

Informe Proyecto ProArroz 2020-2021

Título del proyecto: MAPEO ASOCIADO A TOLERANCIA EN GERMINACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS EN ARROZ

*Ing. Agr. Durand Mariano, **Ing. Agr. (Dr.) Maiale Santiago

* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ** Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH).

INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA

En arroz (*Oryza sativa* L.) la temperatura mínima para el crecimiento se considera en 10 °C (Yoshida, 1981) y para el caso de la germinación, la temperatura óptima se encuentra entre 20 y 35°C (Yoshida, 1981) siendo la temperatura crítica mínima 10°C y la máxima 45°C (Yoshida, 1981). En Argentina, extensas áreas arroceras se encuentran sometidas a bajas temperaturas al inicio de la temporada de crecimiento y al final del ciclo del cultivo. En dichas zonas, la temperatura mínima media en las etapas vegetativas más tempranas promedia los 13°C (Livore, 2006).

Las bajas temperaturas condicionan el proceso de germinación, disminuyendo la velocidad de absorción de agua, la activación enzimática y la división y elongación celular (Basuchaudhuri, 2014).

Por lo tanto, el mejoramiento de arroz por tolerancia a frío en estadios tempranos se vuelve importante en el desarrollo de nuevos materiales para realizar siembras tempranas.

Actualmente, el uso del mapeo por asociación del genoma completo (GWAS) se usa cada vez más en la identificación de genes asociados con caracteres fenotípicos de interés. Esta técnica está basada en el desequilibrio de ligamiento y en las recombinaciones históricas de una población para mapear regiones o genes. En arroz se ha utilizado para estudiar la tolerancia a Aluminio (Famoso et al., 2011); tolerancia a salinidad (Kumar et al., 2015), la morfología de grano, planta y raíces (Biscarini et al., 2016) y longitud de grano (McCouch et al., 2016) entre muchos otros caracteres.

Por otro lado, en el caso de la germinación a bajas temperaturas, es importante conocer las características climáticas de la región objetivo para que los protocolos de fenotipado reflejen las condiciones reales, de lo contrario, se podrían identificar genes que luego no sean importantes en las condiciones de cultivo y por lo tanto no resulten efectivos los marcadores desarrollados para el proceso de mejora.

Entonces, el objetivo de este proyecto es identificar genes o regiones genómicas asociadas a tolerancia a frío en estadio de germinación mediante mapeo de asociación como asistencia al mejoramiento del programa Arroz del INTA-Concepción del Uruguay.

OBJETIVOS

Para el cumplimiento del objetivo general, el plan de trabajo se dividió en 3 etapas.

- A. Establecer una metodología de evaluación adecuada para la región objetivo.
- B. Realizar el fenotipado de un panel de diversidad en base a la metodología específica.
- C. Llevar a cabo el mapeo de asociación para identificar los genes involucrados.

LOGROS Y OBJETIVOS ALCANZADOS

Durante el desarrollo de este proyecto se cumplieron las dos primeras etapas exitosamente, restando la tercera etapa.

A. Desarrollo de la metodología de evaluación

Como primer paso, se realizó una investigación climática de la región objetivo para conocer las temperaturas del suelo para siembras tempranas en arroz en el área de influencia de la EEA Concepción del Uruguay. Se utilizaron datos de temperatura a 5 cm de profundidad obtenidos de la estación meteorológica de EEA para el período de 2003 a 2011 durante los meses de septiembre y octubre. Además, se utilizaron datos horarios de 2018 para establecer la variación de la temperatura durante el día.

El período seleccionado para la metodología de evaluación fue la primera quincena de septiembre, cuya temperatura media fue de 15.1°C (Figura 1). El rango de temperatura de trabajo fue de 17°C de máxima y 13°C de mínima con un perfil horario como se muestra en la figura 3.

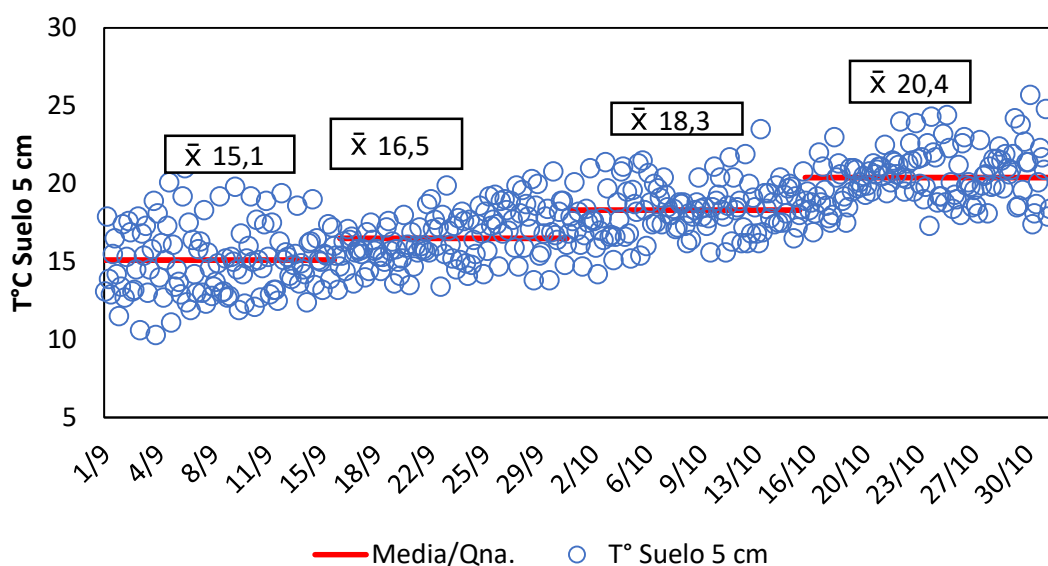


Figura 1. Temperaturas medias diarias a 5 cm de profundidad de suelo. 2003-2011 EEA INTA Concepción del Uruguay.

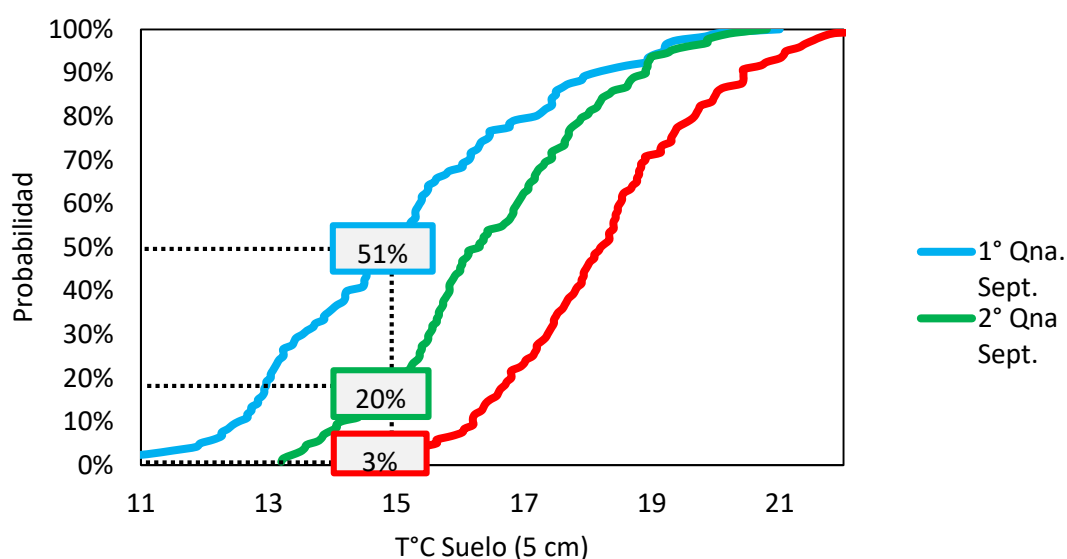


Figura 2. Distribución de probabilidades de Temperaturas. Base de datos 2003-2011 EEA INTA Concepción del Uruguay.

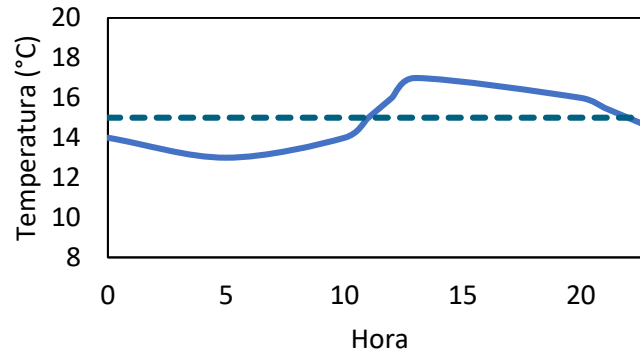


Figura 3. Ciclo térmico establecido para la metodología de evaluación.

Como se observa en la figura 2, la probabilidad de ocurrencia de temperaturas por debajo de 15°C es del 51% en la primera quincena de septiembre y 20% en la segunda quincena.

Para poner a punto la metodología, se utilizó un grupo de cultivares y líneas promisorias que se ensayaron en cámara de germinación en laboratorio y bajo condiciones ambientales en umbráculo, registrando se las temperaturas del suelo con un datalogger.

Los materiales utilizados fueron:

- Puita
- Guri
- Memby-Porá
- Cr1056
- Sur 15
- Cr1204
- ECR78
- Cr741

Las variables medidas en laboratorio fueron: semillas germinadas, longitud y peso fresco de radícula y coleóptile, a 14 y 21 días después de iniciado el ensayo.

En el ensayo a campo se midieron las siguientes variables: plantas emergidas y altura de planta a 14, 21 y 28 días y peso seco a 28 días.

En las tablas 1 y 2 se presentan las medias de las variables evaluadas en el ensayo de laboratorio y del ensayo a campo, respectivamente.

Genotipo	SG 14	LongRad 14	LongCol 14	PesoRad14	PesoCol 14	SG 21	LongRad 21	LongCol 21	PesoRad21	PesoCol 21
Gurí	9	22,9	9,7	6,0	10,6	8	33,9	24,7	7,3	19,7
Memby Porá	10	23,4	10,5	7,7	14,2	9	39,0	27,9	8,3	26,6
Cr 1056	10	25,0	12,6	5,4	18,0	10	43,0	25,3	13,3	30,4
SUR-15	10	23,0	9,4	5,5	9,4	10	46,5	27,4	11,2	24,9
Cr 1204	6	13,9	11,2	2,7	10,4	5	27,8	25,8	7,5	27,4
ECR 78	7	20,8	12,4	4,5	11,8	6	30,2	26,5	10,0	28,6
Cr 741	9	21,3	11,1	5,7	12,7	10	33,1	26,0	10,2	26,8
Puitá	9	29,0	12,1	7,4	15,1	10	43,6	31,1	8,3	25,7

Tabla 1. Valores medios de los parámetros medidos en laboratorio.

Genotipo	1° Conteo	Altura 14 DDS	2° Conteo	Altura 21 DDS	Conteo Final	Altura 28 DDS	PMS/Plantula
Gurí	42	17,8	42	59,1	46	75,0	9,1
Memby Porá	36	20,0	44	57,3	45	81,4	10,4
Cr 1056	44	22,0	44	64,9	45	88,9	13,7
SUR-15	40	17,5	46	61,2	46	93,6	16,6
Cr 1204	22	19,6	27	63,9	27	90,8	12,7
ECR 78	32	21,9	38	64,4	39	86,6	12,8
Cr 741	40	18,2	42	55,5	43	71,5	8,7
Puitá	36	20,8	40	56,9	41	86,0	9,6

Tabla 2. Valores medios de los parámetros medidos a campo.

Una vez obtenidos los valores de las variables correspondiente a cada ensayo, se realizó un análisis de correlación entre estos parámetros con el objetivo de evaluar cuales son los más importantes para tener en cuenta en la realización del análisis del panel de diversidad.

p-valor Correlación Lab * Campo											
LongRad 14	0,29	3,10E-04	0,01	0,01	0,18	0,65	0,59	0,38	0,31	0,73	0,48
	LongCol 14	0,87	9,40E-05	0,51	0,94	0,34	0,04	3,60E-04	0,15	0,41	0,92
		PesoRad 14	0,02	0,05	0,13	0,99	0,79	0,64	0,07	0,14	0,11
			PesoCol 14	0,18	0,83	0,15	0,13	4,10E-03	0,75	0,93	0,62
				LongRad 21	0,02	0,02	0,63	0,68	0,53	0,29	0,25
					LongCol 21	0,28	0,06	0,59	0,27	0,53	0,64
						PesoRad 21	1,70E-03	0,16	0,13	0,17	0,02
							PesoCol 21	0,05	0,31	0,2	0,33
								Altura 14 DDS	3,50E-03	0,11	0,39
									Altura 21 DDS	1,30E-04	3,00E-04
										Altura 28 DDS	1,50E-07
											PMS

Tabla 3. Matriz análisis de Correlación.

En la tabla 3 se presentan los p-valores correspondientes al análisis de correlación entre las variables de laboratorio y las de campo. En resumen, entre la variable LongCol 14 (laboratorio) y la variable Altura 14 DDS (campo) existe una correlación fuerte y significativa. El coeficiente de Pearson para esta correlación es 0.91, con un p-valor de 0.00036. En la figura 4 se representa la relación entre ambas variables.

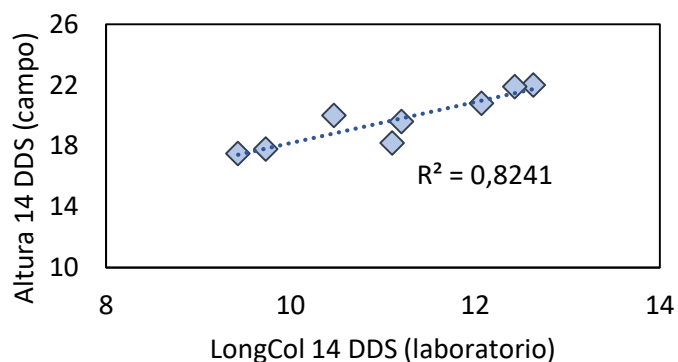


Figura 4. Gráfico de dispersión variables laboratorio*campo.

B. Evaluación del panel de diversidad

Una vez desarrollada y validada la metodología de evaluación, se realizó el análisis del panel de diversidad.

El Rice Diversity Panel (RDP-1) es una colección global de más de 400 accesiones de *Oryza Sativa* que se encuentran secuenciadas. En el RDP-1 están representadas las cinco subpoblaciones más importantes de los grupos varietales INDICA y JAPÓNICA.

Este panel se multiplicó en EEA Concepción del Uruguay, lográndose multiplicar exitosamente alrededor de 350 materiales. Las accesiones de este panel proceden de diversas regiones del planeta y la multiplicación en escala debe realizarse en invernadero por lo que no todas las líneas llegan a completar el ciclo. Para los análisis de GWAS se requiere un mínimo de 200 accesiones y esos requerimientos se lograron en el desarrollo de este proyecto.

La temperatura de ensayo para frío fue 17°C de máxima y 13°C de mínima con una media de 15°C respetando el principio de igualar la suma térmica a los datos climáticos. El control se realizó a 28°C. Se midió en frío a 14 y 21 días mientras que en control se realizaron mediciones a 7 días. Los parámetros medidos fueron los mismos que en ensayo anterior para las condiciones de laboratorio. Se realizaron mediciones por triplicado con un número de 10 semillas por replicado y por cada tiempo de medición. Todas las semillas fueron tratadas con calor (50°C durante 5 días) para eliminar la dormancia.

El número de accesiones evaluadas del panel de diversidad hasta este momento fueron 271 en control, 246 a 14 días y 219 a 21 días. En la tabla 4 se detalla el número de líneas evaluadas por subpoblación y a continuación la gráfica y análisis para los parámetros de longitud del coleóptilo a 14 días de frío (ARO: aromáticos; AUS: aus; IND: indica; TEJ: japónica templado; TRJ: japónica tropical).

Subpopulation group (PCA)	Control	14 Frío	21 Frío
ARO	10	9	8
AUS	49	47	39
IND	65	58	48
TEJ	75	67	72
TRJ	72	65	52
TOTAL	271	246	219

Tabla 4. Número de accesiones evaluadas por subpoblación.

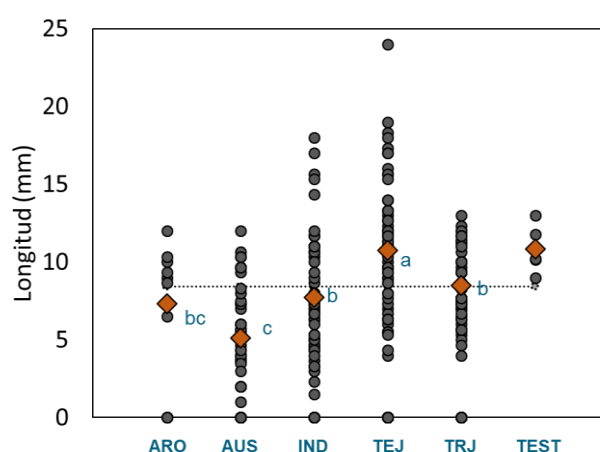


Figura 5. Longitud de coleoptile 14 frío en función de las líneas por subpoblación. ANOVA longitud promedio para cada subpoblación (p -valor= 0.0001).

Se observan diferencias significativas entre grupos, siendo la subpoblación Japónica Templada la de mejor comportamiento para la variable longitud de coleoptile 14 frío. Sin embargo, existen numerosas accesiones de la subpoblación Indica con excelentes valores y superiores a los testigos. Éstas líneas podrían incorporarse al plan de cruzamientos como progenitores en el programa de mejoramiento.

Accesion	subpob	LongCol14
Vavilovi	TEJ	24
Melanotrix	TEJ	19
Agostano	TEJ	18.33
Ai-Chiao-Hong	IND	18
Kon Suito	TEJ	18
Norin 20	TEJ	17.33
Stegaru 65	TEJ	17
WIR 3764	TEJ	17
Yodanya	IND	17
Chodongji	TEJ	16
Baber	TEJ	15.67
TKM6	IND	15.67

Tabla 5. Líneas con mayores valores de longitud de coleoptile, 14 DDS.

En la tabla 5, se listan las 12 accesiones con mejores valores de longitud de coleóptilo a 14 días, donde se destacan 3 materiales pertenecientes a la subespecie Indica.

Con los datos obtenidos se elaboraron diversos índices extraídos del trabajo de da Cruz y Kothe Milach (2004) que consistieron en:

GI: índice de germinación: $((N_1 + N_2) / 2) / 10 * 100$, siendo N_1 y N_2 el número de semillas germinadas a 14 y 21 días respectivamente y 10 el número de semillas por replicación.

PERCOL14 y PERCOL21: porcentaje de semillas con coleóptilo superior a 2 mm: $(N_1 * 100) / 10$ o $(N_2 * 100) / 10$, siendo N_1 y N_2 el número de semillas germinadas a 14 y 21 días respectivamente y 10 el número de semillas por replicación.

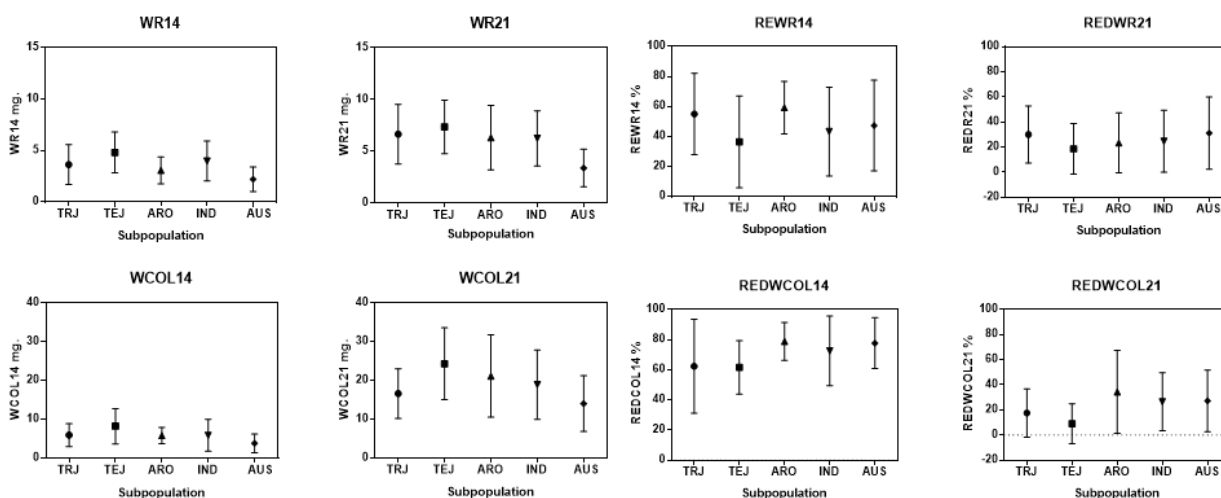
REDCOL14 y REDCOL21: porcentaje de reducción del largo del coleóptilo a 14 o 21 días en frío con relación al control: $((LCOL14 \text{ o } LCOL21 * 100) / LCcontrol) - 100$, siendo LCOL14 o LCOL21 el largo del coleóptilo a 14 o 21 días de frío y LCcontrol, el largo del coleóptilo en condiciones control.

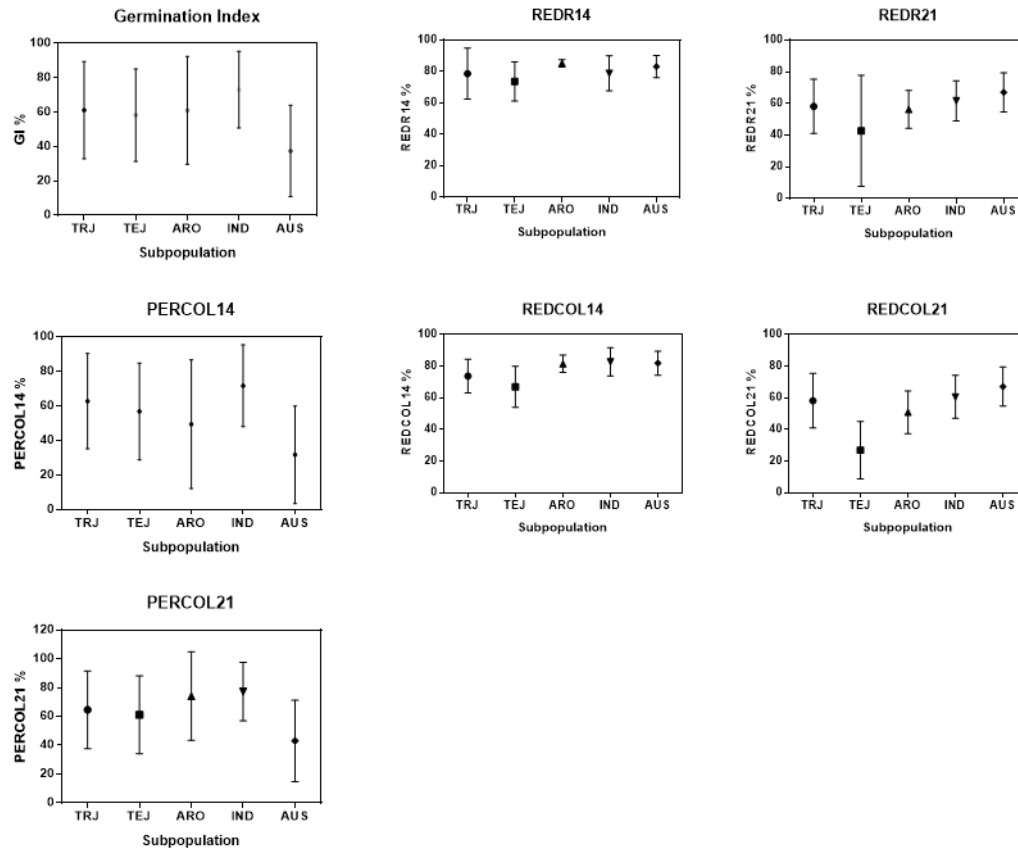
REDR14 y REDR21: porcentaje de reducción del largo de la radícula a 14 o 21 días en frío con relación al control: $((LR14 \text{ o } LR21 * 100) / LRcontrol) - 100$, siendo LR14 o LR21 el largo de la radícula a 14 o 21 días de frío y LRcontrol, el largo de la radícula en condiciones control.

REDWCOL14 y REDWCOL21: porcentaje de reducción del peso del coleóptilo a 14 o 21 días en frío con relación al control $((WCOL14 \text{ o } WCOL21 * 100) / WCcontrol) - 100$, siendo WCOL14 y WCOL21 el peso fresco del coleóptilo a 14 y 21 días de frío y WCcontrol el peso fresco en condiciones control.

REDWR14 y REDWR21: porcentaje de reducción del peso de la radícula a 14 o 21 días en frío con relación al control $((WR14 \text{ o } WR21 * 100) / WRcontrol) - 100$, siendo WR14 y WR21 el peso fresco de la radícula a 14 y 21 días de frío y WRcontrol el peso fresco en condiciones control.

A continuación, se presentan las gráficas de los valores obtenidos agrupados por subpoblación mostrando las medias con el desvío estándar.





Como se observa en los gráficos, las accesiones pertenecientes a la subpoblación AUS presentaron mayor susceptibilidad a germinación en frío. Mientras que, las accesiones de la subpoblación TEJ, mostraron un mejor comportamiento para el carácter.

C. Mapeo de asociación de genoma completo

Aún restan medir unas 40 accesiones que presentaron problemas bajo los tratamientos por frío. Con la evaluación de éstas líneas se concluiría con el segundo objetivo. Una vez completada la evaluación fenotípica del panel, se continuará con la última etapa, la cual consiste en analizar los datos mediante el mapeo de asociación.

Bibliografía:

- Basuchaudhuri P (2014). Cold tolerance in Rice Cultivation. Ed: CRC Press, Boca Raton, FL, USA ISBN 978-1-4822-4517-2.
- Biscarini F, Cozzi P, Casella L, Riccardi P, Vattari A, Orasen G, et al. (2016) Genome-Wide Association Study for Traits Related to Plant and Grain Morphology and Root Architecture in Temperate Rice Accessions. PLoS ONE 11 (5): e0155425. doi:10.1371/journal.pone.0115425.
- Da Cruz RP, Kothe Milach SC (2004). Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluations and characterization of genotypes. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 61 (1):1-8.
- Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung CW, Wright MH, et al. (2011) Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. PLoS Genet 7(8): e1002221. doi:10.1371/journal.pgen.1002221.
- Kumar V, Singh A, Amitha Mithra SV, Krishnamurthy SL, Parida SK, Jain S, Tiwari KK, Kumar P et al (2015) Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). DNA Research, 1-13 doi: 10.1093/dnares/dsu046.
- Livore AB. (2006) La genética del arroz. En: El arroz su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos. Editor: Benavidez RA. Editorial UNL-UNER. Concepción del Uruguay, Argentina.
- McCouch S, Wright M, Tung C-W, Maron L, McNally K, Fitzgerald M, Singh N, DeClerck G, et al (2016) Open Access Resources for Genome Wide Association Mapping in Rice. Nature Comm, 7 (10532) 4 Feb online doi 10.1038/ncomms10532.
- Yoshida S, 1981. Fundamentals of rice crop science. IRRI Los Baños, Laguna, Philippines.