

MAPEO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO PARA TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS EN ARROZ (*Oryza sativa* L) DURANTE LA GERMINACIÓN

Mariano Durand¹; José Colazo²; Alberto Livore³; Andrés Rodríguez⁴; Santiago Maiale⁵.

Palabras claves: Arroz, bajas temperaturas, germinación, coleóptilo.

INTRODUCCIÓN

La temperatura óptima de germinación en arroz es de entre 20 a 35°C, siendo la temperatura mínima 10°C y la máxima 45°C (YOSHIDA, 1981) y en zonas templadas el crecimiento se ve afectado con temperaturas cercanas o inferiores a 15 °C (PINCIROLI et al., 2004).

En Argentina, se registran bajas temperaturas al inicio de la temporada de crecimiento, que promedian los 13°C (LIVORE, 2006), lo que obliga a retrasar la fecha de siembra (QUINTEROS, 2009), siendo la tolerancia un carácter de importancia en el mejoramiento del arroz.

Numerosos trabajos se han desarrollado para evaluar la tolerancia a frío en arroz durante la germinación como el de Da Cruz y Milach (2004) y se han desarrollado técnicas genéticas para encontrar regiones asociadas a genes de tolerancia.

El mapeo por asociación del genoma completo (GWAS) está basado en el desequilibrio de ligamiento y en las recombinaciones históricas de una población para mapear regiones o genes. En arroz se ha utilizado para estudiar la tolerancia a Aluminio (FAMOSO et al., 2011); tolerancia a salinidad (KUMAR et al., 2015), la morfología de grano, planta y raíces (BISCARINI et al., 2016) y longitud de grano (McCOUCH et al., 2016).

El objetivo del presente trabajo fue identificar genes o regiones genómicas asociadas a tolerancia a frío en estadio de germinación mediante un análisis de asociación de genoma completo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. Se utilizó el panel de diversidad N°1 (RDP-1), el cual está genotipificado a 44K marcadores SNPs, McCouch et al. (2016). Se evaluaron 261 líneas, comprendiendo las cinco subespecies (10 ARO, 71 TEJ, 77 TRJ, 61 IND y 42 AUS).

Metodología de Fenotipado. Las accesiones fueron evaluadas en condiciones de frío, bajo un régimen térmico que simula las temperaturas de suelo que se registran en la EEA Concepción del Uruguay, durante la primera quincena de septiembre. Para esta región, la siembra en el mes de septiembre es considerada siembra temprana. El rango de temperatura del régimen establecido varía de 13°C a 17°C, con una media de 15°C. Las semillas se colocaron en cajas de Petri con dos capas de papel de germinación y se humedecieron con una solución de Carbendazim 2,5 ppm para evitar contaminación. El diseño experimental fue completo al azar con tres repeticiones.

Las cajas se colocaron aleatoriamente en la cámara de germinación, durante 14 días. La variable analizada en este trabajo fue longitud de coleóptilo, medida al día 14 (LongCol14). Este

⁵ Dr., INTECH, CONICET, Int Marino Km8, Chascomús, Argentina, smaiale@intech.gov.ar

¹ Ing. Agr., INTA, marianodurand87@gmail.com

² Lic., INTA, colazo.jose@inta.gob.ar

³ Dr., INTA, alivore@yahoo.com.ar

⁴ Dr., CONICET, andresrodriguez@intech.gov.ar

parámetro fue seleccionado por su fuerte correlación con crecimiento de plántulas a bajas temperatura en ensayos realizados en condiciones de campo (R^2 0,82).

Análisis de Asociación. Para el procesamiento de la asociación entre el fenotipo y el genotipo se utilizó el programa TASSEL 5.2.81 (BRADBURY et al., 2007). Los marcadores fueron filtrados con un $MAF < 5\%$ y una tasa de datos perdidos menor a 5%, quedando 34454 SNPs. 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) y se determinaron los marcadores significantes con un $p < 0.0001$ (\log_4) según McCouch et al. (2016). La búsqueda de genes asociados a los marcadores significativos se realizó utilizando la base de datos de MSU (www.rice.uga.edu), con un intervalo de 200kb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la Varianza (ANOVA). Los resultados para el parámetro LongCol14 se observan en la figura 1. La subespecie japónica templada (TEJ) mostró diferencias significativas respecto a las demás subespecies, con excepción de las aromáticas (ARO). La subespecie AUS presentó los genotipos más sensibles para LongCol14. En coincidencia con estos resultados, Wang et al (2018), encontraron que los cultivares de origen japónica templado y japónica tropical poseen mayor porcentaje de germinación que los AUS, aunque estos autores observaron bajo porcentaje en sus líneas aromáticas a diferencia del presente trabajo.

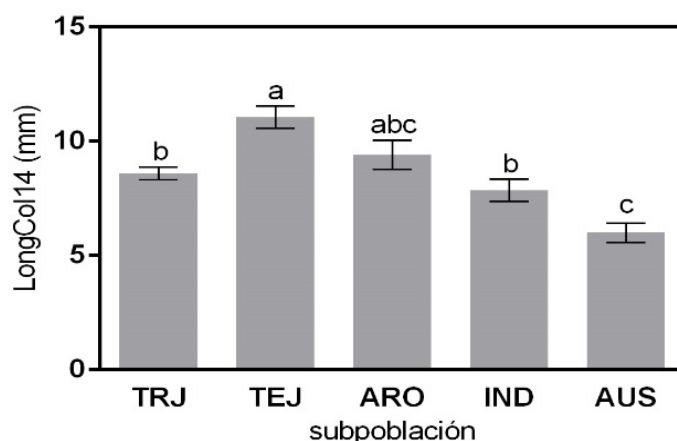


Figura 1: Grafico de barras para el parámetro LongCol14 del panel RDP-1. TRJ: japónica tropical, TEJ: japónica templada, ARO: aromático, IND: índica, y AUS. Comparación de medias, Tukey $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencias significativas.

Análisis de Asociación. La figura 2 muestra el Manhattan Plot y el gráfico de Quantiles correspondientes para la variable LongCol14. Se observan un importante pico de asociación en el cromosoma 4 y otro menor en el cromosoma 1. También se observan marcadores en el cromosoma 9 y 11. Los marcadores SNPs de estos 4 cromosomas tuvieron un p -valor menor a 0.0001 que fue el límite considerado para establecer significancia de acuerdo con McCouch et al (2016). Se identificaron 4 QTL con un total de 188 genes, de los cuales solo 65 tienen una función asignada (Tabla 1). El QTL del cromosoma con mayor número de marcadores asociados, tiene solo el 13% de sus genes identificados. Mientras que, el QTL del cromosoma 1 posee el 87 % de sus genes con función asignada.

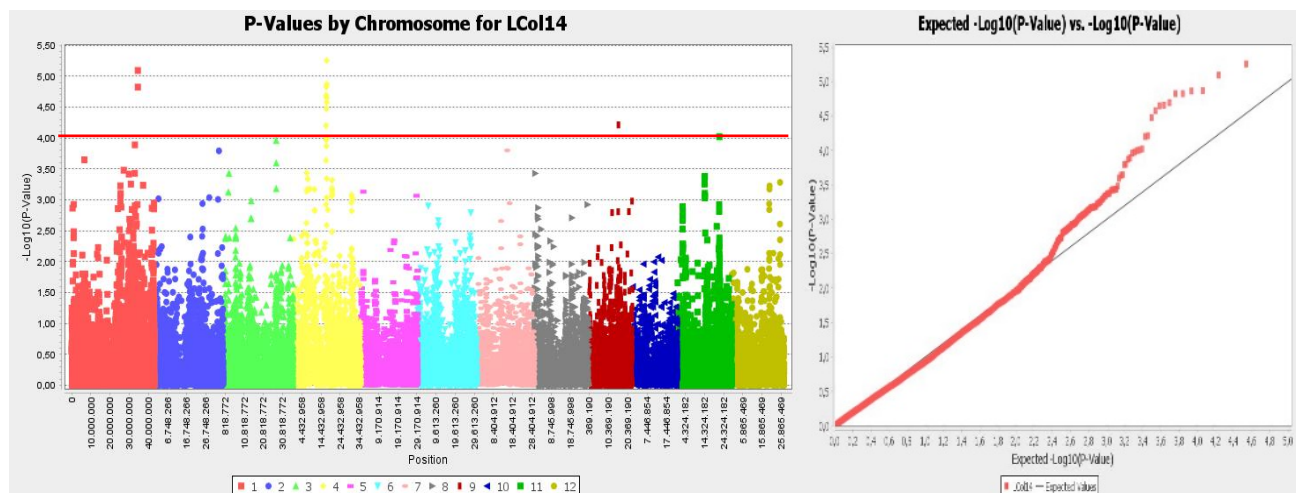


Figura 2: Manhattan Plot y QQ plot para el carácter LongCol14 en germinación a bajas temperaturas. La línea roja indica el límite de p-valor significativo ($\log 4$) para los marcadores.

Otros autores hallaron marcadores asociados a bajas temperaturas en germinación en los cromosomas 10 y 11 (WANG et al., 2018), estando en este último, ubicado en la posición 0.140 - 0.141 Mb. Mientras tanto, en este trabajo, los marcadores se encontraron en la posición 22-22.20 Mb del cromosoma 11 (Tabla 1).

Tabla 1: QTL identificados mediante GWAS para el carácter LongCol14, ubicación en los cromosomas, genes totales encontrados y genes con función atribuida.

| QTL | Chr | Posición (Mb) | Total de Genes | Genes con función |
|-------------|-----|---------------|----------------|-------------------|
| qLongCol14a | 1 | 34,42 - 34,62 | 31 | 27 |
| qLongCol14b | 4 | 16,98 - 17,69 | 93 | 12 |
| qLongCol14c | 9 | 15,39 - 15,59 | 29 | 15 |
| qLongCol14d | 11 | 22,00 - 22,20 | 35 | 11 |

Tabla 2: Funciones asignadas a genes identificados en el qLongCol14b pertenecientes al cromosoma 4

| Gen | Función |
|----------------|--|
| LOC_Os04g28680 | NAD_binding_4 |
| LOC_Os04g28690 | fatty acyl coA reductase |
| LOC_Os04g28780 | serine/threonine-protein kinase receptor precursor |
| LOC_Os04g28860 | A/G specific adenine glycosylase/endonucleaseIII |
| LOC_Os04g28870 | alcohol dehydrogenase zinc-containing |
| LOC_Os04g28990 | alcohol dehydrogenase zinc-containing |
| LOC_Os04g29000 | Flavonol sulfotransferase-related |
| LOC_Os04g29030 | alcohol dehydrogenase zinc-containing |
| LOC_Os04g29090 | FAD-binding and arabino-lactone oxidase |
| LOC_Os04g29210 | FAD-binding and arabino-lactone oxidase |
| LOC_Os04g29580 | protein kinase |
| LOC_Os04g29680 | protein kinase |

Dentro de los genes localizados en el qLongCol14b se encuentran Os4g28870, Os4g28990 y Os4g29030. Estos genes poseen función alcohol deshidrogenasa (ADH). Según Kato-Noguchi y

Yasuda (2007), el etanol y la actividad ADH se incrementan en raíces y vástagos de plántulas de arroz de 5 días de edad bajo condiciones de bajas temperaturas. Mientras que, inhibidores de ADH disminuyen la tolerancia a bajas temperaturas en raíces y vástago. Esta reducción en la tolerancia se recupera con el agregado de etanol exógeno. Por otro lado, la sobreexpresión de ADH en *Arabidopsis* le confiere tolerancia al frío (SONG; LIU; MAE, 2019).

CONCLUSIÓN

Se hallaron 4 regiones genómicas que contienen un total de 188 genes, asociadas a germinación a bajas temperaturas en arroz mediante la técnica de GWAS. El parámetro evaluado en las accesiones fue previamente asociado a respuesta de cultivares bajo condiciones ambientales de siembra temprana.

AGRADECIMIENTOS

A fundación PROARROZ por su apoyo financiero para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISCARINI, F. et al. Genome-Wide Association Study for Traits Related to Plant and Grain Morphology and Root Architecture in Temperate Rice Accessions. **PLoS ONE** 11 (5): e0155425, 2016.
- BRADBURY, P. J. et al. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics** 23:2633-2635, 2007.
- da CRUZ, R.; MILACH, S. Cold tolerance at germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Science Agricola**, 61 (1): 1-8, 2004.
- FAMOSO, A. N. et al. Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. **PLoS Genetic** 7(8): e1002221, 2011.
- KATO-NOGUCHI, H., YASUDA, Y. Effect of low temperature on ethanolic fermentation in rice seedlings. **Journal of Plant Physiology**, 164:1013-1018, 2007.
- KUMAR, V. et al. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). **DNA Research**, 1-13, 2015.
- Livore, A. B. La genética del arroz. En: **El arroz su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos**. Editor: Benavidez RA. Editorial UNL-UNER. Concepción del Uruguay, Argentina, 2006.
- 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.
- PINCIROLI, M. et al. Aplicación de índices agroclimáticos sobre la productividad de arroz en una zona templada marginal. **Actas de la 10 Reunión Argentina y 4 Latinoamericana de Agrometeorología**, 2004.
- QUINTERO, C. E. 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, 2009.
- SONG, Y.; LIU, L.; MA, X. CbADH1 improves plant cold tolerance. **Plant Signaling and Behavior**, 14 (7): 1612680, 2019.
- WANG, H. et al. Genome-wide association study reveals candidate genes related to low temperature tolerance in rice (*Oryza sativa*) during germination. **3Biotech**, 8: 235, 2018.
- YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. IRRI Los Baños, Laguna, Philippines, 1981.