

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

Pachecoy, M.I.^{1*}, Marín, A.R.¹, Pontaroli, A.C.²

Palabras clave: frío, plántula, germinación, polimorfismo de nucleótido simple, indel

INTRODUCCIÓN

El arroz es una especie de clima templado-subtropical a subtropical susceptible a frío durante las etapas iniciales del desarrollo (FAO, 2003). Las bajas temperaturas pueden afectar el crecimiento y desarrollo del cultivo desde la germinación hasta el llenado de los granos, reduciendo marcadamente el rendimiento (NAKAGAHARA *et al.*, 1997). En particular, la germinación, el establecimiento de plántulas, el inicio del estadio reproductivo y el llenado de granos son los momentos de mayor riesgo de daño por frío (YE *et al.*, 2009).

Si bien existen en el mundo materiales tolerantes, actualmente no se dispone de materiales de este tipo adaptados a la región arrocería argentina, con los que se podría adelantar la fecha de siembra, hacer coincidir la floración con el momento de máxima radiación solar y aumentar el rendimiento.

Según el régimen térmico de Corrientes no habría riesgo de daño por bajas temperaturas en la etapa reproductiva, pero éstas podrían ser una limitante en la etapa de germinación y establecimiento del cultivo.

En este sentido, ya se ha realizado el mapeo de la tolerancia a bajas temperaturas al estadio de plántula en poblaciones segregantes y el mapeo fino de un QTL asociado al carácter (ANDAYA Y MACKILL, 2003). A su vez se han propuesto varios genes candidatos, entre ellos *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* (ANDAYA Y TAI, 2006) y *OsCDPK13* (ABBASI *et al.*, 2004).

Si bien se dispone de información sobre el control genético de la tolerancia a bajas temperaturas en estadios tempranos del desarrollo en arroz (LOU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009; KIM, *et al.*, 2011), no se conoce el comportamiento del material del programa de mejoramiento genético de la EEA INTA Corrientes para dicho carácter.

Por consiguiente, los objetivos del presente trabajo fueron (1) caracterizar el comportamiento de 116 materiales genéticos de arroz de la EEA INTA Corrientes, de origen diverso, en condiciones controladas de bajas temperaturas en las etapas de germinación y establecimiento de plántula (2) determinar la variación alélica de los genes candidatos *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* en algunos de dichos materiales genéticos y (3) evaluar la asociación entre el comportamiento frente a bajas temperaturas y el genotipo de la planta para dichos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como tratamientos 116 materiales de la EEA INTA Corrientes, incluidos seis cultivares de comportamiento conocido (cuatro tolerantes y dos susceptibles) frente a bajas temperaturas al estado de plántula. El diseño empleado fue un BDCA con tres repeticiones.

Germinación: el factor de bloqueo fue la ubicación dentro de la cámara y la unidad experimental una tira de papel con 35 semillas de cada material. Las semillas se pusieron a germinar en cámara fría a 12 °C de acuerdo con el protocolo de evaluación y selección por

¹EEA Corrientes INTA, Ruta 12 km 1008 (3400) Corrientes, Argentina; *mpachecoy@corrientes.inta.gov.ar;

²EEA Balcarce INTA-CONICET, Ruta 226 km 73,5 (7620) Balcarce, Argentina.

tolerancia a frío en germinación propuesto por el Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR, CORREDOR et al., 2007).

Plántulas: el factor de bloqueo fue la fecha de siembra, y la unidad experimental, cinco plántulas de cada material ubicadas en celdas consecutivas de una bandeja de almácigo, que se evaluaron siguiendo la metodología descrita por Andaya y Tai (2006). Al estado de tres hojas ingresaron a cámara fría a 9°C y fotoperiodo de 12 h. Se determinó su reacción a los 8, 10, 12 y 14 días usando una escala visual de severidad de síntomas de 1 (tolerante) a 9 (susceptible) (IRRI 1996).

Variación alélica: se emplearon los diez materiales genéticos de respuesta más contrastante a frío en el estadio de plántula (cinco tolerantes y cinco susceptibles). Para los tres genes candidatos, se amplificó la región codificante en varios fragmentos por gen mediante el empleo de iniciadores específicos. Se realizó la secuenciación y posteriormente el análisis y alineamiento de las secuencias obtenidas para la detección de polimorfismos.

Análisis estadísticos: Los datos obtenidos a partir de las observaciones realizadas en el estadio de plántula fueron analizados con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 1999), con la opción de análisis de mediciones repetidas en el tiempo. Luego se realizó un análisis multivariado de conglomerados utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2010) y el coeficiente de similitud de Jaccard. Se establecieron arbitrariamente cuatro grupos de líneas según su comportamiento frente a bajas temperaturas.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el ensayo de germinación se utilizó el procedimiento GLM del SAS. Posteriormente se realizó un análisis multivariado utilizando como variable el porcentaje de semillas germinadas con coleóptilos de longitud igual o mayor a 4 mm y, como criterio de clasificación, a las líneas, formando cuatro grupos al igual que para la evaluación en el estadio de plántula, pero empleando en este caso el coeficiente de distancia euclídea.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los testigos empleados tuvieron una respuesta acorde a lo esperado en la evaluación fenotípica. Además, tanto en la germinación como en el estadio de plántula se detectaron materiales de comportamiento similar a los testigos, intermedio entre testigos tolerantes y susceptibles y más extremo (Figuras 1 y 2), pero no se halló correlación entre ambos estadios ($r=0,0118$). Luego, para los dos estadios en estudio, se realizó un análisis multivariado de conglomerados para el que se definieron previamente cuatro grupos según su tolerancia a frío (Figura 3 y 4)

Con respecto al análisis de la variación alélica, se hallaron diferencias entre los genotipos analizados en cuanto al éxito de la amplificación y el tamaño de los amplicones obtenidos a partir de fragmentos de los tres genes en estudio. Para cada uno de los fragmentos se alinearon las secuencias obtenidas con las correspondientes secuencias de referencia (ADN genómico y ADNc para las dos subespecies de arroz cultivado, *japonica* e *indica*, extraídas de bases de datos públicas). Se analizó la densidad de polimorfismos de nucleótido simple ("SNPs") e inserciones/delecciones ("indels") (Tabla 1).

Se identificaron polimorfismos (tanto SNPs como indels) en los tres genes analizados. La densidad de SNPs encontrados en cada uno de ellos varió ligeramente. Se detectaron 2,6, 3,2 y 3 SNPs por kb y 0,75, 0 y 1 indel por kb para los genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* respectivamente. Se encontró un total de 34 polimorfismos en los tres genes (28 SNPs y seis indels) y se determinó su ubicación en intrones y exones (Tabla 2 y 3). Del total de polimorfismos detectados, nueve (26,5%) separaron a los diez materiales según su respuesta en la evaluación fenotípica (ocho SNPs y un indel). De estos, dos de los SNPs se localizaron en exones, uno se detectó en la región no traducida 3', y los restantes SNPs y el indel se hallaron en intrones. Para los SNPs hallados en exones se determinó la ubicación de la base polimórfica en el codón y se realizó la traducción de la región codificante a proteína para determinar el tipo de cambio producido. Únicamente uno de los SNPs (A>G), ubicado en el gen *OsGSTZ2*, resultó en un cambio de aminoácido

(Ile>Val). La presencia de este SNP en los materiales analizados indicaría una asociación del alelo G con la sensibilidad a bajas temperaturas. No obstante, debería verificarse si dicha asociación se mantiene en un mayor número de genotipos.

CONCLUSIÓN

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, F.; ONODERA, H.; TOKI, S.; TANAKA, H.; KOMATSU, S. *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Molecular Biology*. 55: 541–552. 2004.
- ANDAYA, V.C.; MACKILL, D.J. Mapping of QTL associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *Journal of Experimental Botany*. 54:2579–2585. 2003.
- ANDAYA, V.C.; TAI, T.H. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:467–475. 2006.
- CORREDOR, E.; CRUZ, M.; BERRÍO L. Fitomejoramiento. Actividades sobresalientes 2006-2007; Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR), Colombia; 82 p. 2007.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz. Comisión Internacional del Arroz. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO; Roma, 73 p. 2003.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). Standard evaluation system for rice, 4th edition. The International Network for Genetic Evaluation of Rice (INGER), the International Rice Testing program (IRTP), Philippines; 52 p. 1996.
- KIM, S.-I.; ANDAYA, V.C.; TAI T.H. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring Ile99Val mutation in the multifunctional glutathione transferase isozyme GSTZ2. *Biochemical Journal*. 435: 373–380. 2011.
- LOU, Q.; CHEN, L.; SUN, Z.; XING, Y.; LI, J.; XU, X.; MEI, H.; LUO. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 158:87–94. 2007.
- NAKAGAHARA, M.; OKUNO, K.; VAUGHAN, D. Rice genetic resources: history, conservation, investigative characterization and use in Japan. *Plant Molecular Biology*. 35:69–77. 1997.
- WANG, Z.; WANG, J.; WANG, F.; BAO, Y.; WU, Y.; ZHANG, H. Genetic Control of Germination Ability under Cold Stress in Rice. *Rice Science* 16(3): 173–180. 2009.
- YE, C.; FUKAI, S.; GODWIN, I.; REINKE, R.; SNELL, P.; SCHILLER, J.; BASNAYAKE, J. Cold tolerance in rice varieties at different growth stages. *Crop & Pasture Science*. 60:1–11. 2009.

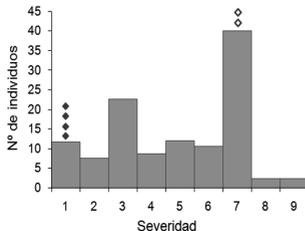


Figura 1. Número de líneas por categoría de la escala de severidad de IRRI (1996).

♦ Testigos tolerantes, ◇ Testigos susceptibles

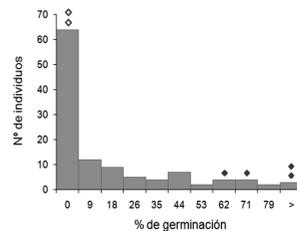


Figura 2. Número de líneas por categoría de porcentaje de germinación a 12°C.

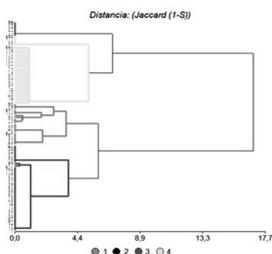


Figura 3. Dendrograma del agrupamiento de los genotipos en el análisis de conglomerados por tolerancia a bajas temperaturas en el estadio de plántula.

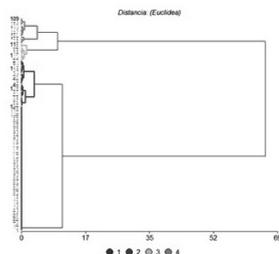


Figura 4. Dendrograma del agrupamiento de los genotipos en el análisis de conglomerados por tolerancia a bajas temperaturas en germinación.

Tabla 1. Número de SNPs e indels detectados en los fragmentos de los genes *OsGSTZ1*, *OsGSTZ2* y *OsCDPK13* en algunos de los materiales genéticos en estudio. Entre paréntesis se indica la densidad de SNPs e indels en cada región secuenciada.

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

Tabla 2. SNPs detectados en los tres genes en estudio para los genotipos analizados, separados en tolerantes y susceptibles a frío en plántula. Los números en la parte superior de la tabla identifican los diferentes SNPs encontrados. Para cada uno de ellos, diferencias en color indican bases distintas.

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

Tabla 3. Indels detectados en los genes en estudio para los genotipos analizados. Los números en la parte superior identifican los diferentes indels encontrados. Diferencias en color indican presencia o ausencia del indel. No se detectaron indels en el gen *OsGSTZ2*.

Genotipos	Indel					
	1	2	3	4	5	6
Susceptibles	15	T		C		
	88			C		
	95			TATCCAGCT		
	119			TATCCAGCT		T
Tolerantes	103					
	104				T	
	112					
	115					
	I	I	I	E	I	I
	<i>OsGSTZ1</i>			<i>OsCDPK13</i>		