

Metodo rápido de clasificación de genotipos de arroz por su tolerancia a las bajas temperaturas, basado en parámetros cuantitativos e independientes del operador, determinados mediante técnicas no invasivas

Michelini María Carolina, Ayelén Gazquez, Mariana Leonela Checovich, Santiago Javier Maiale*, Ana Bernardina Menéndez, Andrés Alberto Rodríguez

* Autor de correspondencia

Laboratorio de Fisiología y Asistencia al Mejoramiento Vegetal, Instituto Tecnológico Chascomús (INTECH-CONICET) Intendente Marino Km 8.2- B7130IWA, Chascomús, Argentina; Tel: +54 2241 430323; Fax: +54 2241 424048. E-mail: smaiale@intech.gov.ar

Ing. M. C. Michelini: INTECH, cmichelini@intech.gov.ar,

Dra. A. Gazquez: ICBiBE, UV, Ayelen.Gazquez@uv.es

Dra. M. L. Checovich: INTECH, mchecovich@intech.gov.ar

Dra. A. B. Menéndez: FCEyN-UBA anamen@bg.fcen.uba.ar

Dr. A. A. Rodríguez: INTECH, andresrodriguez@conicet.gov.ar

Palabras clave: *Oryza sativa*, estrés por frío, técnicas no destructivas, parámetros de crecimiento, parámetros fotosintéticos

INTRODUCCIÓN

Los agricultores de regiones templadas siembran arroz durante la primavera para evitar los eventos fríos al final del ciclo del arroz (*Oryza sativa*) cuando se produce la formación del grano (FARELL et al., 2003). Esta práctica implica que el arroz debe desarrollarse, desde la germinación hasta estados vegetativos avanzados, bajo un rango de estrés de por baja temperaturas (BT) que comienza alrededor de 20 °C a 12-13 °C (ALLEN y ORT, 2001). La obtención de genotipos con tolerancia a BT mejorados, podría ser una vía para aumentar los rendimientos de una manera ambiental y económicamente sostenible. Sin embargo, para que la selección selectiva sea efectiva, debe haber variación genética presente en la población examinada (HILL, 2001).

La detección de una mejor tolerancia al estrés y mayores rendimientos en condiciones de campo a menudo impone problemas debido a la variabilidad del clima, las condiciones edáficas y las prácticas de manejo (TAVAKKOLI et al., 2012). Paralelamente, las cámaras de cultivo con ambiente controlado a menudo están limitadas en volumen y número, lo que priva al investigador de la posibilidad de llevar a cabo experimentos a gran escala, rápidos, económicos y eficientes con plantas que completan su ciclo de vida. Por lo tanto, el desarrollo de indicadores fisiológicos de tolerancia a BT en plántulas, podría ser un enfoque indirecto útil para la detección de la tolerancia a dicho estrés en grandes poblaciones (YE et al., 2009).

Más recientemente, se demostró que parámetros adicionales relacionados con la fotosíntesis y el crecimiento distinguen entre genotipos de arroz sensibles y tolerantes a BT, tales como: la tasa fotosintética neta (P_n), la conductancia estomática (G_s), algunos parámetros de la prueba OJIP y el área debajo de la hoja curva de crecimiento (GAZQUEZ et al., 2015; 2018; 2020; VILAS et al., 2020). La prueba OJIP es una técnica que describe en detalle el estado de las estructuras relacionadas con el complejo del fotosistema II (PSII). Incluye la eficiencia fotoquímica máxima de PSII (FV/FM), que representa la eficiencia máxima con la que un fotón absorbido da

como resultado la reducción de la quinona A, la eficiencia máxima del transporte de electrones en PSII más allá de la quinona A reducida ($\Psi E0$), y el γRC , lo que puede reflejar alteraciones del centro de reacción (RC) del PSII activo a través de cambios en la clorofila activa asociada al RC (STRASSER et al., 2000).

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales vegetales. Se utilizaron semillas de un conjunto de 405 genotipos, 334 de los cuales representan las 5 subpoblaciones de arroz: 56 aus y 82 indica, 93 japónica templada, 89 japónica tropical y 14 genotipos aromáticos. Además, el estudio incluyó 58 genotipos mezclados y 13 no clasificados. Entre el conjunto de genotipos estudiados, hubo 24 y 25 previamente caracterizados bibliográficamente de manera respectiva como tolerantes y sensibles BT, que se usaron como referencia.

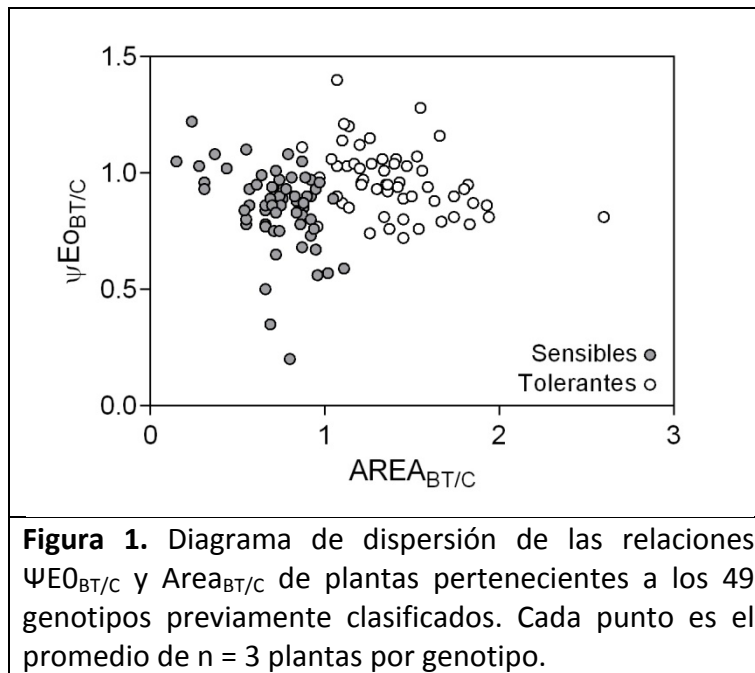
Condiciones de crecimiento. Las semillas de todos los genotipos se sembraron y cultivaron en macetas bajo condiciones óptimas en una cámara de cultivo acorde a Gazquez et al (2015) hasta el tiempo de aparición de la tercera hoja de la plántula (T3). La mitad de las macetas dentro de cada genotipo se transfirieron a otra cámara de cultivo en condición de BT que difería del tratamiento control en que la temperatura promedio diaria fue de 16°C (20/13 °C, día/noche). Posteriormente, se midieron diferentes parámetros en la tercera hoja de plantas intactas.

Parámetros de crecimiento. La longitud de la hoja de la tercera hoja se midió con una regla desde T3 hasta el tiempo en que la hoja alcanzó su longitud final (TF). Los datos de longitud de hoja en función del tiempo se ajustaron a diferentes funciones polinómicas según Zhu y Chen (2015), minimizando la suma total de errores cuadráticos (SSE) para cada punto de la curva de crecimiento, utilizando la herramienta Solver del software Excel®. El SSE más bajo se obtuvo con una función polinomial de grado 5 en todos los casos. Luego, se calculó el valor del área por debajo de la curva de crecimiento (Area, en adelante) utilizando el Software Matlab®.

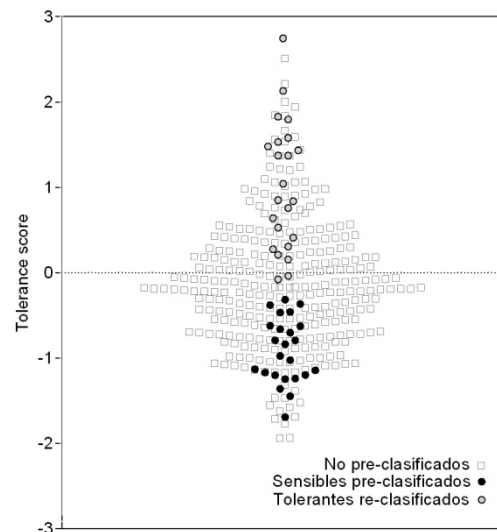
Parámetros de intercambio de gases y parámetros OJIP. P_n y G_s y la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a determinada mediante OJIP-test se analizaron en la tercera hoja a TF acorde a Gazquez et al (2015). Los parámetros γRC , FV/FM y $\Psi E0$ se calcularon según las ecuaciones descritas por Bordenave et al. (2019) y Puig et al. (2021).

Análisis de los datos. Se calculó la relación entre los datos obtenidos bajo la condición BT y los obtenidos bajo la condición control (BT/C) para Area, P_n , G_s , γRC , FV/FM y $\Psi E0$, en los 49 genotipos de referencia de estrés (sensibles y tolerantes). Las proporciones se procesaron mediante análisis discriminante canónico (ADC). Para obtener la mejor discriminación entre genotipos tolerantes y sensibles, se realizaron varias rondas de análisis, bajando parámetros hasta obtener el menor error de clasificación. Los parámetros restantes en la función ADC resultante (FADC) se usaron para obtener una puntuación de tolerancia a BT o tolerance score (ST) para cada genotipo, introduciendo los datos paramétricos previamente obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



También se calculó un valor de TS para cada genotipo del panel de diversidad no clasificado previamente de manera bibliográfica, introduciendo en F_{ADC} los datos de $Area_{BT/C}$ y $\Psi E_{O_{BT/C}}$ correspondientes. Los resultados de la puntuación de todos los genotipos RDP1 sobre la base de su TS mostraron que, en general, alrededor del 40 % de los genotipos del panel serían tolerantes (valores positivos de TS; Figura 2).



Dentro de las subespecies *indica ssp.* y *japonica ssp.*, los genotipos tolerantes representaron, respectivamente, el 17% y el 55% del total. Al analizar a nivel de subpoblaciones, los resultados mostraron que, en promedio, las subpoblaciones japónica tropical, aus e indica fueron sensibles,

mientras que las subpoblaciones aromática y japónica templada fueron tolerantes.

CONCLUSIÓN

Un rasgo que diferencia al método presentado respecto de otros similares anteriores es la inclusión de un panel de diversidad de arroz, que representan de manera integral la variabilidad genética de *O. sativa*. La aplicación de dicho rasgo dio como resultado niveles de tolerancia a BT de sus subespecies y subpoblaciones consistentes con informes anteriores. Otro rasgo metodológico que diferencia nuestro sondeo de germoplasma de arroz para la tolerancia a BT de los anteriores, es el establecimiento de un tratamiento de control para la temperatura de estrés. En el presente trabajo, las relaciones $\text{Area}_{\text{BT/C}}$ y $\Psi\text{E}_{\text{BT/C}}$, fueron los dos parámetros fisiológicos que permitieron diferenciar con mayor precisión entre los genotipos previamente descritos como tolerantes y sensibles a BT. Ambos parámetros se midieron en plántulas con técnicas que no alteraron las plantas lo que permitiría realizar mediciones en un gran número de plantas, en poco tiempo. Los datos fáciles y rápidos de obtener son un rasgo experimental deseable cuando se trata de programas de mejoramiento, ya que comúnmente requieren analizar una gran cantidad de plantas por genotipo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, Damian. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. **Trends in Plant Science**, 6, 36-42, 2001.
- Bordenave, Cesar. Chlorophyll a fluorescence analysis reveals divergent photosystem II responses to saline, alkaline and saline-alkaline stresses in the two *Lotus japonicus* model ecotypes MG20 and Gifu-129. **Acta Physiologiae Plantarum**, 41, 1-13, 2019.
- Farrell, T. C. Avoiding low temperature damage in Australia's rice industry with photoperiod sensitive cultivars. **Proceedings of the 11th Australian Agronomy Conference**. Victoria, Deakin University, 2003.
- Gazquez, Ayelén. Redox homeostasis in the rice leaf growth zone plays a key role in cold tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 71, 1053-1066, 2020.
- Gazquez, Ayelén. Physiological response of multiple contrasting rice (*Oryza sativa* L) cultivars to suboptimal temperatures. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 201, 117–127, 2015.
- Gazquez, Ayelén. Rice tolerance to suboptimal low temperatures relies on the maintenance of the photosynthetic capacity. **Plant Physiology and Biochemistry**, 127, 537-552, 2018.
- Hill, W. G. Selective Breeding. In **Encyclopedia of Genetics**, London, Academic Press, 2001.
- Puig, María Lucrecia. Patterns of physiological parameters and nitrogen partitioning in flag leaf explain differential grain protein content in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, 168, 457-464, 2021.
- Strasser, Reto. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In **Probing photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**, London, CRC press, 2000.
- Tavakkoli, Ehsan. A comparison of hydroponic and soil-based screening methods to identify salt tolerance in the field in barley. **Journal of experimental botany**, 63, 3853-3867, 2012.
- Vilas, Juan. Close relationship between the state of the oxygen evolving complex and rice cold stress tolerance. **Plant Science**, 296, 110488.
- Ye, C. Cold tolerance in rice varieties at different growth stages. **Crop and Pasture Science**, 60, 328-338, 2009.
- Zhu, Si. Numerical solution of a microbial growth model applied to dynamic environments. **Journal of microbiological methods**, 112, 76-82, 2015.