ANALISIS DE MECANISMOS DE TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Tesis de Doctorado

Ing. Agr. Lic. Bioq. Victoria Bonnecarrère MSc.

2013

AREA CIENCIAS BIOLÓGICAS

Subárea BIOQUíMICA

Orientador: Dr.Jorge Monza
Co-orientador: Dr. Omar Borsani

Tribunal: Dra. Lina Bettucci, Dr. Ariel Castro, Dra. Inés Ponce de León

Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a mi tutor, Dr. Jorge Monza y a mi cotutor, Dr. Omar Borsani, por su confianza, ayuda, consejos y correcciones durante todo este tiempo. Esta tesis fue la semilla de un vínculo que nos permitió hacer nuevos proyectos y trabajar como un verdadero equipo, más allá de las instituciones.

Al coordinador de la Unidad de Biotecnología, Dr. Marco Dalla Rizza por su apoyo constante a mi proyecto de doctorado.

A toda la gente del programa Arroz de INIA, en especial a Fernando Perez de Vida (ideólogo de toda esta locura del frío), a Pedro Blanco quien me permitió crecer incluso estando un poco lejos del arroz (solo en kilómetros) y a Juan Rosas, quien me ayudó en todos los experimentos cercanos al campo.

A los compañeros de la Unidad de Biotecnología (Maribel, Marlene, Daniela, Sarita y Belén) y Eliana Monteverde que me ayudaron con mucho entusiasmo en los experimentos de mapeo.

A Maribel Cruz y Edgar Corredor, del FLAR (Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego) por su colaboración en la evaluación de ranking visual y en el desarrollo de la población de mapeo.

A los compañeros del laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía (Pedro, Martita, Marta, Esteban, Germán, Mariana), con quienes compartí mucho tiempo de mesada y me divertí mucho, sintiendo a veces que volvía a mis épocas de estudiante de grado.

A Lucía Gutierrez y Natalia Berberian, quienes literalmente me cambiaron la cabeza, haciéndome entender que la estadística puede ser algo entendible y extremadamente necesario, y que me ayudaron siempre que les pedí una mano.

A Alicia Castillo y Silvia Garaycochea, compañeras de camino, en el más amplio de los sentidos, y grandes responsables de que esta tesis haya salido adelante.

A Gastón Quero, quien me ayudó siempre en los análisis estadísticos compartiendo todo sus conocimientos de R y estando siempre a mano para cuando yo lo necesitaba.

A mi familia, Marcelo, Pedro y Emilia, por mi felicidad.

Muchas gracias a todos !!

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN *4*

ABSTRACT *6*

INTRODUCCIÓN GENERAL *8*

Efecto de las bajas temperaturas en plántulas de arroz *8*

1. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y MARCO GENERAL DE LA TESIS **11**

CAPÍTULO 1 ..... *13*

Evaluación del daño y de la respuesta bioquímica a la baja temperatura *13*

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES **13**

1.1 EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE EL APARATO FOTOSINTÉTICO Y LA FOTOSÍNTESIS 13

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO DE COMPONENTES CELULARES 16

1.3 DISIPACIÓN DE ENERGÍA A TRAVÉS DE PIGMENTOS COMO MECANISMO DE DEFENSA AL ESTRÉS POR FRÍO 19

1.4 DISMINUCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN 21

2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA **23**

3. MATERIALES Y MÉTODOS **24**

3.1 MATERIAL VEGETAL, CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y TRATAMIENTO CON FRIO 24

3.2 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO 25

3.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA 27

4. RESULTADOS **29**

4.1 EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS 29

4.2 EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS 30

4.3 DAÑOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA: PÉRDIDA DE ELECTROLITOS 31

4.4 EFECTO DEL FRÍO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE H2O2 32

4.5 CONTENIDO DE PIGMENTOS Y CICLO DE LAS XANTOFILAS 34

4.6 RESPUESTA AL FRÍO DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS ANTIOXIDANTES 35

5. DISCUSIÓN **36**

CAPÍTULO 2 ..... *41*

Identificación de marcadores moleculares en genes candidatos asociados a tolerancia a frío en arroz *41*

Tabla de contenidos

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES 41

1.1 BASES MOLECULARES DE LA RESPUESTA AL FRÍO EN PLÁNTULAS DE ARROZ 42

1.2 GENÉTICA CUANTITATIVA DE LA RESPUESTA AL FRÍO EN PLÁNTULAS DE ARROZ 45

1.3 MICROSATÉLITES GÉNICOS PARA BÚSQUEDA DE ASOCIACIÓN EN GENES CANDIDATOS 50

2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA 51

3. MATERIALES Y MÉTODOS 52

3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO 52

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN 52

3.3 IDENTIFICACIÓN DE GSSR EN GENES CANDIDATOS 52

3.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR Y VISUALIZACIÓN DE FRAGMENTOS 54

3.5 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN 54

3.6 FENOTIPADO 1. DAÑO SOBRE FOTOSISTEMAS II: FV/FM 55

3.7 FENOTIPADO 2. DAÑO DE MEMBRANA PLASMÁTICA: PÉRDIDA DE ELECTROLITOS 55

3.8 FENOTIPADO 3. APRECIACIÓN VISUAL DEL DAÑO: RANKING VISUAL 56

3.9 BÚSQUEDA DE ASOCIACIÓN MARCADOR-FENOTIPO 57

3.10 ANÁLISIS DE QTL EN POBLACIÓN F2:3 58

4. RESULTADOS 59

4.1 IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS POR REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 59

4.2 IDENTIFICACIÓN IN SILICO DE GENES CANDIDATOS 60

4.3 SSR EN GENES CANDIDATOS PARA TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ 62

4.4 GENOTIPADO, DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN ELITE DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE ARROZ 65

4.5 ANÁLISIS DE DATOS FENOTÍPICOS DE LA POBLACIÓN ELITE DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO 69

4.6 DETERMINACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LA TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ EN UNA POBLACIÓN ELITE DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO 72

4.7 VALIDACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS MEDIANTE SMA EN UNA POBLACIÓN F2:3 75

5. DISCUSIÓN 79

5.1 ESTRATEGIA DE GENES CANDIDATOS Y SSRG PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES ASOCIADOS A TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ 79

5.2 ASOCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ 81

5.3 FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS GENES IDENTIFICADOS 82

Bibliografía 85

RESUMEN

Una de las principales limitantes ambientales del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en regiones templadas es la ocurrencia de temperaturas por debajo de 15 ºC en etapas vegetativas tempranas. Los síntomas de frío son: clorosis, disminución de vigor y ralentización de crecimiento, los cuales se deben principalmente a daños en la membrana plasmática, estrés oxidativo y daño sobre el aparato fotosintético. El daño y la respuesta es dependiente de la subespecie (ssp.) Indica/Japonica y del genotipo. Los genotipos Japonica están más adaptados a climas templados y los Indica a climas tropicales. Existen un gran número de evidencias bioquímicas y moleculares que muestran estas diferencias. Sin embargo, los genotipos Indica presentan mayor potencial de rendimiento por lo que generar cultivares Indica mejor adaptados al frío es prioritario para los programas de mejoramiento genético de países templados.

En esta tesis se estudiaron los niveles de daño y los mecanismos bioquímicos más importantes de la respuesta a frío en genotipos contrastantes Indica y Japonica, y se identificaron marcadores moleculares funcionales del tipo microsatélite génico (SSRg) en genes candidatos (GC) asociados con la respuesta a frío usando un enfoque de genética cuantitativa.

Para evaluar el daño por frío se consideraron los parámetros Fluorescencia variable/Fluorescencia máxima (Fv/Fm), Fluorescencia basal (Fo) y la eficiencia del FSII a partir de la emisión de fluorescencia de la clorofila, la producción de H_2O_2, la oxidación de proteínas, la peroxidación de lípidos y la pérdida de electrolitos (PE) como indicador de integridad de la membrana plasmática. Para la evaluación de la respuesta a frío se determinó el valor de qN a partir de la fluorescencia de la clorofila, las xantofilas y se cuantificó la actividad de las principales enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT).

La emisión de fluorescencia evidenció que el FSII de los genotipos Indica fueron los más afectados y que los genotipos Japonica se comportaron diferencialmente entre ellos. Dentro de estos, los genotipos L2825CA e INIA Caraguatá presentaron daño en el FSII significativamente menor al resto, pero solamente L2825CA no presentó alteraciones en la captación de luz luego del tratamiento con frío. Esta diferencia en el daño también se observó a través de la peroxidación de lípidos, determinada como concentración de ácido tiobarbitúrico (TBARS), que fueron significativamente menores en L2825CA e

INIA Caraguatá respecto a los demás genotipos. Por el contrario, en la evaluación del daño de membrana solamente en L2825CA no hubo aumento significativo en el nivel de daño después de 48 h de frío.

Se identificaron mecanismos diferenciales de respuesta entre los genotipos L2825CA e INIA Tacuarí. L2825CA presentó mayor estabilidad del aparato fotosintético y de la membrana plasmática, y altos niveles basales de actividad de enzimas antioxidantes. Por otro lado, la tolerancia de INIA Tacuarí estaría vinculada a la disipación no dañina de la energía en exceso a través del ciclo de la xantofila. La cuantificación de la producción de H_2O_2 permitió identificar, en las primeras horas de tratamiento con frío, un pico de producción que fue superior en INIA Tacuarí respecto a L2825CA, e inexistente en El Paso 144. Este pico puede estar asociado al rol señalizador de esta molécula que desencadena mecanismos inducibles de respuesta únicamente en INIA Tacuarí.

Para la identificación de SSRg asociados a la respuesta al frío se identificaron genes candidatos (GC) mediante análisis *in silico* y a través de la bibliografía. Se seleccionaron 237 GC de los cuales 36 presentaron SSRg en su secuencia. Estos fueron utilizados para genotipar una población de 131 genotipos y solamente 14 fueron polimórficos. Los 131 genotipos fueron fenotipados deteminando el valor de Fv/Fm, PE y ranking visual. Partiendo de una estructura poblacional determinada por la ssp. y el programa de mejoramiento de origen, se buscaron asociaciones en TASSEL considerando cuatro modelos estadísticos. Independientemente del modelo estadístico utilizado se identificaron dos marcadores asociados a los fenotipos en estudio. El marcador RM22034, localizado en el gen *Lti6a*, está asociado al fenotipo PE y el marcador RM6547, localizado en un factor de transcripción de la familia NAC, está asociado al fenotipo Fv/Fm.

Para validar los marcadores en estudio, y para identificar nuevos marcadores, se generó una población segregante mediante el cruzamiento de los genotipos El Paso 144 x L2825CA. De la F2 se genotiparon 171 plantas con los 10 SSRg polimórficos para sus parentales y 4 SSR co-localizados en QTLs publicados en la base de datos de Gramene. Las 171 familias F3 fueron fenotipadas para Fv/Fm y PE. Se realizó un SMA y se identificaron los marcadores RM6651, RM14978, RM22034 y RM4 asociados al fenotipo PE y el marcador RM22034 al fenotipo Fv/Fm. Estos marcadores serán utilizados por el programa de mejoramiento local para caracterizar los genotipos Indica e incluir como nuevo criterio de selección para desarrollar variedades más tolerantes.

ABSTRACT

One of the most important rice (*Oryza sativa* L.) production constraint in temperate regions is the occurrence of low temperature during early vegetative stages. Temperature below 15 ºC generates leaves chlorosis, inhibits early vegetative growth and reduces plant vigor. These phenotypes are mainly caused by the oxidative stress which induces damages on plasmatic membrane and photosynthetic machinery. Damage and response to cold are dependent of rice subspecie (ssp.) Indica/Japonica and rice genotype involved. Considering the genetic origin, Japonica genotypes are better adapted to temperate climate whereas Indica genotypes are adapted to tropical climate. This differential adaptation is reflected in a great number of biochemical and molecular experimental evidences. Despite of cold susceptibility, Indica genotypes exhibit higher yield potential in temperate regions. Thus, development of cold tolerant Indica cultivars is a priority in rice breeding programs of temperate countries.

In this thesis cold damage and biochemical mechanisms involved in stress response in contrasting Indica and Japonica genotypes were evaluated. In addition, functional molecular markers associated to cold response were identified, particularly gSSR located within candidate genes (CG) using a quantitative genetic approach.

In order to assess cold damage the following parameters were considered: Fv/Fm, Fo and PSII efficiency from chlorphyll fluorescence emission experiments, H_2O_2 production, protein oxidation, lipid peroxidation and electrolyte leakage (EL) as plasmatic membrane integrity indicator. Cold response was evaluated by determination of qN from chlorophyll fluorescence emission experiments, xanthophyll content and quantification of activities of antioxidant enxymes: SOD, APX and CAT.

The emission of fluorescence showed that PSII activity was more affected in Indica genotypes compared to Japonica genotypes. However, it was also possible to find differences in this parameter among Japonica genotypes. PSII activity of L2825CA and INIA Caraguatá were significantly less damaged than the others genotypes. L2825CA was the only genotypes that did not show alterations on light harvest system and membrane integrity, quantified as Fo, lipid peroxidation and PE.

Different response mechanisms were identified between INIA Tacuarí and L2825CA. L2825CA had high plasmatic membrane and photosynthetic machinary stability as well as higher antioxidant enzyme

activities. On the other hand, INIA Tacuarí cold tolerance was related to harmless energy dissipation through xanthophyll cycle. In addition, H_2O_2 quantification showed a production burst in INIA Tacuarí during the first hours of cold treatment which was significantly lower in L2825CA and absent in El Paso 144. This H_2O_2 burst could be related to a signaling role of this molecule which triggers an inducible response to cold stress only in INIA Tacuarí.

For identification of gSSR associated to cold response, first candidate genes (CG) were identified by in silico analysis and literature review. From the 237 CG selected only 36 presented gSSR in the sequence. These gSSR were used for genotyping a population of 131 genotypes and results showed that only 14 were polymorphics. All 131 genotypes were phenotyped for Fv/Fm, EL and visual ranking Markers association exploring by TASSEL considered a structured population determined by the ssp. the breeding program and four statistical models. . Independently of the statistical model, two gSSR associated to cold response were found. Marker RM22034, located in the gene Lti6a, was associated to EL and marker RM6547, located in a transcription factor from NAC family, was associated to Fv/Fm.

In order to validate markers and identify nobel associated marker, a segregating population was generated by crossing El Paso 144 x L2825CA. 171 plants from F2 population were genotyped with 10 gSSR and 4 SSR co-located in QTLs reported in Gramene database. The 171 F3 families were phenotyped for Fv/Fm and EL. A SMA analysis identified the markers RM6651, RM14978, RM22034 and RM4 associated to EL and the RM22034 to Fv/Fm.

Associated markers will be used to assist the Uruguayan rice breeding program in order to characterize Indica germplasm and select more cold tolerant genotypes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

EFECTO DE LAS BAJAS TEMPERATURAS EN PLÁNTULAS DE ARROZ

Las plantas están sometidas a factores adversos, tanto bióticos como abióticos, que condicionan su desarrollo y crecimiento, y en especies de utilidad agrícola su productividad. El estrés abiótico es causado por condiciones ambientales desfavorables, como sequía, excesiva salinidad del suelo, anegamiento y bajas temperaturas.

La temperatura determina la distribución geográfica de las especies vegetales cultivables. El arroz (*Oryza sativa* L.) es una especie tropical cultivada desde la latitud 50ºN hasta la latitud 40ºS y desde el nivel del mar hasta 3000m de altitud (Juliano, 1993). Estas latitudes contemplan tierras tropicales, subtropicales y templadas, como es el caso de Uruguay.

Las bajas temperaturas afectan el desarrollo del cultivo de arroz, reduciendo la productividad y limitando la adaptación del germoplasma tropical de alto potencial de rendimiento en países de clima templado (Cruz, 2003). Los últimos datos registrados muestran que en el cono sur de América Latina existían casi un millón de hectáreas de arroz potencialmente afectadas por frío (Cruz et al., 2001) y en el mundo se estimaba que el frío causaba daño en siete millones de hectáreas por año (Kariya, 2003). Para la región del cono sur de América latina los estudios de cambio climático proponen que sucederá una reducción de las temperaturas medias máximas durante el verano y que las medias mínimas durante todo el año se incrementarán. Si bien no hay estudios sobre la incidencia de frentes fríos en el verano, se ha pronosticado que existirá una mayor variabilidad y una mayor frecuencia de eventos extremos (http://www.fao.org/climatechange/80141/es/). Cualquiera sea el escenario futuro, la generación de cultivares de arroz tolerantes a frío es uno de los principales objetivos de los programas de mejoramiento de arroz de clima templado y de Uruguay en particular (http://www.inia.org.uy/online/site/invproyinia.php).

En el cultivo de arroz, temperaturas por debajo de 15 ºC afectan tres etapas críticas: el período reproductivo, la germinación y el desarrollo de etapas vegetativas tempranas (Yoshida, 1981). El

comportamiento de las plantas en las diferentes etapas no está correlacionado, existiendo comúnmente genotipos tolerantes en etapas vegetativas y susceptibles en las etapas (da Cruz y Milach 2000).

En Uruguay, las etapas reproductivas (desarrollo de la panoja y antesis) ocurren durante los meses de verano, específicamente en el mes de febrero. En este mes, en la zona este del país, la ocurrencia de temperaturas por debajo de 15 ºC es frecuente y este hecho es una de las principales causas de inestabilidad de los rendimientos (Blanco et al., 1993). Según Deambrosi et al. (1997) durante el mes de enero y los primeros 20 días del mes de febrero, la probabilidad de que ocurran temperaturas mínimas menores a 15 ºC es del 20 %. Esto demuestra que aún en enero existe la probabilidad de ocurrencia de baja temperatura y por lo tanto es importante disponer de variedades tolerantes al frío en esta etapa.

Otro de los requerimientos fundamentales para el correcto desarrollo de los órganos reproductivos del arroz es la luminosidad. El arroz requiere de determinada radiación solar para el desarrollo de sus órganos reproductivos, desde las etapas de diferenciación de la panoja hasta 10 días antes de alcanzar la madurez (Stansel, 1975). En Uruguay, considerando los datos climáticos desde 1977 a 2006 obtenidos en la Estación Agrometeorológica de la Unidad Experimental Paso de la Laguna – INIA Treinta y Tres, la disponibilidad de luz disminuye notoriamente en el mes de febrero, alcanzando su máximo en el mes de enero (Figura 1). Las determinaciones en actinógrafo muestran que en febrero los valores promedio son de 7.4 horas de sol, mientras que en enero el promedio alcanza las 8.5 horas de sol diarias. Deambrosi et al. (1997) mostraron, para un período de 14 años, que no solo disminuye el promedio de horas de luz real en febrero respecto a enero, sino también la probabilidad de ocurrencia de días con 10 -12 horas de sol. En conclusión, la mayor disponibilidad de luz durante los meses de verano se da en los primeros veinte días de enero.

De esta manera, se entiende que sería óptimo lograr que la floración se de en el período de mayor luminosidad, lo cual corresponde a los primeros veinte días del mes de enero. Con este objetivo, y sin tener que recurrir a cultivares de ciclos más cortos, y por ende de menores rendimientos, una estrategia es adelantar la fecha de siembra a inicio de la primavera. Sin embargo, durante el mes de setiembre se registran temperaturas medias promedios de 13,6 ºC y temperaturas mínimas promedio de 8 ºC, en contraste con la temperatura media de octubre sensiblemente superior de 16.6 ºC y temperaturas mínimas de 11 ºC (Datos registrados en la Estación Agrometeorológica de la Unidad Experimental Paso

de la Laguna, INIA Treinta y Tres). Con esta temperatura, la alternativa de siembra temprana plantea el problema del segundo momento crítico del arroz a las bajas temperaturas: la germinación y el desarrollo de las etapas vegetativas tempranas en el campo (Pérez de Vida, 2010).

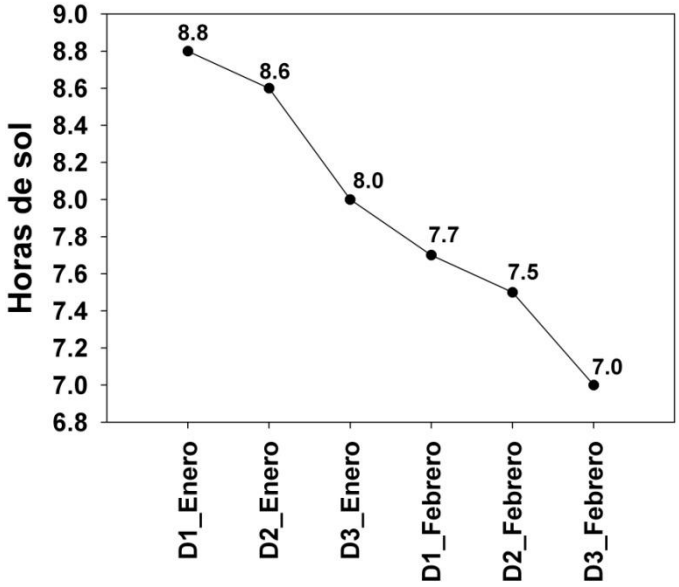


Figura 1. Promedio de horas de sol diaria por década. Serie histórica 1977-2006 agrupados cada 10 días (Décadas-D). Datos registrados en la Estación Agrometeorológica de la Unidad Experimental Paso de la Laguna, INIA Treinta y Tres, Uruguay. Fuente: Deambrosi et al.1997.

Durante las etapas tempranas los síntomas más comunes de frío involucran: menor germinación o germinación retardada, menor síntesis de clorofila (clorosis), disminución del vigor de las plántulas y ralentización del crecimiento (Yoshida et al., 1996; Sthapit y Witcombe, 1998; Pereira Da Cruz et al., 2006). Estos daños no permiten un correcto establecimiento del cultivo, por reducción de la germinación y principalmente, porque no se logra el desarrollo de las plántulas (acumulación de biomasa) que lleve a adelantar el ciclo del cultivo. Si se pudieran evitar los daños causados por frío en arroz plantado tempranamente, se podrían realizar siembras tempranas y se generaría un sistema de producción alternativo que podría mejorar la eficiencia del uso de los recursos de producción, específicamente la luminosidad en las etapas reproductivas. La tolerancia al frío en el estado de germinación y de plántula es la única opción para asegurar el rápido y uniforme establecimiento del cultivo.

La arroz cultivado en América del Sur se divide en dos subespecies (ssp.): Indica y Japonica (Oka, 1988; Glaszmann et al., 1990; Mackill y Lei, 1997; Baruah et al., 2009). De acuerdo a los estudios

evolutivos, la ssp. Indica fue domesticada en el pie de las montañas del Himalaya y distribuida después en regiones tropicales y subtropicales, mientras que la ssp. Japonica se dispersó al sur de China y se adaptó a condiciones de clima templado (Khush, 1997). Esto significa, que ambas ssp. se diferenciaron en regiones climáticas diferentes y que la adaptación a la baja temperatura es parte sustancial de la diferencia entre las mismas. A priori se podría pensar que en climas templados la plantación de variedades Japonica resolvería el problema generado por el frío; sin embargo, su potencial de rendimiento es menor en relación a los genotipos Indica. Obtener variedades Indica de alto potencial de rendimiento adaptadas al frío es fundamental para países productores de arroz en zonas de clima templado. Igualmente, la adaptación diferencial al frío de ambas ssp. han hecho al arroz un modelo ideal para el estudio bioquímico y genético de la respuesta al frío mediante la utilización de genotipos contrastantes.

1. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y MARCO GENERAL DE LA TESIS

Como hipótesis de trabajo se plantea que las diferencias fenotípicas respecto a la tolerancia a la baja temperatura entre genotipos se debe a diferencias en el nivel de daño y en las respuestas bioquímicas y fisiológicas, producto de diferencias genéticas. A su vez, éstas están dadas por diferencias en la expresión génica, y una de las razones es el polimorfismo en la secuencia de los genes.

El objetivo de esta tesis es identificar marcadores bioquímicos y moleculares asociados con la respuesta al estrés por baja temperatura en etapas vegetativas tempranas del arroz para asistir la selección de genotipos.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos (OE):

OE1. Identificar marcadores bioquímicos mediante la evaluación del daño y de la respuesta a la baja temperatura en genotipos de arroz uruguayos.

OE2. Identificar genes candidatos y microsatélites génicos asociados a la tolerancia a frío.

La tesis se organizó en dos capítulos. En el Capítulo 1 se estudian las bases bioquímicas buscando responder el OE1. Primero se realizó una caracterización bioquímica del daño y de la respuesta al frío en genotipos de las ssp. Indica y Japonica. Se trabajó con genotipos contrastantes de referencia y con genotipos nacionales cuyo comportamiento en el campo frente al frío ha sido descrito por los

mejoradores. Como indicadores de daño se evaluaron los daños sobre: el aparato fotosintético, lípidos, proteínas y membranas. Se identificaron aquellos procesos vinculados con la generación y la respuesta a las especies reactivas del oxígeno (ERO), como fundamentales en la generación y respuesta al daño, pero también en el rol en la inducción de la respuesta.

En el Capítulo 2 se plantea la identificación de genes candidatos (GC) y marcadores moleculares funcionales asociados a la respuesta al frío para responder al OE2. Para la identificación de marcadores moleculares se utilizó como estrategia la selección de marcadores microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat) en GC o SSR génicos (SSRg). Para ello, primero se identificaron GC in sílico y por revisión de la literatura, y después se encontraron SSR en su secuencia. Se analizó la variabilidad alélica en el germoplasma elite del Programa de Mejoramiento de Arroz de INIA. Este material fue fenotipado para su respuesta al frío y se buscaron asociaciones entre los datos genotípicos y fenotípicos mediante estudios estadísticos de asociación. Los marcadores identificados como putativamente asociados a la tolerancia a frío en arroz fueron validados mediante análisis de QTL (Quantitative Trait Loci) en una población segregante de mapeo de arroz.

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DEL DAÑO Y DE LA RESPUESTA BIOQUÍMICA A LA BAJA TEMPERATURA

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los principales efectos inducidos por la baja temperatura en arroz durante las etapas vegetativas tempranas involucran, la fotoinhibición o inhibición del transporte de electrones a través del fotosistema II (FSII), el daño oxidativo debido a la generación de ERO (Jeong et al., 2002) y el daño en las membranas (Bertin et al., 1998; Pereira da Cruz et al., 2010) desestabilizando las estructuras celulares.

Los primeros dos efectos se encuentran relacionados, ya que el daño del FSII puede ser directo por las ERO, o indirecto por inhibición de la capacidad de reparación de sus componentes (Jeong et al., 2002; Nishiyama et al., 2006). La inactivación de los FSII reduce los subsecuentes procesos fotosintéticos generando un exceso de energía y la formación de clorofila excitada (Chl*), que no vuelve a su estado basal por las vías fotoquímicas normales. Esta energía puede ser disipada por procesos no dañinos como el ciclo de las xantofilas, o por transferencia directa de la Chl* al oxígeno produciendo ERO que conducen al daño oxidativo de la célula (Demming-Adams y Adams, 1992). La disipación de la energía para impedir la generación de ERO y la detoxificación de las ERO generadas, son procesos claves en la respuesta de las plantas a los estreses abióticos y particularmente al estrés por frío.

A continuación se describen cada uno de los procesos involucrados en la generación de daño y respuesta a las bajas temperaturas y los antecedentes reportados para el arroz en etapas vegetativas tempranas. Además se presentan las herramientas metodológicas utilizadas para cuantificar los diferentes parámetros asociados al daño y a la respuesta.

1.1 EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE EL APARATO FOTOSINTÉTICO Y LA FOTOSÍNTESIS

Se han planteado varias hipótesis sobre como el frío favorece el proceso de fotoinhibición, no siendo necesariamente excluyentes: 1) al reducir la demanda química se favorece la transferencia de energía en

exceso al oxígeno, causando un daño oxidativo sobre los componentes del aparato fotosintético (especialmente el componente D1 del FSII); 2) el estrés oxidativo causado puede conducir a cambios en el estado redox del estroma, interfiriendo con la activación de enzimas involucradas en la asimilación de CO_2, como la fructosa-1,6-bifosfatasa y la seudoheptulosa-1,7-bifosfatasa; 3) el frío impide la reparación del FSII, particularmente el reemplazo de la proteína D1, tanto por disminución de la expresión y traducción de los genes que la codifican como por la reducción de la fluidez de las membranas; 4) se destruyen enzimas del aparato fotosintético y 5) se inhibe la formación de zeaxantina (Z) que normalmente capta la energía de excitación en exceso y la disipa como calor (Allen y Ort, 2001; Ji et al., 2001; Zhang y Wei, 2001; Hirotsu et al., 2004; Hirotsu et al. 2005; Yan et al., 2005; Nishiyama et al., 2006; Takahashi y Murata, 2008).

La incidencia de la baja temperatura sobre la fotoinhibición ha sido evaluada en arroz y particularmente en las ssp. Japonica e Indica. De acuerdo a lo esperado, el arroz tipo Indica mostró mayor fotoinhibición por frío comparado con el tipo Japonica *(*Ji et al., 2001; Jeong et al., 2002; Hirotsu et al. 2005). Estos efectos se correlacionaron con un menor contenido de la proteína D1 del FSII en Indica respecto a Japonica. El frío también produce un aumento de la foto-oxidación, entendida como la foto-destrucción de pigmentos fotosintéticos, específicamente una disminución en el contenido de anteraxantina (A) y Z, lo que fue más pronunciado en la variedad tipo Indica (Ji et al., 2001).

Como fue mencionado, la baja temperatura induce la destrucción de enzimas involucradas en la fotosíntesis. Zhang y Wei (2001) reportaron como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) afecta la estructura secundaria y terciaria de la Rubisco; mientras que Yan *et al*. (2005) mediante análisis comparativos del proteoma de plántulas de arroz, determinaron que la mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente (35.3 %) estaban vinculadas a la fotosíntesis y particularmente a la degradación de proteínas como la Rubisco, las del complejo del FSII y la ATPsintasa.

Desde el punto de vista experimental, la emisión de fluorescencia por las clorofilas es uno de los análisis más utilizados para determinar el estado del aparato fotosintético y cómo éste es afectado por diferentes tipos de estrés. El análisis se basa en que la energía absorbida por la clorofila puede tener tres destinos: 1) ser utilizada para la fotosíntesis (energía fotoquímica); 2) puede ser disipada como calor (energía no fotoquímica) y 3) puede ser re-emitida como fluorescencia desde las clorofilas. Estos

procesos son competitivos, y la suma de los mismos constante. De esta forma, midiendo la energía emitida como fluorescencia se pueden determinar indirectamente la energía fotoquímica o la que es emitida como calor (Rohácek y Barták, 1999; Maxwell y Johnson, 2000).

El análisis de fluorescencia de la clorofila permite determinar una serie de indicadores que describen los diferentes procesos afectados. El daño sobre los FSII es estimado por el parámetro Eficiencia Cuántica Máxima del FSII medida como Fluorescencia variable/Fluorescencia máxima (Fv/Fm) mientras que el parámetro Fluorescencia basal (Fo) es un indicador del estado del sistema captador de energía. El valor Fo corresponde a la fluorescencia basal o mínima, emitida por clorofilas de plantas adaptadas a la oscuridad en las que todos los centros de reacción del FSII están abiertos y los procesos fotoquímicos en la membrana tilacoidea están minimizados. La Fo se determina aplicando un rayo de luz débil y permite medir principalmente los daños a nivel de la antena. Valores mayores de Fo están relacionados a ruptura de la antena y liberación de clorofila de los complejos proteínas-pigmentos (Rivas et al., 2008). El parámetro Fv/Fm, o rendimiento cuántico máximo fotoquímico del FSII, es el más utilizado como indicador de la fotoinhibición causada por estrés y el daño a nivel de estos fotosistemas. La fluorescencia máxima (Fm) se mide cuando plantas adaptadas a la oscuridad, con los centros de reacción abiertos, son sometidas a un rayo de luz saturante. La Fv, fluorescencia variable, es la diferencia entre Fm y Fo (Rohácek y Barták, 1999; Maxwell y Johnson, 2000).

El tercer parámetro más utilizado para describir el efecto de un estrés sobre los fotosistemas es el de eficiencia del FSII o ϕ_{PSII}. La ϕ_{PSII} mide la proporción de luz absorbida por las clorofilas asociada con el FSII y que es usada en procesos fotoquímicos.

El cuarto parámetro de importancia en los estudios de emisión de fluorescencia es el *quenching* no fotoquímico o qN. Cuando los tejidos fotosintéticos son sometidos a excesos de energía o a estreses que disminuyen la capacidad de su utilización fotoquímica, la energía es disipada como calor mediante procesos no fotoquímicos. Este es el proceso cuantificado por qN (Young et al., 1997; Müller et al., 2001). qN refleja la influencia de los procesos no fotoquímicos en la emisión de fluorescencia de la clorofila durante la transición del estado adaptado a la oscuridad al estado adaptado a la luz (Rohácek y Barták, 1999; Maxwell y Johnson, 2000). Este valor tiene diferentes componentes bioquímicos, entre ellos el más

importante e inmediato es el quenching electroquímico (qE), que es el componente dependiente de variaciones en el pH tilacoidal. La disminución en el pH tilacoidal conduce a una qE mediante la protonación de las proteínas del FSII y la activación de la síntesis de xantofilas Z y A, a través del ciclo de las xantofilas (Müller et al., 2001), como se describe más adelante.

Jeong et al. (2002) compararon estos parámetros para genotipos contrastantes de la ssp. Japonica. Ambos genotipos se vieron afectados por el frío, pero el genotipo susceptible siempre presentó valores menores de Fv/Fm respecto al tolerante, alcanzando valores de aproximadamente 0.5 en plantas crecidas a 10 ºC, mientras que los tolerantes presentaban valores cercanos a 0.7. Por su parte, Hirotsu et al. (2004) encontraron diferencias significativas entre Indica y Japonica respecto a Fv/Fm. Los mismos autores (Hirotsu et al. 2005) reportaron que el Fotosistema I (FSI) no se ve afectado por frío. Respecto a los daños sobre el FSI no existen otros estudios en arroz y en plantas superiores los primeros estudios de fotoinhibición del PSI se reportan en 1994. Sonoike (1996) revisó los trabajos realizados sobre la fotoinhibición del PSI y concluye que el estrés oxidativo es esencial en el daño de estos fotosistemas. De hecho, Tjus et al. (1998) reportaron en cebada que los daños sobre PSI estaban asociados a la ineficiencia del sistema de detoxificación de ERO y Cazzaniga et al. (2012) demostraron que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en carotenoides (cuya función principal es la fotoprotección) presentaron una disminución de la actividad de los PSI.

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO DE COMPONENTES CELULARES

La baja temperatura, al igual que otros tipos de estreses bióticos y abióticos, generan estrés oxidativo a nivel celular por aumento en la formación de ERO; compuestos que reaccionan y oxidan lípidos, proteínas y ácidos nucleídos (Prasad et al., 1994; Saruyama y Tanida, 1995; Hodges et al., 1996). Las ERO se forman mediante la excitación del oxígeno formando oxígeno singulete (O_2^1) o durante reducciones incompletas del oxígeno por la cadena de transferencia de electrones mitocondrial y cloroplástica, siendo esta última la más importante. En estas reacciones se forman las ERO: H_2O_2, anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y radicales perhidroxilos ($O_2H^{\bullet}$).

Los daños de las ERO sobre los componentes celulares han sido extensamente reportados como indicadores del daño causado por frío (Møller et al., 2007). Recientemente se ha puesto mayor énfasis en

el rol de las ERO, y particularmente el H_2O_2 como señalizadores del estrés a nivel celular activando vías de respuesta (Suzuki y Mittler, 2006; Foyer y Noctor, 2009; Jaspers y Kangasjärvi, 2010). Este rol requiere de un adecuado balance entre producción y eliminación de las mismas. La señalización se ha visto asociada a una descarga oxidativa rápida o *burst* oxidativo, generado mayoritariamente por NADPH oxidasas (Mittler et al., 2004; Torres y Dangl, 2005). En el caso específico del estrés por frío existen pocos antecedentes que hagan referencia a este hecho. Cheng et al. (2007) y Yun et al. (2010) han visualizado la importancia del H_2O_2 durante las primeras horas del estrés, pudiendo estar implicado en la respuesta del arroz sometido a bajas temperaturas. Por otro lado en *Arabidopsis*, Teige et al. (2004) comprobaron que el frío dispara un sistema de señalización oxidativo donde el H_2O_2 tiene un rol central en la regulación de las cascadas MAP kinasas (MAPK).

1.2.1 Daño oxidativo de proteínas

Las proteínas pueden ser oxidadas por las ERO (Shacter, 2000), porque éstas reaccionan con casi todos los –R de los aminoácidos, así como con el esqueleto polipeptídico (Garrison, 1987). Como consecuencia de la reacción de los –R, principalmente Lisina, Arginina, Prolina y Treonina, con OH● se producen grupos carbonilos que pueden ser determinados experimentalmente.

La cuantificación de grupos carbonilos ha sido utilizada como medida indirecta de la oxidación de las proteínas. Los grupos carbonilos reaccionan con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) formando hidrazona, que puede ser determinada espectrofotométricamente (Levine et al., 1990). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada, debido a que es robusta, reproducible y adaptable para la cuantificación de un alto número de muestras (Shulaev y Oliver, 2006).

Hasta el momento no existen antecedentes que reporten el efecto del frío sobre la oxidación de proteínas en arroz.

1.2.2 Peroxidación de lípidos

Uno de los principales daños causados por las ERO es la peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados produciendo α,β-aldehídos como malonaldehídos (MDA) (Hartley et al., 1999) los cuales son fuertes mutagénicos al formar daña las moléculas de ADN formando los aductos de ADN deoxiguanosina y deoxiadenosina (Marnett 1999). De hecho, la cuantificación de la peroxidación de lípidos es uno de los

parámetros ampliamente aceptados como indicadores del daño oxidativo a nivel celular (Shulaev y Oliver, 2006). Existen métodos indirectos de cuantificación de peroxidación de lípidos, mediante la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Por otro lado, la peroxidación de fosfolípidos de membrana celular puede alterar las propiedades físicas de esta. Hay estudios que demuestran que la susceptibilidad a las bajas temperaturas en arroz está asociada a un mayor contenido de peróxido de lípidos (Ji et al., 2001; Guo et al., 2006; Morsy et al., 2007). Guo et al. (2006) analizaron la respuesta diferencial al frío entre Indica y Japonica. Los dos genotipos de la ssp. Indica sometidos a frío acumularon aproximadamente 2.5 veces más TBARS que las plantas control, mientras los genotipos tolerantes de la ssp. Japonica acumularon aproximadamente 1.9 veces más TBARS respecto a las plantas control. Este mismo comportamiento en la producción y acumulación de TBARS en genotipos susceptibles respecto a tolerantes lo encontró Morsy et al. (2007).

1.2.3 Daño de membranas celulares

El frío daña a las membranas directamente a través de la oxidación de lípidos, cambios derivados de la saturación de los ácidos grasos y rigidización de la bicapa lipídica; efectos que afectan la integridad estructural de las membranas. El nivel de saturación de los lípidos de membrana puede cambiar en respuesta a cambios en la temperatura de crecimiento. Bertin et al. (1998) demostraron que el mejoramiento de la tolerancia al frío en arroz, en cultivo de tejidos, está relacionado con el aumento de la insaturación de ácidos grasos. Por su parte, Pereira da Cruz et al. (2010), reportaron que el contenido de ácidos grasos del tipo linoleico y palmítico difieren entre genotipos de arroz tolerantes y susceptibles. El contenido de ácido linoleico aumentó luego del tratamiento con frío en los genotipos tolerantes, mientras que el ácido palmítico disminuyó. En los genotipos susceptibles disminuyó el contenido de ácido linoleico y aumentó el de ácido palmítico. El rol del ácido linoleico en la modificación de la fluidez de las membranas y en respuesta a estreses ha sido recientemente revisado por Upchurch (2008).

Hugly y Somerville (1992) demostraron la importancia de los lípidos insaturados para el mantenimiento de las características estructurales de los cloroplastos en plantas sometidas a bajas temperaturas. Estos autores plantearon las primeras evidencias de que el papel de los ácidos grasos no es solamente sobre la fluidez de la membrana sino sobre el mantenimiento de la biogénesis de los

cloroplastos. Esta afirmación fue confirmada por Routaboul et al. (2000) mediante estudios con una línea triple mutante de *Arabidopsis* (fad3-2 fad7-2 fad8) que no contiene ácidos grasos trienoicos (18:3 y 16:3). Además, demostraron que el efecto sobre la fotosíntesis tiene lugar luego de períodos largos de baja temperatura (30 días a 4 ºC) y que los ácidos grasos insaturados tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la capacidad fotosintética.

La integridad de la membrana plasmática puede ser evaluada mediante métodos que cuantifican la pérdida de electrolitos a través de la misma. Este es uno de los métodos más usado para evaluar el daño por frío en arroz (Huang y Guo, 2005; Guo et al., 2006; Kim y Tai, 2011). Todos estos trabajos han demostrado correlación positiva entre el daño causado por frío en membrana y el comportamiento del genotipo (susceptible/tolerante). Además, el trabajo reciente de Kim y Tai (2011) plantea este parámetro como un buen indicador cuantitativo de los cambios fisiológicos generados en la planta.

1.3 DISIPACIÓN DE ENERGÍA A TRAVÉS DE PIGMENTOS COMO MECANISMO DE DEFENSA AL ESTRÉS POR FRÍO

Cuando la energía absorbida por la antena del FSII es mayor a la utilizada con fines fotoquímicos, la planta presenta mecanismos de disipación térmica para proteger el aparato fotosintético de los efectos deletéreos del exceso de energía. Como fue mencionado anteriormente esta disipación es clave en la respuesta al estrés por frío y puede ser cuantificada a través del parámetro qN. El primer proceso que lleva al qN involucra la protonación de residuos carbonilos claves de los complejos proteínas-pigmentos del FSII, y la formación de Z y A a partir de Violaxantina (V) (Demming-Adams y Adams III, 1992; Young et al., 1997) (Figura 1.1). Este proceso, conocido como el ciclo de las xantofilas, ha sido propuesto como el principal mecanismo de disipación energética. El ciclo de las xantofilas actúa directamente en la disipación de energía, o indirectamente como facilitador de cambios en la estructura y organización de los complejos capturadores de luz (LHC, del inglés Light Harvest Complex) (Young et al., 1997; Xu et al., 2000). Niyogi (2000) propone que la eficiencia del ciclo de las xantofilas es determinante en el efecto del frío sobre los fotosistemas.

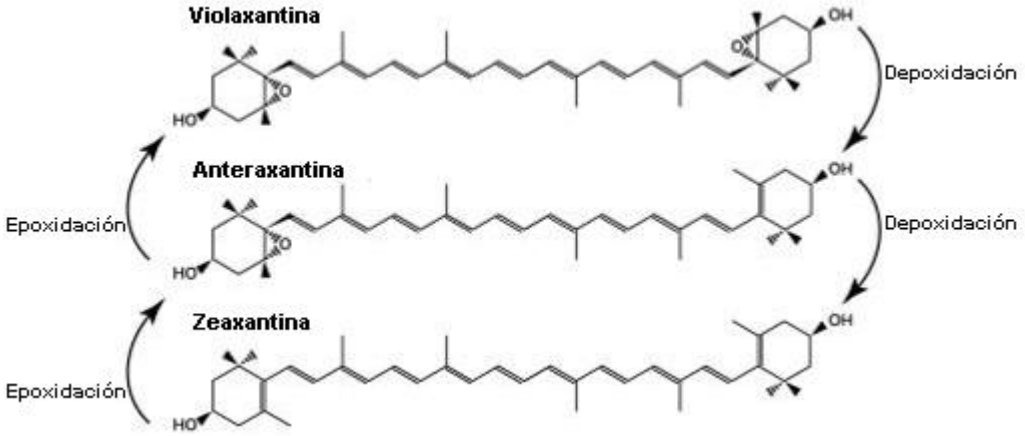


Figura 1.1. Ciclo de las Xantofilas. La depoxidación de la V en A y Z es un mecanismo de disipación no nocivo de la energía en exceso. El parámetro A+Z/A+Z+V es usado como indicador de actividad de este ciclo.

Existen varios componentes que estarían vinculados a este ciclo, y que además podrían tener un efecto en sí mismo en la disipación de la energía, más allá de inducir la formación de Z y A a partir de V. Estos componentes involucran la acidificación intratilacoidal y el aumento de la proteína PsbS, una proteína transmembrana del FSII cuya presencia es fundamental para la generación de qE (Demming-Adams y Adams III, 1992; Young et al., 1997; Li et al., 2000).

Algunos autores proponen que otras xantofilas, como la luteína, pueden tener un rol importante en la disipación no dañina de la energía, estudiada en mutantes de *Arabidopsis* y otras especies vegetales (Pogson et al., 1998; Niyogi, et al., 2001) donde la luteína en particular tiene un rol estructural y funcional en los LHC.

Xu et al. (2000) plantean que el rol del ciclo de las xantofilas en la respuesta de las plantas al frío es controversial y consideran que en arroz, trigo y cebada la diferencia en la susceptibilidad al frío no puede ser explicada por la actividad del ciclo de las xantofilas. Sin embargo, Jeong et al. (2002) entienden que las diferencias de susceptibilidad al estrés por frío en arroz dependen únicamente de la capacidad de disipación de la energía. A su vez, Hirotsu et al. (2004) reportan que el arroz se defiende del exceso de energía causado por este tipo de estrés a través de un incremento en la disipación de la energía y del flujo de electrones por el ciclo agua-agua, independientemente del genotipo y del estado de desarrollo de la hoja.

1.4 DISMINUCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN

Mecanismos deficientes de disipación de la energía en exceso conlleva a la formación de ERO. Su detoxificación es la segunda barrera para evitar los daños causados por baja temperatura. La detoxificación de ERO puede llevarse a cabo por carotenoides, por la acción de enzimas antioxidantes, tales como catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX EC 1.11.1.11) y glutationa reductasa (GR, EC 1.8.1.7) y por compuestos antioxidantes como: ascorbato, glutatión, β-caroteno y α-tocoferol, que sirven como sustrato de reacciones antioxidantes (Saruyama y Tanida, 1995; Mittler, 2002; Huang y Guo, 2005), entre otros.

La SOD reacciona con radicales $O_2^{\bullet -}$, convirtiéndolos en O_2 y H_2O_2, que puede ser convertido en agua y O_2 por acción de la CAT y/o APX. La transformación del H_2O_2 por acción de la APX requiere de la actividad de las enzimas monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y GR (Figura 1.2).

Los efectos de la baja temperatura sobre estas enzimas son ampliamente conocidos y han sido reportados en un gran número de especies vegetales, particularmente en especies de clima cálido (Allen y Ort, 2001). En arroz se han realizado estudios con genotipos contrastantes, en los que se comparó la actividad de distintas enzimas antioxidantes en etapas de plántula, según su respuesta a la aclimatación (In Kuk et al., 2003), a la recuperación luego de ser tratadas con frío (Saruyama y Tanida, 1995) y al crecimiento en condiciones de baja temperatura (Saruyama y Tanida, 1995; Jeong et al., 2002; Huang y Guo, 2005; Guo et al., 2006). En estos trabajos se encontraron resultados diferentes de la actividad de varias enzimas. Jeong et al. (2002) y Saruyama y Tanida (1995) no vieron afectada la actividad de la SOD en ninguno de los genotipos crecidos en frío; aunque encontraron un incremento en la actividad luego de restablecidas la temperatura óptima de crecimiento. Contrariamente a estos resultados, Huang y Guo (2005) y Guo et al. (2006) demostraron que en genotipos tolerantes la actividad de la SOD se incrementó en 17-19 % después de 3 días de crecimiento a baja temperatura, mientras que en genotipos susceptibles la actividad disminuyó considerablemente.

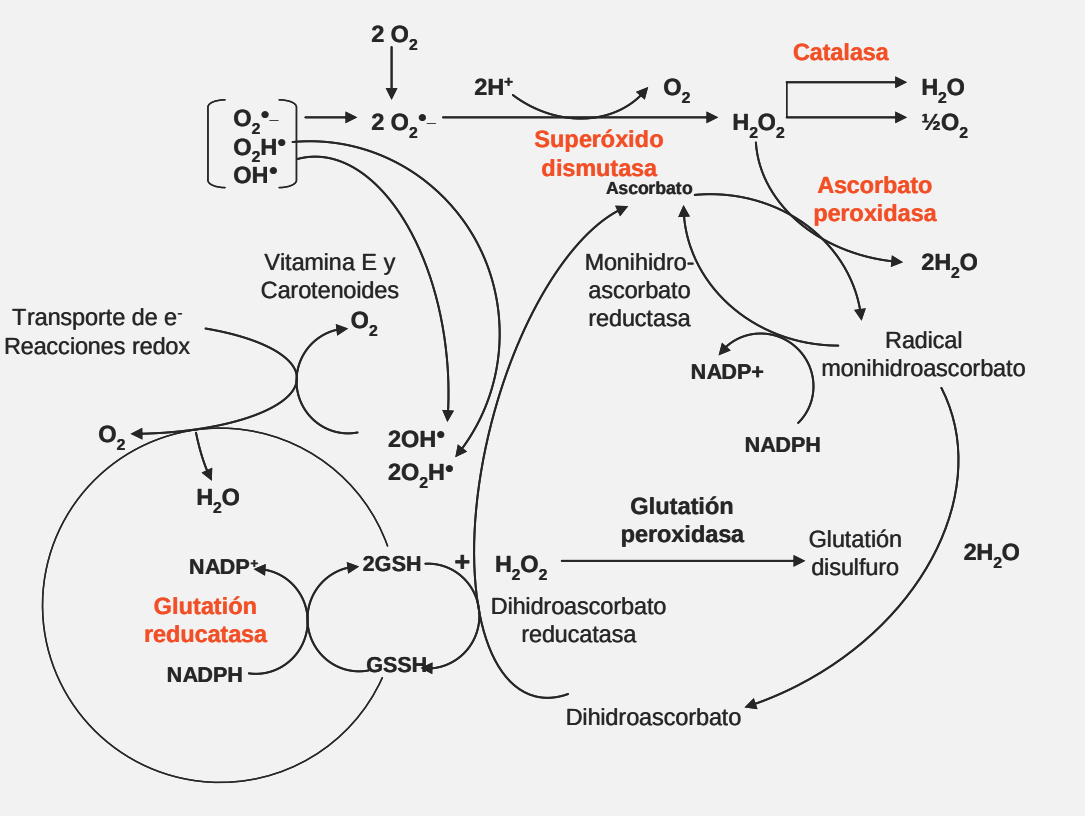


Figura 1.2. Esquema de diferentes sistemas de defensa de antioxidantes. O2*- radical superóxido, OH* hidroxilo y GSH glutatión reducido, GSSH glutatión oxidado. Adaptado de Buchanan et al. (2000).

Estas diferencias fueron más notorias para la actividad CAT. Mientras que Saruyama y Tanida (1995) encontraron una disminución en la actividad CAT luego del tratamiento con frío en ambos genotipos, Guo et al. (2006) demostraron que la actividad de CAT se incrementó en los genotipos tolerantes crecidos a baja temperatura y disminuyó en los susceptibles. Por otro lado, Morsy et al. (2007) reportaron un incremento en la actividad CAT en ambos genotipos.

En relación a la actividad APX, al igual que para la enzima SOD, tanto Saruyama y Tanida (1995) como Jeong et al. (2002) no observaron cambios de actividad en hojas de plántulas, mientras que Guo et al. (2006) observaron una mayor actividad en los genotipos tolerantes y una importante reducción en los susceptibles.

La enzima GR ha sido menos estudiada en genotipos contrastantes de arroz. Únicamente Saruyama y Tanida (1995) reportaron que no existían diferencias de actividad entre genotipos contrastantes.

Estas aparentes contradicciones o diferencias en los resultados referentes a la actividad de las enzimas antioxidantes, puede deberse, entre otros, a que se utilizaron diferentes genotipos, más allá de sus características fenotípicas similares (tolerantes/susceptibles). Saruyama y Tanida (1995) compararon

los cultivares Dunghan Shali (tolerante) y K-sen 4 (susceptible); Guo et al. (2006) estudiaron los cultivares Xiangnuo no. 1 y Zimanuo como tolerantes y los cultivares Xiangzhongxian no. 2 e IR50 como susceptibles al frío. Tanto IR50 como Xiangnuo no. 1 también fueron utilizados por Huang y Guo (2005), obteniendo los mismos resultados que Guo et al. (2006). Por su parte, Jeong et al. (2002) analizaron la actividad de las enzimas antioxidantes en el genotipo Stejaree 45, descrito como resistente, y en el genotipo susceptible Milyang 23. De esta manera se puede especular que la respuesta de las enzimas antioxidantes al frío es dependiente del genotipo, independientemente de su comportamiento (tolerante/susceptible) y que por lo tanto, la tolerancia a baja temperatura de arroz puede involucrar diferentes mecanismos bioquímicos.

La importancia de estas enzimas en la tolerancia a la baja temperatura en arroz, ha sido confirmada por In Kuk et al. (2003), quienes utilizaron como modelo contrastante, plantas aclimatadas (sometidas a un enfriamiento previo por encima del umbral de daño y que en muchas especies desencadena mecanismos de tolerancia al frío) y plantas no aclimatadas, como forma de evaluar la tolerancia al frío en un mismo genotipo. Si bien no existieron grandes diferencias, en plántulas aclimatadas la actividad de la SOD fue inducida únicamente en raíces, mientras que la actividad de CAT aumentó tanto en hojas como en raíces sugiriendo una mayor eliminación de H_2O_2. Un resultado importante del trabajo de In Kuk et al. (2003) fue la observación de que la expresión de estas enzimas es tejido específico y por ende los mecanismos de protección al frío. Mientras que CAT y APX mostraron un papel principal en la protección de hojas, SOD y GR parecieron ser las más importantes como protectores radiculares.

Además de los procesos enzimáticos, las ERO pueden ser detoxificadas mediantes mecanismos no enzimáticos. Por ejemplo, los carotenoides como la neoxantina y la luteína se han asociado a los procesos de detoxificación de ERO. La neoxantina fue implicada en la detoxificación de $O_2^{\bullet -}$, mientras que la luteína se ha asociado al quenching de clorofila triplete (Dall'Osto et al., 2007a; Dall'Osto et al., 2007b).

2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA

El objetivo fue identificar marcadores bioquímicos mediante la evaluación del daño y de la respuesta causado por baja temperatura en genotipos uruguayos de arroz.

Primeramente se evaluaron los genotipos nacionales y de referencia de acuerdo al daño producido por el estrés, específicamente daño oxidativo, daño sobre fotosistemas y daño sobre membrana plasmática. El daño oxidativo se determinó cuantificando la producción de H_2O_2 y los daños a nivel de lípidos y proteínas. El daño sobre los procesos fotosintéticos se estimó mediante la emisión de fluorescencia de la Clorofila y el daño a nivel de la membrana plasmática se determinó cuantificando la pérdida de electrolitos. Posteriormente se evaluó la respuesta al estrés por frío. Para ello se cuantificaron los componentes del ciclo de las xantofilas, contenido de carotenoides, la actividad de las principales enzimas antioxidantes y la producción de H_2O_2.

El daño se cuantificó en 4 genotipos nacionales (El Paso 144, INIA Caraguatá, INIA Tacuarí y L2825CA) y en 2 genotipos de referencia (IR50 y M202). La respuesta al estrés por frío se evaluó en 3 genotipos nacionales (El Paso 144, INIA Tacuarí y L2825 CA). La selección de estos genotipos se realizó en base a los datos obtenidos en la evaluación del daño.

Los genotipos uruguayos se seleccionaron por ser los más plantados en el país, como INIA Tacuarí (Japonica) y El Paso 144 (Indica) o por tener particularidades en su comportamiento frente al frío. Este es el caso de INIA Caraguatá, que a pesar de ser del tipo Japonica se presenta altamente susceptible, y la línea L2825CA (Japonica) que ha mostrado ser muy tolerante al frío y está siendo usada como progenitor en los programas de mejoramiento para la introgresión de esta característica (Com. Pers. Fernando Pérez de Vida). Los materiales de referencia son los dos utilizados en estudios recientes para mapeo de QTL: M202 (Japonica) tolerante y IR50 (Indica) susceptible (Andaya y Tai, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL, CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y TRATAMIENTO CON FRIO

Las semillas de los genotipos IR50, El Paso 144, INIA Tacuarí, L2825CA, INIA Caraguatá y M202 fueron suministrados por el Proyecto de Mejoramiento Genético de INIA – Treinta y Tres.

Las semillas de arroz se embebieron con agua durante 10 min y se esterilizaron mediante inmersiones consecutivas en etanol 70 % durante 2 min y tres veces en hipoclorito 50 % durante 10 min cada una y se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril. Las semillas estériles se pre-germinaron en

placas de Petri a 30 °C. Las plántulas fueron plantadas en un sistema de hidroponía con medio conteniendo la mitad de la concentración de sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin sacarosa y se cultivaron en cámara de crecimiento bajo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y a una temperatura de 28 °C. La irradiancia en la superficie de las hojas fue de 300 µmol photons $m^{-2} \cdot s^{-1}$. Cuando las plantas alcanzaban el estadio de crecimiento V3 (Counce et al., 2000) se les realizó el tratamiento con baja temperatura a 10 °C, durante 6, 24 y 48 h, dependiendo del experimento.

3.2 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO

3.2.1 Fluorescencia del FS II

Se cuantificó la emisión de fluorescencia de la clorofila a en hojas completamente expandidas de plantas control (28 ºC) y plantas sujetas a 6, 24 y 48 h de tratamiento con frío (10 ºC). Las medidas de fluorescencia se realizaron con un fluorímetro FMSI Hansatech fluorometer (King's Lynn Instrument Ltd., King's Lynn, UK). Este parámetro fue determinado en todos los genotipos y variedades analizadas. Las hojas fueron pre-oscurecidas durante 30 min antes del experimento. Los datos fueron tomados durante 0.8 s de exposición a 8000 µmol fotones $\cdot$ $m^{-2} \cdot s^{-1}$ de luz actínica. Fv/Fm, qN y Fo fueron calculados directamente por el fluorímetro (Verhoeven et al., 1997).

3.2.2 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue determinada a través de la medición de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) según lo descrito por Iturbe-Ormaetxe et al. (1998) con modificaciones. 100 mg de hojas totalmente expandidas de plantas control (28 ºC) y de plantas sujetas a tratamiento de frío (10 ºC) durante 6, 24 y 48 h fueron homogenizadas en 500 µL 0.2 M fosfato de sodio, pH 7.6, Triton X-100 1 % (v/v) y butilhidroxitolueno 1 % (p/v). Posteriormente se centrifugaron durante 20 min a 13000 g a 4 ºC y a 150 µL de sobrenadante se agregó 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (p/v) y se hirvió 20 min. Las muestras se centrifugaron durante 2 min a 3000 x *g*, y 150 µL del sobrenadante resultante fueron mezclados con 150 µL de SDS 3 % (w/v), 250 µL de ácido 2-tiobarbitúrico 3 % (p/v) y 250 µL HCl 25 % (v/v). Las mezclas se calentaron a 80 ºC por 20 min y se enfriaron inmediatamente en hielo. A continuación se agregó 900 µL de 1-butanol a cada uno. Los peróxidos de lípidos fueron determinados

como TBARS midiendo la absorbancia de MDA a 532 nm y usando como coeficiente de extinción 156 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ (Rustérucci ,1996). Se analizaron 8 réplicas de cada muestra. Este parámetro fue determinado en todos los genotipos.

3.2.3 Oxidación de proteínas por determinación de carbonilos

Se determinó la cantidad de proteínas de las hojas de arroz crecidas bajo condiciones control (28 ºC) y después de 48 h de tratamiento con frío (10 ºC) siguiendo el protocolo descrito por Bradford (1976). Se tomó el peso de tejido correspondiente a 1 mg de proteína y se maceró con tampón de extracción (0.1 M fosfato de potasio, pH 7, 1 mM EDTA, PVP 1 % (p/v), Triton X-100, 0.1 % (v/v), glicerol 15 % (v/v), 1mM PMSF, 10 mM ácido ascórbico y β-mercaptoetanol 2.5 % (v/v). Se le agregó 500 µL de DNP 10mM y se dejó a temperatura ambiente durante 1 h y 30 min, agitando mediante vortex cada 15 min. Posteriormente se agregó 500 µL de 22 % TCA (o el volumen suficiente para que la concentración de TCA no sea inferior a 10 %) y se centrifugó a 11500 x *g* durante 4 min. El precipitado se lavó 3 veces con 1 mL de etanol-acetato de etilo esperando 10 min entre cada lavado. Luego se re-disolvió el precipitado en 600 µL de una solución de guanidina 6M durante 15 min a 37 °C. Se centrifugó nuevamente a 11000 x *g* durante 3 min. En el sobrenadante se midió la absorbancia entre 360 y 390 nm y se determinó el máximo de absorbancia en ese rango. Se calculó el contenido de carbonilos utilizando el máximo de absorbancia y el coeficiente de extinción 22000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. El protocolo utilizado se basó en la metodología descrita por Levine et al. (1990) y se realizó en todos los genotipos.

3.2.4 Estabilidad de membrana mediante pérdida de electrolitos totales

Se colectaron dos hojas de plantas control (28 ºC) y plantas sujetas a 24 y 48 h de tratamiento de frío (10 ºC). Las hojas fueron inmersas en 20 mL de agua destilada en tubos de ensayo durante 2 h a 25 ºC con agitación constante. La conductividad del agua fue medida inmediatamente antes de colocadas las hojas en el tubo y luego de las 2 h de agitación. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 30 min, se dejaron enfriar hasta 25 ºC y se cuantificó la conductividad nuevamente. Las medidas de conductividad se realizaron con un conductímetro modelo DDS-IIA (Shanghai Leici Instrument Inc., Shanghai, China). La pérdida relativa de electrolitos (PE) fue estimada como la relación de conductividad

antes (menos conductividad del agua) y después del hervido (Huang y Guo, 2005). Este parámetro fue determinado en todos los genotipos y variedades.

3.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA

3.3.1 Cuantificación de xantofilas, carotenoides y clorofila

El análisis de pigmentos fue hecho en plantas control (28 ºC) y en plantas sujetas a 48 h de tratamiento con frío (10 ºC). La extracción de pigmentos fue hecha en condiciones de semi-oscuridad pulverizando 500 mg de tejido congelado en 2 mL de acetona 100 %. El extracto se centrifugó dos veces a 5000 x *g* durante 10 min a 4 ºC y el sobrenadante obtenido fue posteriormente filtrado en filtros de 0.45 µm (Sartorius ®, Goettingen, Germany). Las xantofilas fueron analizadas en HPLC como fue descrito por Bungard et al. (1999) usando una columna C18 de fase reversa (tamaño de partícula 5 µm, diámetro interno 8 mm × longitud 250 mm, Restek®, Bellefonte, PA) y con una elución isocrática de 2 mL · min^{-1} con una fase móvil acetonitrilo: metanol 85:15 (v/v). Los pigmentos fueron detectados midiendo la absorbancia a 445 nm, usando un detector Shimadzu SPD–10A UV-VIS (Kyoto, Japan). Se utilizó como estándar luteína purificada (Sigma Chemical, St. Louis, MO). El área de los picos fue integrada usando un Chromatopac Shimadzu C-R6A. El grado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas fue expresado como (A + Z)/(A + V + Z). Las cuantificación de carotenoides y clorofilas fue realizada usando el método de Bungard et al. (1999) y Wellburn (1994), respectivamente. Este parámetro fue determinado en los genotipos INIA Tacuarí y L2825CA.

3.3.2 Producción de peróxido de hidrógeno in vivo

La detección de H_2O_2 *in vivo* fue realizada sobre hojas de arroz de los seis genotipos o variedades usadas en este estudio en plantas control (28 ºC) o sujetas a 48 h de tratamiento con frío (10 ºC). El protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito por Vanacker et al. (2000).

3.3.3 Cuantificación de peróxido de hidrógeno

Se obtuvieron hojas de las variedades El Paso 144, INIA Tacuarí y L2825CA tratadas con 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 h de frío (10 ºC). 500 mg de muestras de hojas fueron homogeneizadas en 2 mL de 20 mM

fosfato de sodio, pH 6.8. Los homogenizados se centrifugaron tres veces a 4 ºC por 15 min a 10000 x *g* y los sobrenadantes obtenidos fueron usados para la cuantificación. Las medidas de H_2O_2 fueron hechas por triplicado usando Amplex Red Hydrogen Peroxide-Peroxidase Assay kit (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones indicadas por los fabricantes. La fluorescencia fue medida con un lector de placas de fluorescencia (Varioskan Flash, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlandia), usando una longitud de onda de excitación de 530 nm y de detección de fluorescencia de 590 nm. La concentración de H_2O_2 de cada muestra fue calculada usando una curva estándar según fabricante.

3.3.4 Determinaciones de actividad de enzimas antioxidantes

500 mg de tejido de hoja fue homogenizado en 2 mL de tampón de extracción: 0.1 M fosfato de potasio, pH 7, 1 mM EDTA, PVP 1 % (p/v), Triton X-100, 0.1 % (v/v), glicerol 15 % (v/v), 1 mM PMSF, 10 mM ácido ascórbico y β-mercaptoetanol 2.5 % (v/v). Los homogenizados fueron centrifugados por 15 min a 10000 x g a 4 ºC. Los extractos libres de células resultantes fueron usados para determinación de la actividad SOD, CAT y APX. El contenido de proteínas totales fue determinado según Bradford (1976).

La actividad SOD fue determinada según Foster y Hess (1980), en 15 µL de extracto vegetal en 50 mM fosfato de potasio, 100 µM EDTA y 50 µM xantina, pH 7.8. Una unidad de SOD fue definida como la cantidad de enzima que inhibe la reducción de ferricitocromo XO - dependiente en un 50 %.

La actividad CAT fue medida usando el método descrito por Beers y Sizer (1952) en 20 µL de extracto vegetal diluido en 1 mL de 50 mM fosfato de potasio, pH 7.0. La actividad se monitoreó espectrofotométricamente a 240 nm durante 2 min después del agregado de 20 mM H_2O_2. Una unidad CAT fue definida como la actividad que descompone 1 µmol de peróxido de H_2O_2 a 25 ºC y a pH 7.0.

La actividad de la APX fue medida usando el método descrito por Chen y Asada (1989) en 50 mM fosfato de potasio pH 7.4, con 0.5 mM ácido ascórbico y 2 mM H_2O_2. La reacción fue iniciada con el agregado de 15 µL de extracto vegetal y la disminución de la absorbancia fue medida a 290 nm por 90 s. Una unidad de APX fue definida como la actividad que oxida 1 µmol de ácido ascórbico por minuto a 25 ºC a pH 7.4.

3.3.5 Análisis estadístico

Para contenido de pigmentos, parámetros de fluorescencia de clorofila, determinación de TBARS y PE el análisis de varianza fue realizado en tres experimentos independientes. En el caso de cuantificación de actividades enzimáticas y H_2O_2 el análisis de varianza fue realizado en los resultados de dos experimentos independientes. Las medias fueron comparadas usando el test de Duncan con un $P<0.5$.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS

El genotipo L2825CA no presentó variaciones de la fluorescencia basal (Fo) durante todo el tratamiento de frío y el genotipo M202 mostró incremento después de 24 h de frío. En los otros cinco genotipos este parámetro se incrementó significativamente después de 6 h de frío. A las 48 h los genotipos Indica (IR50, El Paso 144) mostraron valores significativamente superiores a los de Japonica (INIA Tacuarí, INIA Caraguatá, L2825CA y M202) (Fig. 1.2 A).

El parámetro Fv/Fm disminuyó significativamente a las 6 h de tratamiento en IR50 y a las 24 h en los otros genotipos. Igualmente a las 24 h L2825CA y M202 existieron diferencias significativas respecto a El Paso 144, INIA Tacuarí e INIA Caraguatá. A las 48 h de tratamiento los genotipos Indica mostraron mayor daño comparado a los Japonica, aunque El Paso 144 presentó valores significativamente mayor a IR50. Por su parte en los Japonica, L2825CA e INIA Caraguatá presentaron menos fotoinhibición comparados con INIA Tacuarí y M202. (Fig. 1.2 B).

En lo que respecta al parámetro eficiencia del fotosistema II (Ef. FSII) los genotipos de tipo Japonica se mostraron siempre más eficientes, aunque la diferencia entre ssp. aumentó a las 24 h. A las 48 h de tratamiento, los genotipos L2825CA e INIA Caraguatá mostraron los mayores valores de Ef. FSII (Figura 1.2 C).

En todos los genotipos se observó un aumento del qN a lo largo del tiempo de exposición a baja temperatura. Los valores de qN obtenidos a las 48 h de tratamiento presentaron un error estándar mayor, de tal forma que no fue posible discriminar entre los diferentes genotipos (Fig. 1.2 D). Sin embargo, a las 24 h se pudieron diferenciar los dos genotipos Indica de los de Japonica. Dentro de los genotipos

Japonica, L2825CA y M202 mostraron valores superiores a los demás genotipos, especialmente a INIA Caraguatá que mantuvo niveles significativamente bajos de qN (Figura 1.2 D).

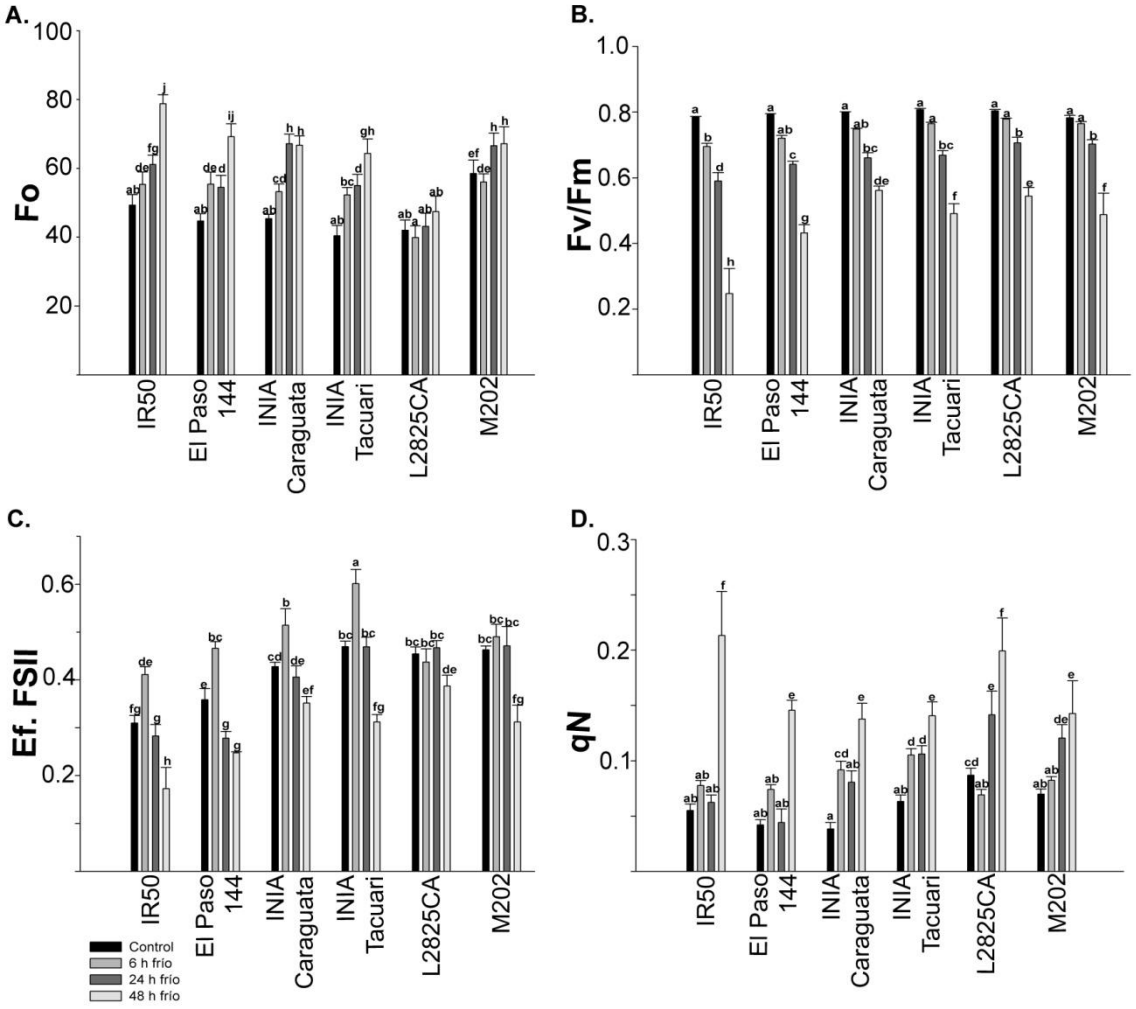


Figura 1.2. Efecto de la baja temperatura sobre parámetros fotosintéticos determinados por emisión de fluorescencia de la clorofila. Se usaron 6 genotipos de arroz y las determinaciones se realizaron a 0, 6, 24 y 48 h de frío (10ºC). **A.** Fluorescencia basal (Fo). **B.** Fv/Fm. **C.** Eficiencia del fotosistema II (Ef. FSII). **D.** *Quenching* no fotoquímico (qN). Las barras representan el promedio de tres repeticiones y las líneas verticales el error estándar.

4.2 EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA SOBRE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

La peroxidación de lípidos es uno de los parámetros más utilizados para la cuantificación del daño oxidativo, estimado a través de TBARS. Contrariamente a lo esperado INIA Tacuarí mostro valores mayores de daño a las 6 h de frío, aunque este efecto se modificó a las 24 h en donde los genotipos Indica mostraron mayor producción de TBARS respecto a los genotipos Japonica. L2825CA se comportó mejor durante todo el tratamiento, mostrando menores valores que el genotipo tolerante de referencia

M202 (Figura 1.3 A). A las 48 h de frío también fue posible determinar el menor daño ocurrido en INIA Caraguatá respecto a INIA Tacuarí y M202.

La cuantificación de la oxidación de las proteínas permitió observar que en los genotipos Indica susceptibles y en INIA Tacuarí hubo un aumento significativo de la cantidad de carbonilos, y por ende del daño oxidativo de las proteínas. IR50 fue el genotipo más afectado por el tratamiento de frío. En el caso de L2825CA, no hubo cambios significativos en la cantidad de carbonilos aunque los niveles basales fueron muy elevados y similares a los encontrados en los genotipos Indica y en INIA Caraguatá (Figura 1.3 B).

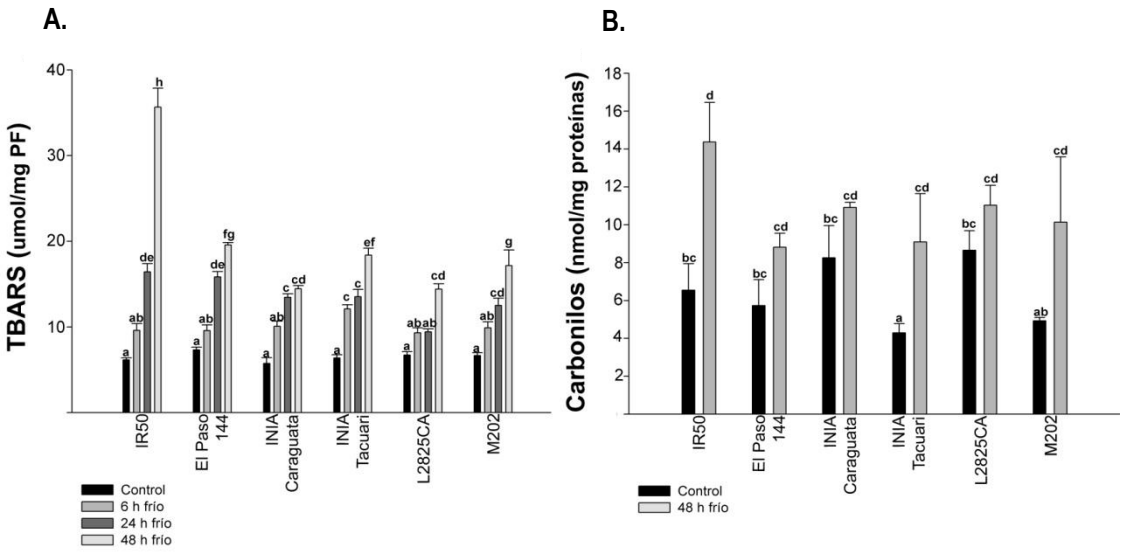


Figura 1.3. Daño oxidativo evaluado a través de TBARS y carbonilos. A. Peroxidación de lípidos como nmoles de TBARS. **B.** Cuantificación de los niveles de oxidación de proteínas medidos como nmoles de carbonilos. Las barras representan el promedio de tres repeticiones y las líneas verticales el error estándar.

4.3 DAÑOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA: PÉRDIDA DE ELECTROLITOS

La Figura 1.4 muestra los valores de la PE en los genotipos estudiados. De acuerdo a lo esperado, el genotipo IR50 fue el más dañado después de 24 y 48 h de frío. Por su parte, El Paso 144 fue significativamente menos dañado que IR50 lo que evidencia un mejor comportamiento frente al frío respecto a IR50 según este parámetro. INIA Caraguatá, a pesar de ser del tipo Japonica, presentó mayor PE a las 24 h de frío, semejante a El Paso 144. Los genotipos INIA Tacuarí y M202 presentaron el mismo nivel de daño luego de 48 h de frío. Ambos genotipos mostraron a las 24 h de tratamiento, los mismos niveles de PE que los genotipos Indica en condiciones control. Nuevamente el genotipo L2825CA

se presentó tolerante en lo que a daño de membrana respecta. Este genotipo mantuvo niveles de daño igual a los genotipos Indica en condición control, incluso después de 48 h de frío.

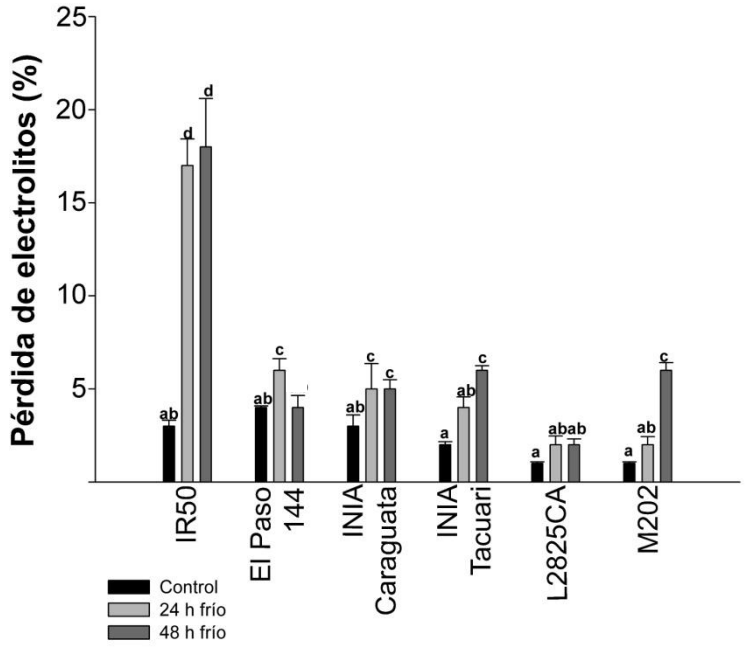


Figura 1.4. Pérdida de electrolitos en 6 genotipos de arroz sometidos a bajas temperaturas. Las barras representan el promedio de tres repeticiones y las líneas verticales el error estándar.

4.4 EFECTO DEL FRÍO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE H2O2

La acumulación de H_2O_2 se estimó mediante la visualización *in situ* en hojas de arroz de los 6 genotipos. Este ensayo se realizó comparando plantas control, con plantas sometidas a 10 ºC durante 48 h. Mediante esta técnica no fue posible visualizar diferencias cualitativas en la acumulación de H_2O_2 entre los diferentes genotipos y entre las plantas control y las tratadas con 48 h de frío (Figura 1.5). De este ensayo resultó particularmente destacable un patrón de acumulación definido de H_2O_2 en INIA Caraguatá. En todas las muestras observadas tratadas con frío el H_2O_2 se generaba en la zona intercostal. En esta zona existen únicamente células bulliformes, las cuales se caracterizan por no presentar cloroplastos.

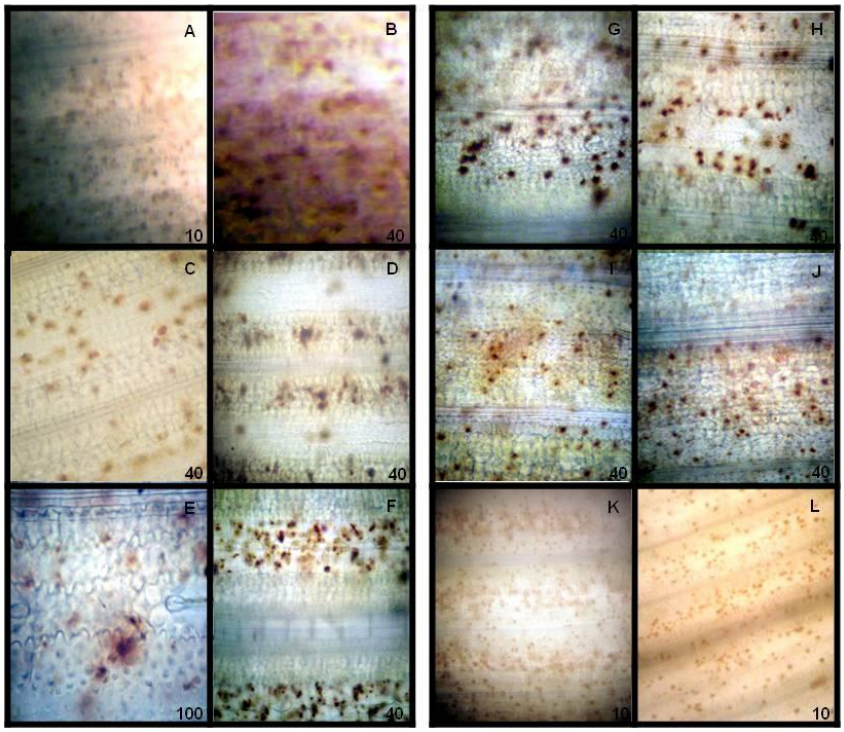


Figura 1.5. Acumulación de H_2O_2 *in situ*. A. IR50 control, **B.** IR50 frío, **C.** El Paso 144 control, **D.** El Paso 144 frío, **E.** INIA Caraguatá control, **F.** INIA Caraguatá frío, **G.** INIA Tacuarí control, **H.** INIA Tacuarí frío, **I.** L2825CA control, **J.** L2825CA frío, **K.** M202 control, **L.** M202 frío. Los aumentos del microscopio se indican en cada una de las fotografías abajo a la derecha.

Debido a que era esperable un aumento en la producción de H_2O_2 en plantas sometidas a baja temperatura, se cuantificó su acumulación en tres de los genotipos. La selección de los mismos se hizo en base a: 1) estudios previos que demostraban su comportamiento diferencial y 2) que eran genotipos uruguayos relevantes para el programa de mejoramiento. De esta forma se seleccionó el genotipo El Paso 144 y los genotipos INIA Tacuarí y L2825CA. En la Figura 1.6 se muestran los resultados de la acumulación de H_2O_2.

La cuantificación de H_2O_2 indica que efectivamente entre las plantas control y las plantas sometidas a 48 h de frío no hay diferencias significativas en la cantidad acumulada. La cuantificación en períodos más cortos de tiempo, permitió observar un incremento o pico de producción de H_2O_2 a las 2 h de frío y a las 4 h de frío en INIA Tacuarí y L2825CA, respectivamente. El incremento es significativamente superior en INIA Tacuarí respecto a L2825CA. Por otro lado, El Paso 144 no mostró cambios en la cantidad de H_2O_2 acumulada durante todo el período analizado.

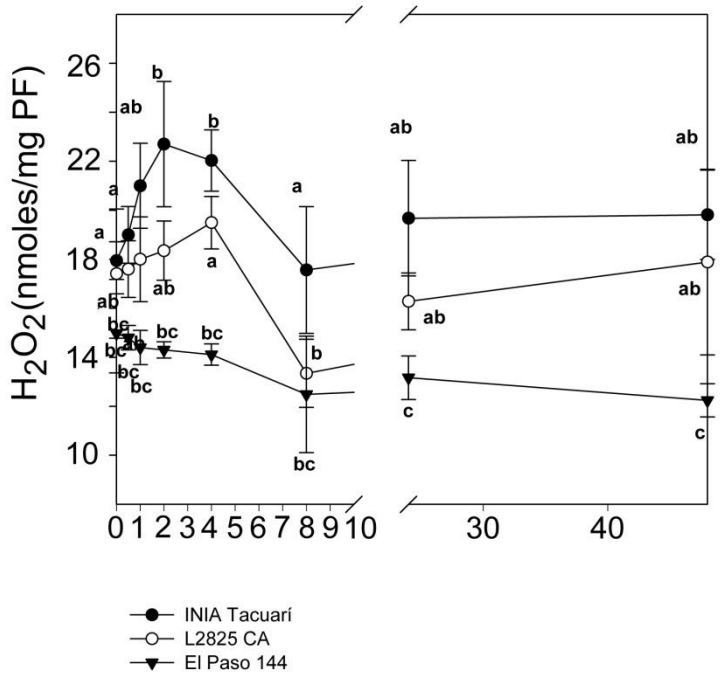


Figura 1.6. Cuantificación de peróxido H_2O_2 en hojas de El Paso 144, INIA Tacuarí y L2825CA. Las barras representan el promedio de tres repeticiones y las líneas verticales el error estándar..

4.5 CONTENIDO DE PIGMENTOS Y CICLO DE LAS XANTOFILAS

La cuantificación de pigmentos e intermediarios del ciclo de la xantofila, anteroxantina (A) zeaxantina (Z) y violoxantina (V), se realizó en los genotipos INIA Tacuarí y L2825CA. El cuadro 1.1 muestra los niveles de clorofila, carotenoides, xantofilas y el estado de de-epoxidación de intermediarios del ciclo de la xantofila en hojas sometidas a baja temperatura. INIA Tacuarí tuvo niveles mayores de clorofila y carotenoides totales en las plantas control y estresadas en comparación con L2825CA, en las mismas condiciones. En ambos genotipos se encontraron cambios en el contenido de xantofilas luego de ser sometidos a estrés por frío. Considerando únicamente el estado de de-epoxidación (indicador de los niveles de disipación no nociva de energía vía el ciclo de las xantofilas) se podría concluir que en ambos genotipos se activó el ciclo de xantofilas cuando fueron sometidos a estrés. Sin embargo, únicamente INIA Tacuarí mostró reducción en el contenido de V asociado a una disminución de Z. En L2825CA la concentración de A y Z no cambió, mientras que los niveles de V disminuyeron significativamente. Esto significa que en L2825CA no se activó el ciclo de las xantofilas. La disminución de V no estuvo asociada con la formación de neoxantina a través de la isomerización de V, posiblemente porque se clivó formando xantoina. Además hubo un incremento en el contenido de luteína en ambos genotipos (Cuadro 1.1).

Tabla 1.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos en los genotipos INIA Tacuarí y L2825CA.

	INIA Tacuarí		L2825CA	
	Control	Frío	Control	Frío
Chla	139.80 ± 4.94 a	128.67 ± 10.65 a	106.61 ± 7.91 b	92.49 ± 1.27 b
Chlb	42.64 ± 3.90 a	35.41 ± 4.75 ab	26.80 ± 0.22 bc	16.58 ± 2.94 c
Chla/b	3.31 ± 0.18 a	3.69 ± 0.22 a	4.01 ± 0.14 a	5.59 ± 0.19 b
Car. Totales	63.11 ± 4.86 a	53.9 ± 4.74 ab	53.17 ± 2.27 ab	44.01 ± 0.87 b
Neoxantina	41.98 ± 1.17 a	47.24 ± 1.57 a	56.64 ± 0.10 b	47.21 ± 3.98 a
Anteroxantina (A)	123.14 ± 6.45 a	116.48 ± 8.17 a	94.87 ± 6.25 a	101.84 ± 8.53 a
Violaxantina (V)	255.32 ± 7.44 a	110.30 ± 0.72 b	251.14 ± 18.38 a	112.08 ± 8.83 b
Luteina	460.52 ± 2.30 a	641.71 ± 38.71 b	452.58 ± 46.78 a	634.67 ± 25.60 b
Zeaxantina (Z)	36.60 ± 0.16 a	46.26 ± 3.39 b	58.47± 2.50 bc	51.23 ± 4.12 c
(A+Z)/(A+Z+V)	0.385	0.596	0.379	0.578

Las clorofilas y los carotenoides (car) totales son expresados como µg/g PF. Las xantofilas son expresadas como µmol/mmol del total de clorofilas. Los valores son la media de 3 réplicas biológicas ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$ entre las muestras de acuerdo al test de Duncan. Estado de de-epoxidación (A+Z)/(A+Z+V).

4.6 RESPUESTA AL FRÍO DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Se determinó la actividad de las principales enzimas antioxidantes, SOD, CAT y APX, en los genotipos INIA Tacuarí y L2825CA. En la Figura 1.7 se muestran los resultados obtenidos.

Para las tres enzimas analizadas, ninguno de los genotipos mostró cambios en la actividad entre las 8 y 48 h de tratamiento con frío. Sin embargo, durante las primeras 8 h hubo diferencias en los niveles de las mimas. Las plantas control de L2825CA mostraron tres veces mayor actividad de SOD y dos veces de APX respecto a INIA Tacuarí. La actividad SOD del genotipo L2825CA se mantuvo alta hasta las 2 h de tratamiento con frío, mientras que en INIA Tacuarí la actividad fue significativamente más baja y constante durante todo el período. Después de 1 h y 2 h de iniciado el tratamiento hubo una abrupta disminución de la actividad APX y CAT respectivamente. La actividad CAT bajó a la hora de tratamiento en ambos genotipos y después se mantuvo constante. Durante las primeras 4 h hubo diferencias significativas en la actividad de esta enzima, que presentó mayor actividad en L2825CA.

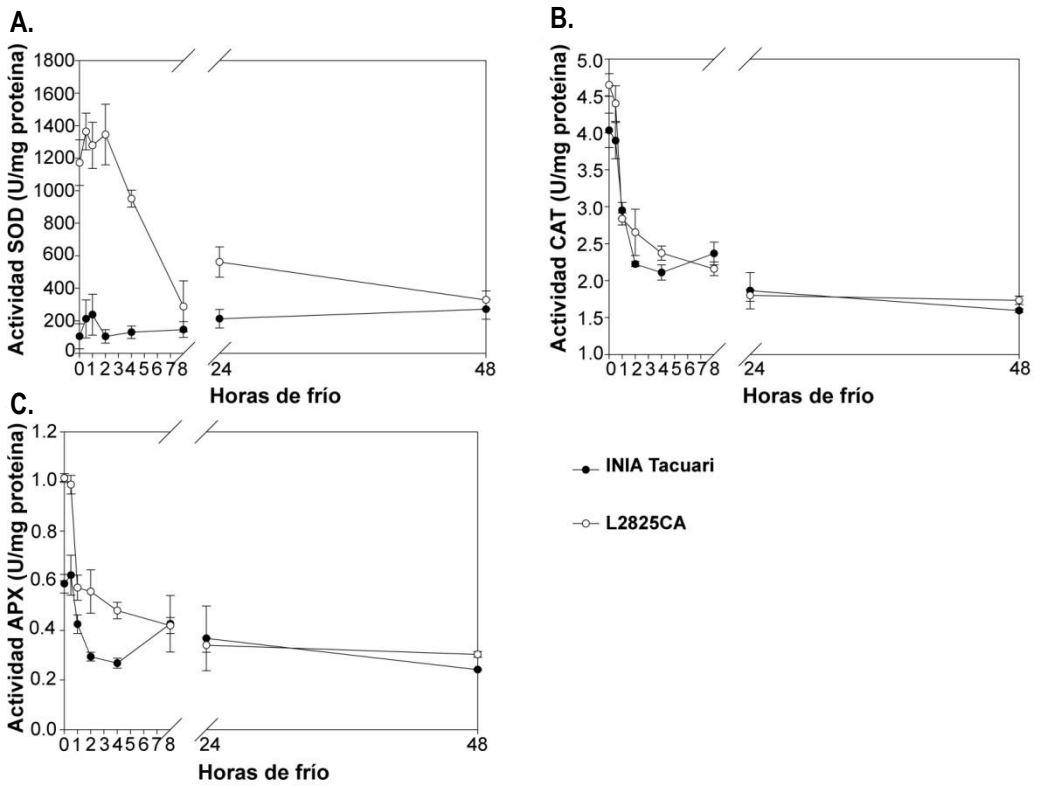


Figura 1.7. Actividad de enzimas antioxidantes en plántulas de INIA Tacuarí y L2825 CA sometidas a frío. A. Actividad SOD. **B**. Actividad CAT. **C.** Actividad APX. INIA Tacuarí (círculo negro) y L2825CA (círculo blanco). Los valores son medias de 3 réplicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre horas de tratamiento en el mismo genotipo (P≤0.05). Asteriscos indican diferencias estadísticas entre genotipos en la misma hora.

5. DISCUSIÓN

La tolerancia al estrés por frío involucra cambios bioquímicos y fisiológicos complejos que varían entre especies y entre genotipos de la misma especie. La existencia de ssp. contrastantes, como lo son Indica y Japonica, han hecho del arroz un excelente modelo para estudiar los efectos de las baja temperatura en plantas, especialmente en el impacto sobre la fotosíntesis, las respuestas del sistema antioxidante y la estabilidad de las membranas (Saruyama y Tanida, 1995; Hirotsu et al., 2004; Huang y Guo, 2005; Kim y Tai, 2011). Los artículos publicados hasta el momento han dejado en evidencia la respuesta contrastante entre ssp. pero no han profundizado sobre las diferencias entre genotipos de la misma ssp. Los resultados obtenidos en esta tesis confirmaron la mayor susceptibilidad a frío de los genotipos Indica respecto a los Japonica, pero además se pudieron identificar en genotipos de Japonica diferentes mecanismos de tolerancia.

Una de las estructuras celulares más dañadas son las membranas en general y la membrana plasmática en particular (Pereira da Cruz et al. 2010). De acuerdo a lo esperado, los resultados de peroxidación de lípidos y pérdida de electrolitos muestran que los genotipos Japonica fueron menos dañados que los Indica. Igualmente, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos Indica evaluados: IR50 presentó daños en los componentes celulares, como lípidos, proteínas y membranas significativamente superiores a El Paso 144. Estos resultados confirman que El Paso 144 es más tolerante a baja temperatura que el IR50; lo cual es esperable ya que la variedad El Paso 144 es producto de un programa de mejoramiento que selecciona en clima templado, y por ende selecciona genotipos de Indica más tolerantes al frío que las generadas en ambientes tropicales. INIA Caraguatá, a pesar de ser del tipo Japonica, presentó un comportamiento semejante a El Paso 144 con altos niveles de daño en membrana luego de 24 h de frío, confirmando lo observado por los mejoradores en el campo. El parámetro PE también permitió discriminar entre genotipos Japonica, confirmando la mayor tolerancia de la línea L2825CA usada comúnmente como dadora de tolerancia a frío en el programa de mejoramiento del FLAR (Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego) (com.pers. mejoradores FLAR). De esta forma, se validó el parámetro PE como una herramienta escalable y rápida para fenotipar la tolerancia a frío en plántulas de arroz reportada recientemente por Kim y Tai (2011).

Por otro lado, otros trabajos plantean que la tolerancia al frío depende de mecanismos seguros de disipación de la energía y sistemas eficientes de detoxificación de ERO. En el caso del arroz, Jeong et al. (2002) sugirieron que la susceptibilidad diferencial al frío de genotipos tipo Japonica dependía únicamente de los mecanismos de disipación de energía.

En base a estudios que indicaban que los principales daños por frío ocurren en el FSII y no en el FSI (Hirotsu et al., 2005), en esta tesis se utilizó el parámetro Fv/Fm como indicador de fotoinhibición. Asimismo, se utilizaron otros parámetros relacionados al estado del aparato fotosintético y a los mecanismos de disipación de la energía.

Los valores de Fo mostraron que L2825CA no presentó daño en la antena durante todo el tratamiento y los valores de Fv/Fm evidenciaron que la fotoinhibición fue menor a todos los genotipos, especialmente después de 48 h de frío, e incluso menor al control tolerante M202. En todos los genotipos se observó un aumento del qN con el aumento del tiempo de exposición a baja temperatura. Sin

embargo, la alta variabilidad experimental de este parámetro no permitió usarlo como un indicador de la disipación no nociva de energía. Hirotsu et al. (2004) ya habían reportado que el qN no está necesariamente correlacionada con el ciclo de las xantofilas, principal vía de disipación no nociva de energía, debido a que niveles bajos de Fm pueden estar subestimando qN. De hecho, a pesar de tener un mayor valor de qN, L2825CA no presentó los mayores niveles de conversión de xantofilas, como si lo hizo INIA Tacuarí. El significativo aumento en la cantidad de luteína puede explicar mecanismos alternativos de disipación de la energía. Müller et al. (2001) citan en su revisión que mutantes con niveles menores de luteína tienen valores menores de qE, uno de los componentes principales del qN.

En lo que respecta al daño sobre lípidos obtenidos a través de la cuantificación de TBARS, en todos los casos la peroxidación de lípidos aumentó con el frío, pero L2825CA mostró niveles significativamente menores a todos y específicamente respecto a INIA Tacuarí. Los daños sobre proteínas evidenciaron por la alta concentración de carbonilos, incluso en plantas control. Comparando los genotipos L2825CA con INIA Tacuarí, en el primero no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas, por lo que se puede plantear la existencia de un activo metabolismo proteico en estas últimas en condiciones normales de crecimiento.

Mediante la visualización de H_2O_2 *in situ* en plantas control y crecidas en frío por 48 h no fue posible diferenciar respuestas que permitieran sacar conclusiones sobre los mecanismos de defensa vinculados con la generación de esta ERO. Sin embargo, la cuantificación de H_2O_2 en El Paso 144, INIA Tacuarí y L2825CA durante períodos más cortos de tiempo reveló la existencia de un pico en la acumulación de H_2O_2 durante las primeras horas de tratamiento. La máxima acumulación de H_2O_2 en INIA Tacuarí ocurrió antes que en L2825CA y fue mayor durante las primeras 24 h de tratamiento. En el genotipo El Paso 144 no hubo inducción de la producción de H_2O_2 durante todo el tratamiento.

La importancia del H_2O_2 como molécula señalizadora ha sido reportada por Cheng et al. (2007) y Yun et al. (2010). Estos autores demostraron que durante las primeras horas de frío había genes cuya expresión estaba mediada por estrés oxidativo y particularmente por H_2O_2. Cheng et al. (2007) plantean que las diferencias fenotípicas encontradas entre los genotipos Indica y Japonica se deben a las diferencias en la inducción de la respuesta mediada por H_2O_2. La implicancia de las ERO en la señalización del estrés por frío ha sido comprobada en *Arabidopsis*, donde Teige et al. (2004)

demostraron que las ERO tienen un rol fundamental en la regulación de las cascadas MAPK, particularmente en la cascada de señalización MEKK1-MKK1/2-MPK4/6. El componente MEKK1 es activado y estabilizado por el H_2O_2. Considerando estos antecedentes, las diferencias en la intensidad del pico de producción de H_2O_2 y la asociación entre este y el comportamiento de la planta ante el estrés, se puede especular que el H_2O_2 puede actuar como molécula señal disparadora de la respuesta a frío en los genotipos analizados.

Los niveles ligeramente superiores de la actividad de las enzimas APX y CAT en L2825CA pueden contribuir a la reducción en la concentración de H_2O_2 acumulado respecto a INIA Tacuarí. La función de señalización de H_2O_2 y su relación con el sistema de detoxificación de ERO es parte de una compleja red extensamente revisada por Torres y Dangl (2005) y Suzuki y Mittler (2006). La contribución de las enzimas antioxidantes en la tolerancia a frío en arroz es controversial (Saruyama y Tanida, 1995; Morsy et al., 2007; Guo et al., 2006). Varios estudios reportan diferencias en la actividad SOD, APX y CAT después del tratamiento con frío en genotipos tolerantes y susceptibles, sugiriendo que una enzima antioxidante dada puede o no reflejar qué mecanismos están involucrados en la respuesta. Sin embargo, altos niveles de actividad de enzimas antioxidantes ha sido considerada siempre una ventaja en la tolerancia a diferentes estreses ambientales (Türkan et al., 2005).

El genotipo L2825CA tuvo altos niveles de actividad constitutiva de las tres enzimas evaluadas, pero después de establecido el estrés mantuvo altos niveles de actividad SOD, lo que puede ser ventajoso para desarrollar tolerancia durante las primeras horas de estrés inducido por baja temperatura.

Considerando todos los parámetros analizados, los resultados de esta tesis demuestran que los mecanismos de tolerancia del genotipo INIA Tacuarí están vinculados a la actividad del ciclo de las xantofilas el que le provee de un mecanismo eficiente de disipación de la energía en exceso generada por la ruptura, o menor actividad del aparato fotosintético. A su vez, el genotipo L2825CA presenta un aparato fotosintético más resistente al daño, que puede estar asociado a la mayor estabilidad de la membrana plasmática (menores daños sobre la antena), y a altos niveles basales de enzimas antioxidantes que le provee de mecanismos inmediatos de defensa al daño celular. Estos mecanismos constitutivos de tolerancia pueden significar costos metabólicos a L2825CA los que podrían explicar el bajo rendimiento promedio de esta línea y que por consecuencia no haya sido liberada como una variedad comercial.

Por otro lado, se visualiza al H_2O_2 como una molécula señal importante en el desencadenamiento de la respuesta al estrés. Sería importante profundizar el estudio sobre esta molécula, para encontrar mecanismos por los cuales las variedades Indica pudieran sensar el frío y responder rápidamente al mismo como lo hacen los genotipos Japonica.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN GENES CANDIDATOS ASOCIADOS A TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Uno de los objetivos de los programas de mejoramiento de los países de clima templado es producir cultivares con tolerancia a frío y alto potencial de rendimiento; esto es generar cultivares Indica tolerantes a frío. El mejoramiento para tolerancia a frío presenta importantes limitaciones que son las responsables del bajo éxito obtenido en los objetivos planteados. Estas dificultades derivan del alto grado de esterilidad de la descendencia de los cruzamientos Indica x Japonica y de dificultades metodológicas en la selección fenotípica. Las grandes variaciones de temperatura en el campo hacen que la única forma de evaluación sea en cámaras de crecimiento. La selección en generaciones segregantes en cámaras de crecimiento o fitotrones es impracticable y extremadamente costosa. Además, los parámetros definidos para identificar la tolerancia a frío en estado de plántula son muy difíciles de medir, y el fenotipado es costoso y laborioso (Pereira y Kothe, 2000).

Como fue discutido en el Capítulo 1 de esta tesis, existen diversas metodologías ajustadas para evaluar la respuesta al frío, como la cuantificación del daño oxidativo y la respuesta antioxidante, la integridad a la membrana plasmática. Por otro lado, el método rutinariamente usado por algunos programas de mejoramiento hasta el momento involucra la evaluación del daño visual estableciendo un ranking visual de amarillamiento (RV) de escala discreta del 1-9 desarrollada (Andaya and Mackill, 2003). Kim y Tai (2011) evaluaron diferentes metodologías e indicadores fisiológicos que pueden ser utilizados para evaluar la tolerancia a frío en etapas vegetativas del arroz. Los autores compararon el método de RV con otros indicadores cuantitativos, como contenido de prolina, ácido ascórbico, malonaldehído, glutationa reducida y pérdida de electrolitos (PE). Este último resultó ser el menos laborioso y estar altamente correlacionado con el RV. Como ya fue mencionado en esta tesis, la PE está relacionada con la integridad de las membranas, uno de los blancos principales del daño por baja temperatura.

Considerando la complejidad del fenotipado por frío y sobre todo cuando éste debe realizarse a gran escala, la aplicación de marcadores moleculares como herramienta de selección en arroz ha sido planteada como una alternativa válida y necesaria.

Los genotipos Indica y Japonica son fácilmente diferenciables por marcadores moleculares (Garris et al., 2005), pero es particularmente interesante las diferencias de expresión génica entre ambas ssp. en respuesta a diferentes factores y en particular al frío. Liu et al. (2007) han propuesto, a partir del análisis comparativo de los niveles de expresión de genomas de ambas ssp. que el polimorfismo de secuencias en regiones codificantes pueden ser las responsables de las diferencias de expresión detectadas, y por ende del fenotipo. A través del análisis comparativo del transcriptoma estos autores demostraron que el polimorfismo estaba generado mayormente por inserciones o deleciones, variaciones de un único nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y variaciones de tamaño en las secuencias de ADN génicas. Considerando estos antecedentes, a pesar de que es dependiente del germoplasma en estudio, encontrar polimorfismo de secuencia en genes candidatos (GC) es una estrategia válida para encontrar marcadores asociados a fenotipos de interés en general y a la tolerancia al frío en particular.

La identificación de genes y marcadores moleculares génicos asociados a una característica determinada puede realizarse usando métodos de genética cuantitativa por mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) o de genética molecular. La búsqueda de marcadores génicos en GC es una estrategia que vincula ambas estrategias. Este es el caso del trabajo de Tondelli et al. (2006) quienes identificaron GC, específicamente en factores de transcripción (FT), asociados a la respuesta al frío en cebada utilizando métodos convencionales de mapeo.

La gran disponibilidad de información obtenida a través de estudios de genética molecular y tradicional, así como la disponibilidad del genoma completo del arroz (tanto Indica como Japonica) con una anotación de genes muy avanzada, hace que la selección de GC sea una herramienta factible e interesante para descubrir marcadores asociados a fenotipos de interés.

1.1 BASES MOLECULARES DE LA RESPUESTA AL FRÍO EN PLÁNTULAS DE ARROZ

Cuando una planta es sometida a un estrés ambiental como el frío, se disparan procesos celulares que involucran el reconocimiento de la señal, la transducción de la misma y la respuesta génica que determina el comportamiento de la planta frente al estrés (Figura 2.1). Todaka et al. (2012) clasificaron

estos genes en dos grupos: 1) componentes de señalización que regulan la expresión en la respuesta al estrés (transducción de la señal y FT) y 2) genes que protegen directamente a las células vegetales contra el estrés a los que denominó genes efectores (GE).

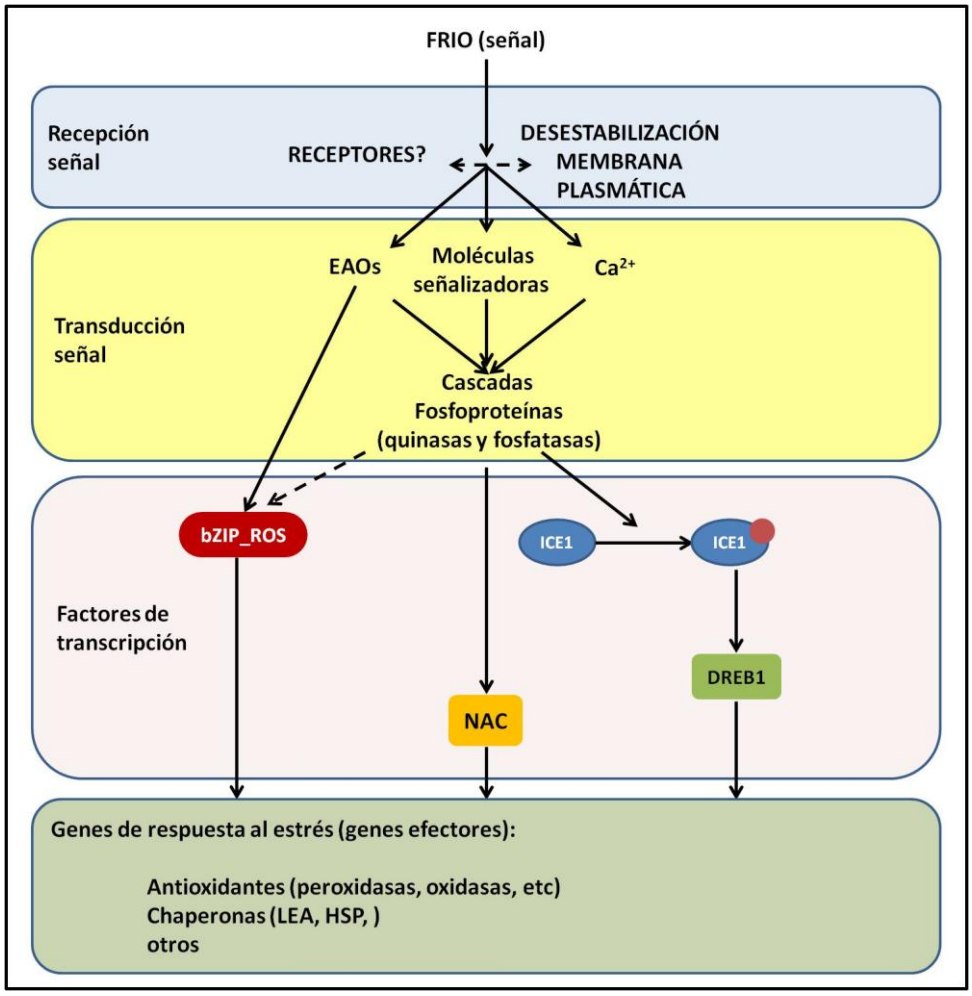


Figura 2.1. Modelo general de respuesta al estrés por bajas temperaturas.

La baja temperatura genera alteraciones físicas y cambios químicos en la membrana, tanto a nivel de lípidos como de proteínas, específicamente sobre los canales de calcio (Murata y Los, 1997; Plieth et al., 1999). Los cambios en los lípidos se han asociado al grado de tolerancia al frío en un gran número de especies vegetales (Somerville, 1995) y particularmente en etapas vegetativas tempranas del arroz (Pereira da Cruz et al., 2010). El calcio es uno de los principales mensajeros y actúa a través de mediadores proteicos como la calmodulina o las quinasas reguladas por calcio (Komatsu et al., 2001; Martin y Busconi, 2001; Yang et al., 2003). La fosforilación reversible de las proteínas es clave en los

procesos de señalización involucrando diversos grupos de quinasas y fosfatasas y actúa como modulador en la respuesta al estrés. Entre ellos las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) tienen un rol fundamental (Nakagami et al., 2005). Xiong y Yang (2003) demostraron como la cascada de MAPK a través de la expresión diferencial del gen OsMAPK5 juegan un rol importante en la respuesta al frío en arroz.

Además de los daños sobre las membrana, una de las primeras consecuencias de la baja temperatura es la formación de ERO con la consecuente generación de daño oxidativo. Algunas ERO, como el H_2O_2, pueden actuar como señalizadores del estrés a nivel intracelular e inducir la respuesta de la planta (Cheng et al., 2007).

Los FT son claves en la regulación de la expresión génica. Es bien conocido y ha sido extensamente revisado como el frío induce la expresión de FT de unión al ADN tipo AP2 conocidos como DREB1/CBF a través de la activación por Ca^{2+} de proteínas constitutivas ICE1 (inducer of CBF expression) (Liu et al., 1998; Shinozaki, 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Todaka et al., 2012).

Recientemente, en arroz han sido identificados otros regulones involucrados en la respuesta a las bajas temperaturas. Cheng et al. (2007) reportaron la existencia de un nuevo regulón inducido por frío y por H_2O_2. Estos autores identificaron un FT de la familia de Zip finger denominado *ROS-bZIP1* que induce la expresión de genes que contienen elementos as1/ocs-like. Este trabajo demostró que existe una correlación positiva entre la actividad del regulón del FT *ROS-bZIP1* y la tolerancia al frío de las variedades analizadas, existiendo diferencias a nivel de genotipos.

Los FT de la familia de NAC han sido normalmente relacionados con la respuesta a estrés a sequía (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos genes miembros de esta familia son inducidos por baja temperatura, como: *OsNAC6/SNAC2,* OsNAC5 (Takasaki et al., 2010) y *SNAC1* (Hu et al., 2006). El gen *OsNAC6/SNAC2* controla la expresión de genes que codifican, entre otros, para peroxidasas; enzimas claves en la defensa contra el daño oxidativo (Hu et al., 2008; Nakashima et al., 2007).

Además se han reportado otros FT, como el ZFP245 (Huang et al., 2009) que aumenta la actividad de enzimas antioxidantes y genes de la familia *WRKY* (Tao et al., 2011) o *Myb* (Park et al., 2010). La

sobre-expresión del gen *OsMyb3R-2* incrementó la tolerancia de arroz al frío mediante la regulación de genes involucrados en el ciclo celular y en la acumulación de prolina (Ma et al., 2009).

Dentro del segundo grupo de genes descritos por Tadaka et al. (2012), que se denominan GE porque codifican para proteínas cuya función específica es dar tolerancia al estrés, se han descrito enzimas detoxificadoras de ERO, proteínas anti-congelamiento, enzimas del metabolismo de ácidos grasos, ferritinas, inhibidores de proteasas, chaperonas, estabilizadores de membranas plasmáticas y proteínas, entre otros. Dentro de las proteínas que controlan la degradación proteica o plegamiento de las proteínas, se han descrito proteínas F-box, dehidrinas con funciones de chaperonas y HSP (Heat Shock Protein) (Lee et al., 2005; Jain et al., 2007; Sarkar et al., 2009). En lo que respecta a la estabilización de membrana plasmática, Morsy et al. (2005) describieron una proteína integral de membrana denominada Lti6a que conferiría tolerancia a las bajas temperaturas en arroz.

Las tecnologías de alta performance u ómicas han permitido tener una visión más general del conjunto de genes expresados en condiciones de bajas temperaturas en arroz, tanto en FT como en GE. Mediante el análisis de transcriptómica, confirmados mediante *northern blot*, Rabbani et al. (2003) determinaron la sobreexpresión de 73 genes luego de la exposición a estreses abióticos, de los cuales únicamente 9 se sobre-expresaron por baja temperatura. Por su parte, Lee et al. (2004) utilizaron técnicas de *T-DNA tagging* para la identificación de genes inducidos por frío en plántulas de arroz, validando así esta metodología.

Como fue mencionado anteriormente, Cheng et al. (2007) encontraron un regulón de respuesta temprana inducido tanto por frío como por H_2O_2 identificando 121 genes sobre-expresados durante las primeras 24 h de frío, dentro de los cuales encontraron 4 FT. Por su parte, Yun et al. (2010) identificaron 86 FT que se sobre-expresaron después del tratamiento de plántulas de arroz a 10 ºC.

1.2 GENÉTICA CUANTITATIVA DE LA RESPUESTA AL FRÍO EN PLÁNTULAS DE ARROZ

Estudios de genética clásica en plántulas de arroz evidenciaron que la respuesta a la baja temperatura presenta una alta heredabilidad. Estudiando el fenotipo de dos poblaciones de familias F3, generadas del cruzamiento de 'Chhomrong' (tolerante) x 'Makwanpur-1' (susceptible) y 'Raksali' (tolerante) x 'Makwanpur-1' (susceptible), Sthapit y Witcombe (1998) demostraron que la respuesta a frío medida como amarillamiento de las hojas (escala de 1-9) presenta una heredabilidad de 0.69 y 0.73

respectivamente para cada población. Otros estudios, concordantes con los anteriores, identificaron que la herencia de la tolerancia al frío en estadio de plántula está determinada por un bajo número de genes (Shahi y Khush, 1986; Li y Rutger 1980). Li y Rutger (1980) determinaron el crecimiento de plántulas (vigor) durante 14 días a 18 ºC en las generaciones F1 y F3 de nueve cruzamientos y reportaron que el crecimiento potencial de las plántulas en frío muestra dominancia completa y que está controlada por 4 ó 5 genes.

Estudios posteriores de genética cuantitativa clásica identificaron regiones cromosómicas responsables del fenotipo. La genética cuantitativa es una estrategia que permite diseccionar en partes pequeñas características complejas identificando QTL implicados en el fenotipo (Collard et al., 2005). En arroz se identificaron 12 QTLs asociados con la tolerancia a frío en etapas vegetativas (Han et al., 2004; Zhang Z.H. et al., 2005; Han et. al., 2007, Andaya y Tai, 2006; Andaya y Tai, 2007; Baruah et. al., 2009; Zhi-juan et. al., 2010) los cuales están reportados en la base de datos gramene (www.gramene.org). La tabla 2.1 muestra los principales QTLs mapeados, así como su posición y los marcadores asociados a los mismos.

En estos QTLs existen diferentes alelos de los genes responsables de la variación fenotípica que co-segregan en la región cromosómica del QTL y mediante mapeo fino es posible identificarlos. Este es el caso de los genes que codifican para la Glutationa-S-transferasa en el QTL qCTS12, identificados por Andaya y Tai (2007) como los responsables de otorgar tolerancia al frío al genotipo de arroz M202. Otros autores han planteado como metodología alternativa y menos laboriosa, la identificación previa de GC, búsqueda de marcadores en los mismos y búsqueda de asociación marcador-carácter. Tondelli et al. (2006) mapearon genes regulatorios candidatos para la tolerancia a estrés por frío y sequía en cebada, en diferentes poblaciones de mapeo. Estos autores demostraron la utilidad de las estrategias de genética cuantitativa para validar la funcionalidad de los genes previamente identificados, incluso para caracteres complejos como la respuesta a estreses ambientales.

Tabla 2.1. QTLs asociados con la tolerancia a frío en etapa de plántula.

ID QTL	Símbolo	Cr.	Mapa	Marcadores co-localizados	C. E.*1	Posición
AQDU006	qCTS1	1	M202/IR50 UCD QTL 2003*2	RM297, RM319	(3)	123.7-129.6 cM
AQDU007	qCTS3	3	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM200, RM85	(3)	161.5-170.5 cM
AQDU008	qCTS4-1	4	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM335, RM261	(2)	0-5.2 cM
AQDU001	qCTS4-2	4	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM255, RM348	(2)	91.6-102.9 cM
AQDU009	qCTS6-1	6	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM253, RM50	(3)	24.8-28.6 cM
AQDU002	qCTS6-2	6	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM3, RM325	(2)	49.2-50.1 cM
AQBO001	Cts	7	CNYU Naj11/Bal DH QTL 1999*3	G379, RG4	(1)	0-36.9 cM
AQDU010	qCTS8-1	8	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM284, RM230	(3)	1.5-23.2 cM
AQDU003	qCTS8-2a	8	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM223, RM284	(2)	0.1-1.5 cM
AQDU011	qCTS10	10	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM239, RM284	(3)	8.5-10.8 cM
AQDU004	qCTS11-1	11	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM20, RM4	(2)	0-0.6 cM
AQDU013	qCTS11-2	11	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM254, RM144	(2)	73-84.1 cM
AQDU005	qCTS12a	12	M202/IR50 UCD QTL 2003	RM101, RM292	(2)	36.7-40.5 cM

La información fue obtenida de la base de datos Gramene. *1C.E. Condiciones Experimentales. (1) Se midió el porcentaje de muerte de plántulas bajo frío para evaluar la tolerancia y para el análisis de QTL. (2) Para evaluar la tolerancia al frío y realizar el análisis de QTLs se utilizó la tolerancia al marchitamiento inducido por frío a partir de plántulas evaluadas a temperaturas constante de 9ºC día/noche durante 16 días. (3) La tolerancia al frío fue evaluada en plántulas crecidas a 15/9 ºC día/noche durante 14 días. La puntuación fue hecha utilizando el sistema de ranking visual estándar de evaluación propuesto por IRRI (International Rice Research Centre). *2 La población M202/IR50 UCD QTL 2003 es una población de RIL (del inglés Recombinant Inbred Line) de 191 líneas F5 derivadas del cruzamiento de la líena Japonica templada M-202 y la Indica tropical IR50. El mapa de ligamiento se construyó con 181 loci producidos por 175 microsatélites. *3 La población de mapeo consistió de 67 líneas doble haploides derivadas del cultivo de anteras del cruzamiento de una F1 de Nanjing 11 (Indica) x Balilla (Japonica). El mapa de ligamiento fue construído por 131 marcadores RFLP que cubren los 12 grupos de ligamiento con una distancia promerio de 14.1 cM.

La estrategia de polimorfismos en GC fue usada por Vinod et al. (2006) para identificar genes asociados a tolerancia a sequía en arroz. Estos autores identificaron 12 GC con polimorfismo en su secuencia en cultivares Indica y Japonica y los usaron para analizar una población de mapeo. Mediante análisis de marcadores único o single marker analysis (SMA) asociaron tres marcadores a la respuesta a sequía.

Los trabajos mencionados hasta el momento utilizaron como estrategia de identificación de QTL métodos clásicos a partir de diferentes tipos de poblaciones segregantes. Estas estrategias han sido extensamente revisadas por Mackay et al. (2009). Por otro lado, basados en estudios genéticos humanos, en donde no es posible analizar poblaciones por cruzamientos dirigidos, surgió una estrategia de identificación de QTLs denominada mapeo asociativo (MA) o mapeo por desequilibrio de ligamiento (LD) (Zhu et al., 2008). Esta estrategia no requiere de cruzamientos dirigidos y explora poblaciones diversas. A diferencia del mapeo de QTL, el MA se realiza sobre un grupo diverso de genotipos sin

requerir cruzamientos específicos y se basa en la identificación de una asociación entre un marcador molecular y un QTL, explotando la diversidad genética natural o la recombinación histórica, como las encontradas en las líneas de un programa de mejoramiento (Hartl y Clark, 1997). De esta forma, el MA es una metodología mejor adaptada a los programas de mejoramiento convencionales, ya que no requiere que los mejoradores realicen poblaciones de mapeo específicas y analiza la diversidad de los genotipos adaptados. El número de QTLs que se puede mapear para un fenotipo dado está limitado por el número real de QTLs para ese fenotipo y el grado de diversidad genética total que captura la población de mapeo (Zhu et al., 2008).

Existen dos estrategias para MA: 1) mapeo asociativo en todo el genoma o GWA (Genome Wide Association) y 2) mapeo asociativo de genes candidatos o CGAM (Candidate-gen Association Mapping). El GWA hace una búsqueda sistemática utilizando un gran número de marcadores dispersos en todo el genoma y el CGAM realiza una búsqueda de genes en base a información previa (estudios genéticos, bioquímicos y fisiológicos) y busca variaciones en los mismos (Zhu et al., 2008).

Hasta el momento existen varios antecedentes de GWA en diferentes especies vegetales, pero hay muy pocos antecedentes en arroz. Zhang M. et al. (2005) utilizando análisis de discriminante encontraron alelos marcadores asociados a diversas características agronómicas, como altura de la planta, tamaño de hoja y diversos componentes del rendimiento. Posteriormente, Agrama et al. (2007) lograron encontrar marcadores asociados a rendimiento y sus componentes, pero utilizando material de origen muy diverso y marcadores microsatélites anónimos que abarcaban una limitada extensión del genoma. Recientemente, Huang et al. (2010) identificaron 37 marcadores SNPs asociados a 12 caracteres agronómicos de interés y Zhao et al. (2011) buscaron asociación con 6 caracteres de interés (morfología de la planta, componentes del rendimiento, morfología de semillas y grano, estrés, calidad culinaria y desarrollo vegetal) identificando regiones cromosómicas que explican cada uno de ellos.

El CGAM tiene un uso menos extendido debido a la disponibilidad cada vez mayor de marcadores dispersos a lo largo de todo el genoma. Sin embargo, desde un punto de vista bioquímico adquieren relevancia ya que son capaces de asociar el marcador a una función biológica determinada y no son solamente asociaciones estadísticas. Esta estrategia ha sido mayormente utilizada cuando un fenotipo está determinado por características fisiológicas conocidas, como tiempo de floración en *Arabidopsis*

(Ehrenreich et al., 2009) o por vías bioquímicas simples como la síntesis de almidón en papa (Chen et al. 2001). Sin embargo, también el CGAM ha sido utilizado para características más complejas como calidad de malteado en cebada (Matthies et al., 2009) y acumulación de ácido clorigénico y maysina en maíz (Szalma et al., 2005).

Considerando estas evidencias respecto a la heredabilidad y el relativamente bajo número de genes involucrados en la respuesta al frío, el mapeo usando GC es una alternativa válida para identificar y validar marcadores para esta característica.

La selección del germoplasma es crucial para el análisis de asociación, la densidad requerida de marcadores y los métodos estadísticos a utilizar. Si bien se espera que la asociación estadística esté asociada con un ligamiento físico (i.e. que el marcador se encuentre cercano físicamente en el genoma al QTL asociado), éste no es la única causa de desequilibrio de ligamiento. El desequilibrio de ligamiento se puede generar debido a la estructura, selección, mezclas, y otras causas evolutivas (Jannink et al., 2001). Por lo tanto, la primera etapa en el MA por desequilibrio de ligamiento es la eliminación de las asociaciones espurias debidas a otras causas que no son ligamiento físico (i.e. debidas a estructura). Existe un gran número de métodos para identificar estructura en las poblaciones de mapeo. Los primeros estudios que contaban con pocos marcadores utilizaron un modelo genético asociado a inferencia bayesiana para determinar la estructura (STRUCTURE, Pritchard et al., 2000). Esta metodología fue actualizada para permitir la incorporación de un gran número de marcadores ligados (Falush et al., 2003). Posteriormente se incorporó la matriz de relacionamiento genético para determinar estructura utilizando modelos que permitieran separar alelos idénticos por estado de los idénticos por descendencia (Parisseaux y Bernardo, 2004). Esta matriz es conocida como matriz *Kinship* (del inglés, parentesco) la cual es obtenida de la información de marcadores moleculares. Yu et al. (2006) propusieron la inclusión de los dos componentes simultáneamente en el modelo (i.e. estructura y relacionamiento genético) consolidando un modelo unificado. La matriz de STRUCTURE fue posteriormente cuestionada y se propusieron otros métodos más simples para determinar estructura como son el análisis por componentes principales (Price et al., 2006) o por escalamiento multidimensional no-métrico (Zhu y Yu, 2009), que demostraron tener mayor poder de detección y menor tasa de falsos positivos (Zhao et al., 2007; Zhu y Yu, 2009).

1.3 MICROSATÉLITES GÉNICOS PARA BÚSQUEDA DE ASOCIACIÓN EN GENES CANDIDATOS

La genómica y la identificación masiva de genes ha permitido identificar microsatélites (SSR de Simple Sequence Repeat) dentro de los genes, tanto en regiones expresadas como lo son los EST (Expressed Sequence Tag) denominados EST-SSR o en secuencias génicas no necesariamente expresados. Ambos tipos de SSR son denominados como SSR génicos (SSRg). Estudios en bacterias y en humanos les han adjudicado a los SSRg funciones en la organización de la cromatina, regulación de la actividad génica, recombinación y replicación del ADN (Li et al., 2002). Por su parte, Li et al. (2004) plantean que la distribución de SSRs no es aleatoria y que pueden proveer una ventaja evolutiva para la adaptación rápida a nuevos ambientes. Los SSRg pueden estar localizados en regiones codificantes, en intrones o en regiones no traducidas o UTR (Untranslated Regions) 3'UTR y 5'UTR. Existen trabajos revisados por varios autores donde se demuestra que los SSR ubicados en regiones no traducidas pueden regular la expresión de los genes (Kashi et al., 1997; Li et al., 2002). Li et al. (2004) enumeran una serie de ejemplos donde se demuestra que: 1) los repetidos 5'UTR pueden ser requeridos para la expresión de ciertos genes o pueden influir en la expresión y traducción; 2) cambios en los repetidos en 3'UTR pueden llevar a un deslizamiento en la transcripción; 3) SSR en intrones afectan la transcripción, el correcto corte y empalme del ARNm y la exportación al citoplasma. Además, expansiones en SSR de cualquiera de estas tres regiones pueden conducir a silenciamiento génico o pérdida de función. Todos estos ejemplos están referidos a humanos y a bacterias y existen muy pocos antecedentes en plantas. Hasta el momento, solamente existe un trabajo en *Capsicum annuum* donde los autores reportan que la presencia de SSR en varios genes está relacionada con perfiles diferenciales de expresión entre diferentes tejidos y etapas del desarrollo (Ince et al., 2010). En arroz, si bien existen estudios sobre la asociación de alelos de SSRg con ciertas características fenotípicas, como es el caso del gen *waxy* (Ayres et al., 1997; Bao et al., 2002), aún no se han realizado análisis vinculando la presencia de un SSRg con la expresión del gen en cuestión. Igualmente, la existencia de polimorfismos que generen secuencias "sin sentido", deleciones, cambios en la secuencia de amino ácidos o cambios en los niveles de expresión, hace que la posibilidad de que el gen con SSRg sea responsable del fenotipo, sea mayor (Borevitz y Chory, 2004). En cereales (arroz, trigo, cebada y otros) entre 1.5% y 7.5% de los ESTs incluyen SSR (Kantety et al., 2002; Thiel et al., 2003). Estos ESTs tienen un rango de funciones que

incluye enzimas metabólicas, proteínas estructurales y de almacenamiento y FT, lo que indica la posibilidad de asociar variantes alélicas con características funcionales.

La identificación de SSR y sobre todo, el análisis de su polimorfismo en genotipos con fenotipos contrastantes para la tolerancia a baja temperatura, puede ser clave en la identificación de las funciones de los genes al cual pertenecen y en el desarrollo de marcadores genómicos, asociados a una función, que puedan ser aplicados en programas de mejoramiento para selección asistida (Varshney et al., 2005). En la revisión de Varshney et al. (2005) se citan los estudios de asociación realizados en diferentes especies vegetales, incluyendo el arroz, donde su utilizaron microsatélites génicos como marcadores moleculares.

2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA

El objetivo fue identificar GC y marcadores moleculares del tipo SSRg asociados a la respuesta a frío en etapas vegetativas tempranas en germoplasma de arroz uruguayo. Esta estrategia se utilizó debido a la alta heredabilidad y la relativa baja complejidad en el número de genes implicados en la respuesta al frío en etapas vegetativas en arroz.

Para la identificación de GC se realizó una búsqueda in silico en bases de datos públicas de ESTs y una revisión de la bibliografía en artículos publicados. Se usaron herramientas bioinformáticas para identificar SSRg. Para la búsqueda de asociación se estudió una población diversa de genotipos pertenecientes a la población elite del programa de mejoramiento de arroz de INIA y en una población segregante F2:3 generada por cruzamiento de una línea de arroz susceptible y una línea de arroz tolerante al frío. Se optó por una población F2:3 por no contar con una población segregante homocigota (como RIL – del inglés, Recombinant Inbreed Lines) y por existir trabajos previos que reportan la utilidad de este tipo de poblaciones (Zhang y Xu, 2004). Se utilizaron técnicas de fenotipado que permitieron un análisis masivo de la población como lo son: evaluación de la fotoinhibición por emisión de fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm), evaluación del amarillamiento mediante RV (sólo se utilizó en la población elite) y evaluación de la integridad de membranas por cuantificación de PE.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

El material vegetal fue obtenido del banco de semillas del programa de mejoramiento de arroz de INIA. Para los estudios de mapeo por asociación se analizaron 131 genotipos correspondientes al material elite del programa de mejoramiento de INIA del año 2009, 72 genotipos de la ssp. Indica y 59 de la ssp.o Japonica. De los 72 genotipos Indica, 30 provienen del programa de mejoramiento de INIA y 42 del programa de mejoramiento de FLAR. Las semillas fueron germinadas y crecidas en almacigueras en cámara de crecimiento con 90% de HR bajo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La irradiancia en la superficie de las hojas fue de 300 µmol photons $m^{2}\cdot s^{-1}$. Las plántulas se crecieron a 28 ºC hasta que promedialmente alcanzaron el estado de crecimiento V3 (Counce et al., 2000), cuando se colectaron las hojas para extracción de ADN o se sometieron a fenotipado según se describe posteriormente.

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Una muestra de 200 mg de tejido vegetal verde fresco se pulverizó en nitrógeno líquido en morteros previamente enfriados. Luego se colocaron en tubos de 2 mL y se le agregó 700 µL de tampón de extracción CTAB 1.5 %. Se incubaron a 65 °C durante 20 min, mezclando periódicamente. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezclaron por inversión 5 veces y se centrifugó a 13000 x *g* por 20 min. Luego de centrifugado se tomó la fase acuosa y se colocó en otro tubo y se agregó 0,7 volúmenes de isopropanol frío. Se mezcló por inversión, se dejó a 4 °C durante 2 h y se centrifugó a 6000 x *g* durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70 %. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 100 µl de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) o agua ultrapura. Se verificó la integridad del ADN en electroforesis en gel de agarosa 1 % y se cuantificó por comparación con ADN de cantidad conocida. EL ADN se diluyó a 50 ng μl^{-1}.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE gSSR EN GENES CANDIDATOS

En la Figura 2.2 se muestra la estrategia bioinformática seguida para la selección y la caracterización funcional de genes asociados a la tolerancia a las bajas temperaturas.

Los ESTs obtenidos por búsqueda de palabras clave, “cold”, “chilling” y “low temperature”, en la base de datos del NCBI fueron ensamblados usando el programa CAP3 disponible públicamente (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=cap3). Se generó una base de datos a partir de la anotación vía BLAST contra una base de datos local de CDS de plantas. Esta base de datos fue analizada utilizando la herramienta BIOPARSER (Catanho et al. 2006) donde nuevamente se utilizaron las palabras claves “cold”, “chilling” y “low temperature” para la selección de secuencias.

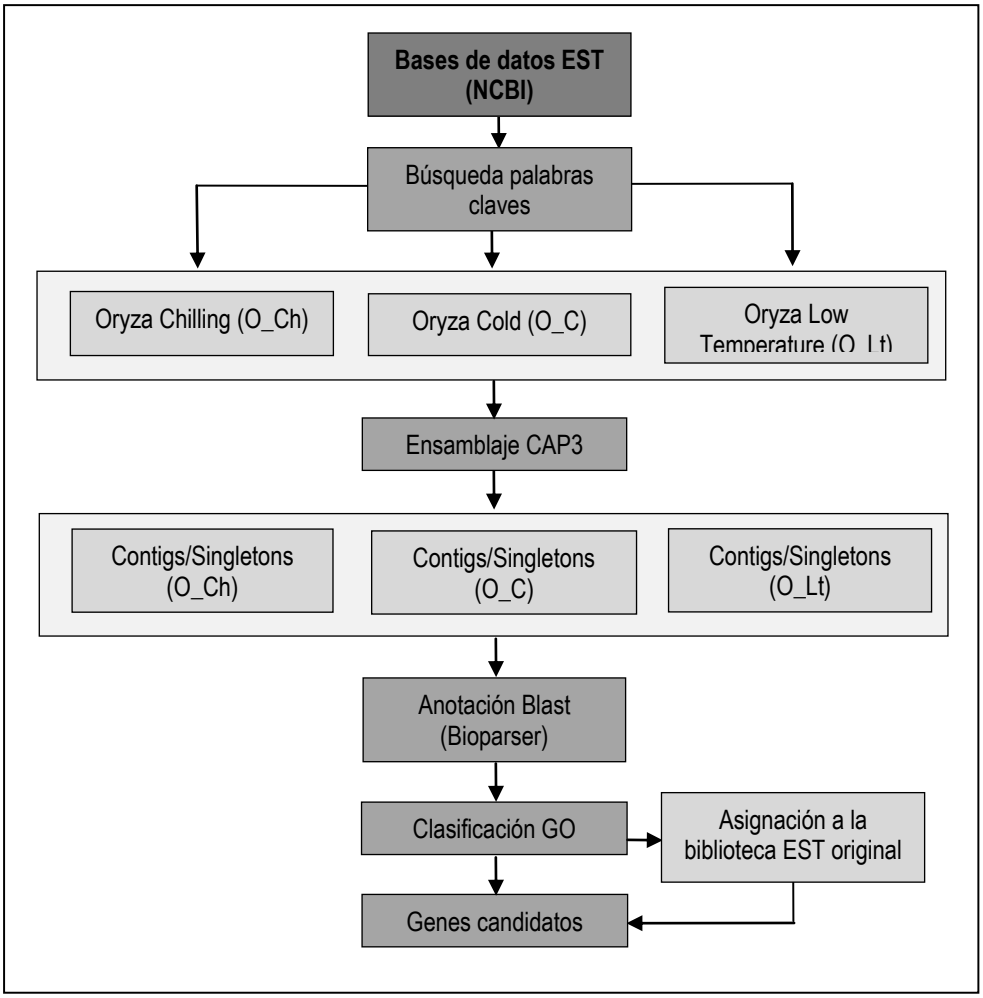


Figura 2.2. Flujo de trabajo *in silico* para la identificación de genes candidatos asociados al frío en arroz.

La identificación de SSR en la secuencia de genes candidatos se realizó utilizando el programa SSRIT (Temnykh et al., 2001) implementado en Gramene (www.gramene.org). Los SSR fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: para repetidos dinucleótidos y trinucléotidos la

longitud mínima aceptada fue de 18 pb y para tetranucleótidos fue de 16 pb. El diseño de cebadores para cada SSR fue obtenido de la base de datos de Gramene.

Sobre las secuencias seleccionadas se hizo una validación vía BLAST sobre la base de datos GenBank obteniéndose en todos los casos homologías con secuencias hipotéticas del genoma de arroz. A continuación se analizó la ontología de las secuencias seleccionadas mediante el Gene Ontology (http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi) y se les asignó un rol celular y/o metabólico. Estas secuencias se mapearon sobre la base de datos original vía BLAST de modo de encontrar los EST que le dieron origen a los *contigs* y determinar sobre qué biblioteca de expresión y bajo qué condiciones experimentales habían surgido y así determinar si un *contig* estaba formado por EST originarios de diferentes bibliotecas bajo diferentes condiciones.

3.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR Y VISUALIZACIÓN DE FRAGMENTOS

La amplificación de SSR se realizó en todos los casos con los cebadores específicos para cada SSR y un cebador M13 marcado con fluorocromos para detección en secuenciador. El cebador izquierdo (forward) específico presentaba una secuencia complementaria al cebador M13 (Schuelke, 2000). La mezcla para la reacción de PCR contenía buffer de reacción 1 X, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.12 mM dNTP, 0.22 µM del cebador M13, 0.22 µM del cebador derecho (reverse), 0.056 µM del cebador izquierdo, taq polimerasa 0.32 U y 50 ng ADN. Los ciclos definidos fueron: 94 ºC 3 min, 10 ciclos de touchdown 94 ºC 1 min, 65 ºC 1 min, 72 ºC 1 min, 32 ciclos de 94 ºC 1 min, 55 ºC 1min, 72 ºC 2 min y un ciclo de 72 ºC 10 min.

Los fragmentos fueron separados usando electroforesis capilar con un analizador Applied Biosystems 3730xl. Los datos fueron analizados con el programa PickScan (PE Applied Biosystem, Foster City, CA).

3.5 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN

Los datos descriptivos de los marcadores utilizados (PIC, número de alelos) y el Análisis de varianza molecular (AMOVA) para estudios de diversidad de la población, fueron realizados utilizando el programa estadístico Info-Gen (Balzarini et al., 2004).

Para poder visualizar la estructura de la población se generó un cladograma implementado en Tassel (Bradbury et al., 2007) utilizando el método de agrupamiento UPGMA.

Para la determinación de la estructura poblacional se utilizó el programa Structure versión 2.3.3. Se corrieron los datos utilizando 100000 de quemado y 100000 MCMC. Este procedimiento se hizo para K=1 a K=10. Una vez determinado el número de sub-poblaciones se corrió nuevamente con un quemado de 1000000 y MCMC de 1000000.

3.6 FENOTIPADO 1. DAÑO SOBRE FOTOSISTEMAS II: FV/FM

Se cuantificó la emisión de fluorescencia de la clorofila a en hojas completamente expandidas de plantas sujetas a 48 h de tratamiento con frío (10 ºC). La medidas de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro FMSI Hansatech fluorometer (King's Lynn Instrument Ltd., King's Lynn, UK). Las hojas fueron pre-oscurecidas durante 30 min antes del experimento. Los datos fueron tomados durante 0.8 s de exposición a 8000 µmol fotones $m^{-2}s^{-1}$ de luz actínica. Fv/Fm fue calculado directamente por el fluorímetro (Verhoeven et al., 1997).

Para el estudio de asociación, éste parámetro se determinó en los 131 genotipos haciendo 2 repeticiones, en un experimento de 3 bloques completos al azar. Para el SMA en la población F2:3 se sembraron 171 genotipos en las mismas condiciones y con el mismo diseño experimental. En este caso cada repetición es un individuo diferente de cada familia F3.

3.7 FENOTIPADO 2. DAÑO DE MEMBRANA PLASMÁTICA: PÉRDIDA DE ELECTROLITOS

Se colectaron dos hojas por planta, de plantas sujetas a 48 h de tratamiento de frío (10 ºC). Las hojas fueron inmersas en 20 mL de agua destilada en tubos de ensayo durante 2 h a 25 ºC con agitación constante (ponerla). La conductividad del agua fue medida inmediatamente antes de colocadas las hojas en el tubo y luego de las 2 h de agitación. Seguidamente los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 30 min, se dejaron enfriar hasta 25 ºC y se cuantificó la conductividad nuevamente. Las medidas de conductividad se realizaron con un conductímetro modelo DDS-IIA (Shanghai Leici Instrument Inc., Shanghai, China). La pérdida relativa de electrolitos fue estimada como la relación de conductividad antes y después del hervido (Huang y Guo, 2005).

Para el estudio de asociación éste parámetro se determinó en los 131 genotipos haciendo 3 repeticiones en un experimento de 3 bloques completos al azar. Para el mapeo de QTL en la población F2:3 se sembraron 171 genotipos en las mismas condiciones y con el mismo diseño experimental. En este caso cada repetición es un individuo diferente de cada familia F3.

3.8 FENOTIPADO 3. APRECIACIÓN VISUAL DEL DAÑO: RANKING VISUAL

Este ensayo fue realizado en las instalaciones del FLAR localizado en el CIAT (Centro Internacional de Agricultura tropical) en Cali-Colombia. Se hizo de acuerdo a los procedimientos ajustados y utilizados rutinariamente por los mejoradores del FLAR.

Para el estudio de asociación se realizó la siembra de los 131 genotipos en bandejas con suelo traído del campo. Cada bandeja estaba formada por 20 surcos con 17 plantas en cada uno. En cada bandeja se colocó un testigo tolerante Quilla 64117 y un testigo susceptible Oryzica 1. A los 21 días después de siembra, las plántulas se sometieron a 5 °C durante 32 h en una cámara sin luz. Al finalizar el período de frío, se retiraron y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se evaluó el daño foliar mediante una escala visual con valores de 1 a 9 (Tabla 2.2) de acuerdo al método desarrollado por IRRI (Han y Zhang, 2004).

Para el estudio de asociación éste parámetro se determinó en los 131 genotipos haciendo 2 repeticiones en un experimento de 3 bloques completos al azar. Para el SMA en la población F2:3 se sembraron 171 genotipos en las mismas condiciones y con el mismo diseño experimental. En este caso cada repetición es un individuo diferente de cada familia F3.

Tabla 2.2. Escala visual de daño o Ranking visual (RV) para evaluación de tolerancia al frío en estado de plántula.

Fenotipo	Ranking Visual	% Daño
Tolerante	1	0
	3	1-30
Intermedio	5	31-50
Susceptible	7	51-70
	9	70

3.9 BÚSQUEDA DE ASOCIACIÓN MARCADOR-FENOTIPO

Para evaluar el efecto de la estructura de la población elite del programa de mejoramiento en la asociación con los marcadores utilizados se compararon 4 modelos estadísticos:

1) Modelo näive:

$$y_{Nävie} = X\beta + e$$

Este es un modelo de efectos fijos donde sólo se considera la información de marcadores expresados como *Xβ*. No se considera estructura alguna.

2) Modelo fijo (Pritchard et al., 2000):

$$y_{Fijo} = X\beta + Qv + e$$

Este modelo tiene dos componentes: por un lado el efecto de los marcadores (X) y por otro el componente asociado a la estructura poblacional (Q), ambos tratados como efectos fijos. En este estudio se consideraron 2 posibles estructuras poblacionales (Q): la subespecie (S) Indica o Japonica, la subespecie y el programa de mejoramiento de origen (SPM).

3) Modelo kinship (Yu et al., 2006):

$$y_{Kinship} = X\beta + \underline{Ku} + e$$

En este modelo se consideran los marcadores como efectos fijos y la matriz de "kinship", como efecto aleatorio (K).

4) Modelo Yu (Yu et al., 2006)::

$$y_{Yu} = X\beta + Qv + \underline{Ku} + e$$

Este modelo considera toma considera los efectos de coancestría de la matriz Kinship (K) como efecto aleatorio y los efectos fijos relacionados con la estructura de la población (Q).

Los modelos fueron implementados en TASSEL 2.1 para la búsqueda de asociación marcador-carácter (Bradbury et al., 2007). Se corrieron por separado para cada fenotipo. La matriz K se obtuvo de TASSEL 2.1.

Para los modelos donde no se consideró la coancestría se usó el modelo GLM (General Linear Model) y cuando se consideró coansestría se uso el modelo MLM *(Mixed Model Method)* con 10^4 permutaciones en TASSEL, versión 2.1 (Yu et al., 2006; Bradbury et al., 2007). Para el modelo GLM el valor p considerado para la asociación fue el valor perm_p el cual controla la probabilidad de falsos positivos (según descrito en TASSEL versión 2.1) y para el MLM el valor p-marker dado por el programa ya que de acuerdo al manual de TASSEL este valor esta corregido por probabilidad de falsos positivos. Para el diagnóstico de los residuales, en el caso de GLM se obtuvieron corriendo los modelos lineales generalizados en R versión 2.15.0 (2012 The R Foundation for Statistical Computing) como utilizando la función glm del paquete base de R. En el caso de los modelos corridos en MLM los residuales fueron obtenidos en TASSEL 2.1. El test de normalidad Shapiro-Wilk (SW) se realizó en el programa Infostat (Infostat, 2004). En el caso de que los residuales no cumplieran con los supuestos de normalidad, se utilizaron las funciones raíz cuadrada y logaritmo para transformar la variable medida.

3.10 ANÁLISIS DE QTL EN POBLACIÓN F2:3

3.10.1 Construcción de la población de mapeo y evaluación de la tolerancia a frío en plántulas

La población híbrida F1 fue generada por cruzamiento entre la variedad Indica El Paso 144 y la línea Japonica L2825CA en 2010. En el año 2011 se generó una población F2 de 171 individuos y su descendencia (familias F3) fueron obtenidas en 2012. Todas fueron realizadas en la Estación Experimental del Este de INIA, Treinta y Tres, Uruguay. En la etapa de macollaje de las plantas F2 fue extraído ADN genómico total.

Las 171 familias F3 fueron evaluadas por su respuesta al frío cuantificando los parámetros Fv/Fm y PE de acuerdo a lo descrito en las secciones 2.6 y 2.7 de éste capítulo. El diseño experimental fue de bloques completos al azar con dos repeticiones.

3.10.2 Extracción de ADN genómico, detección de los marcadores SSR y análisis de QTL

Se extrajo ADN genómico de las 171 plantas F2 como se describe en la sección 2.2. Los SSR seleccionados fueron amplificados y los fragmentos fueron visualizados como se describe en 2.4.

Las medias ajustadas de los fenotipos para cada genotipo se obtuvieron mediante el ajuste de un modelo lineal mixto utilizando el paquete R/lme4 (Bates et al., 2011) en R versión 2.15.0 (2012 The R Foundation for Statistical Computing)

El mapa genético (grupos de ligamiento) se hizo usando el paquete R/onemap (García et al., 2006) y el SMA realizó utilizando el paquete de R/qtl desarrollado por Broman et al. (2008).

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS POR REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las referencias bibliográficas analizadas fueron: Hahn y Walbot (1989), Aguan et al. (1991), Binh y Oono (1992), De los Reyes et al. (2003), Rabbani et al. (2003), Yang et al. (2003), Hur et al. (2004), Lee et al. (2004), Vannini et al. (2004), Lee et al. (2005), Morsy et al. (2005), Oh et al. (2005); Akiyama y Jin (2006), Ito et al. (2006), Vij y Tyagi (2006), Andaya y Tai (2006), Andaya y Tai (2007), Cheng et al. (2007), Jain et al. (2007), Mukhopadhyay et al. (2004) y Yun et al. (2010).

De estos trabajos se seleccionaros aquellos GC que cumplieran con uno o más de los siguientes criterios: (1) que hayan sido reportados en más de un trabajo; (2) que se hayan encontrado diferencias significativas de expresión; (3) que estén involucrados en procesos regulatorios generales, en particular FT y (4) que estén localizados en QTL asociados a la tolerancia al frío. En el caso de los FT identificados por Yun et al. (2010) se seleccionaron aquellos que presentaron mayor nivel de expresión. Siguiendo estos criterios se identificaron 214 GC. En la tabla 2.3 se muestra el número de GC encontrados, su función y las referencias correspondientes.

Tabla 2.3 Genes identificados por revisión bibliográfica

Función de los genes	Nº genes	Referencias
Protección celular		
Dehidrinas	3	(1) (10) (12) (8) (7)
LEA	1	(12)
Estabilización membrana plasmática	2	(6) (11)
Heat shock proteina	1	(12)
Señalización		
Proteína fosfatasas	3	(4) (12)
Proteínas 14-3-3	1	(6)
Proteínas de respuesta al estrés	2	(6)
Proteínas F-box	3	(9)
Receptores	1	(10)
SAP	3	(14)
Estrés oxidativo		
Glutatión transferasas	14	(2) (3) (4) (15)
Peroxidasa	12	(15)
Tioredoxinas	8	(15)
Glutaredoxina	6	(15)
Superoxido dismutasa	2	(15)
Catalasa	1	(6)
Oxidasas/Oxidoreductasa/carboxilasas	8	(15)
Ferritina	1	(5) (15)
Factores de Transcripción (familias)		
FT	11	(1) (5) (6) (13) (15)
AP2	24	(5) (15)
bZIP	11	(5) (15)
HLH	30	(5) (15)
MYB	33	(5) (15)
NAC	20	(15)
WRKY	13	(15)
Total	214	

(1) Aguan et al. (1991); (2) Andaya y Tai, (2006); (3) Andaya y Tai, 2007; (4) Binh y Oono,1992; (5) Cheng et al. 2007; (6) De los Reyes et al. 2003; (7) Hahn y Walbot, 1989; (8) Ito et al. 2006; (9) Jain et al. 2007; (10) Lee et al. 2004; (11) Morsy et al. 2005; (12) Oh et al 2005; (13) Rabbani et al. 2003; (14) Vij y Tyagi. 2006; (15) Yun et al. 2010.

4.2 IDENTIFICACIÓN IN SILICO DE GENES CANDIDATOS

La búsqueda bioinformática en bases de datos públicos de ESTs, permitió identificar genes en *O. sativa* expresados bajo condiciones de baja temperatura en estado vegetativo e identificar genes en otras especies que puedan estar involucrados en la tolerancia a la baja temperatura, y mediante genómica comparativa identificarlos en arroz.

En la Tabla 2.4 se resumen los resultados obtenidos del análisis *in silico*, cómo el número total de ESTs y los *contigs* y *singletons* resultantes del ensamblaje.

Tabla 2.4 Análisis in silico de genes asociados a respuesta a frío en arroz.

Palabras claves	ESTs Japonica	ESTs Indica	Contigs Japonica	Singletons Japonica	Contigs indica	Singletons indica
"oryza" AND "cold"	12021	5	1772	4273	0	5
"oryza" AND "Chilling"	3301	144	633	198	16	103
"oryza" AND "low temperatura	369	2	62	63	0	2

Luego de filtrar por repeticiones (ya que existían *contigs* o *singletons* que originariamente o en la búsqueda con Bioparser aparecieron con más de una de las palabras claves utilizadas) se obtuvieron 57 secuencias candidatas (35 *contigs* y 22 *singletons*) con su respectiva actividad/función putativa. El mapeo vía BLAST sobre la base de datos original de estas secuencias confirmó que eran todas originarias de bibliotecas de expresión en arroz y que la mayoría de los *contigs* estaban formados por ESTs procedentes de diferentes bibliotecas (no se muestran los datos). El hecho de que un *contig* esté formado por ESTs procedentes de diferentes bibliotecas es una evidencia fuerte del rol del gen en la respuesta a frío.

El análisis de ontología permitió asignarle un rol celular y/o metabólico. De estas secuencias, el 28 % estaba directamente relacionado a estrés abiótico por GO y el restante 72 % a otros procesos celulares (Figura 2.3A). Dentro de los procesos celulares que el GO no reconoce como vinculados a estrés abiótico directamente, fue posible adjudicarles un rol de respuesta a estrés a partir de información previa. Este es el caso de genes relacionados al estrés oxidativo, síntesis de prolina y poliaminas, integridad de membrana y algunos FT y procesamiento de proteínas. De esta forma se obtuvo que el 40 % de los genes estaban vinculados a estrés abiótico, lo que corresponde a 23 genes (Figura 2.3B).

Solamente 7 de las 57 secuencias encontradas habían sido reportadas en la bibliografía estudiada. Estos genes son: LOC_Os02g44870 (dehidrina), LOC_Os02g02400 (catalasa), LOC_Os07g44180 (Lti6a), LOC_Os05g04700 (lti6b), LOC_Os03g55850 (cold acclimation protein WCOR413), LOC_Os03g23010 (proteína de unión a poli-A) y LOC_Os01g70310 (HLH FT). Exceptuando los genes LOC_Os07g44180, LOC_Os05g04700, LOC_Os03g23010, en el resto se re-confirma su implicancia en la

respuesta al frío al haber encontrado similitud con genes expresados en otras especies vegetales frente al mismo estrés.

Dos singletons provenientes de diferentes bibliotecas de ESTs, homólogos al gen *LOC_Os03g22120*, presentaron similitud con genes codificantes para sacarosa sintasa en *Cucumis sativus* y *Deschampsia antárctica*. En ambos casos el gen había sido inducido por baja temperatura.

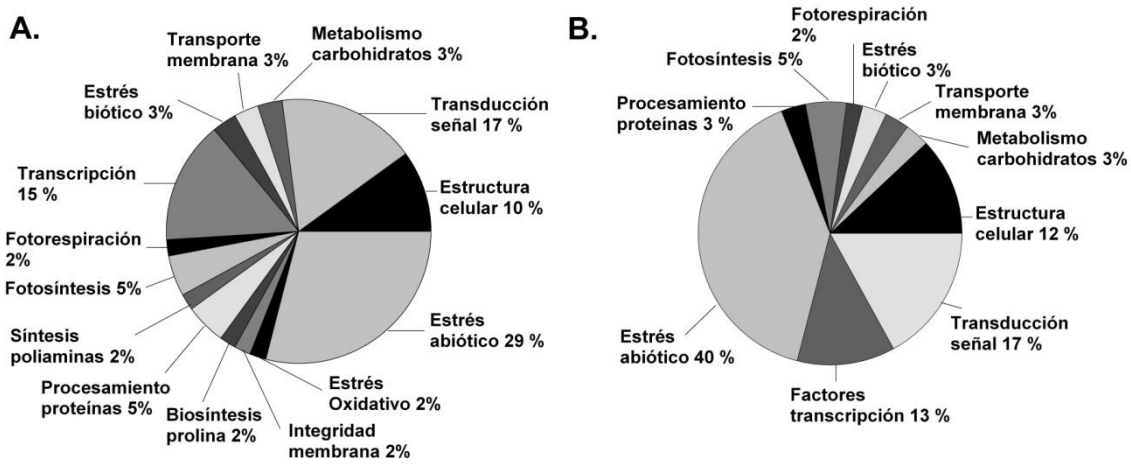


Figura 2.3. Distribución de los genes candidatos identificados *in silico* por su función. A. Clasificación de genes obtenidos por análisis bioinformático de acuerdo a GO. **B** Clasificación de genes obtenidos por análisis bioinformático de acuerdo a GO y función asignada por revisión y anotación vía Blast.

4.3 SSR EN GENES CANDIDATOS PARA TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ

Una vez identificados los GC se procedió a la búsqueda de SSRg dentro de los mismos. La búsqueda de SSR se realizó sobre los 214 GC seleccionados mediante revisión de la literatura y los 57 GC identificados mediante anotación *in silico* utilizando el sitio gramene (www.gramene.org). De los 57 genes identificados *in silico*, 5 contenían SSR en la secuencia y de los 214 obtenidos de búsqueda bibliográfica solamente 31 contenían SSR. Los 36 SSRg fueron seleccionados para genotipar y realizar estudios de asociación marcador-fenotipo en la población del programa de mejoramiento.

Una vez identificados los SSRg éstos se clasificaron de acuerdo a Todaka et al. (2012) en: (1) GE que tienen un efecto directo y más fácilmente cuantificable sobre el fenotipo (Tabla 2.5) y 2) FT debido a

que su expresión regula coordinadamente un conjunto de genes y por ende tienen un mayor efecto sobre el fenotipo (Tabla 2.6).

Tabla 2.5. SSR en genes candidatos con rol adaptativo

Función*1	Gen ID*2	gSSR	Repetido SSR	Posición en el gen
Low-temperature induced 6a	LOC_Os07g44180	RM22034	(ATTA)5	3´UTR
Phosphatase 2C	LOC_Os01g40094	RM11239	(TG)15	intrón
Gluthation peroxidase	LOC_Os03g24380	RM14978	(TC)10	intrón
Auxin induced protein	LOC_Os01g13030	RM6651	(GTG)8	intrón
Ferritin	LOC_Os11g01530	RM1761	(AT)16	intrón
Early-response to dehydration-like	LOC_Os03g23010	RM14960	(CGA)7	exón
Alternative oxidase	LOC_Os04g51150	RM17440	(CGC)8	exón
Heat-shock protein 70	LOC_Os11g47760	RM144	(ATT)7	intrón
Low temperature viability protein	LOC_Os03g25620	RM15041	(GCC)7	5´UTR
AMP binding protein	LOC_Os02g32490	RM13335	(GT)10	intrón

*1 La función se describe de acuerdo a la anotación dada en el MSU Rice Genome Annotation Project *2 ID del MSU Rice Genome Annotation Project. El cromosoma donde se ubica el gen está indicado en el ID previo a la letra g.

Tabla 2.6. SSR en factores de transcripción identificados como genes candidatos

Familia FT	Gen ID*2	gSSR	Repetido SSR	Posición en el gen
WRKY	LOC_Os01g14440	RM6516	(CCG)8	exón
WRKY	LOC_Os02g53100	RM8016	(AT)22	intrón
WRKY	LOC_Os05g04640	RM17863	(TA)11	intrón
WRKY	LOC_Os05g50610	RM19165	(CTG)7	exón
HLH	LOC_Os01g11910	RM10381	(CCG)10	intrón
HLH	LOC_Os02g12820	RM12729	(AT)33	exón
HLH	LOC_Os03g53020	RM15892	(AAG)7	5´UTR
HLH	LOC_Os03g59670	RM16111	(CCG)8	exón
HLH	LOC_Os03g51580	RM15841	(GCG)7	exón
HLH	LOC_Os08g38080	RM5353	(TC)13	exón
NAC	LOC_Os01g60020	RM6547	(GCA)9	5´UTR
NAC	LOC_Os01g66490	RM11987	(GGA)7	exón
NAC	LOC_Os12g41680	RM28690	(CT)17	intrón
NAC	LOC_Os11g05614	RM26081	(TCA)7	3´UTR
ROS_bZIP1	LOC_Os08g43090	RM23550	(TA)35	3´UTR
bZIP	LOC_Os12g06520	RM27564	(GGA)7	exón
bZIP	LOC_Os08g38020	RM23346	(GTG)7	exón
bZIP	LOC_Os02g03960	RM12403	(GGC)8	exón
bZIP	LOC_Os05g37170	RM18776	(GA)13	3´UTR
AP2/ERF	LOC_Os05g28350	RM18462	(CCG)7	exón
AP2/ERF	LOC_Os06g11860	RM19630	(GCC)7	exón
AP2/ERF	LOC_Os04g44670	RM17273	(CCG)7	5´UTR
AP2/ERF	LOC_Os01g04750	RM10114	(GAG)7	exón
AP2/ERF	LOC_Os03g08500	RM14490	(CGG)7	exón
MYB	LOC_Os04g40420	RM17139	(AT)13	Intrón
MYB	LOC_Os09g36730	RM215	(AG)16	3´UTR

*1De acuerdo a la anotación dada en MSU Rice Genome Annotation Project *2 ID del MSU Rice Genome Annotation Project. El cromosoma donde se ubica el gen está indicado en el ID previo a la letra g.

4.4 GENOTIPADO, DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN ELITE DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE ARROZ

Los 131 genotipos de arroz de la población elite del programa de mejoramiento de INIA fueron genotipados con los 38 marcadores seleccionados. De estos solamente 14 fueron polimórficos, 16 fueron monomórficos y 6 no amplificaron. Los 14 SSR polimórficos permitieron detectar 74 alelos en toda la población con un promedio de alelos por locus de 5.3 en un rango de 2 a 12.

En la Figura 2.4 se visualiza la localización de los genes de los SSRg polimórficos y en la Figura 2.5 la localización genética en los mapas reportados de los SSR en los cromosomas. De acuerdo a lo esperado, solamente 2 SSR localizados en exones fueron polimórficos (RM14960 y RM10114) y los demás SSR en regiones expresadas fueron monomórficos.

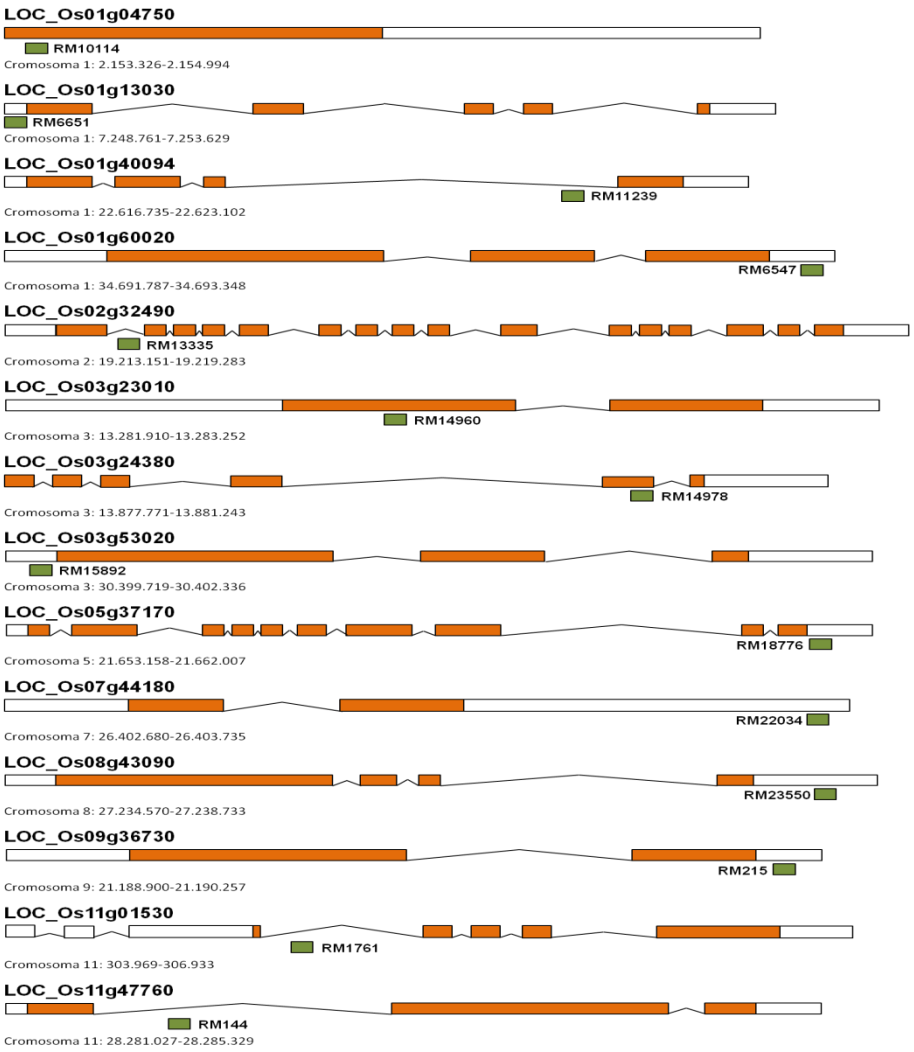


Figura 2.4. Localización de SSRg que fueron polimórficos para la población en estudio en los GC. Se indica el cromosoma y posición física del gen en el genoma y localización aproximada de los SSRg en el gen. La ubicación se realizó a través de la anotación en el genoma de Oryza sativa japonica Nipponbare versión 71.6 (MSU6).

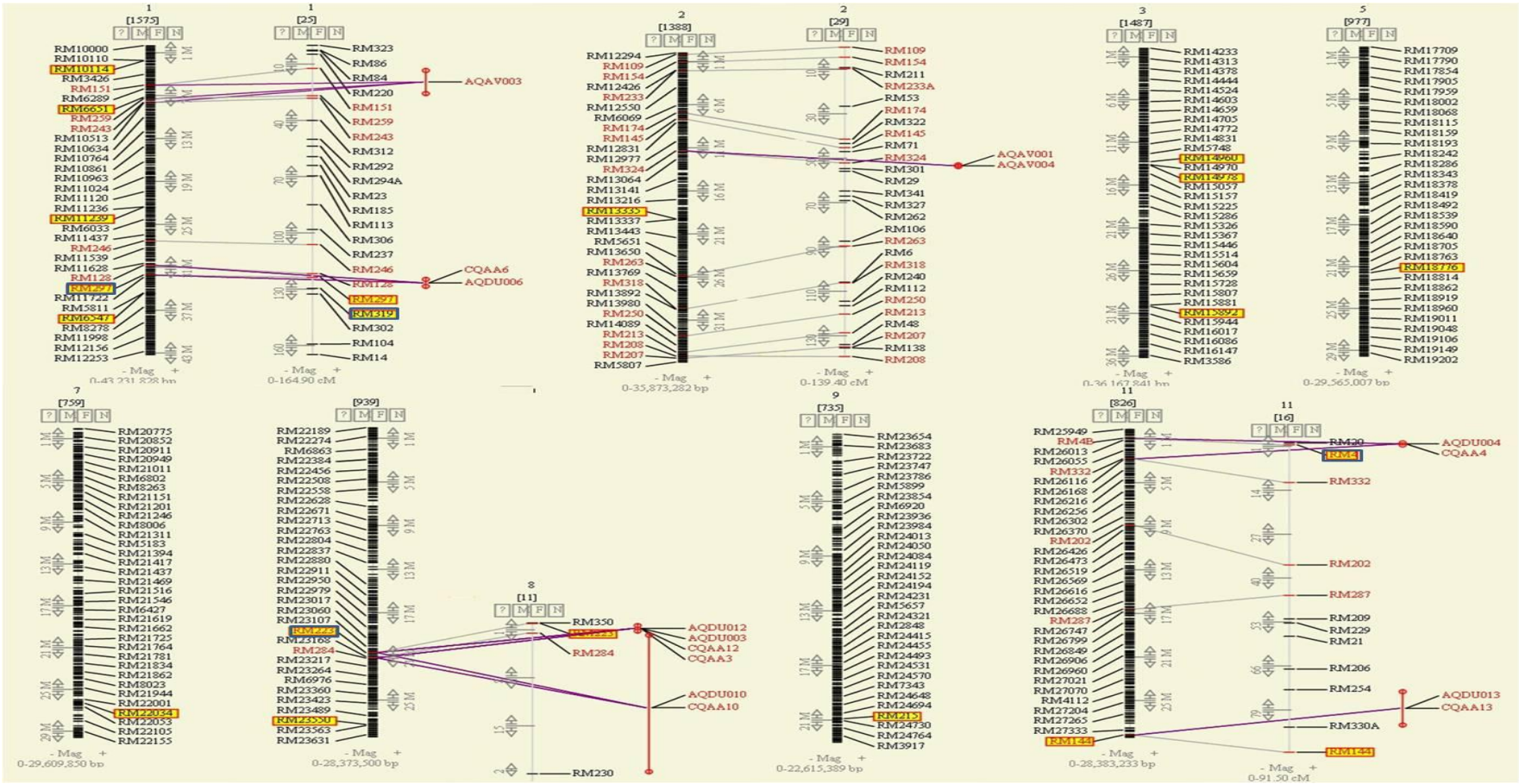


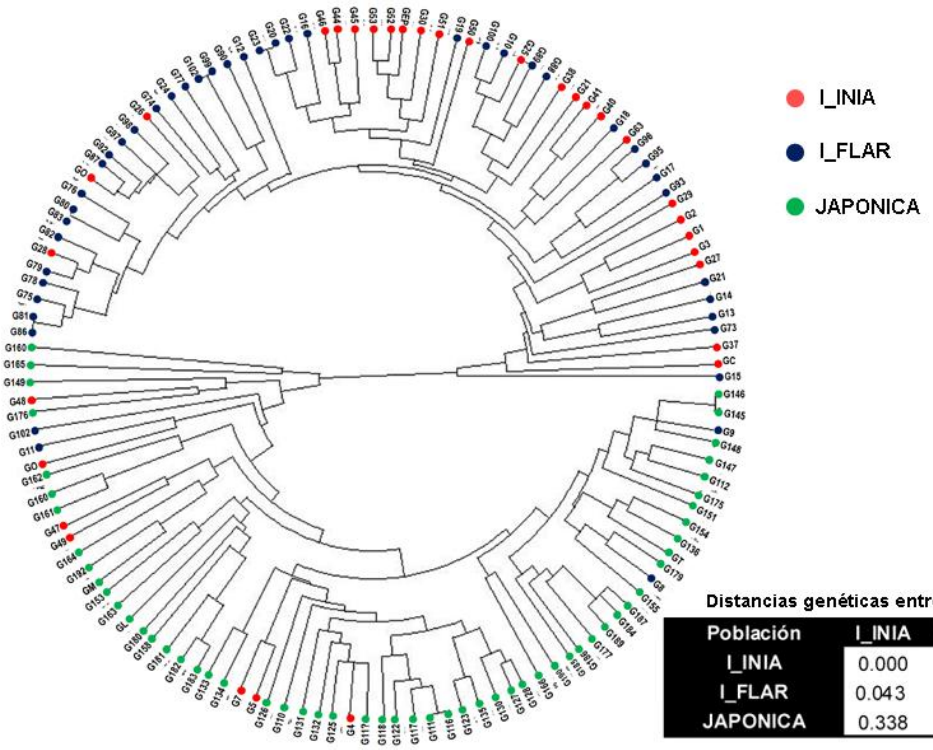
Figura 2.5. Localización de SSR polimórficos en mapa genético *Oryza sativa* Class I SSR (IRGSP) 2005 (izquierda) comparado con el mapa genético M202/IR50 UCD QTL 2003 (derecha). Se identifican de color amarillo los SSR usados en este trabajo. Con rojo se enmarcan los 14 SSR polimórficos usados para analizar la población del programa de mejoramiento y en azul los SSR co-localizados a QTL previamente identificados y polimórficos para la población segregante F2:3 utilizada en esta tesis (Fuente: http://www.gramene.org).

Los SSRg localizados en intrones presentan un mayor número de alelos respecto a los encontrados en exones y en regiones no traducidas; exceptuando el marcador RM23550 localizado en una región 3'UTR con un valor de PIC (Polymorphism Information Content) de 0.774. Contrariamente a lo esperado, el marcador RM10114, localizado en un exón presenta un alto número de alelos y un alto valor de PIC (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Variabilidad de los SSR polimórificos en la población en estudio.

SSRg	Posición en el gen	Individuos /locus	Número de alelos	Diversidad genética	PIC
RM22034	3'UTR	126	2	0.5	0.375
RM11239	Intron	126	5	0.632	0.567
RM14978	intron	125	3	0.507	0.386
RM6651	Intron	123	4	0.504	0.393
RM1761	intron	121	10	0.485	0.453
RM14960	Exón	123	2	0.497	0.373
RM144	Intron	125	7	0.81	0.788
RM13335	Intron	121	6	0.617	0.546
RM15892	5'UTR	127	3	0.407	0.336
RM6547	5'UTR	120	2	0.489	0.369
RM23550	3'UTR	110	12	0.8	0.774
RM18776	3'UTR	121	3	0.51	0.396
RM10114	Exón	117	4	0.73	0.68
RM215	3'UTR	120	9	0.71	0.664

Como se muestra en la Figura 2.6, el dendrograma producido a partir de estos 14 marcadores polimórficos discrimina claramente dos grupos constituidos por las dos ssp. Asimismo, si se considera el programa de origen en los genotipos Indica, también se observa una tendencia a separar los originarios de INIA de los originarios del FLAR. El análisis de diversidad poblacional entre el grupo Japonica e Indica determinó un valor de Fst de 0.35 (Fst es el índice de fijación el cual mide la diversidad genética de poblaciones) mientras que el análisis de diversidad considerando el programa de mejoramiento muestra que el valor de Fst es mayor entre la población de Japonica e Indica FLAR que respecto a la Indica INIA (Figura 2.6). Los valores de Fst están de acuerdo con los de distancia genética de Nei.

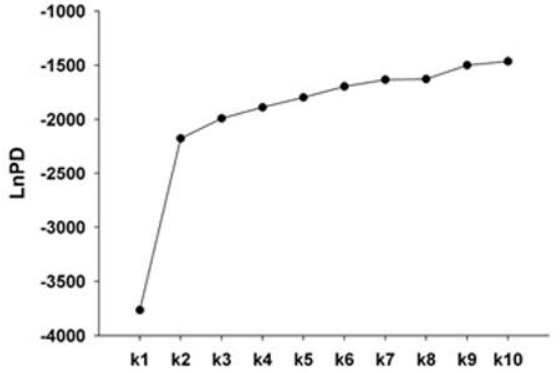


Distancias genéticas entre poblaciones (Fst/Nei)

Población	I_INIA	I_FLAR	JAPONICA
I_INIA	0.000	0.077	0.915
I_FLAR	0.043	0.000	1.292
JAPONICA	0.338	0.427	0.000

Figura 2.6. Estructura de la población mediante análisis UPGMA realizado en Tassel 2.1. En la tabla se muestra el análisis de diversidad genética. Se calcularon las distancias genéticas de las poblaciones utilizando las distancias de Nei (arriba de la diagonal) y mediante los valores de Fst (debajo de la diagonal).

Como otra forma de evaluar la estructura de una población se utilizó el programa Structure (Pritchard et al., 2010) el que implementa un método de agrupamiento para inferir la estructura poblacional usando datos genotípicos. Se determinó el número de poblaciones dentro de los genotipos analizados, graficando el LnP(D) para cada número de grupo (K) y determinando el inicio de plateau en la gráfica (Figura 2.7). Se seleccionó como número más probable de poblaciones el de K=3. Una vez seleccionado este parámetro se corrió nuevamente el programa Structure, pero con condiciones diferentes de corrida. En la Figura 2.7 se observa el gráfico de estructura de la población, donde se identifican las diferentes subpoblaciones en diferente color. Los tres grupos se corresponden casi perfectamente con los programas de mejoramiento de origen. El estudio de diversidad de población con los grupos si identificados muestra valores semejantes a los reportados en la Figura 2.6.



Distancias genéticas entre poblaciones (Fst/Nei)

Grupo	K1	K2	K3
K1	0.000	0.071	1.105
K2	0.072	0.000	1.286
K3	0.433	0.461	0.000

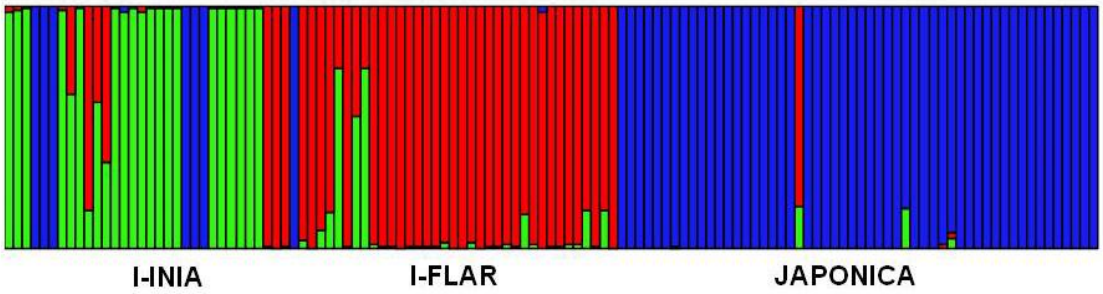


Figura 2.7. Estructura de la población realizada en Structure. Para seleccionar el número de poblaciones se graficó la probabilidad Ln de los datos (LnP(D)) en función del número de poblaciones (K) y se seleccionó K3 como el número más probable de poblaciones. Se calculó las distancias genéticas de las poblaciones utilizando las distancias de Nei y mediante los valores de Fst. En la diagonal figuran los valores de Fst y abajo las distancias de Nei en la diagonal superior. Ver la frase final

En conclusión, considerando los resultados de estructura y diversidad se visualiza claramente la existencia de tres sub-poblaciones, una constituida por los genotipos de la ssp. Japonica, una constituida por los genotipos de la ssp. Indica originaria del programa de mejoramiento de INIA y otra de los genotipos de la ssp. Indica originaria del programa de mejoramiento del FLAR. Por esta razón, para los análisis de asociación posteriores solamente se usaron como criterios de estructura las ssp. (S) y la ssp. y programa de mejoramiento de origen (PM).

4.5 ANÁLISIS DE DATOS FENOTÍPICOS DE LA POBLACIÓN ELITE DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO

Para cuantificar la respuesta al frío se evaluaron los 131 genotipos para: 1) fotoinhibición a través del parámetro Fv/Fm, 2) integridad de membrana a través de la cuantificación del porcentaje de PE y 3) daño foliar a través de la cuantificación de la clorosis como RV.

Para realizar un análisis descriptivo de la distribución de las variables fenotípicas se construyó un histograma de frecuencia y el gráfico de QQplot para cada una de ellas (Figura 2.8). El gráfico de QQ plot compara cuantiles teóricos de una distribución normal típica contra los cuantiles observados de la

población en estudio. La variable Fv/Fm pareciera tener una clara distribución normal sin sesgo, mientras que para la variable PE esta distribución pareciera presentar un sesgo positivo alejándose de la simetría esperada en una distribución normal. Asimismo, el gráfico de QQplot presenta extremos alejados de la diagonal principal, lo cual confirma lo expresado anteriormente. Por otra parte, la variable RV el histograma no muestra una distribución normal y el gráfico de QQplot presenta un patrón escalonado, lo que refleja la discretización de la misma. Esto se debe a la metodología a partir de la cual se recabaron los datos.

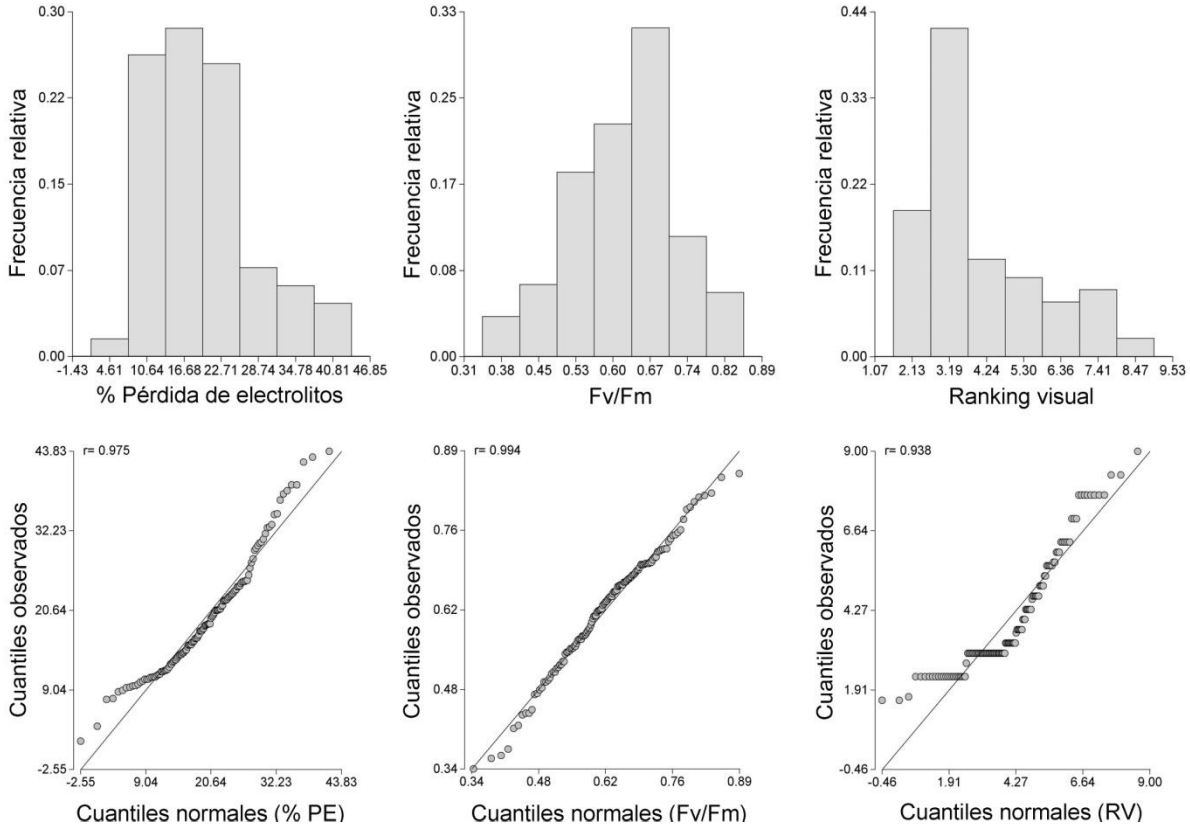


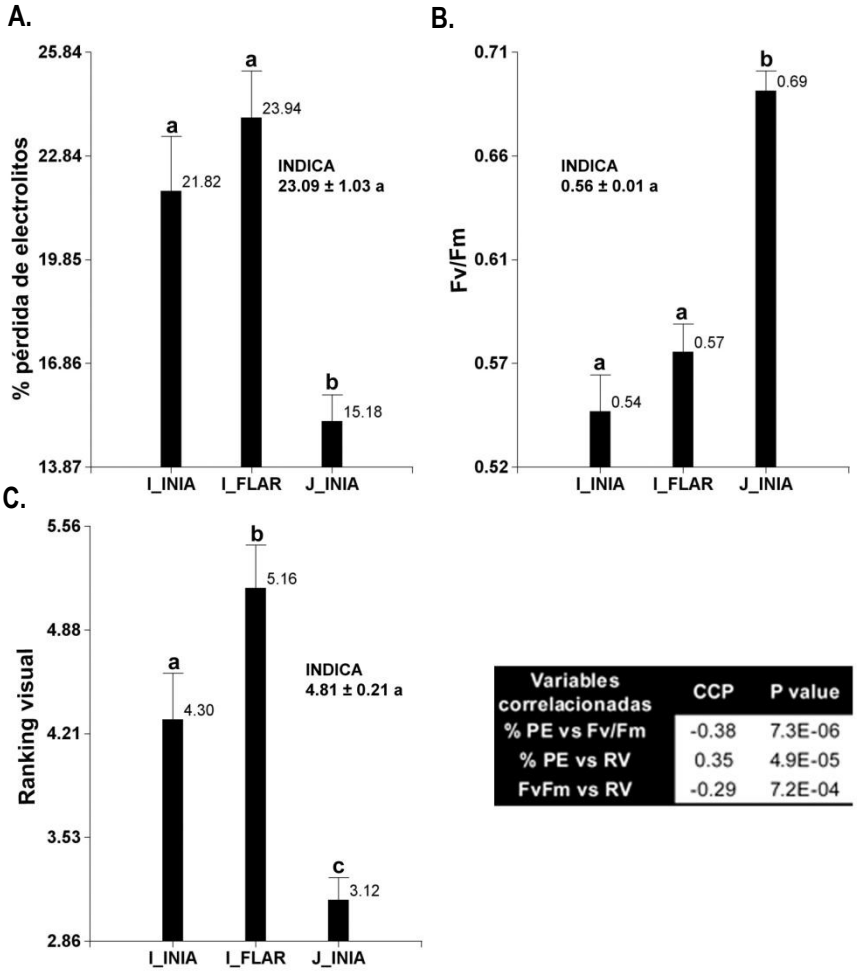
Figura 2.8. Descripción de la distribución de fenotipos analizados. Pérdida de electrolitos (%PE), emisión de fluorescencia de clorofila a (Fv/Fm) y ranking visual (RV).

En la Figura 2.9 se representan las medias por ssp. y PM. En el cuadrante superior derecho de cada gráfico se muestra la media para los genotipos Indica conjuntamente. Cuando se considera solamente la ssp. las medias de las tres variables mostraron diferencias significativas y si se considera la ssp. y el PM

de origen de los genotipos únicamente la variable RV discrimina significativamente entre los tres grupos (Figura 2.9).

Debido a que el origen de las ssp. se relaciona con su tolerancia a baja temperatura es esperable que presenten diferencias significativas para los fenotipos analizados.

Para estudiar la relación entre las variables fenotípicas cuantificadas se planteó un análisis de asociación lineal entre las variables considerando el nivel de significancia de 0.05. Los valores de correlación (menores a 0.4) demuestran que no existen asociaciones importantes entre las variables (Figura 2.9).



Variables correlacionadas	CCP	P value
% PE vs Fv/Fm	-0.38	7.3E-06
% PE vs RV	0.35	4.9E-05
FvFm vs RV	-0.29	7.2E-04

Figura 2.9. Comparación de medias fenotípicas según sub-especie (ssp.) y programa de mejoramiento (PM). A. Pérdida de electrolitos**. B.** Fv/Fm. **C.** Ranking visual. CCP, coeficiente de correlación de Pearson.

4.6 DETERMINACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LA TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ EN UNA POBLACIÓN ELITE DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO

A partir de los datos genotípicos obtenidos de los 14 SSRg seleccionados se realizó un análisis de asociación con los tres fenotipos cuantificados. Para ello se implementaron cuatro modelos estadísticos, considerando como subpoblaciones la subespecie (S), la subespecie y el programa de mejoramiento (SPM) y los valores de Q de structure. En la Tabla 2.8 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2.8 Marcadores asociados a tolerancia a frío en arroz.

Modelo	% PE		Fv/Fm		RV	
	Marcador	p-valor	Marcador	p-valor	Marcador	p-valor
Näive	RM6547	$9.99x10^{-6}$	RM144	$9.99x10^{-6}$	RM144	$9.99x10^{-6}$
	RM11239	$9.99x10^{-6}$	RM215	$9.99x10^{-6}$	RM215	$9.99x10^{-6}$
	RM13335	$9.99x10^{-6}$	RM6547	$9.99x10^{-6}$	RM6547	$9.99x10^{-6}$
	RM14960	$9.99x10^{-6}$	RM6651	$9.99x10^{-6}$	RM11239	$9.99x10^{-6}$
	RM14978	$9.99x10^{-6}$	RM11239	$9.99x10^{-6}$	RM13335	$9.99x10^{-6}$
	RM18776	$9.99x10^{-6}$	RM14960	$9.99x10^{-6}$	RM14960	$9.99x10^{-6}$
	RM22034	$9.99x10^{-6}$	RM14978	$9.99x10^{-6}$	RM14978	$9.99x10^{-6}$
	RM6651	0.0178	RM18776	$9.99x10^{-6}$	RM18776	$9.99x10^{-6}$
	RM144	0.0013	RM22034	$9.99x10^{-6}$	RM22034	$9.99x10^{-6}$
	RM215	0.001	RM13335	$5.09x10^{-4}$	RM6651	$9.99x10^{-5}$
K	RM14960	$6.61x10^{-4}$	RM215	0.0424	RM144	0.0332
	RM22034	4.85×10^{-4}	RM6547	0.0357		
	RM144	0.0085				
	RM11239	0.0299				
	RM18776	0.0046				
	RM14978	$3.4x10^{-4}$				
S	RM22034	0.0298	RM6547	0.02	RM144	0.022
S+K	RM22034	0.0297	RM6547	0.05	Nas	
SPM	RM22034	0.0463	RM6547	0.0129	RM144	0.012
SPM+K	RM22034	0.0363	RM6547	0.0371	Nas	
Q	Nas		RM14978	0.0198	RM144	0.0039
					RM6547	0.0181
Q+K	Nas		RM14978	0.0266	RM6547	0.0152
					RM144	0.05

En ausencia de una estructura poblacional supuesta (modelo näive) la mayoría de los marcadores presentaron asociaciones significativas con los fenotipos en estudio. Esta situación cambió a medida que se incorporaban criterios de estructura de la población. No se vieron diferencias cuando se consideraba

como estructura S y SPM, aunque cuando se agregaba la variable aleatoria de co-ancestría (K) se perdió la asociación del marcador RM144 para RV. Estas pérdidas de asociación pueden deberse a un efecto de sobre corrección de la matriz K. Las mayores diferencias por estructura se encontraron cuando se consideró la matriz Q de structure en los modelos. En este caso, el marcador RM14978 asoció con la variable Fv/Fm y el marcador RM6547 mostró asociación con la variable RV en lugar de Fv/Fm como fue encontrado para las estructuras S y SPM. Por su parte, el marcador RM144 siguió dando asociación con la variable RV. En la Figura 2.10 se muestran los gráficos de respuesta a frío para los alelos de los marcadores asociados.

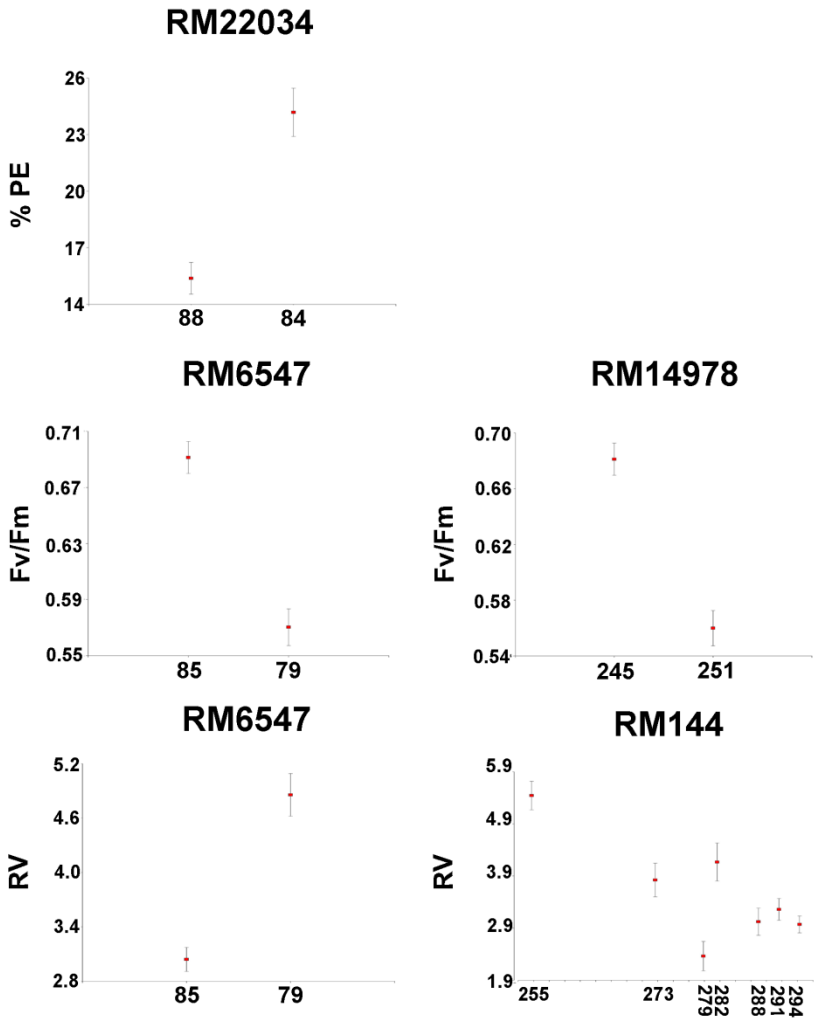


Figura 2.10. Efectos alélico de los marcadores asociados a %PE (RM22034), Fv/Fm (RM6547 y RM14978) y RV (RM6547 y RM144).

A modo de diagnóstico, sobre los modelos finales (considerando únicamente los marcadores asociados) se analizaron los residuales para los modelos MLM y GLM para comprobar el cumplimiento de los supuestos de distribución normal de los residuales. Este análisis se hizo para los fenotipos donde se encontró asociación y para cada variable de manera independiente empleando el test de Shapiro-Wilk (SW). En la Tabla 2.9 se muestran los valores de SW para todos los modelos usados.

Tabla 2.9. Pruebas de bondad de ajuste para la distribución normal de los residuales para variables fenotípicas originales según modelo utilizado.

Näive			**K**		
Fenotipo	W	p-valor	Fenotipo	W	p-valor
%PE	**0.984**	**0.4013**	%PE	0.95	0.001
Fv/Fm	**0.988**	**0.6929**	**Fv/Fm**	**0.98**	**0.4309**
S			**S+K**		
Fenotipo	W	p-value	Fenotipo	W	p-value
%PE	**0.9738**	**0.01578**	%PE	0.96	0.0058
Fv/Fm	**0.991**	**0.6342**	Fv/Fm	0.93	<0.0001
SPM			**SPM+K**		
Fenotipo	W	p-value	Fenotipo	W	p-value
%PE	**0.9723**	**0.01129**	%PE	0.96	0.004
Fv/Fm	**0.9889**	**0.4445**	Fv/Fm	0.93	<0.0001

W. Valor del estadístico. En negrita se muestran los valores de p-valor mayor a 0.01 por lo que se cumple la normalidad de los residuales

Basados en el test de SW los residuales mostraron una distribución normal en los modelos que consideran estructuras de S y SPM (considerando valores de p-value > 0.01) pero no en aquellos que agregan la matriz K. Se probaron varias transformaciones con la finalidad de corregir el no cumplimiento de este primer supuesto y la transformación Raíz Cuadrada logró mejorar el comportamiento de los residuos para el caso de %PE en el modelo de SPM+K y S+K, pero con niveles de significancia inferiores a 0.05 (Tabla 2.10).

Por lo antes expuesto, los modelos que no consideran co-ancestría serían los más apropiados para los fenotipos Fv/Fm y %PE.

Tabla 2.10. Pruebas de bondad de ajuste para la distribución normal de los residuales para variables fenotípicas transformadas según modelo utilizado.

S+K Raíz			**S+K Log**		
Fenotipo	W	p-value	Fenotipo	W	p-value
%PE	**0.93**	**0.016**	%PE	0.91	0.0012
Fv/Fm	0.92	0.001	Fv/Fm	0.89	<0.0001
SPM Raíz			**SPM+K Log**		
Fenotipo	W	p-value	Fenotipo	W	p-value
%PE	**0.94**	**0.0259**	%PE	0.91	0.0006
Fv/Fm	0.92	0.0007	Fv/Fm	0.86	<0.0001

4.7 VALIDACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS MEDIANTE SMA EN UNA POBLACIÓN F2:3

De los 14 SSR polimórficos se seleccionaron 10 SSR que fueron polimórficos para los parentales de la población F2 usada para el SMA: El Paso 144 y L2825CA. Estos fueron: RM10114, RM6651, RM11239 y RM6547 del cromosoma 1, RM14060 y RM14978 del cromosoma 3, RM22034 del cromosoma 7, RM23550 del cromosoma 8, RM215 del cromosoma 9 y RM144 del cromosoma 11. Para este análisis se agregaron los marcadores co-localizados en QTL reportados anteriormente (Tabla 2.1) de los cuales solamente 3 resultaron ser polimórficos para los parentales analizados: RM4 (cromosoma 11), RM297 (cromosoma 1) y RM319 (cromosoma 1) (Figura 2.5).

4.7.1 Análisis fenotípico de la población de mapeo F2:3

El análisis de correlación de las medias ajustadas de %PE y Fv/Fm mostró que los fenotipos no están correlacionados, con un valor de CCP (Coeficiente de Correlación de Pearson) de 0.12.

Los valores de Fv/Fm de la progenie se encontraban en el rango de 0.563 a 0.782, con una media de 0.708 y un desvío estándar de 0.04. La media fue levemente inferior al padre tolerante L2825CA (0.744 ± 0.003) pero significativamente superior al peor de los padres El Paso 144 (0.534 ± 0.002).

Para %PE la progenie presentó una media de 22.93 ± 0.72 el cual fue inferior a la media de El Paso 144 (31.92 ± 3.98) y superior a L2825CA (19.56 ± 2.83). Por otro lado la media de la progenie fue ligeramente inferior a la media de ambos padres (25.64).

4.7.2 Análisis genotípico de la población de mapeo F2:3

Previo al análisis de QTLs, se estimó para cada par de marcadores la fracción de recombinación entre ellos (r) y se calculó la probabilidad (LOD score) para el test de r = ½. La r estimada entre los marcadores se encuentra en parte inferior de la diagonal y el LOD score en la parte superior de la diagonal. Los valores de LOD indican cuan probable es que dos loci se encuentren cercanos en un cromosoma y por tanto que sean heredados conjuntamente.

Los puntos rojos indican marcadores ligados y los puntos azules indican marcadores no ligados (Figura 2.11). La ubicación genética de los marcadores se corresponde con la ubicación física obtenida de la secuenciación del genoma del arroz. Los marcadores RM6547 y RM297 (cromosoma1), y los marcadores RM14978 y RM14960 (cromosoma 3) mostraron una baja frecuencia de recombinación (Figura 2.11).

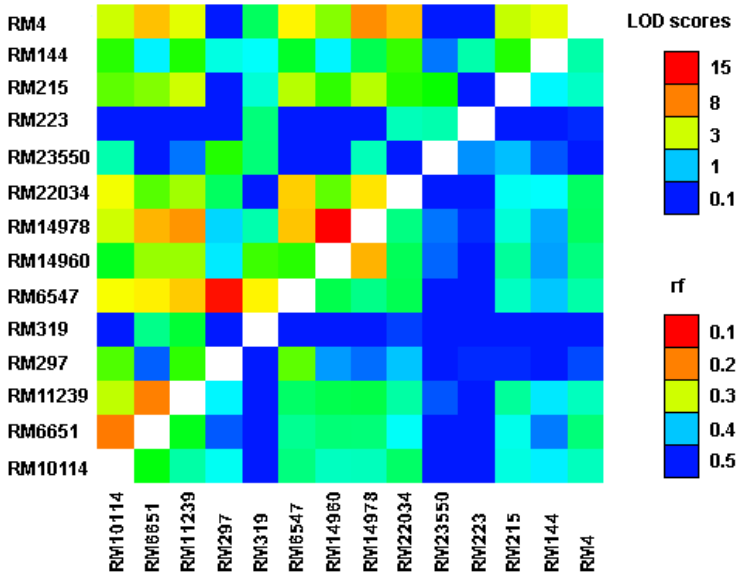


Figura 2.11. Fracciones de recombinación genética y scores de LOD. Este grafico muestra por debajo de la diagonal las fracciones de recombinación y por encima el valor de LOD. La escala va de rojo (pequeña distancia o alto LOD) a azul oscuro (mayor distancia o bajo LOD).

4.7.3 SMA en la población F2:3

Mediante el SMA se identificaron 4 marcadores asociados a %PE y un marcador asociado a Fv/Fm considerando un umbral de LOD de 3 (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Marcadores asociados a %PE y Fv/Fm en la población F2:3 de El Paso 144 x L2825CA.

Fenotipo	Marcador	LOD
% PE	RM6651	5.64
% PE	RM14978	5.99
% PE	RM22034	3.53
% PE	RM4	3.91
Fv/Fm	RM22034	3.27

En las Figuras 2.12 se muestran los efectos de sustitución alélica sobre el %PE de los marcadores asociados. Considerando que el alelo A es el correspondiente al alelo masculino (L2825CA) y el B al alelo femenino (El Paso 144) se puede observar superioridad del alelo parental femenino en 9 de los 13 marcadores analizados y en solo uno se observa superioridad del alelo del parental masculino. En los 3 marcadores restantes no se observó un marcado efecto de sustitución alélica. En todos los marcadores con una asociación significativa sobre la variable %PE se observó una superioridad del alelo del parental El Paso 144. La superioridad fenotípica para la variable %PE significa mayor daño de membrana lo cual está asociado a una mayor sensibilidad al frio. Esto significa que los individuos que muestran una homocigosis del parental femenino (El Paso 144) en esos marcadores poseen una mayor sensibilidad al frio.

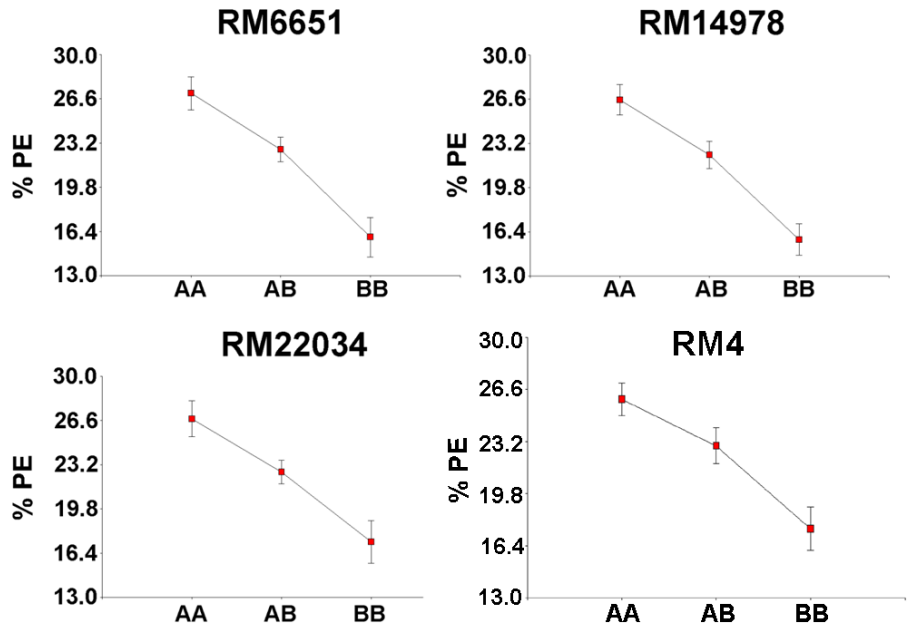


Figura 2.12. Efectos alélicos de los marcadores asociados a %PE en la población F2:3 de El Paso 144 x L2825CA.

En las Figuras 2.13 se muestran los efectos de sustitución alélica sobre el Fv/Fm de los marcadores asociados en la población segregante y en la colección de germoplasma de la población elite del programa de mejoramiento. En el caso del marcador RM22034, asociado a la variable Fv/Fm en la población F2:3, se observó una superioridad del alelo del parental L2825CA. La superioridad fenotípica para la variable Fv/ Fm significa menor fotoinhibición lo cual está asociado a una menor sensibilidad al frio. Esto significa que los individuos que muestran una homocigosis del parental masculino en esos marcadores poseen menor sensibilidad al frio.

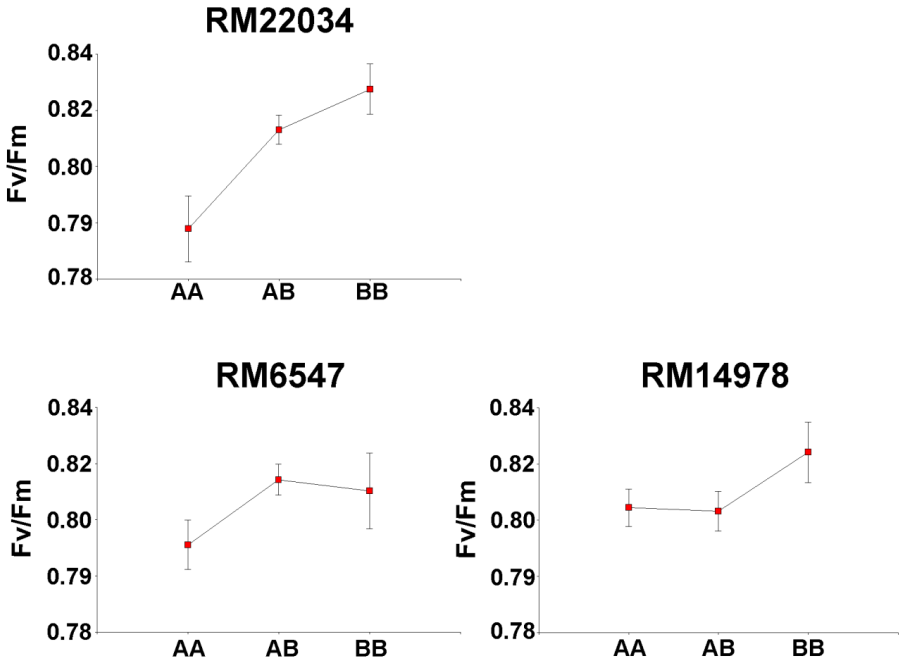


Figura 2.13. Efectos alélicos de los marcadores asociados a Fv/Fm en la población F2:3 de El Paso 144 x L2825CA. Se ilustra además el efecto alélico del marcador RM6547 que asoció en la población elite del programa de mejoramiento pero no en la población segregante F2:3.

En la Figura 2.14 se grafican las interacciones entre los marcadores asociados para los diferentes fenotipos, encontrándose interacción únicamente entre los marcadores RM6651 y RM14978. La performance del homocigoto AA para el marcador RM6651 fue desfavorecida por el homocigoto BB de RM14978 (5 % de incremento en la PE) mientras que la del heterocigoto para RM6651 fue favorecida por éste alelo (disminución de 10 % en la PE). El homocigoto BB para RM6651 no se vio afectado por RM14978.

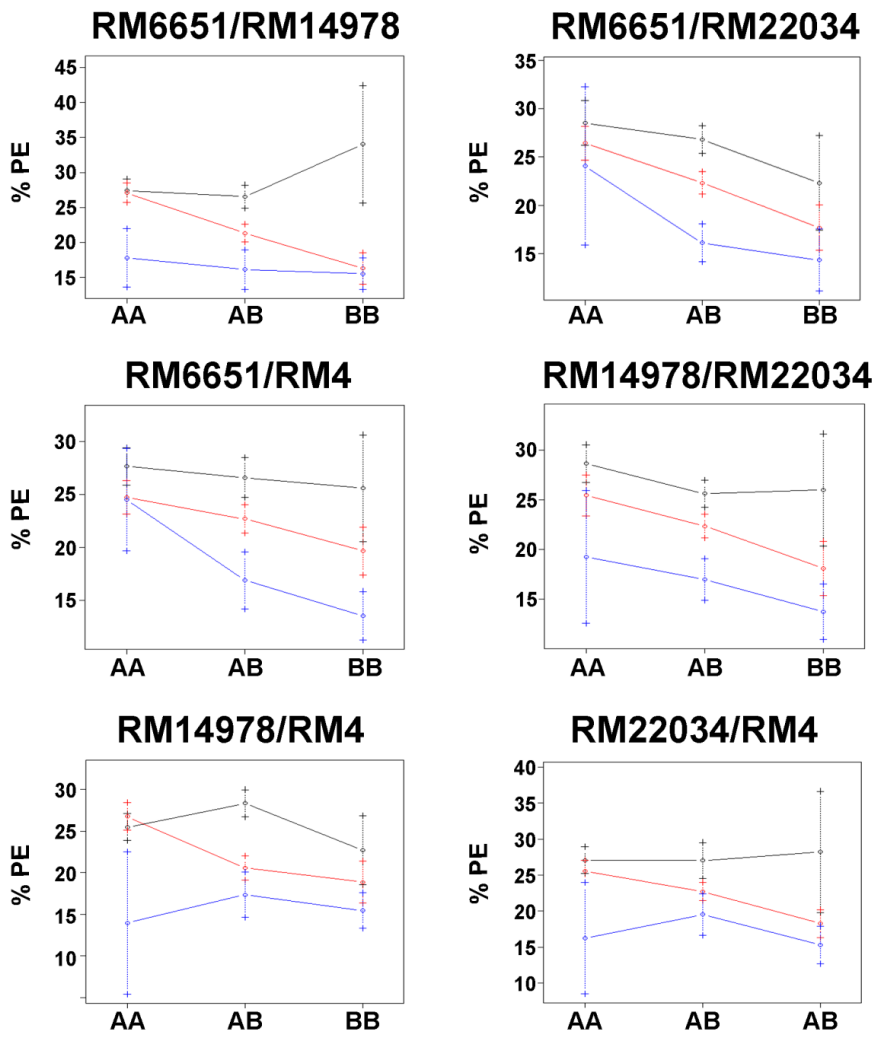


Figura 2.14. Interacciones epistáticas entre los marcadores asociados. Los colores indican el alelo del marcador nombrado en primer lugar (AA negro, AB rojo y BB azul) mientras que en el eje de las abscisas se indican los alelos del marcador nombrado en segundo lugar.

5. DISCUSIÓN

5.1 ESTRATEGIA DE GENES CANDIDATOS Y SSRG PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES ASOCIADOS A TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ

Las respuestas a estreses ambientales son normalmente visualizadas como fenómenos complejos de herencia cuantitativa. Esta premisa es esencialmente cierta para estreses como la sequía o el anegamiento, pero la respuesta a baja temperatura en arroz en etapas vegetativas ha mostrado ser un carácter menos complejo. Estudios de genética clásica y molecular lo han demostrado y justifica el uso de

la estrategia de GC para la identificación de marcadores asociados a la respuesta (Sthapit y Witcombe, 1998; Shahi y Khush, 1986; Li y Rutger, 1980).

Las dos metodologías usadas en este trabajo para identificar GC mostraron ser complementarias. En una primera instancia se esperaba obtener resultados redundantes por publicación en Genbank de genes reportados, sin embargo únicamente 7 de los 214 genes seleccionados de la literatura fueron encontrados por análisis de bases de datos. Esta última estrategia mostró ser más eficiente, ya que no solo contempló estudios de ESTs, sino también estudios de mutantes y análisis de QTL. Por otro lado, el análisis *in silico* permitió identificar ESTs homólogos a genes que han sido identificados en otras especies vegetales frente a la respuesta a estrés por frío. De hecho, la genómica comparativa es una importante estrategia para identificar GC.

Si bien en este trabajo se seleccionaron genes pertenecientes a dos grandes grupos, GE y FT, la mayoría pertenecían a este último. Los FT son especialmente importantes debido a su efecto pleiotrópico, aumentando las chances de que su expresión diferencial conlleve a cambios mayores en el fenotipo, tanto cambios positivos como negativos.

El advenimiento de las tecnologías masivas de secuenciación, que permiten la identificación de un gran número de SNPs, ha relegado la búsqueda de marcadores asociados a caracteres cuantitativos en GC y se han enfocado en el estudio de GWA. Esta estrategia ha sido usada para caracteres más simples como floración en *Arabidopsis* (Ehrenreich et al., 2009) o caracteres cuyas vías bioquímicas están bien conocidas como calidad de malteo en cebada (Matthies et al. 2009) o acumulación de maysina y ácido clorogénico en maíz (Szalma et al., 2005). Sin embargo, contrariamente a los estudios de GWAs, el uso de GC en la identificación de marcadores prioriza la función biológica de los genes por encima de las asociaciones puramente estadísticas. El trabajo de Tondelli et al. (2006) combina ambos enfoques y deja en evidencia la importancia del rol de los genes, en particular FT, en los QTLs para tolerancia a frío y sequía en cebada.

Si bien los marcadores SNP son los más utilizados, no son siempre los más informativos, sobre todo en estudios de GC donde el nivel de polimorfismo esperable es muy bajo. Los SSRg además de presentar alto nivel de polimorfismo, pueden tener un efecto directo sobre las variaciones fenotípicas, lo cual ha sido estudiado en humanos y bacterias (Li et al., 2004). Además, se ha propuesto que la

existencia de SSR en regiones génicas, traducidas o no, es una estrategia evolutiva específicamente relacionada con la rápida adaptación a nuevos ambientes (Li et al., 2004).

Contrariamente a lo esperado, en este trabajo se encontraron un gran número de SSRg en regiones exónicas de los GC, los que en su mayoría presentaban trinucleótidos repetidos, ya que cambios en el número de repetidos no afectan el marco de lectura. Sorprendentemente, dos de los SSR en exones fueron dinucleótidos, pero ninguno de ellos fue amplificable. Por otro lado, las regiones no traducidas presentan un mayor número de SSR que las codificantes y con más cantidad de patrones de repetición (dímeros y trímeros).

5.2 ASOCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA TOLERANCIA A FRÍO EN ARROZ

La tolerancia a frío en plántulas está determinada principalmente por la respuesta antioxidante a nivel celular, la tolerancia del aparato fotosintético y la estabilidad de las membranas. Lamentablemente, considerando los resultados presentados en el Capítulo 1, no se dispone de sistemas de fenotipado masivo para evaluar la respuesta antioxidante, por lo que no fue posible utilizar este fenotipo en la búsqueda de asociación. Igualmente, los datos fenotípicos obtenidos para los otros dos mecanismos en las poblaciones de mapeo permitieron confirmar su implicancia en la respuesta al estrés por frío en el germoplasma analizado. Ambos fenotipos evidenciaron diferencia en la respuesta esperada entre las ssp. Indica y Japonica, siendo las primeras más susceptibles a frío. Además, dentro del grupo Indica, fue posible discriminar entre los PM de origen. Los genotipos FLAR, provenientes de regiones tropicales, presentaron una tendencia a tener mayor daño que los uruguayos, lo cual se relaciona con el hecho de que en Uruguay se selecciona en climas más templados.

La principal consideración que se debe tener para encontrar marcadores asociados a un fenotipo en una población de este tipo, es la de evitar asociaciones espurias por estructura poblacional, incluso en poblaciones pequeñas de arroz pertenecientes a un PM. Es decir, que la asociación no se deba a que el marcador esté ligado físicamente al QTL o gen de interés sino que sea producto de una asociación puramente estadística generada entre otras cosas por la estructura de la población (Jannink y Walsh, 2002). Para determinar la estructura de una población, normalmente se corren marcadores anónimos o se presupone estructura por información previa, como por ejemplo el origen del germoplasma. Debido a la fuerte estructura dada por la ssp. y la tecnología de genotipado disponible para realizar esta tesis

(marcadores SSR) no se usaron marcadores anónimos, ya que se consideró que no se iba a poder discriminar mas allá que la estructura planteada de ssp. o programa de mejoramiento. Esta estructura fue confirmada cuando se utilizaron los SSRg para estudiar la diversidad de la población, sin importar el método utilizado, se diferenciaron claramente los tres grupos mencionados: Japonicas, Indica INIA e Indica FLAR.

Considerando esta estructura, fue posible encontrar marcadores asociados a los tres fenotipos en estudio, los cuales fueron encontrados usando diferentes modelos estadísticos. El número de marcadores asociados fue muy bajo, lo que se debe por un lado al bajo número de marcadores analizados y por otro al carácter analizado, la respuesta al frío. Considerando que la base de la estructura seleccionada está relacionada con el carácter en estudio (el origen de las ssp. de arroz se debió a la divergencia en ambientes tropicales y subtropicales o templados) es posible que los marcadores que determinan la estructura estén también indicando un comportamiento diferencial al frío. Por esta razón, los modelos que consideran estructuras podrían subestimar el número de marcadores asociados. En los hechos, la validación de marcadores en la población F2:3 permitió identificar un mayor número de marcadores, particularmente para el fenotipo estabilidad de membrana.

Si bien en principio las poblaciones F2:3 pueden no ser las óptimas para la identificación de QTLs, en este trabajo se demostró su utilidad lo cual es ventajoso considerando el poco tiempo que se necesita para desarrollarla. De hecho, este tipo de poblaciones ha sido exitosamente usada de manera reciente en arroz para identificar QTLs asociados a tolerancia a altas temperaturas (Zhang et al., 2009), rendimiento (Rahman et al., 2008) y tolerancia a bajas temperaturas (Han et al., 2004).

5.3 FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS GENES IDENTIFICADOS

Considerando la premisa de este trabajo que llevó a seleccionar la estrategia de GC para la búsqueda de marcadores, es particularmente relevante el rol biológico de los genes asociados. Teniendo en cuenta que las especies más sensibles al frío presentan una mayor rigidización de las membranas cuando son sometidas a frío haciéndolas más inestables (Kratsch y Wise, 2000), la asociación del marcador RM22034 a la estabilidad de membrana tanto en la población de mejoramiento como en la F2:3 evidencian la importancia del gen *OsLti6a* (*Low Temperature Induced*) en la respuesta a las bajas temperaturas. Este gen, identificado por Morsy et al. (2005) se encuentra relacionados con la familia de

genes denominada "*Rare Cold Inducible Gene*" de *Arabidopsis*, particularmente con el gen *RC12B*. El análisis del polipéptido codificado por este gen demostró que tienen una muy alta hidrofobicidad y dos hélices transmembrana, que indican que ambos pueden estar localizados en la membrana plasmática estabilizando las mismas cuando las plantas crecen en temperaturas sub-óptimas (Morsy et al., 2007). Estudios de expresión de este gen demostraron que pertenece al regulón CBF/DREB y que en las líneas tolerantes la expresión es más temprana. Considerando los antecedentes que demuestran que los SSR ubicados en regiones no traducidas pueden regular la expresión de los genes (Kashi et al., 1997; Li et al., 2002) es posible que el polimorfismo en el SSR tenga un rol sobre la expresión diferencial.

Por su parte es particularmente interesante la asociación encontrada para el marcador RM6547, el cual se localiza en un gen que codifica para un FT tipo NAC. El rol de los FT tipo NAC en la respuesta al frío ha sido reportada por Hu et al. (2008) y Nakashima et al. (2007) quienes demostraron que el gen *OsNAC6/SNAC2* controla la expresión de genes que codifican entre otros para peroxidasas; enzimas claves en la defensa contra el daño oxidativo.

La cercanía física de este marcador al QTL qCTS1 (Andaya y Mackill, 2003) y la cercanía genética encontrada con el marcador RM297 en el mapa obtenido de la población F2:3 hacen de este FT un candidato interesante a ser responsable del efecto del qCTS1 a pesar de que no se haya encontrado asociación en la población segregante. Es probable que este QTL no sea el responsable de dar la tolerancia a frío en la línea L2825CA, pero sí que sea importante en otros genotipos del germoplasma uruguayo. Esto demuestra como los estudios de asociación en poblaciones constituidas por un gran número de germoplasma puede brindar información diferente a la generada en estudio de poblaciones segregantes, donde solamente se estudian dos genotipos.

Como fue mencionado, el estudio de asociación realizado en la población F2:3 permitió encontrar un mayor número de marcadores asociados a la respuesta al frío. Además del marcador RM22034, los marcadores RM6651 y RM14978 presentaron un valor significativo de asociación al %PE. RM14978 está localizado en un intrón de una glutatión peroxidasa cuyo rol en el estrés oxidativo es ampliamente conocido, en particular en la respuesta a estrés generado por baja temperatura (Kocsy et al., 2001). Existen pruebas genéticas y moleculares contundentes que demuestran su importancia en la respuesta al frío en arroz (Takesawa et al., 2002; Andaya y Tai, 2006) por lo cual sería importante estudiar más en

profundidad la variabilidad y el efecto del gen *LOC_Os03g24380* en el germoplasma uruguayo. Por otro lado, el gen donde se localiza el marcador RM6651 codifica para una proteína inducida por auxinas. Estos genes pertenecen a una amplia familia de genes que responden a las auxinas. Si bien siempre se vincularon a la fisiología del desarrollo, recientemente Jain et al. (2009) demostraron que también están implicados en la respuesta a estrés abiótico en arroz.

En conclusión, los caracteres fenotípicos seleccionados en este trabajo para identificar marcadores asociados a la respuesta a frío permitieron caracterizar la respuesta correctamente, tanto en los estudios de asociación en la colección de germoplasma del programa de mejoramiento como en la población segregante F2:3. Asimismo, el análisis de poblaciones F2:3 es una alternativa rápida y fácilmente disponible, respecto a la generación de RILs, para identificar QTLs (Fisch et al., 1996; Jiang y Zeng 1997; Chapman et al., 2003; Kao et al., 2004; Kao, 2006).

Es importante continuar este trabajo mediante estudios moleculares que permitan profundizar sobre el rol biológico de los genes *LOC_Os07g44180* (Lti6a), *LOC_Os03g24380* (Glutation peroxidasa), *LOC_Os01g13030* (proteína inducida por auxina) y *LOC_Os01g60020* (FT tipo NAC) e identificar marcadores SNPs en estos genes. Esto permitirá el uso masivo como estrategia de mejoramiento asistido en el PM de arroz de INIA-Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

Agrama,H. A., Eizenga, G. C. Yan W. (2007). Association mapping of yield and its components in rice cultivars. Mol. Breeding, 19(4):341-356. doi:10.1007/s11032-006-9066-6

Aguan, K., Sugawara, K., Suzuki, N., Kusano, T. (1991). Isolation of genes for low-temperature-Induced proteins in rice by a simple subtractive method. Plant Cell Physiol. 32(8):1285-1289.

Akiyama, T., Jin, S. (2006). Molecular cloning and characterization of an arginine decarboxylase gene up regulated by chilling stress in rice seedlings. J. Plant Physiol. 164(5):645-654. doi 10.1016/j.jplph.2006.04.006

Allen, D.J., Ort, D.R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends Plant Sci., 6(1):36-42. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01808-2

Andaya, V. C., Mackill, D. J. (2003). Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. J. Exp. Bot., 54 (392):2579–2585. doi: 10.1093/jxb/erg243

Andaya, V.C., Tai, T.H. (2006). Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. Theor. Appl. Genet., 113(3): 467-475. doi:10.1007/s00122-006-0311-5

Andaya, V.C., Tai, T.H. (2007). Fine mapping of the qCTS4 locus associated with seedling cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) Mol. Breeding, 20(4):349-358. doi: 10.1007/s11032-007-9096-8

Ayres, N.M., McClung, A.M., Larkin, P.D., Bligh, H.F.J., Jones, C.A., Park, W.D. (1997). Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparentamylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theor. Appl. Genet., 94(6/7):773-781. doi: 10.1007/s001220050477

Balzarini, M., Di Rienzo, J. (2004) Info-Gen: software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Bao, J., Corke, H., Sun, M. (2002). Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet., 105(6/7):898-905. doi: 10.1007/s00122-002-1049-3

Baruah, A.R., Ishigo-Oka, N., Adachi, M., Oguma, Y., Tokizono, Y., Onishi, K., Sano, Y. (2009). Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. Euphytica, 165(3):459-470. doi: 10.1007/s10681-008-9753-y

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. (2011). lme4: Linear Mixed-E_ects Models Using S4 Classes. R package version 0.999375-38, URL http://CRAN.R-project.org/package=lme4.

Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem., 195:133-140. Disponible en: http://www.jbc.org/content/195/1/133.long

Bertin, P., Bullens, P., Bouharmont, J., Kinet, J.M. (1998). Somaclonal variation and chilling tolerance improvement in rice: changes in fatty acid composition. Plant Growth Regul., 24(1):31-41. doi: 10.1023/A:1005950113741

Blanco, P., Perez de Vida, F., Roel, A. (1993). Tolerancia a fríos de los nuevos cultivares precoces INIA Yerbal e INIA Tacuarí. In: Anais XX Reuniao de Cultura de Arroz Irrigado, Pelotas, RS, Brasil. EMBRAPA-CPACT. p. 77-80

Borevitz, J., Chory, J. (2004). Genomics tools for QTL analysis and gene discovery. Curr. Opinion Plant Biol. 7(2):132-136. doi: 10.1016/j.pbi.2004.01.011

Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S.(2007).TASS1-2)EL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics., 23(19):2633-2635. doi: 10.1093/bioinformatics/btm308

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72(1-2):248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Broman, K. W., Wu, H., Churchill, G., Sen, S., Yandell, B. (2008) qtl: Tools for analyzing QTLexperiments R package version 1. 9-43

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists. 1191p.

Bungard, R.A., Ruban, A.V., Hibberd, J.M., Press, M.C., Horton, P., Scholes, J.D. (1999). Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. Proc Natl Acad Sci USA., 96(3):1135 1139. doi: 10.1073/pnas.96.3.1135

Cazzaniga, S., Li, Z., Niyogi, K., Bassi, R., Dall'Osto, L. (2012). The Arabidopsis szl1 Mutant Reveals a Critical Role of β-Carotene in Photosystem I Photoprotection. Plant Physiol. 159:1745-1758

Chapman, A., Pantalone, V. R., Ustun ,A., Allen, F. L., Landau-Ellisetal D. (2003). Quantitative trait loci for agronomic and seed quality traits in an F2 and F4:6 soybean population. Euphytica, 129(3):387-393. doi: 10.1023/A:1022282726117

Chen, X., Salamini, F., Gebhardt, C.(2001). A potato molecularfunction map for carbohydrate metabolism and transport. Theor. Appl. Genet., 102(2/3):284–295. doi: 10.1007/s001220051645

Chen, G.X., Asada, K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol. 30(7):987-998.

Cheng, C., Yun, K.Y., Ressom, H.W., Mohanty, B., Bajic, V.B., Jia, Y., Yun, S.J., de los Reyes, B.G. (2007). An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant Japónica rice. BMC Genomics, 8:175-193. doi:10.1186/1471-2164-8-175

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z, Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, 142(1-2): 169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5

Counce, P.A., Keisling, T.C., Mitchell, J. (2000). A uniform, objective and adaptive system for expressing rice development. Crop Sci., 40(2):436-443. doi: 10.2135/cropsci2000.402436x

Cruz, M., Pulver, E., Jennings, P., Berrío, L., Blanco, P., Rosso, A., Marassi, J. (2001). Identificación de materiales genéticos de arroz para tolerancia a temperaturas bajas. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, Reunião da cultura de arroz irrigado. (II, XXIV: 2001: Porto Alegre-RS). Anais. Porto Alegre-RS, Brasil, IRGA, 2001. p 15-17.

Cruz, M., Pulver, E., Jennings,P., Torres, E., Berrío, L.E. (2003). Avances en mejoramiento para la zona templada de América del Sur. Foro FLAR.

Da Cruz, R. P., Milach, S. C. K. (2000). Breeding for cold tolerance in irrigated rice. Ciência Rural 30:909-917. doi: 10.1590/S0103-84782000000500031

Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., North, H., Marion-Poll, A., Bassi, R. (2007a). The *Arabidopsis aba4-1* mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. Plant Cell, 19(3):1048–1064. doi: 10.1105/tpc.106.049114

Dall'Osto, L., Luca, S., Fiore, A., Cazzaniga, S., Bassi, R. (2007b). Different roles of α- and β-branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. J. Biol. Chem., 282(48):35056-35068. doi: 10.1074/jbc.M704729200

De los Reyes, Morsy, M., Gibbons, J., Varma, T.S.N., Antoine, W., McGrath, J.M., Halgren, R., Redus, M. (2003). A snapshot of the low temperature stress transcriptome of developing rice seedlings (*Oryza sativa* L.) via ESTs from subtracted cDNA library. Theor. Appl. Genet., 107(6):1071-1082. doi: 10.1007/s00122-003-1344-7

Deambrosi, E., Méndez, R. y Roel, A. (1997). Estrategia en la producción de arroz: para un mejor aprovechamiento de las principales variables climáticas. Montevideo:INIA. 14 p. (Serie Técnica INIA Nº 89).

Demming-Adams, B., Adams III, W.W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., 43:599-626. doi: 10.1146/annurev.pp.43.060192.003123

Ehrenreich, I.M, Hanzawa, Y., Chou, L., Roe, J.L., Kover, P.X., Purugganan,M.D. (2009). Candidate gene association mapping of arabidopsis flowering time. Genetics, 183(1):325-335. doi: 10.1534/genetics.109.105189

Erling, S., Lindberg, B., Vibe Scheller, H. (1998). Photosystem I Is an Early Target of Photoinhibition in Barley Illuminated at Chilling Temperatures. Plant Physiol. 116:755-764. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.116.2.755

Falush, D., Stephens, M. Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164(4):1567-1587. Disponible en: http://www.genetics.org/content/164/4/1567.full.pdf+html

Fisch R. D., Ragot M., Gay G. (1996). A generalization of the mixture model in the mapping of quantitative trait loci for progeny from a bi-parental cross of inbred lines. Genetics, 143(1):571–577. Disponible en: http://www.genetics.org/content/143/1/571.full.pdf+html

Foster, J.G., Hess, J.L. (1980). Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. Plant Physiol., 66(3):482-487. doi:10.1104/pp.66.3.482

Foyer, C.H., Noctor, G. (2009). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. Antiox. Redox Sign. 11(4):861-905. doi:10.1089/ars.2008.2177

García, A.A., Kido, E.A., Meza, A.N., Souza, H.M., Pinto, L.R., Pastina, M.M., Leite, C.S., Silva, J.A., Ulian, E.C., Figueira, A., Souza, A.P. (2006). Development of an integrated genetic map of a sugarcane (Saccharum spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. Theor. Appl. Gen., 112(2):298-314. doi: 10.1007/s00122-005-0129-6

Garris, A.J., Tai, T. H., Coburn, J., Kresovich, S., McCouch, S. (2005) Genetic Structure and Diversity in Oryza sativa L . Genetics, 169(3):1631-1638.

Garrison, W. M. (1987) Reaction Mechanisms in the Radiolysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. Chem. Rev., 87(2):381-398. doi: 10.1021/cr00078a006

Glaszmann, J.C., Kaw, R.N., Khush, G.S. (1990) Genetic divergence among cold tolerant rices (Oryza sativa L.). Euphytica, 45(2):95-104. doi: 10.1007/BF00033276

Guo, Z., Ou, W., Lu, S., Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiol. Biochem., 44(11-12):828-836 doi: 10.1016/j.plaphy.2006.10.024

Hahn, M., Walbot, V. (1989). Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. Plant Physiol. 91(3):930-938. Disponible en línea: http://www.plantphysiol.org/content/91/3/930.full.pdf

Han, L., Qiao, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Cao, G., Kim, J., Lee, K., Koh, H. (2007). Identification of quantitative trait loci for cold response of seedling vigor traits in rice. J. Gen. Geno., 34(3):239-246. doi: 10.1016/S1673-8527(07)60025-3

Han, L., Qiao, Y.L., Cao, G.L., Zhang, Y.Y., AN, Y.P.,Ye, J.D., Koh, H.J. (2004). QTLs analysis of cold tolerance during early growth period for rice. Rice Sci., 11(5-6):245-250.

Hang, L.Z., Zhang, S.Y. (2004). Methods of characterization and evaluation of cold tolerance in rice. J. Plant Gen. Res., 5:75-80.

Hartl, D.L., Clark, A.G. (1997). Principles of population genetics. 4th Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 545 p.

Hartley, D.P., Kolaja, K.L., Reichard, J., Petersen, D.R. (1999). 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. Toxicol Appl. Pharmacol., 161(1): 23-33. doi: 10.1006/taap.1999.8788

Hirotsu, N., Makino, A., Ushio, A., Mae, T. (2004). Changes in the thermal dissipation and the electron flow in the water-water cycle in rice grown under conditions of physiologically low temperature. Plant Cell Physiol. 45(5):635-644. doi: 10.1093/pcp/pch075

Hirotsu, N., Makino, A., Yokota, S., Mae, T. (2005). The photosynthetic properties of rice leaves treated with low temperature and high irradiance. Plant Cell Physiol., 46(8):1377-1383. doi: 10.1093/pcp/pci149

Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I. (1996). Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize line. Physiol. Plant., 98(4):685-692 doi: 10.1034/j.1399-3054.1996.980402.x

Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 103(35):12987-12992. doi: 10.1073/pnas.060488210

Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., Xiong, L. (2008). Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. Plant Mol. Biol., 67(1-2):169-181. doi: 10.1007/s11103-008-9309-5

Huang, M., Guo, Z. (2005). Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. Biol. Plantarum, 49(1):81-84. doi: 10.1007/s00000-005-1084-3

Huang, J., Sun, S.J., Xu, D.Q., Yang, X., Bao, Y.M., Wang, Z.F., Tang, H.J., Zhang, H. (2009). Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that

encodes the zinc finger protein ZFP245. Biochem. Biophys. Res. Commun., 389(3):556–561. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.032

Huang, X. et al. (2010). Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. Nature Gen. 42(11): 961–967. doi: 10.1038/ng.695

Hugly, S., Somerville, C. (1992). A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. Plant Physiol., 99(1):197-202. doi: 10.1104/pp.99.1.197

Hur, J., Jung, K.H., Lee, C.H, An, G. (2004). Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. Plant Sci., 167(3):417-426. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.009

In Kuk, Y.I., Shin, J.S., Burgos, N.R., Hwang, T.E., Han, O., Cho, B.H., Jung, S., Guh, J.O. (2003). Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. Crop Sci., 43(6):2109-2117. doi: 10.2135/cropsci2003.2109

Ince, A.G., Karaca, M., Onus, A.N. (2010). Polymorphic Microsatellite Markers Transferable Across Capsicum Species. Plant Mol. Biol. Reporter. 28(2):285-291. doi: 10.1007/s11105-009-0151-y

InfoStat (2004). InfoStat versión 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, Y., Kobayashi,M., Seki, M.,Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. Plant Cell Physiol., 47(1):141-153. doi:10.1093/pcp/pci230

Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P., Arrese-Igor, C., Becana, M. (1998), Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiol., 116(1):173-181. doi:10.1104/pp.116.1.173

Jain, M., Khurana J.P. (2009). Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. FEBS J., 276(1):3148–3162 doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07033.x

Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Kapoor, S., Tyagi, A.K., Khurana, J.P. (2007). F-Box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. Plant Physiol., 143(4):1467-1483. doi 10.1104/pp.106.091900

Jannink, J.L., Bink, M.C.A.M., Jansen, R.C.(2001). Using complex plant pedigrees to map valuable genes. Trends Plant Sci. 6(8):337-342. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02017-9

Jannink, J.L., Walsh, B. (2002). Association mapping in plant populations. In Kang, M. S.(ed.). Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding. CABI: New York. p.59-68.

Jaspers, P., Kangasjärvi, J. (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. Physiol. Plant., 138(4):405-413. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x

Jeong, S.W., Choi, S.M., Lee,D.S., Ahn, S.N., Hur,Y., Chow,W.S., Park,Y.I. (2002). Differential susceptibility of photosynthesis to light-chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) depends on the capacity for photochemical dissipation of light. Mol. Cells 13(3):419-428.

Ji, B.H., Xie, H.S., Jiao, D.M., Ma, Q. (2001). Photochemical efficiency of PS and membrane lipid peroxidation in leaves of Indica and Japónica rice (*Oryza sativa* L.) under different temperatures and light intensities. In Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis. Queensland, Australia, August 18-23, 2001.

Jiang, C.J., Zeng, Z.B. (1997). Mapping quantitative trait loci with dominant and missing markers in various crosses from two inbred lines. Genetica, 101(1):47-56.

Juliano, BO. (1993). Rice in human nutrition. Los Baños: International Rice Research Institute and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Cap.1: Introduction: p.1-15.

Kantety, R.V., La Rota, M., Matthews, D.E., Sorrells, M.E. (2002). Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. Plant Mol. Biol. 48(5-6):501-510. doi: 10.1023/A:1014875206165

Kao, C.H. (2004). Multiple interval mapping for quantitative trait loci controlling endosperm traits. Genetics, 167(4):1987-2002. doi: 10.1534/genetics.103.021642

Kao, C.H. (2006). Mapping quantitative trait loci using the experimental designs of recombinant inbred populations. Genetics, 174(3): 1373-1386. doi: 10.1534/genetics.106.056416

Kariya, K. (2003). Chilling injuries in reproductive phase of rice plants. National Agricultural Research Center for Hokkaido. In: 3ra. Conferencia Internacional de arroz de Clima Templado. Uruguay.

Kashi, Y., King, D., Soller, M. (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. Trends Gen. 13(2):74-78. doi: 10.1016/S0168-9525(97)01008-1

Khush, GS. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant Mol. Biol., 35: 25-34. doi: 10.1007/978-94-011-5794-0_3

Kim, S-I, Tai, T.H. (2011). Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. Euphytica, 178(3):437-447. doi: 10.1007/s10681-010-0343-4

Kocsy, G., Galiba, G. Brunold, C. (2001). Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. Physiol. Plantarum, 113(2):158-164 doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1130202.x

Komatsu, S., Li, W., Konishi, H., Yoshikawa, M., Konishi, T., Yang, G. (2001). Characterization of a Ca21 dependent protein kinase from rice root: differential response to cold and regulation by abscisic acid. Biol. Pharm. Bull., 24(11):1316-1319. doi: 10.1248/bpb.24.1316

Kratsch, H.A., Wise, R.R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. Plant Cell Environ.23(4):337–350. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00560.x

Lee, S.C., Kim,J.Y., Kim, S.H., Kim,S.J., Lee,K., Han, S.K., Choi, G.S., Jeong, D.H., An, G., Kim, S.R. (2004). Trapping and characterization of cold-responsive genes from T-DNA tagging lines in rice. Plant Sci. 166(1):69–79. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.08.008

Lee, S.C., Lee, M.Y., Kim, S.J., Jun, S.H., An, G., Kim, S.R. (2005). Characterization of an abiotic stress inducible dehydrin gene,OsDhn1, in Rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Cells, 19(2):212-218. Disponible en: http://www.postech.ac.kr/life/pfg/International-133.pdf

Levine, R., Garlkand, D., Oliver, C., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, A., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol.,186:464-475. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-H

Li, C.C., Rutger, N. (1980). Inheritance of cool-temperature vigor in rice and its relationship with other agronomic characters. Corp Sci., 20(3):295-298.

Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of the photosynthetic light harvesting. Nature, 403(6768):391-395. doi: 10.1038/35000131

Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol. Ecol., 11(12): 2453-2465. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x

Li,Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. Mol. Biol.Evol., 21(6):991-1007. doi: 10.1093/molbev/msh073

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2,with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively in Arabidopsis. Plant Cell, 10(8):1391-1406. doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.10.8.1391

Liu, X., Lu, T., Yu, S., Li, Huang, Y., Huang, T., Zhang, L., Zhu, J., Zhao, Q., Fan, D., Mu, J., Shangguan, Y., Feng, Q., Guan, J., Ying, K., Zhang, Y., Lin, Z., Sun, Z., Qian, Q., Lu, Y., Han, B. (2007). A collection of 10.096 indica rice full-length cDNAs reveals highly expressed sequence divergence between *Oryza sativa* indica and Japónica subspecies. Plant Mol. Biol., 65(4):403-415. doi: 10.1007/s11103-007-9174-7

Ma, Q., Dai, X., Xu, Y., Guo, J., Liu, Y., Chen, N., Xiao, J., Zhang, D., Xu, Z., Zhang, X., Chong, K. (2009). Enhanced Tolerance to Chilling Stress in OsMYB3R-2Transgenic Rice Is Mediated by Alteration in Cell Cycle and Ectopic Expression of Stress Genes. Plant Physiol., 150(1):244-256. doi: org/10.1104/pp.108.133454

Mackill, DJ., Lei, X. (1997) Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. Crop Sci. 37(4):1340-1346.

Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. Mutat. Res., 424:83–95

Martin, M.L., Busconi, L. (2001). A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. Plant Physiol., 125(3):1442-1449. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.125.3.1442

Matthies, I.E., Weise, S. Förster, J. Röder, M.S. (2009). Association mapping and marker development of the candidate genes (1 → 3),(1 → 4)-β-d-Glucan-4-glucanohydrolase and (1 → 4)-β-Xylan endohydrolase 1 for malting quality in barley. Euphytica, 170(1-2):109-122. doi: 10.1007/s10681-009-9915-6

Maxwell, K., Johnson, GN. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J Exp. Bot., 51(345): 659-668. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerant. Trends Plant Sci., 7(9):405-410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9

Mittler,R., Vanderaauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci., 9(10):490-498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009,

Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu Rev. Plant Biol., 58: 459-481. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946

Morsy, M.R., Almutairia, A.M., Gibbonsa, J., Yunb,S.J., de los Reyesa, B.G. (2005). The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. Gene, 344(3):171-180. doi: 10.1016/j.gene.2004.09.033

Morsy, M.R., Jouve, L., Hausman, J.F., Hoffman, V., Stewart, J.M. (2007). Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (Oryza sativa L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. J. Plant Physiol., 164(2):157-167. doi: 10.1016/j.jplph.2005.12.004

Mukhopadhyay, A., Vij, S., Tyagi, A.K. (2004). Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. Proc Natl Acad Sci USA 101(16):6309–6314. doi: 10.1073/pnas.0401572101

Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol., 125(4):1557-1566. doi: 10.1104/pp.125.4.1558

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 153(3):473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Murata, N., Los, D.A. (1997). Membrana fluidity and temperature perception. Plant Physiol., 115:875-879. doi: 10.1104/pp.115.3.875

Nakagami, H., Pitzschke, A., Hirt, H. (2005). Abiotic stress series Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. Trends Plant Sci., 10(7):339-344. doi:10.1016/j.tplants.2005.05.009

Nakashima, K., Lam-Son P., T., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress- responsive gene expression in rice. Plant J., 51(4):617–630. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03168.x

Niyogi, K.K. (2000) Safety valves for photosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol., 3(6): 455-460. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00113-8

Niyogi, K.K., Shih,C., Chow, W.S., Pogson, B.J., DellaPenna, D., Björkman, O. (2001). Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein- deficient double mutant of Arabidopsis. Photosyn Res., 67(1-2):139-145. doi: 10.1023/A:1010661102365

Oh,S.J., Song, S.I., Kim, Y.S., Jang, H.J., Kim, S.Y., Kim, M., Kim, Y.K., Nahm, B.H., Kim, J.K. (2005). Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. Plant Physiol., 138(1): 341–351. doi: 10.1104/pp.104.059147

Oka, H. I. (1988). Origin of cultivated rice. Japan Sci. Soc. Press/Elsevier, Tokyo/Amsterdam.

Parisseaux, B., Bernardo, R. (2004). In silico mapping of quantitative trait loci in maize. Theor. Appl. Genet., 109(3):508–514. doi: 10.1007/s00122-004-1666-0

Park, M.R., Yun, K.Y., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Wijaya, E., Bajic, V.B., Yun, S.J., De Los Reyes, B.G. (2010). Supra-optimal expression of the cold-regulated OsMyb4 transcription factor in transgenic rice changes the complexity of transcriptional network with major effects on stress tolerance and panicle development. Plant Cell Environ., 33(12):2209–2230. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02221.x

Pereira da Cruz, R., Ineu Golombieski, J., Bazana, M. T., Cabreira, C., Foletto Silveira, T., Picolli da Silva, L. (2010). Alterations in fatty acid composition due to cold exposure at the vegetative stage in rice. Braz. J. Plant Physiol., 22(3): 199-207. Disponible en: http://www.scielo.br/pdf/bjpp/v22n3/v22n3a07.pdf

Pereira da Cruz, R., Milach, S.C. (2000) Melhoramiento genético para tolerancia ao frio em arroz irrigado. Ciência Rural, 30(5):909-917. doi: 10.1590/S0103-84782000000500031

Pereira Da Cruz, R., Milach, S.C., Federizzi, L.C. (2006). Inheritance of rice cold tolerance at the germination stage. Genet. Mol. Biol., 29(2):314-320. doi: 10.1590/S1415-47572006000200020

Pérez de Vida, F.B. (2010). Aspectos de la Ecofisiología del Cultivo de Arroz en Uruguay: Análisis de la Productividad en los últimos 15 años. En: Arroz: Resultados Experimentales 2009-2010. INIA, Treinta y Tres. Capítulo 8: 8-12 (INIA Serie Actividades de Difusión, 611).

Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H. and Knight,M.R. (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. Plant J., 18(5):491-497. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00471.x

Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Björkman, O., DellaPenna, D. (1998). Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and non-photochemical quenching in Arabidopsis mutants. Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13324-13329. doi: 10.1073/pnas.95.22.13324

Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell, 6(1):65-74. doi: 10.1105/tpc.6.1.65

Price,A.L., Patterson,N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A., Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. Nature Gen. 38:904-909. doi:10.1038/ng1847

Pritchard,J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A., Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. Am. J. Hum. Genet. 67(1):170-181. doi:10.1086/302959

Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarrayand RNA gel-blot analyses. Plant Physiol., 133(4):1755-1767. doi: 10.1104/pp.103.025742

Rahman, L., Khanam, M.S., Koh, H.J. (2008). QTL analysis for yield related traits using populations derived from an indica-japonica hybrid in rice (*Oryza sativa* L.). Czech J. Genet. Plant Breed., 44(3): 93-104. Disponible en: http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02543.pdf

Rivas, F., Fornes, F., Agustí, M. (2008). Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defenses in Citrus leaves. Env. Exp. Botany, 64(3): 256-263. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2008.07.006

Rohácek, K., Barták, M. (1999). Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. Photosynthetica, 37(3):339-363. doi: 10.1023/A:1007172424619

Routaboul, J.M., Fischer, S.F., Browse, J. (2000). Trieonic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. Plant Physiol., 124(4): 1697-1705. doi:10.1104/pp.124.4.1697

Rozen, S., Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, 132. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365

Rustérucci, C., Stallaert, V., Milat, M.L., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.P. (1996). Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitins in *Nicotiana*, Plant Physiol., 111(3):885–891. doi: 10.1104/pp.111.3.885

Sarkar, N., Kim, Y.K., Grover, A. (2009). Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. BMC Genomics, 10:393. doi:10.1186/1471-2164-10-393

Saruyama, H., Tanida, M. (1995). Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperatura-sensitive and –tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci.,109(2):105-113. doi: 10.1016/0168-9452(95)04156-O

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotech., 18(2):233-234. doi:10.1038/72708

Shacter, E. (2000). Protein oxidative damage. Methods Enzymol., 319:428-436.

Shahi, B.B., Khush, G.S. (1986). Genetic analysis of cold tolerance in rice. In: Proceedings International rice genetics symposium, 1., Los Baños: International Rice Research Institute, 931p. p 429-435.

Shulaev, V., Oliver, D.J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. Plant Physiol., 141(2):367-372. doi: 10.1104/pp.106.077925

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozakiy, K., Sekiz, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr. Opin. Plant Biol., 6(5):410-417. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00092-X

Somerville, C. (1995). Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA., 92(14):6215-6218. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41488/pdf/pnas01490-0009.pdf

Kintake Sonoike, K. (1996). Photoinhibition of photosystem I: its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. Plant Cell Physiol. 37: 239-247.

Stansel, J. (1975). Effective utilization of sunlight. In: Six Decades of Rice Research in Texas. Texas A&M University. Research monograph 4. Texas Agric. Exp. Sta. pp. 43-50

Sthapit, B.R., Witcombe, J.R. (1998). Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. Crop Sci. 38(3):660-665.

Suzuki, N., Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. Physiol. Plantarum 126(1):45-51. doi: 10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x

Szalma, S.J., Buckler IV, E.S., Snook, M.E., McMullen, M.D. (2005). Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks. Theor. Appl. Genet. 110(7):1324-1333 doi: 10.1007/s00122-005-1973-0

Takahashi, S., Murata, N. (2008). How the environmental stresses accelerate photoinhibition?. Trends Plant Sc. 13(4):178-184 . doi: 10.1016/j.tplants.2008.01.005

Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nakashima, K. (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. Mol Gen Genom., 284(3):173-183 doi: 10.1007/s00438-010-0557-0

Takesawa, T., Ito,M., Kanzaki, H., Kameya, N., Nakamura, I. (2002). Over-expression of glutathione-ζ transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. Mol. Breed., 9(2):93-101. doi: 10.1023/A:1026718308155

Tao, Z., Kou, Y., Liu, H., Li, X., Xiao, J., Wang, S. (2011). OsWRKY45 alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. J. Exp. Bot., 62(14):4863–4874. doi: 10.1093/jxb/err144

Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., Hirt, H. , Max, F. (2004). The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. Mol. Cell., 15(1):141–152. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.023

Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., McCouch, S. (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res., 11(8): 1441–1452. doi: 10.1101/gr.184001

Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R., Graner, A. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor. Appl. Genet. 106(3):411-422. doi: 10.1007/s00122-002-1031-0

Todaka, D., Nakashima, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. Rice, 5:6. doi: 10.1186/1939-8433-5-6

Tondelli, A., Francia, E., Barabaschi, D., Aprile, A., Skinner, J.S., Stockinger, E.J., Stanca, A.M., Pecchioni, N. (2006). Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. Theor. Appl. Genet., 112(3):445-454. doi: 10.1007/s00122-005-0144-7

Torres, M.A., Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Curr. Opin. Plant. Biol., 8(4): 397-403. Doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.014

Türkan, I., Melike, B., Özdemir, F., Hulusi, K. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci., 168(1):223-231. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.032

Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in response of plants to stress. Biotechnol. Lett. 30:967-977. doi:10.1007/s10529-008-9639-z

Vanacker, H., Tim L., Carver, W., Foyer, C.H. (2000). Early H2O2 accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. Plant Physiol., 123(4):1289-1300. doi:10.1104/pp.123.4.1289

Vannini, C., Locatelli,F., Bracale, M., Magnani,E., Marsoni, M., Osnato, M., Mattana, M., Baldoni, E., Coraggio, I. (2004). Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants. Plant J., 37(1):115-127. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01938.x

Varshney,R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotech., 23(1):48-55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005

Verhoeven, A.S., Demming-Adams, B., Adams III, W.W. (1997). Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. Plant Physiol., 113(3):817-824. doi:10.1104/pp.113.3.817

Vij, S., Tyagi, A.K. (2006). Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zin-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis. Mol. Gen. Genomics, 276(6):565-575. doi: 10.1007/s00438-006-0165-1

Vinod, M.S., Sharma, N., Manjunath, K., Kanbar, A., Prakash, N.B., Shashidhar, H.E. (2006). Candidate genes for drought tolerance and improved productivity in rice (*Oryza sativa* L.). J. Biosci., 31(1):69-74. doi: 10.1007/BF02705237

Wellburn, A. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. J. Plant Physiol., 144(3):307-313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2

Xiong, L., Yang, Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid–inducible mitogen-activated protein kinase. Plant Cell, 15(3):745-759. doi: 10.1105/tpc.008714

Xu, C.C., Li, L., Kuang, T. (2000). Photoprotection in chilling-sensitive and –resistant illuminated at a chilling temperature: role of the xanthophylls cycle in the protection against lumen acidification. Aust. J. Plant Physiol., 27(7):669-675. doi: 10.1071/PP00009

Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. Trends Plant Sci., 10(2):88-94. doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.012

Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Rev. Plant Biol.57: 781-803. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444

Yan,S.P., Zhang,Q.Y., Tang,Z.C., Su, W.A., Sun, W.N. (2005). Comparative proteomic analysis provides new insight into chilling stress responses in rice. Mol Cell Proteom., 5(3):484-496. doi:10.1074/mcp.M500251-MCP200 pp.484-96

Yang, G., Shen, S., Yang, S., Komatsu, S. (2003). OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, as induced in response to cold and gibberellin. Plant Physiol Biochem., 41(4):369-374. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00032-9

Yoshida, R., Kanno, A., Sato, T. and Kameyla,T. (1996) Cool-temperature-induced chlorosis in rice plants. Plant Physiol., 110(3):997-1005. doi:10.1104/pp.110.3.997

Yoshida, S. (1981). Fundamentals of rice crop science. 269 p. International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, Filipinas.

Young, A.J., Phillip, D., Ruban, A.V., Horton, P., Frank, H.A. (1997). The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. Pure Appl. Chem., 69(10):2125-2130. doi: 10.1351/pac199769102125

Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., et al. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nat. Genet.,38:203-208. doi:10.1038/ng1702

Yun, K.Y., Park, M.R., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Mauleon, R., Wijaya, E., Bajic, V.B., Bruskiewich, R., de los Reyes, B.G. (2010) Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of Japonica rice to chilling stress. BMC Plant Biol.,10:16. doi:10.1186/1471-2229-10-16

Zhang R.X., Wei, L.U. (2001). The effect of H2O2 on the structure and activity of rubisco in rice variety and its chlorophyll b less mutant. In Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis. Queensland, Australia, August 18-23. doi:10.1071/SA0403389

Zhang, G.L., Chen L.Y., Xiao, G.Y., Xiao Y.H., Chen, X.B., Zhang S.T. (2009). Bulked segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. Agr. Sci. China, 8(4):482-487. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60235-7

Zhang, M., Xu, Y., Akash, M., McCouch, S., Oard, J.H. (2005). Identification of candidate markers associated with agronomic traits in rice using discriminant analysis. Theor. Appl. Genet., 110(4): 721-729. doi: 10.1007/s00122-004-1898-z

Zhang, Y.M, Xu, S. (2004). Mapping Quantitative Trait Loci in F2 Incorporating Phenotypes of F3 Progeny. Genetics, 166(4): 1981-1993. doi:10.1534/genetics.166.4.1981

Zhang, Z.H., Su, L., Li, W., Chen, W., Zhu, Y-G. (2005) A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.) Plant Sci., 168(2):527-534. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.09.021

Zhao, K., Aranzana, M.J., Sung Kim, S., Lister, C., Shindo, C., Tang, C., Toomajian, C., Zheng, H., Dean, C., Marjoram, P., Nordborg, M. (2007). An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. PLoS Genet 3(1): e4. doi:10.1371/journal.pgen.0030004

Zhao, K., Tung, C.W., Eizenga, G.C., Wright, M.H., Liakat Ali, M., Price, A.H., Norton, G.J., Rafiqul Islam, M., Reynolds, A., Mezey, J., McClung,A.M., Bustamante, C.D., McCouch, S.R. (2011). Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in Oryza sativa.Nature comm. 2: 467. doi:10.1038/ncomms1467

Zhi-juan, J., Yu-xiang, Z., Da-li, Z., Liang-yong, M., Xi-ming, L., Bing-xin, L., Chang-deng, Y. (2010). Identification of QTLs for rice cold tolerance at plumule and 3-leaf-seedling stages by using QTLNetwork software. Rice Science, 17(4): 282-287. doi: 10.1016/S1672-6308(09)60028-7

Zhu, C., Gore, M., Buckler, E., Yu, J. (2008). Status and prospects of association mapping in plants. The Plant Genome, 1(1):5-20. doi: 10.3835/plantgenome2008.02.0089

Zhu, C., Yu, J. (2009). Nonmetric multidimensional scaling corrects for population structure in association mapping with dierent sample types. Genetics, 182(3):875-888. doi: 10.1534/genetics.108.098863