeptidase, putative

Entre los genes identificados pueden destacarse Os08g25570 que está involucrado en la germinación de las semillas y la respuesta a AG y ABA (Yoon et al. 2022). Otros genes (Os08g25310, Os08g29910 y Os09g19820) están involucrados en la osmorregulación y el estrés hídrico (Mohasses et al 2020, Li et al 2021 y Pei et al 2023). Por otro lado, Os08g30520 está involucrado en la respuesta a germinación en frío obtenido mediante GWAS en un panel de diversidad propio, pero en condiciones similares a este trabajo (Li et al 2024).

Conclusiones

El análisis de asociación permitió localizar cuatro QTLs relacionados con la acumulación de azúcares en los cromosomas 8 y 9. Dentro de estas regiones se identificaron genes con funciones asociadas a procesos de germinación y respuestas a condiciones de estrés abiótico, lo que refuerza su potencial utilidad en programas de mejoramiento orientados a la tolerancia al frío.

Referencias

- BASUCHAUDHURI P (2014). Cold tolerance in Rice Cultivation. Ed: CRC Press, Boca Raton, FL, USA ISBN 978-1-4822-4517-2.
- BRADBURY, P. J. et al. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635, 2007.
- CHAMANI MOHASSES, F., Solouki, M., Ghareyazie, B., Fahmideh, L., & Mohsenpour, M. (2020). Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. *PLoS One*, 15(8), e0237334.
- LI, J., Zhang, M., Yang, L., Mao, X., Li, J., Li, L., ... & Zou, D. (2021). OsADR3 increases drought stress tolerance by inducing antioxidant defense mechanisms and regulating OsGPX1 in rice (*Oryza sativa* L.). *The Crop Journal*, 9(5), 1003-1017.
- LIU L, Xia W, Li H, Zeng H, Wei B, Han S and Yin C (2018). Salinity Inhibits Rice Seed Germination by Reducing α -Amylase Activity via Decreased Bioactive Gibberellin Content. *Front. Plant Sci.* 9:275.
- LIVORE AB. (2006) La genética del arroz. En: El arroz su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos. Editor: Benavidez RA. Editorial UNL-UNER. Concepción del Uruguay, Argentina.
- MAIALE, S.J., Wyss, B., Durand, M., Colazo, J.L., & Rodriguez, A. (2024). Evaluación de la actividad amilolítica en germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) a bajas temperaturas. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, Vol. XXXV, Issue 1 (suppl.), pp. 75-88.
- MCCOUCH. S. et al. Open Access Resources for Genome Wide Association Mapping in Rice. *Nature Communication*, 7 (10532) 4 Feb online doi 10.1038/ncomms10532, 2016.
- PEI, M., Xie, X., Peng, B., Chen, X., Chen, Y., Li, Y., ... & Lu, G. (2023). Identification and expression analysis of phosphatidylinositol transfer proteins genes in rice. *Plants*, 12(11), 2122.
- QUINTERO CE (2009). Factores limitantes para el crecimiento y productividad del arroz en Entre Ríos, Argentina: tesis doctoral. 1ª ed. Paraná: Fundagro-Fundación para el Desarrollo Agropecuario. 180 p. Tesis doctoral.
- SHAKIBA E, Edwards JD, Jodari F, Duke SE, Baldo AM, Korniliev P, et al. (2017) Genetic architecture of cold tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through high resolution genome-wide analysis. *PLoS ONE* 12(3): e0172133. doi: 10.1371/journal.pone.0172133.
- SHAW J, Chuang L (1982). Studies on the amylase from the germinated rice seeds. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 23:45-61
- SHIMOYAMA, N., Johnson, M., Beaumont, A., & Schläppi, M. (2020). Multiple Cold Tolerance Trait Phenotyping Reveals Shared Quantitative Trait Loci in *Oryza sativa*. *Rice*, 13(57). <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00414-3>.
- THAPA R, Tabien RE, Thomson MJ y Septiningsih EM (2020). Genome-Wide Association Mapping to Identify Genetic Loci for Cold Tolerance and Cold Recovery During Germination in Rice. *Front. Genet.* 11:22. doi: 10.3389/fgene.2020.00022.
- University of Georgia. (s.f.). Rice Diversity Panel 1 (RDP1). <http://www.rice.uga.edu>
- YOON, H., Seong, G., Lee, S. J., Lim, C., & Paek, N. C. (2022). Histone deacetylases in rice development and stress responses. *Journal of Plant Biology*, 65(3), 175-185.
- YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. IRRI Los Baños, Laguna, Philippines, 1981.
- WANG, D., et al. (2016). Genome-wide association mapping of cold tolerance genes at the seedling stage in rice. *Rice*, 9(61). <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0133-2>