



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

*Trabajo de Tesis Doctoral:*

**“Análisis de la respuesta del arroz a  
temperaturas subóptimas: un enfoque  
integrado”**

---

Tesista: *Ayelén Gázquez*

Director: *Andrés Alberto Rodríguez*

Director: *Santiago Javier Maiale*

Co-Directora: *Mónica Laura Casella*

Año: *2017*



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



# “Analysis of the rice response to suboptimal temperatures: an integrated approach”

Student: Ayelén Gázquez

Supervisor from UNLP: Andrés Alberto Rodríguez

Supervisor from UA: Gerrit T.S. Beemster

Year: 2017

THESIS PRESENTED AS PART OF A DOUBLE PHD TO OBTAIN THE DIPLOMAS OF:

**-Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas – Área Ciencias Biológicas** [Doctor from the Faculty of Exact Sciences – Biologic Sciences area] (UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA)

**-Doctor in de wetenschappen: biologie** [Doctor of Science: Biology] (UNIVERSITEIT ANTWERPEN)

La presente Tesis doctoral para obtener los títulos de: **Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas – Área Ciencias Biológicas**; y **Doctor in de wetenschappen: biologie**; ha sido realizada en su mayoría en el **Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH)** en el grupo **Laboratorio de Fisiología del Estrés Abiótico en Plantas** en Argentina. Un año de la investigación ha sido realizada en el **Department of Biology** de la **Universiteit Antwerpen** en el grupo **Inegrated Molecular Plant Physiology Research (IMPRES)** en Bélgica. La participación en ambos grupos llevó a un convenio de **doblo Doctorado** entre la **UNLP** y la **UA**. Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de Andrés Alberto Rodríguez y Santiago Javier Maiale y la co-supervisión de Mónica Laura Casella en la UNLP, y la supervisión de Gerrit T.S. Beemster en la UA.



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

I I B - I N T E C H



Universiteit  
Antwerpen



## **AGRADECIMIENTOS**

Al final de mi Tesis, tengo que placentemente agradecer a muchas personas que contribuyeron de varias formas a que este trabajo haya sido realizado con éxito. No puedo empezar por otros más que por mis familiares y amigos que a veces me contuvieron desde más de mil kilómetros y otras veces incluso más. No fue sin ellos y el fuerte apoyo de mi país, Argentina, que he podido estudiar Biotecnología. En ese sentido, tengo que estar agradecida a mi Universidad de origen, la *Universidad Nacional de La Plata* (UNLP), y particularmente a la *Facultad de Ciencias Exactas*, donde crecí durante muchos años y donde encontré a aquellos que hoy puedo llamar mis mejores amigos y a quienes les estoy más que agradecida. La UNLP es más que el lugar donde estudié, es también el lugar donde trabajo y donde me he convertido en la profesional que soy hoy. Tengo que agradecer mucho a la cátedra donde enseñé, *Química Analítica Instrumental*, donde aprendí mucho y donde encontré apoyo durante todo mi Doctorado. Debo dar un agradecimiento especial a Mónica Casella, quien es no solo la Profesora a cargo sino que también fue mi co-supervisora durante esta Tesis. Además, ella estuvo siempre para respaldarme en todos los modos, como investigadora, como Profesora, y como consejera. Por supuesto que no puedo olvidar a mis compañeros, y a mis estudiantes – ¡perdón por mis errores!

Durante mi Doctorado mis supervisores se convirtieron también en parte de mi familia. Andrés Rodríguez y Santiago Maiale me recibieron hace algún tiempo allá por el 2011 en el *Laboratorio del Estrés Abiótico en Plantas* en el IIB-INTECH. No puedo estar más agradecida de haberlos encontrado dado que me han guiado a través de este proceso de la mejor manera en la que un supervisor podría hacerlo. Ustedes siempre me han apoyado en mis decisión, incluso cuando eran incorrectas – ¡bastante seguido dicho sea de paso!-. Nunca me sentí incómoda en el laboratorio y tenemos muy buenas anécdotas para contar. ¡Por supuesto que debo agradecer a todo el equipo del laboratorio! ¡Sin ustedes no hubiese sido tan divertido! ¡Y por supuesto gracias por sus aportes en mi Tesis! No puedo olvidarme de Ana Menéndez y Oscar Ruíz que siempre me han apoyado y ayudado con todo lo que necesité, incluso si no tenía nada que ver con la ciencia.

La *University of Antwerp* (UA) fue mi segunda Universidad, en donde también encontré mucha gente genial y, por supuesto, gente que sumé a mi lista de mejores amigos. Estar en otro país no es fácil, pero el Profesor Gerrit T.S. Beemster me recibió en su laboratorio. El grupo IMPRES no es solo un lugar excelente para trabajar en donde se pueden aprender muchas cosas, sino que también es un lugar donde se

pueden encontrar las mejores personas de distintos lugares del mundo. Tengo mis mejores recuerdos con ustedes ¡Gracias chicos! Не ме пипай! Sé que nos veremos de nuevo.

Mi Doctorado no hubiese sido posible sin el apoyo de CONICET que me otorgó la beca para poder realizarlo. Deseo que mi país nunca deje de lado la ciencia porque es el único modo en el cual podemos mejorar nuestra calidad de vida. Muchas instituciones me han ayudado en este proceso por medio de becas y debo agradecerles por ello: la *Agencia Nacional de Promoción y Tecnología* (PICT 2010-1066; PICT Start Up 2013-0399) por financiar el proyecto; la *Academic Mobility for Inclusive Development in Latin America ERASMUS Mundus Action 2* que me otorgó una beca para poder realizar mi investigación en la UA; la UA por otorgarme otra beca, DOCPRO, para finalizar esa investigación; IIB-INTECH por permitirme realizar mi investigación e incluso vivir allí por un tiempo. Muchas personas también han colaborado en diferentes partes de mi investigación, estoy agradecida a todas ellas. No puedo olvidarme de alguien que me ayudó muchísimo, alguien que abrió los portales del conocimiento y los hizo libres: Alexandra Elbakyan, ¡sin vos no hay Tesis posible en estos días!

Por último pero no menos importante, quiero agradecerme a vos que estás leyendo mi Tesis. Tienes que estar incluido en esta lista porque no fue para otro que para vos que yo escribí este grande y largo manuscrito. Espero que lo disfrutes y que encuentres respuestas y preguntas en el proceso. Y recuerda...

**“... las obras de la imaginación tienen siempre algún punto de contacto con la realidad”**

*La mujer de piedra* in *Rimas y leyendas*, Gustavo Adolfo Bécquer (1871)

Esta Tesis ha sido parcialmente publicada en las siguientes revistas y actas de congresos:

- 2017. Gázquez A** y Beemster GTS. *What determines organ size differences between species? A meta-analysis of the cellular basis* [¿Qué determina las diferencias de tamaño de órgano entre especies? Un meta-análisis de las bases celulares]. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.14573
- 2016. Gázquez A**, Checovich ML, Maiale S, Rodríguez A, Beemster G. *Diferentes estrategias del crecimiento de hojas de cultivares de arroz a temperaturas subóptimas: un punto de vista celular*. Resumen y poster en la XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes, Argentina.
- 2015. Gázquez A**, Maiale SJ, Rachoski MM, Vidal A, Ruíz OA, Menéndez AB, y Rodríguez AA. *Physiological response of multiple contrasting rice (Oryza sativa L.) cultivars to suboptimal temperatures* [Respuesta fisiológica de múltiples cultivares contrastantes de arroz (*Oryza sativa* L.) a temperatura subóptimas]. *J Agron Crop Sci* **201**: 117–127
- 2014. Gázquez A**, Maiale SJ, Bezus R, Menéndez AB, y Rodríguez AA. *Análisis transcripcional de la respuesta al estrés por temperaturas subóptimas en arroz (Oryza sativa, L.) en dos cultivares contrastantes*. Resumen y poster en el XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal - XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (XV CLAFV – XXX RAFV), Buenos Aires, Argentina.
- 2014. Gázquez A**, Maiale SJ, Vidal A, Ruíz OA, Menéndez AB, y Rodríguez AA. *Análisis del comportamiento fisiológico de múltiples cultivares de arroz contrastantes en condiciones de temperaturas subóptimas*. Resumen y poster en el XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal -XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (XV CLAFV – XXX RAFV), Buenos Aires, Argentina.
- 2012. Gázquez A**, Bonfiglio N, Rodríguez A, Maiale S, Bezus R, Vidal A, y Ruíz O. *Caracterización fisiológica y molecular de germoplasma de arroz (Oryza sativa) de uso en Argentina sometido a estrés por frío*. Resumen y poster en la XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (XXIX RAFV), Buenos Aires, Argentina.

## **SUMMARY**

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important cereal crops in the global food system feeding nearly half the world's population and its cultivation, processing and trade represents one of the biggest economic activities on Earth. During the months of culture the temperatures are optimal (28-30 °C) for rice but high frequencies of suboptimal temperatures are observed. Although some early studies demonstrated that rice growth rate and metabolism are noticeably inhibited in the range of 15-20 °C, the physiological bases for rice growth delay by suboptimal temperatures remain fairly unexplored. Hence, the aim of this Thesis was to study the response of rice seedlings from contrasting cultivars to suboptimal temperatures of growth at different organization levels and elucidate some mechanisms related with tolerance.

In order to achieve our goal we designed a screening method for detecting variability in sensitivity among rice cultivars at the seedling stage subjected to suboptimal temperatures usually found in the field (13/21 °C d/n, Entre Ríos, Argentina). This method was based on the reduction of the growth of the third leaf and it had some advantages, for instance, it was specifically designed for testing suboptimal temperatures, it was a quick method easy to set up in a growth chamber where multiple cultivars can fit at once, and it is quantitative. It is noteworthy that the measurements done in growth chambers were highly correlated with the ones in the field, pointing out that the proposed system was able to predict what happened in the field and so it works as a model system of the stress.

The main characteristic of the suboptimal temperatures stress was the reduction of the seedling growth at the shoot as well as at the leaf level. The growth analysis of the fourth leaf together with the transcriptome, proteome and redox system analyses accorded that processes related with cell division were inhibited and that damage occurred in the division zone so enzymatic antioxidant systems were triggered in this zone as a response. The diminution of growth was associated with a detriment of the Photosystem II evidenced in fast-transient chlorophyll analyses that impacted also in the photosynthetic rate and stomata conductance. Besides, carbon assimilation, storage and usage were also compromise. Different comparative analysis between tolerant and sensitive cultivars allowed us to distinguish some responses to the stress that could be associated with its variability in sensitivity. Hence, we associated the tolerance against suboptimal temperatures stress with the capacity of maintaining a



healthy photosynthetic apparatus, the protection of the meristematic zone that leads cell division rate, and the balance between carbon storage and usage. For first time we here described the major effects of the suboptimal temperatures stress in rice seedlings and detected possible mechanism of tolerance that should be further studied. This work will help to design future strategies for stacking tolerant mechanisms that will help in the obtaining of high yield cultivars that perform better under this stress. The creation of new marker assisted breeding programs could be a good way to address this issue and, hence, genome-wide association studies based on the described mechanism could help for finding new markers.

## **RESUMEN**

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos de cereal más importante en el sistema mundial alimentando cerca de la mitad de la población del mundo y su cultivo, procesado y comercio representa una de las actividades económicas más importantes en la Tierra. Durante los meses de cultivo las temperaturas son óptimas (28-30 °C) para el arroz pero altas frecuencias de temperaturas subóptimas son observadas. A pesar de que algunos estudios tempranos demostraron que la velocidad de crecimiento del arroz y su metabolismo son notablemente inhibidos en el rango de 15-20 °C, las bases fisiológicas del retraso del crecimiento del arroz permanecen mayormente inexploradas. Por lo tanto, el objetivo de esta Tesis fue estudiar la respuesta de plántulas de arroz de cultivares contrastantes a temperaturas subóptimas de crecimiento a diferentes niveles organizacionales y dilucidar algunos mecanismos relacionados con su tolerancia.

Con el fin de lograr nuestro objetivo, diseñamos un método de tamizado (*screening*) para detectar variabilidad en sensibilidad entre cultivares de arroz en el estadio de plántula sometidos a temperaturas subóptimas típicamente encontradas en el campo (13/21 °C d/n, Entre Ríos, Argentina). Este método se basó en la reducción del crecimiento de la tercer hoja y tuvo algunas ventajas, por ejemplo, fue específicamente diseñado para probar temperaturas subóptimas, es un método rápido y fácil de montar en una cámara de crecimiento donde múltiples cultivares pueden caber a la vez, y es un método cuantitativo. Es de destacar que las mediciones realizadas en las cámaras de crecimiento correlacionaron fuertemente con las realizadas en el campo, por lo tanto el sistema propuesto pudo predecir lo que sucedió en el campo y funciona como un sistema modelo del estrés.

La principal característica del estrés por temperaturas subóptimas fue la reducción del crecimiento de la plántula a nivel de vástago y a nivel de la hoja. El análisis de crecimiento de la cuarta hoja junto con los análisis del transcriptoma, proteoma y sistema redox coincidieron en que los procesos relacionados con la división celular estaban inhibidos y que ocurrió daño en la zona de división con lo cual se activaron sistemas antioxidantes enzimáticos en esta zona como respuesta. La disminución del crecimiento fue asociada con el daño del fotosistema II evidenciado en el análisis rápido de fluorescencia transitoria de la clorofila y que impactó, además, en la velocidad de fotosíntesis y la conductancia estomática. Por otra parte, la asimilación, almacenamiento y uso de carbono estuvieron comprometidos. Diferentes estudios comparativos entre cultivares tolerantes y sensibles nos permitieron distinguir algunas

respuestas al estrés que estaban asociadas con su variabilidad en sensibilidad. Por lo tanto, vinculamos la tolerancia al estrés por temperaturas subóptimas con la capacidad de mantener un aparato fotosintético sano, la protección de la zona meristemática que realiza la división celular, y el balance entre la asimilación de carbono, su almacenamiento y uso. Por primera vez, aquí describimos los efectos más importantes del estrés por temperaturas subóptimas en plántulas de arroz y detectamos posibles mecanismos asociados a su tolerancia que deberían ser estudiados más ampliamente. Este trabajo ayudará en el diseño de futuras estrategias para apilar mecanismos de tolerancia que permitirán obtener cultivares de alto rendimiento con mejor desempeño bajo este estrés. La creación de nuevos programas de mejoramiento asistido por marcadores podría ser un buen modo para abordar esta problemática y, por lo tanto, los estudios basados en la asociación del genoma completo en base a los mecanismos descriptos podrían ayudar en encontrar nuevos marcadores.

## **SAMENVATTING**

Globaal gezien is rijst (*Oryza sativa* L.) is één van de belangrijkste graangewassen. Het voorziet bijna de helft van de wereldpopulatie van voedsel en de teelt, verwerking en handel behoren tot één van de grootste economische activiteiten op aarde. Tijdens het teeltseizoen zijn de temperaturen voor rijst optimaal (28-30°C), maar toch worden er vaak suboptimale temperaturen waargenomen. Hoewel eerdere studies aantoonde dat de groeisnelheid en het metabolisme van rijst gehinderd worden in de temperatuurrange van 15-20°C, is de fysiologische basis voor deze verminderde groei bij suboptimale temperaturen nog niet echt bestudeerd. Daarom werd in deze thesis het effect van suboptimale temperaturen op de groei van rijstzaailingen van verschillende cultivars bestudeerd en dit in verschillende stadia van ontwikkeling. Hierdoor zullen de onderliggende mechanismen gerelateerd aan stress tolerantie beter begrepen worden.

Hiervoor werd een screening methode ontwikkeld die de variatie in de gevoeligheid voor de typische suboptimale temperaturen die in het veld te meten zijn (13/21°C d/n, Entre Ríos, Argentina) detecteert tijdens het zaailingstadium van verschillende rijstcultivars. Deze methode is gebaseerd op de afname in groei van het derde blad en heeft enkele voordelen. Zo is het specifiek ontwikkeld om suboptimale temperaturen te testen, is het kwantitatief en is het een snelle methode die men gemakkelijk in een groeikamer kan gebruiken waarin verschillende cultivars tegelijkertijd kunnen groeien. Belangrijk op te merken is dat de metingen die gebeurden in de groeikamer een sterke correlatie vertonen met degenen in het veld. Dit duidt erop dat het voorgestelde systeem in staat was om te voorspellen wat er in het veld zou gebeuren en daarom werkt het als een modelsysteem voor deze stress.

Het opmerkelijkste kenmerk voor suboptimale temperatuurstress in zaailingen was de afname in de groei van zowel scheut als blad. De groeianalyse van het vierde blad, samen met de transcriptoom-, proteoom- en redoxsystemanalyse, wezen op een inhibitie van celdeling gerelateerde processen. Verder werd schade vooral in de delingszone toegebracht waardoor in deze zone het enzymatische antioxidantsysteem werd getriggerd. De vermindering in groei was geassocieerd met schade aan Photosysteem II, wat werd aangetoond door fast-transient chlorofylanalyses. Deze schade had op zijn beurt een invloed op de fotosynthesesnelheid, stomatale geleidbaarheid, koolstof assimilatie, -opslag en -verbruik. Uit verschillende vergelijkende analyses tussen tolerante en gevoelige cultivars, konden we observeren hoe de respons op de stress geassocieerd was met de variatie in sensitiviteit. Hieruit

konden we besluiten dat de tolerantie ten opzichte van suboptimale temperaturen samenhangt met de capaciteit om een goed functionerend fotosynthetisch apparaat te onderhouden, om de meristematische zone te beschermen en om de balans tussen koolstofopslag en -gebruik te onderhouden. We beschrijven hier voor het eerst de belangrijkste effecten van stress ten gevolge van suboptimale temperaturen op zaailingen van rijst en beschrijven mogelijke mechanismen voor tolerantie die verder bestudeerd moeten worden. Dit werk zal helpen bij de ontwikkeling van toekomstige strategieën om verschillende tolerantiemechanismen samen te voegen om zo cultivars te ontwikkelen die een hogere opbrengst hebben tijdens deze vorm van stress. De ontwikkeling van merker-geassisteerde kweekprogramma's zou hiervoor een goede aanpak kunnen vormen en hiermee samenhangend zouden genomwijde associatiestudies die gebaseerd zijn op het beschreven mechanisme kunnen helpen bij het vinden van nieuwe merkers.



## **Contenido**

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<u>La importancia del arroz</u> .....	2
<u>El problema de las bajas temperaturas en el cultivo de arroz</u> .....	3
<u>Estrés por frío en arroz</u> .....	3
<u>Hipótesis y objetivo principal</u> .....	5
<b><u>1 CAPÍTULO 1: Análisis fenotípico de cultivares de arroz contrastantes a temperaturas subóptimas</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>1.1 INTRODUCCIÓN</u></b> .....	7
<u>1.1.1 Fluorescencia transitoria de la clorofila a</u> .....	7
<b><u>1.2 OBJETIVO</u></b> .....	12
<b><u>1.3 MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	12
<u>1.3.1 Material de plantas</u> .....	12
<u>1.3.2 Ensayos de laboratorio</u> .....	12
<u>1.3.3 Ensayos al aire libre</u> .....	14
<u>1.3.4 Análisis del crecimiento de la planta en el ensayo de laboratorio de tiempo corto</u> .....	14
<u>1.3.5 Test de fluorescencia transitoria rápida de la clorofila</u> .....	14
<u>1.3.6 Determinación del contenido de clorofila</u> .....	15
<u>1.3.7 Determinación de parámetros de intercambio de gases</u> .....	15
<u>1.3.8 Determinación del contenido relativo de agua</u> .....	15
<u>1.3.9 Análisis estadísticos</u> .....	15
<b><u>1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	16
<u>1.4.1 Tamizado del desempeño del crecimiento del arroz bajo condiciones de temperaturas subóptimas y óptimas</u> .....	16
<u>1.4.2 Efecto del tratamiento de temperaturas subóptimas sobre el desempeño del fotosistema II</u> .....	18
<u>1.4.3 Influencia del tratamiento de temperaturas subóptimas en los parámetros de intercambio de gases</u> .....	22
<b><u>1.5 CONCLUSIONES</u></b> .....	26

**2    CÁPITULO 2: Análisis del crecimiento de la planta ..... 30**

CÁPITULO 2 PARTE 1: ¿Qué determina las diferencias de tamaño de órgano entre especies? Un meta-análisis de las bases celulares..... 32

<u>2.1</u>	<u>INTRODUCCIÓN</u> .....	33
<u>2.2</u>	<u>OBJETIVO</u> .....	35
<u>2.3</u>	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	36
<u>2.3.1</u>	<u>Extracción de los datos</u> .....	36
<u>2.3.2</u>	<u>Análisis estadístico</u> .....	36
<u>2.4</u>	<u>RESULTADOS</u> .....	37
<u>2.4.1</u>	<u>Raíces</u> .....	37
<u>2.4.2</u>	<u>Hojas de Graminae</u> .....	40
<u>2.4.3</u>	<u>Hojas de Eudicotiledóneas</u> .....	45
<u>2.5</u>	<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u> .....	47

CAPÍTULO 2 PARTE 2: Análisis cinemático de la respuesta del crecimiento de la hoja de cultivares de arroz con sensibilidad contrastante a temperaturas subóptimas  
..... 52

<u>2.6</u>	<u>INTRODUCCIÓN</u> .....	53
<u>2.7</u>	<u>OBJETIVO</u> .....	56
<u>2.8</u>	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	56
<u>2.8.1</u>	<u>Material de plantas y condiciones de crecimiento</u> .....	56
<u>2.8.2</u>	<u>Análisis cinemático y de crecimiento</u> .....	57
<u>2.8.3</u>	<u>Cálculo del tiempo termal</u> .....	58
<u>2.8.4</u>	<u>Análisis estadísticos</u> .....	58
<u>2.9</u>	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	58
<u>2.9.1</u>	<u>El efecto de las temperaturas subóptimas en el crecimiento de la hoja</u> 59	
<u>2.9.2</u>	<u>Diferentes respuestas del crecimiento foliar de cultivares tolerantes y sensibles a temperaturas subóptimas</u> .....	63
<u>2.10</u>	<u>CONCLUSIONES</u> .....	66



<b>3</b>	<b><u>CAPÍTULO 3: Análisis transcripcional de la respuesta a temperaturas subóptimas de cultivares de arroz con sensibilidad contrastante</u></b>	<b>68</b>
3.1	<u>INTRODUCCIÓN</u>	69
3.2	<u>OBJETIVO</u>	69
3.3	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	69
3.3.1	<u>Material de plantas y condiciones de crecimiento</u>	69
3.3.2	<u>Extracción de RNA total</u>	70
3.3.3	<u>Análisis de los microarreglos y los datos</u>	70
3.3.4	<u>Validación de microarreglos</u>	71
3.3.5	<u>Asignación de ID de genes a los transcritos con expresión diferencial</u>	71
3.3.6	<u>Anotación de genes y enriquecimiento funcional</u>	72
3.4	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	73
3.4.1	<u>Perfil de los transcriptomas</u>	73
3.4.2	<u>Síntesis y degradación de carbohidratos</u>	78
3.4.3	<u>Respuesta energética</u>	79
3.4.4	<u>Biosíntesis y degradación de ácidos grasos</u>	80
3.4.5	<u>Metabolismo secundario</u>	80
3.4.6	<u>Respuesta del procesamiento de la información genética</u>	82
3.5	<u>CONCLUSIONES</u>	88
<b>4</b>	<b><u>CAPÍTULO 4: Análisis proteómico de la respuesta a temperaturas subóptimas en cultivares de arroz con sensibilidad contrastante</u></b>	<b>89</b>
4.1	<u>INTRODUCCIÓN</u>	90
4.2	<u>OBJETIVO</u>	91
4.3	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	91
4.3.1	<u>Material de plantas y condiciones de crecimiento</u>	91
4.3.2	<u>Extracción y digestión de proteínas</u>	92
4.3.3	<u>Etiquetado iTRAQ de las proteínas</u>	93
4.3.4	<u>Cromatografía líquida en fase nano-reversa y espectrometría de masas</u>	94

4.3.5	<u>Análisis de datos del proteoma</u>	94
4.4	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	96
4.4.1	<u>Perfil de los proteomas</u>	96
4.4.2	<u>Respuesta diferente de los cultivares</u>	105
4.4.3	<u>La homeostasis redox fue regulada de manera diferente entre los cultivares</u>	108
4.4.4	<u>Regulación de la transcripción, la traducción y el plegamiento de proteínas</u>	111
4.5	<u>CONCLUSIONES</u>	116
<b>5</b>	<b><u>CAPÍTULO 5: Análisis bioquímico de cultivares de arroz contrastantes en la respuesta a temperaturas subóptimas</u></b>	<b>117</b>
5.1	<u>INTRODUCCIÓN</u>	118
5.2	<u>OBJETIVO</u>	119
5.3	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	119
5.3.1	<u>Material de plantas y condiciones de crecimiento</u>	119
5.3.2	<u>Determinación del desacoplamiento del complejo liberador de de oxígeno y de los centros reductores de quinona B</u>	120
5.3.3	<u>Análisis ultraestructural</u>	121
5.3.4	<u>Análisis lipidómico</u>	121
5.3.5	<u>Mediciones relacionadas con el estado redox de las plantas</u>	122
5.3.6	<u>Determinación de poliaminas libres</u>	125
5.3.7	<u>Análisis estadístico</u>	125
5.4	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	126
5.4.1	<u>El cultivar tolerante puede mantener un aparato fotosintético sano</u>	126
5.4.2	<u>Consecuencias sobre la ultraestructura de las células del mesófilo</u>	127
5.4.3	<u>El efecto del estrés por temperaturas subóptimas sobre la composición de lípidos</u>	133
5.4.4	<u>El sistema redox</u>	136
5.4.5	<u>Poliaminas</u>	144
5.5	<u>CONCLUSIONES</u>	145

<b>6</b>	<b><u>CONCLUSIONES GENERALES</u></b> .....	<b>147</b>
<b>7</b>	<b><u>REFERENCIAS</u></b> .....	<b>155</b>
<b>8</b>	<b><u>Material suplementario</u></b> .....	<b>184</b>
	<u>Tablas suplementarias</u> .....	184
	<u>Figuras Suplementarias</u> .....	195
	<u>Datos suplementarios</u> .....	208

## ABREVIATURAS

Las abreviaturas están definidas por sus siglas en inglés que aquí se aclaran.

ABA	Abscic acid	Ácido abscísico
ABS	Absorbed energy	Energía absorbida
ANOVA	Analysis of variance	Análisis de varianza
APX	Ascorbate peroxidase	Ascorbato peroxidasa
ASC	Ascorbate	Ascorbato
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosina trifosfato
		Herramienta básica de
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	búsqueda de alineamiento local
BRs	Brassinosteroids	Brasinoesteroides
CAT	Catalase	Catalasa
		Base de datos de dominios
CDD	Conserve Domain Database	conservados
Chl	Chlorophyll	Clorofila
CS	Cross-section	Sección transversal
CSD	Cold Shock Domain	Domínio de choque de frío
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenilindol
		Genes diferencialmente
DEG	Differentially expressed gene	expresados
		Transcriptos diferencialmente
DET	Differentially expressed transcripts	expresados
DHAR	Dehydroascorbate reductase	Dehidroascorbato reductasa
DI <sub>0</sub>	Dissipated energy	Energía disipada
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido deoxiribonucleico
DTT	Dithiotreitol	Ditiotreitol
EC	Enzyme Commission numbers	Número de comisión de enzima
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ácido etilendiaminotetraacético
ET <sub>0</sub>	Electrons transported	Electrones transportados
ET	Ethylene	Etileno
EZ	Elongation zone	Zona de elongación
	Transition zone between the	Zona de transición entre las
EZ-MaZ	elongation and the mature zone	zonas de elongación y madura
FC	Fold change	Razón de cambio
FDR	False Discovery Rate	Tasa de descubrimiento falso
FLL	Final leaf length	Largo final de hoja
		Capacidad férrica de reducción
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma	de plasma
FW	Fresh weight	Peso fresco
GA	Galic acid	Ácido gálico
GCS	Glycine cleavage system	Sistema de escisión de glicina
GDD	Growing degree days	Grados día de crecimiento
GO	Gene ontology	Ontología de genes
		Procesos biológicos de
GOBP	Gene ontology biological process	ontología de genes

GOCC	Gene ontology cellular component	Componentes celulares de ontología de genes
GOMF	Gene ontology molecular function	Función molecular de ontología de genes
GPX	Glutathione peroxidase	Glutación peroxidasa
GR	Glutathione reductase	Glutación reductasa
GRx	Glutaredoxin	Glutaredoxina
Gs	Stomatal conductance	Conductancia estomática
GS/MS	Gas chromatography-mass spectrometry	Cromatografía gaseosa – espectrometría de masas
GSH	Glutathione	Glutación
GSSC	Glutathione disulfide	Glutación disulfuro
HPLC	High performance liquid chromatography	Cromatografía líquida de alto rendimiento
IS	Internal standard	Estándar interno
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantification	Etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta
JA	Jasmonic acid	Ácido jasmónico
JIP test	Non-invasive chlorophyll fluorescence fast-transient test	Test de fluorescencia transitoria rápida de la clorofila
LED	Light Emitting Diode	Diodo emisor de luz
LER	Leaf elongation rate	Velocidad de elongación de la hoja
M	Meristem zone	Zona de meristema
MaZ	Mature zone	Zona Madura
MDA	Malondialdehyde	Malondialdeído
MDAR	Monodehydroascorbate reductase	Monodehidroascorbato reductasa
MDHA	Monodehydroascorbate	Monodehidroascorbato
M-EZ	Transition zone between the meristem and the elongation zone	Zona de transición entre las zonas de meristema y elongación
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Ácido ribonucleic mensajero
MS	Mass spectrometry	Espectrometría de masas
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Espectrometría de masas en tándem
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NBT	Nitro Blue tetrazodinium	Nitro Blue tetrazodinium
OEC	Oxygen Evolving Complex	Complejo liberador de oxígeno
OT	Optimal temperatures of plant growth	Temperatura optima de crecimiento de planta
PAR	Photosynthetically active radiation	Radiación fotosintéticamente active
PCA	Principal components analysis	Análisis de componentes principales

PMSF	Phenylmethane sulfonyl fluoride	Fenilmetanosulfonil fluoruro
Pn	Net photosynthesis rate	Velocidad neta de fotosíntesis
POX	Peroxidase	Peroxidasa
PQ	Plastoquinone	Plastoquinona
PSI	Photosystem I	Fotosistema I
PSII	Photosystem II	Fotosistema II
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	Ácidos grasos poliinsaturados
Q <sub>A</sub>	Quinone A	Quinona A
Q <sub>B</sub>	Quinone B	Quinona B
QE	Quercetin	Quercetina
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
RC	Reaction center	Centro de reacción
RNA	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleic
ROS	Reactive oxygen species	Especies reactivas del oxígeno
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
RWC	Relative water content	Contenido relativo de agua
SD	Standard deviation	Desviación estándar
SE	Standard error	Error estándar
SIM	Selected Ion Monitoring	Monitoreo de iones seleccionado
SOD	Superoxide dismutase	Superóxido dismutasa
ST	Suboptimal temperatures of plant growth	Temperaturas subóptimas de crecimiento de planta
tASC	Total ascorbate	Ascorbato total
TBA	Thiobarbituric acid	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Tricloroacetic acid	Ácido tricloroacético
TEM	Transmission electron microscope	Microscopio electrónico de transmisión
tGSH	Total glutathione	Glutación total
TR <sub>0</sub>	Transferred energy	Energía transferida
TRx	Thioredoxin	Tioredoxina

# **INTRODUCCIÓN**



## ***La importancia del arroz***

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos de cereal más importantes en el sistema de alimentos mundial ya que da de comer a más de la mitad de la población del mundo, y su cultivo, procesado y comercio representa una de las actividades económicas más grandes de la Tierra (GRiSP, 2013; FAO, 2016). 159 millones de hectáreas de arroz son cosechadas cada año cuyo único destino es el consumo humano, llegando a constituir el 78% de su producción total en el 2009, un porcentaje alto si se lo compara con el 64% en el trigo y sólo el 14% en el maíz (GRiSP, 2013). El mayor productor de arroz es por lejos Asia con el 90% de la producción global, seguido por las Américas con el 5% y sólo pequeñas contribuciones de África, Europa y Oceanía (FAO, 2016). La demanda mundial de alimentos se crece rápidamente y en consecuencia se predice que 116 millones de toneladas extra de arroz serán necesarias de manera anual para el año 2035. Dado que las tierras arables de Asia están en disminuyendo debido a la urbanización, el cambio climático, y la competición por otras agriculturas de gran valor, se espera que América y África aumenten sus producciones, especialmente Brasil y Argentina (GRiSP, 2013; Flachsbarth et al., 2015). En América Latina y el Caribe, el arroz es la segunda fuente de calorías diarias para muchos países. El incremento de la producción de arroz de manera eficiente y sustentable en la región es de gran importancia para alcanzar la demanda global de alimentos en el futuro y asegurar la continuidad del mercado de arroz en la zona (Benavidez, 2006; Zorrilla et al., 2013; Laurance et al., 2014). En el proceso, el uso de prácticas de manejo eficientes y el logro de altos rendimientos en las tierras de cultivo existentes llevará a un daño ambiental mínimo.

Además de su importancia para el consume humano y para la economía global, el arroz tiene el genoma más pequeño dentro de los principales cultivos de cereales y ha sido completamente secuenciado (Eckardt, 2000; International Rice Genome Sequencing Project, 2005; Livore, 2006a; Jackson, 2016). La gran cantidad de recursos genéticos desarrollados para el arroz hacen de esta especie un gran modelo de planta especialmente para la genómica comparativa y para el mejoramiento de plantas asistido por marcadores moleculares (Shimamoto and Kyozyuka, 2002; Jena and Mackill, 2008; Das and Rao, 2015; Hasan et al., 2015; Wijerathna, 2015). En los últimos 10 años más de 3,000 cultivares de arroz han sido secuenciados y recursos de acceso abierto basados en el mapeo por asociación del genoma completo han sido desarrollados (The 3000 Rice Genomes Project, 2014; McCouch et al., 2016). El arroz tiene también sus ventajas por sobre otros cultivos respecto de los análisis proteómicos dado que grandes bases de datos de secuencias de proteínas están



también disponibles (Kosová et al., 2011; Singh and Jwa, 2013). El arroz se ha convertido entonces en el primer cultivo de cereal en tener tantas herramientas genómicas permitiendo que se convierta en la especie modelo para las monocotiledóneas en esta área de investigación.

### ***El problema de las bajas temperaturas en el cultivo de arroz***

*Oryza sativa* ha evolucionado en áreas tropicales y subtropicales y es, por lo tanto, vulnerable a climas fríos (Quintero, 2009). Varios millones de hectáreas de cultivo de arroz son afectadas globalmente por bajas temperaturas cada año, resultando pérdidas de rendimiento anuales de 1-3.9 t/ha (Jena and Hardy, 2012). Dado que el agua no es usualmente un problema en Argentina, la calidad del suelo es buena y el suministro de radiación está asegurado, el factor limitante más importante para incrementar el rendimiento del arroz en la región es la temperatura (Quintero, 2009). Para el arroz, la temperatura mínima de crecimiento es alrededor de 8-12 C, la temperatura óptima de crecimiento es de 28-30 C, y la máxima temperatura de crecimiento es de 42-45 C (Quintero, 2009).

La producción está concentrada en la región húmeda del país donde el clima varía desde templado a subtropical húmedo, esto incluye las provincias de Corrientes (40%), Entre Ríos (38%), Santa F (16%), Formosa (3%), y Chaco (3%; Villanova and Albornoz, 2006; GRISP, 2013). El arroz es usualmente sembrado entre Septiembre y Diciembre y es cosechado entre Febrero y Marzo. Durante estos meses las temperaturas son óptimas pero altas frecuencias de temperaturas por debajo del óptimo suelen ser observadas en Entre Ríos durante Septiembre y Octubre, y el final de Enero y comienzos de Febrero, afectando de esta manera el estadio vegetativo y el de floración (Quintero, 2009). Por lo tanto, la presencia de bajas temperaturas condiciona la siembra temprana afectando la captura de recursos y generando grandes consecuencias en el rendimiento de arroz alcanzado (Arguissain, 2006; Brizuela, 2006; Quintero, 2009). Este fenómeno afecta no solo a Argentina sino que también tiene consecuencias similares en la siembra temprana en otras zonas, e.g., China central (Wang et al., 2016).

### ***Estrés por frío en arroz***

Los fisiólogos de plantas utilizan usualmente el término congelación (más usualmente en inglés, *freezing*) para temperaturas inferiores a 0 C, frío (más usualmente en inglés, *chilling*) para temperaturas entre 0 C y la temperatura mínima de crecimiento, y temperaturas subóptimas de crecimiento (ST) para aquellas entre la

última y la óptima (Menéndez et al., 2013). Bajo condiciones de campo, las plántulas de arroz son sometidas de manera excepcional a períodos de congelación, más regularmente sufren frío, mientras que la situación más común es ST que persiste durante la mayor parte del estadio vegetativo (Greaves, 1996; Allen and Ort, 2001; Morsy et al., 2005; Zhang et al., 2012). Muchas especies de plantas han desarrollado una colección de mecanismos que les permiten minimizar los efectos negativos de los estreses por frío. La habilidad de aclimatarse al frío, *i.e.*, de incrementar la tolerancia a frío, es un rasgo multigenético que resulta de un proceso complejo involucrando un número de cambios fisiológicos y bioquímicos. Esto incluye cambios en la expresión de genes, en la estructura y función de membranas, en el contenido de agua, proteínas, lípidos, y metabolitos primarios y secundarios (Basuchaudhuri, 2014). Numerosos autores se han enfocado en las respuestas morfológicas, bioquímicas y moleculares a la congelación y el frío en este cultivo (Bertin et al., 1996; Rabbani et al., 2003; Peng and Ismail, 2004; Cheng, 2006; Bonnacarrère et al., 2011; Zhang et al., 2012; Wang et al., 2013; Basu and Roychoudhury, 2014). Además, algunos estudios tempranos demostraron que la velocidad de crecimiento del arroz y su metabolismo se ven notablemente inhibidos en el rango de 15-20 °C (Kabaki, 1983; Takanashi et al., 1987), diferente al efecto del frío que frena por completo el crecimiento de la plántula (Allen and Ort, 2001; Aghaee et al., 2011). Sin embargo, las bases fisiológicas del retraso del crecimiento del arroz por ST permanecen bastante inexploradas.

El estrés por frío ocurre usualmente en los estadios de plántula o de desarrollo de panoja. A pesar de que el ST induce la esterilidad de la espiguilla del arroz cuando este es sometido durante el desarrollo de panoja, parte de esta esterilidad puede ser explicada por ST durante el estadio de plántula (Shimono et al., 2007; Quintero, 2009). Temperaturas de 18-19 °C durante los estadios tempranos de crecimiento pueden incrementar la susceptibilidad de la planta a la esterilidad por ST durante el estadio reproductivo, sin embargo no se conocen los mecanismos fisiológicos. El efecto de las ST durante el estadio de plántula puede ser de gran importancia en Argentina debido a que para poder evitar episodios de ST durante la temporada de floración, el arroz es usualmente sembrado temprano en Septiembre-Octubre cuando las ST son frecuentes. Quintero (2009) analizó los factores que limitan el crecimiento y la productividad del arroz en Argentina, particularmente en Entre Ríos, y encontró que a pesar de que el uso de buenas prácticas agronómicas incrementaría el rendimiento del arroz, el desarrollo de cultivares que sean tolerantes a estreses por frío en el estadio de plántula es esencial para alcanzar mejores rendimientos. La importancia de la mejora genética ya fue descripta como un factor decisivo que contribuyó en un 74.0%

del incremento total del rendimiento en China entre 1980 y 2012 (Yu et al., 2012). Por lo tanto, es necesario diseñar nuevos programas de mejoramiento que traten de desarrollar cultivares de alto rendimiento tolerantes a frío y para ello hay que investigar la respuesta a ST para dilucidar las características de este estrés sobre el estadio de plántula.

A pesar de ser mayormente sensible a las bajas temperaturas, considerable variación en el daño por este estrés existe entre plántulas de diferentes germoplasmas de arroz. De las dos subespecies más grandes de *O. sativa*, los cultivares japonica, típicamente cultivados en zonas con climas tropicales y templados, son usualmente más tolerantes al frío que los cultivares indica, mayormente cultivados en tierras bajas tropicales (Yoshida, 1981; Livore, 2006b; Kim and Tai, 2011). Sin embargo, los cultivares indica son usualmente más eficientes en la absorción de energía, tienen un excelente vigor de plántula y una rápida emergencia cuando las temperaturas se encuentran por encima del óptimo (Livore, 2006b). En consecuencia, existe un potencial uso del germoplasma japonica para mejorar los cultivares indica de alto rendimiento para que toleren el estrés por ST (Negrão et al., 2008). La disponibilidad de cultivares con respuesta contrastante a bajas temperaturas brinda la oportunidad de usarlos para identificar potenciales mecanismos asociados a la tolerancia.

### ***Hipótesis y objetivo principal***

En base a lo que se ha descripto arriba y en la información conocida en este tema, se postuló la siguiente **hipótesis**: *“existe una respuesta diferencial a las temperaturas subóptimas entre las plántulas de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) Diferentes”*. Para poner a prueba esta hipótesis se propuso aquí *“estudiar la respuesta a diferentes niveles de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes a temperaturas subóptimas de crecimiento sometidos durante el estadio de plántula”* como el **objetivo principal** de esta Tesis.

***CÁPITULO 1: Análisis fenotípico de cultivares de arroz  
contrastantes a temperaturas subóptimas***



## **1.1 INTRODUCCIÓN**

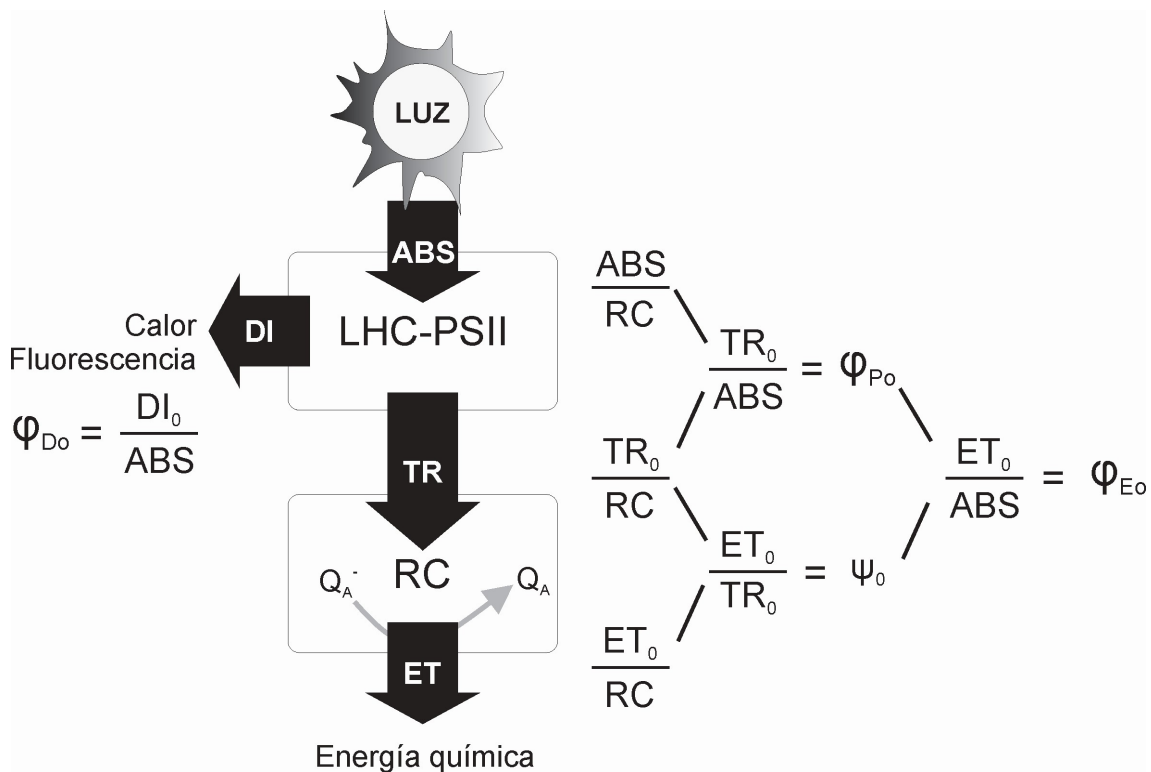
El mejoramiento y la manipulación genética para incrementar el rendimiento de los cultivos requiere de un procedimiento para seleccionar a los más adaptados dentro de un número de cultivares que sea rápido y confiable. Se ha sugerido que técnicas específicas de selección bajo condiciones controladas serían útiles para acelerar el desarrollo de cultivares con mayor tolerancia a frío (Wery et al., 1994; Bertin et al., 1996; Strauss et al., 2006). Existen muchos métodos que tratan de distinguir cultivares tolerantes de sensibles al estrés por frío. Por ejemplo, el más popular es el *Standard Evaluation System* (IRRI, 1988), un protocolo que necesita 30 días para realizar la evaluación y está basado en la calificación visual. Por lo tanto, disminuir el tiempo de evaluación y obtener datos cuantitativos para poder aplicar análisis estadísticos sería preferible por sobre las mediciones visuales o subjetivas para la selección de cultivares. Encontrar cultivares de arroz con respuesta contrastante a ST de manera objetiva podría contribuir al mejoramiento o al desarrollo biotecnológico de cultivares con mejor tolerancia a ST y también a incrementar el conocimiento actual sobre esta restricción de crecimiento.

Ha sido demostrado que el fotosistema II (PSII) es un componente importante en la determinación de la sensibilidad al estrés por temperaturas bajas (Strauss et al., 2006; Strauss et al., 2007; Pagter et al., 2008). Entre los mayores efectos del frío sobre las plantas de arroz durante el crecimiento vegetativo temprano es la inhibición del transporte de electrones a través del PSII y, en consecuencia, la fotoinhibición (Gesch and Heilman, 1999; Jeong et al., 2002). La tolerancia a frío fue asociada con una reducción en el nivel de fotoinhibición y el daño oxidativo (Bonnecarrère et al., 2011). Una baja temperatura podría también afectar la fluorescencia de la clorofila (Chl) del PSII en varias especies (Long and Humphries, 1994; Strasser et al., 1995). La relación de fluorescencia de Chl variable a máxima o eficiencia cuántica máxima de PSII ( $F_v/F_M$ ) disminuye en plantas sometidas a bajas temperaturas (Renaut et al., 2005; Pagter et al., 2008). Por lo tanto, esta relación ha sido ampliamente utilizada y demostró ser útil como parámetro para discriminar por tolerancia a frío (Neuner and Larcher, 1990; Sthapit et al., 1993; Agati et al., 1995; Fracheboud et al., 1999) y por ello podría ser útil también para discriminar plantas de arroz bajo estrés por ST.

### **1.1.1 Fluorescencia transitoria de la clorofila a**

La fluorescencia de la Chl-a emitida por las plantas refleja las actividades fotosintéticas que pueden ser mediadas por medio del test no-invasivo de la fluorescencia rápida transitoria de la Chl (test JIP; Strasser et al., 2000). El test JIP

define los flujos máximos de energía (subíndice "0") en la cascada energética (Figura 1-1): la luz es absorbida por las moléculas antena dentro de la membrana fotosintética (ABS), esta energía absorbida es transferida como energía de excitación y es atrapada (TR<sub>0</sub>) dentro de un centro de reacción (RC) y los electrones son transportados (ET<sub>0</sub>) para hacer trabajo químico útil generando ATP y NADPH, o disipada (DI<sub>0</sub>) mayormente como calor y en menor medida es emitida como fluorescencia. Basándose en la fluorescencia emitida por la planta en respuesta a un pulso de luz saturante, los flujos energéticos específicos (por RC) y los flujos energéticos fenomenológicos (por sección transversal excitada, CS), así como también las relaciones de flujos o rendimientos, pueden ser derivados.

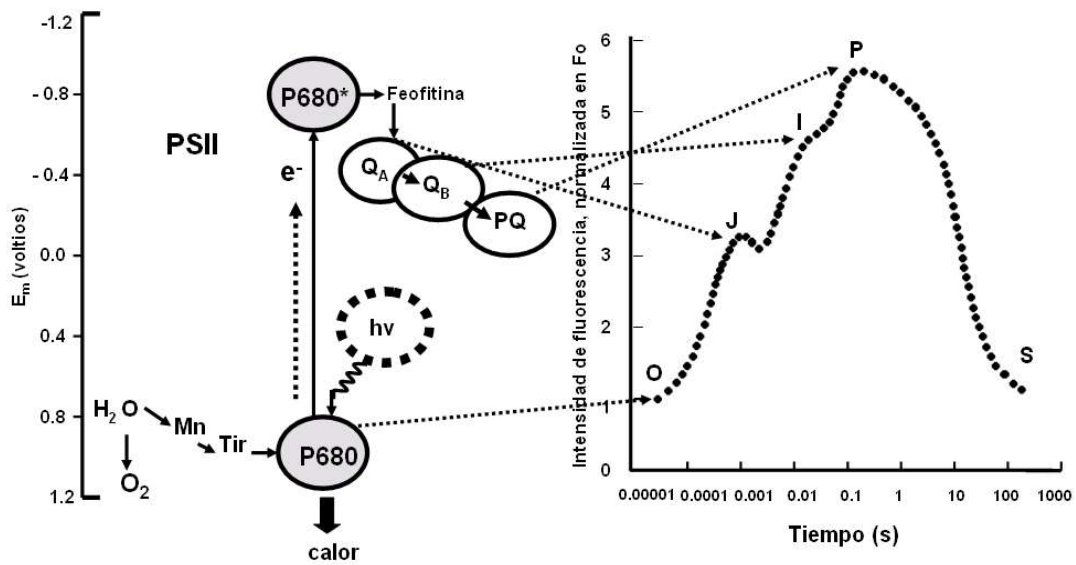


**Figura 1-1.** Modelo simplificado de flujos de energía en el aparato fotosintético. La energía es absorbida (ABS) por las moléculas antena del fotosistema II (LHC-PSII). Parte de esta energía es atrapada (TR) por los centros de reacción (RC) y los electrones son transportados (ET) por medio del aceptor quinona A (Q<sub>A</sub>) para generar energía química, o disipada (DI) como calor y fluorescencia. Los flujos de energía específicos (por RC) y los rendimientos de los flujos ( $\psi$  and  $\phi$ ) están descritos en la figura. El subíndice "0" indica flujos de energía máximos. Figura adaptada de González Moreno et al. (2008).

Si una muestra es pre-adaptada a oscuridad y luego repentinamente iluminada, la fluorescencia de la Chl aumenta con el tiempo reflejando la reducción de los RC del PSII y así brindando información de la actividad fotoquímica. El gráfico de la cinética

de la emisión de la fluorescencia en función del tiempo presenta cuatro puntos denominados O-J-I-P que pueden ser utilizados para calcular los flujos y rendimientos antes descritos. En resumen, estos puntos se encuentran marcados en la Figura 1-2 y representan (Stirbet and Govindjee, 2011):

- en un comienzo todos los aceptores de electrones están mayormente en estado oxidado con lo cual los centros están abiertos y la intensidad de la fluorescencia está en su mínimo,  $F_0$ , representada como “O” en la curva por “origen” (usualmente a 20  $\mu$ s);
- desde O a J la fluorescencia se eleva muy rápido, esto es conocido como la fase fotoquímica y depende fuertemente de la intensidad de la luz de excitación (J o  $F_J$  usualmente a 2 ms);
- J a I (I o  $F_I$  usualmente a 20 ms) y I a P son conocidas como las fases termales y son mucho más lentas, estas representan la reducción parcial de la quinona A ( $Q_A$ ) y la quinona B ( $Q_B$ );
- cuando la fluorescencia alcanza el pico P, usualmente denominado  $F_M$ , cuando la luz excitante es saturante, todas las moléculas  $Q_A$  están completamente reducidas (los centros de PSII están cerrados) y los electrones han alcanzado a la plastoquinona (PQ), debido a la reducción de la línea entera de la cadena de transporte de electrones;
- cuando la fluorescencia disminuye se dice que ha alcanzado el estado estacionario y se simboliza con S.



**Figura 1-2.** Ejemplo de cinética de emisión de fluorescencia de la Chl-a del PSII de una muestra pre-oscurcida y su relación con las reacciones de la cadena de electrones. Las letras y pasos están explicadas en el texto. Figura de González Moreno et al., (2008).

Estos puntos de la curva OJIP son luego utilizados para calcular diferentes parámetros que son útiles para describir la actividad fotoquímica y están enumerados en la Tabla 1-1.



**Tabla 1-1.** Resumen de formulas del test OJIP (Strasser et al., 2000; González Moreno et al., 2008; Stirbet and Govindjee, 2011).

<b>Parámetros de fluorescencia extraídos y técnicos</b>	
$F_0$	= intensidad de fluorescencia a 20 $\mu$ s
$F_{250}$	= intensidad de fluorescencia a 250 $\mu$ s
$F_J$	= intensidad de fluorescencia en el paso J (a 2 ms)
$F_M$	= intensidad de fluorescencia máxima
$t_{fmax}$	= tiempo para alcanzar $F_M$ , en ms
$V_J$	= $(F_J - F_0) / (F_M - F_0)$
Área	= área entre la curva de fluorescencia y $F_M$
$M_0$	= $4 \cdot (F_{250} - F_0) / (F_M - F_0)$
$S_m$	= Área / $(F_M - F_0)$ ; área complementaria normalizada relacionada con el número de portadores de electrones por cadena de portadores de electrones o energía necesaria para cerrar todos los centros de reacción
ABS	= flujo de energía absorbida
$TR_0$	= flujo de energía atrapada en el tiempo $F_0$
$ET_0$	= flujo de energía del transporte de electrones en el tiempo $F_0$
$DI_0$	= flujo de energía disipada en el tiempo $F_0$
RC	= centro de reacción
$CS_0$	= sección transversal excitada CS en el tiempo $F_0$
RC/ABS	= número de $Q_A$ recudiendo RC por Chl antena del PSII
RC/ $CS_0$	= número de RC por $CS_0$
<b>Eficiencias cuánticas</b>	
$TR_0/ABS$	= $(1 - F_0) / (F_M)$ ; o $F_v/F_M$ ; rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria del PSII
$DI_0/ABS$	= $1 - (TR_0/ABS)$ ; rendimiento cuántico máximo de la energía disipada del PSII
$ET_0/TR_0$	= $1 - V_J$ ; probabilidad de que los excitones atrapados muevan un electrón en la cadena de electrones más allá de la quinona A ( $Q_A$ )
$ET_0/ABS$	= $(1 - F_0) / (F_M) \cdot (1/ ET_0/TR_0)$ ; rendimiento cuántico para el transporte de electrones
<b>Flujos de energía específicos</b>	
ABS/RC	= $M_0 \cdot (1/V_J) \cdot (1/ TR_0/ABS)$ o energía absorbida por centro de reacción
$TR_0/RC$	= $M_0 \cdot (1/V_J)$
$ET_0/RC$	= $M_0 \cdot (1/V_J) \cdot (ET_0/TR_0)$
$DI_0/RC$	= $(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
<b>Flujos de energía fenomenológicos</b>	
ABS/ $CS_0$	= $F_0$ o energía absorbida a $T_0$ por sección transversal excitada
$DI_0/CS_0$	= $(ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$
$TR_0/CS_0$	= $(TR_0/ABS) \cdot (ABS/CS_0)$
$ET_0/CS_0$	= $(TR_0/ABS) \cdot (ET_0/TR_0) \cdot (ABS/CS_0)$
<b>Índices vitales</b>	
$PI_{ABS}$	= $(RC/ABS) \cdot (TR_0/ABS / 1 - TR_0/ABS) \cdot (ET_0/TR_0 / 1 - ET_0/TR_0)$ ; índice de rendimiento para la conservación de energía de los fotones absorbidos por la antena de PSII para reducir $Q_B$

## **1.2 OBJETIVO**

El objetivo de este capítulo fue comprender mejor la respuesta fisiológica del arroz frente a ST y detectar cultivares de arroz con desempeño contrastante sometidos a un rango de ST. Con este propósito se caracterizó el crecimiento de la plántula, el funcionamiento del PSII y los parámetros fotosintéticos de intercambio de gases, entre otros, de varios cultivares de arroz confrontados a la condición de ST.

## **1.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.3.1 Material de plantas**

Los cultivares de arroz Koshihikari, IR24, IR28, IR50, Japonésito 3 meses, Japonésito 8 meses, Japonésito Prolífico, General Rossi, H313-1-2, H313-26-2, Bombilla, Cini 754, Cnia 948, CT-6742-10-10-1, Oro, Cala PA, Ayasmi, Honezhaosen fueron amablemente proporcionados por el Programa Arroz de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Semillas de estos cultivares fueron colocadas dentro de placas de Petri sobre dos capas de papel de filtro Whatman N° 5 con 7 mL de solución Carbendazim 0.025 %p/v (Yoshida, 1981) e incubadas en cámara de crecimiento a 30 °C en oscuridad hasta germinación. Las plántulas resultantes fueron trasplantadas a diferentes sustratos para realizar los ensayos de laboratorio y al aire libre.

### **1.3.2 Ensayos de laboratorio**

Los siguientes ensayos A y B fueron realizados in cámaras de crecimiento con 12 h de fotoperiodo, 80% humedad y 200  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Las temperaturas día/noche para ST y para temperaturas óptimas (OT) fueron de 21/13 y 28/24 °C, respectivamente.

**A)** Ensayos de tiempo corto: las plántulas fueron cultivadas en sistema hidropónico en condiciones OT trasplantándolas a redes plásticas dentro de bandejas negras de 4 L que contenían 3 L de agua destilada. Luego de tres días de cultivo, el agua fue reemplazada por 3 L de solución Yoshida (Gregorio et al., 1997). De ahí en más, la solución Yoshida fue renovada cada tres días hasta el final del experimento. Cuando la tercer hoja (Yoshida, 1981) emergió (estadio  $T_0$ ), la mitad de las plántulas fue transferida a condiciones ST. Las plántulas fueron cultivadas por otros 3 d bajo condiciones OT o ST (Figura 1-3 A).

**B)** Ensayos de tiempo largo: las plántulas fueron trasplantadas a potes plásticos de 0,5 L de capacidad, conteniendo suelo orgánico estéril como sustrato. Los potes

fueron inundados dentro de bandejas de 4 L con 3 L de agua destilada y se mantuvieron bajo condiciones ST u OT durante 24 d. Se agregó agua de manera periódica a las bandejas para así mantener invariable el nivel de agua durante el tiempo que duró el experimento. En el caso de las plantas bajo condiciones OT, en el día 25 del experimento o la temperatura se estableció en 24 °C durante 2 h al comienzo del fotoperiodo, y luego fue gradualmente disminuida, hasta alcanzar los 11.5 °C luego de 3 h para medir los parámetros de intercambio de gases a diferentes temperaturas (Figura 1-3 B).

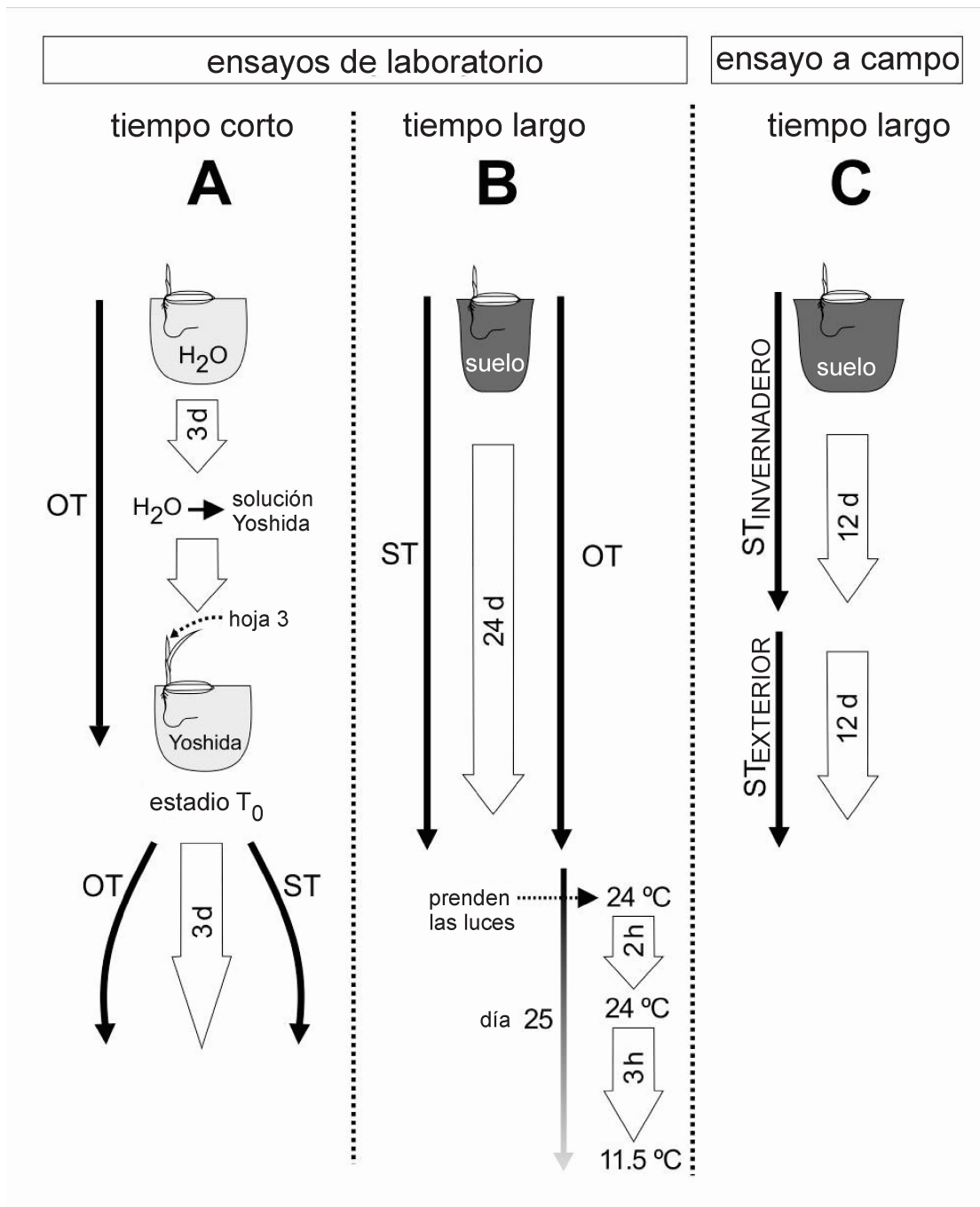
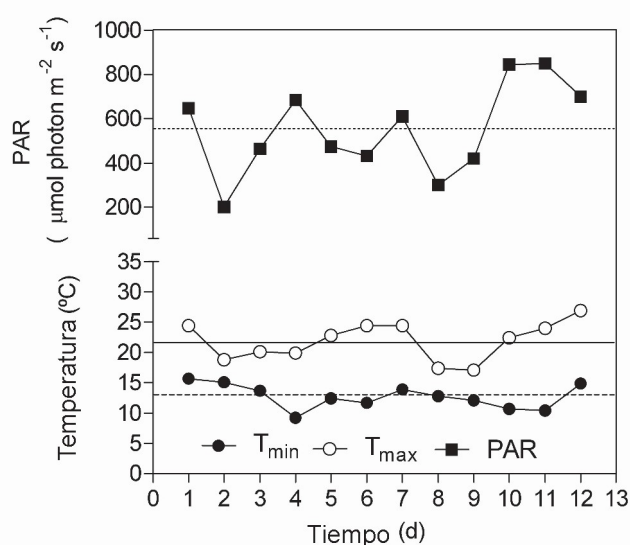


Figura 1-3. Esquema de la organización de los ensayos de laboratorio y al aire libre.

### 1.3.3 Ensayos al aire libre

Las plántulas fueron trasplantadas a potes de 4 L con agujeros en su base llenos con suelo orgánico estéril. Los potes fueron colocados en bandejas de 10 L e inundados con 5 L de agua destilada (Figura 1-3 C). Las bandejas se mantuvieron en el invernadero, con temperaturas día/noche de  $21/13 \pm 2$  °C, 550 PAR, durante 12 d. Luego de ese tiempo, las bandejas se transfirieron al aire libre, donde crecieron durante otros 12 d, bajo las temperaturas y PAR graficadas en la Figura 1-4.



**Figura 1-4.** PAR del ambiente y temperatura de aire durante el experimento al aire libre. El gráfico representa el PAR y la temperatura del aire registrada desde el día 12 hasta el día 24 del experimento. La línea de puntos, a rayas y sólida representan los promedios de PAR, temperatura máxima y temperatura mínima, respectivamente.

### 1.3.4 Análisis del crecimiento de la planta en el ensayo de laboratorio de tiempo corto

Las plántulas del cultivo hidropónico fueron escaneadas a 600 dpi de resolución (HP PSC 1510 Hewlett Packard Development Company, LP, USA) en el estadio  $T_0$  y luego de tres días de cultivo bajo condiciones OT y ST. Las imágenes digitalizadas fueron analizadas con el paquete de software Optimas (Optimas 6.1, Corporation, Bothell, WA) para determinar el largo de la tercer hoja. Se calculó la elongación neta de la hoja a partir de la ecuación:

$$\text{Elongación neta de la hoja} = \text{largo al día 3} - \text{largo en el estadio } T_0$$

### 1.3.5 Test de fluorescencia transitoria rápida de la clorofila

El test no invasivo de fluorescencia transitoria rápida de la clorofila (test JIP) fue realizado en la lámina de hojas expandidas con un fluorómetro de clorofila portable (Pocket PEA, Hansatech Instrument, UK) en los ensayos de laboratorio y al aire libre. Para este propósito, las hojas fueron cubiertas con clips de hoja para adaptarlas a

oscuridad durante 20 min. Luego los clips de hoja fueron abiertos y las muestras fueron expuestas durante 3 s a  $3500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (en el pico de longitud de onda 637 nm). El software pocket PEA (PEA plus v1.1, Hansatech Instrument Ltd., UK) fue usado para analizar las propiedades del PSII de acuerdo a Strasser et al., 2000. Los parámetros JIP analizados fueron: RC/CS<sub>0</sub>, RC/ABS, F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub>, ABS/RC, DI<sub>0</sub>/RC and PI<sub>ABS</sub>. Sus definiciones fueron descriptas en la Tabla 1-1.

### **1.3.6 Determinación del contenido de clorofila**

El contenido de Chl fue medido en la lámina de hojas expandidas de plantas crecidas al aire libre con un espectrofotómetro portable de la clorofila no invasivo (Clorofilio, Cavadevices, BA, Arg.). Los datos fueron expresados en unidades SPAD.

### **1.3.7 Determinación de parámetros de intercambio de gases**

Los parámetros de intercambio de gases, velocidad neta de fotosíntesis (P<sub>n</sub>), conductancia estomática (G<sub>s</sub>) y la concentración interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) fueron medidos en láminas de hojas en expansión bajo luz saturante ( $1200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  iluminación, luces LED) a la misma temperatura del aire de cada condición experimental particular, usando un sistema portable de fotosíntesis (TPS-2 Portable Photosynthesis System, MA, USA).

### **1.3.8 Determinación del contenido relativo de agua**

El contenido relativo de agua (RWC) se estimó en la lámina de la hoja. Con este propósito, el tejido fue pesado fresco, luego fue sumergido en agua destilada durante 24 h y alcanzar turgencia, y luego de secarlo en un horno a 70 °C durante 48 h. El RWC fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{RWC} = [(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso turgente} - \text{peso seco}] \times 100$$

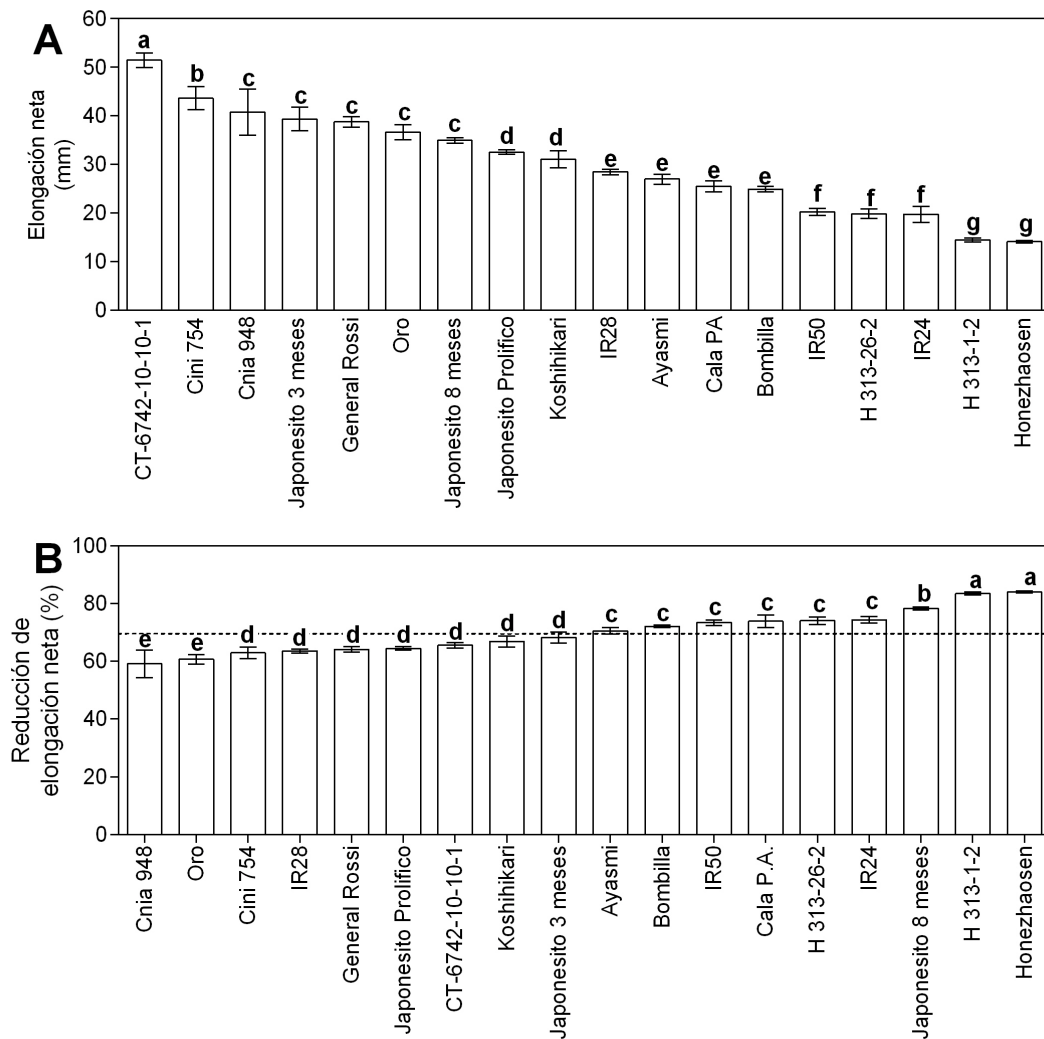
### **1.3.9 Análisis estadísticos**

Los datos fueron sometidos a un ANOVA y a análisis *post-hoc*, el test DGC (Balzarini and Di Rienzo, 2012) y el test T fueron usados en el paquete de software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2016).

## **1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.4.1 Tamizado del desempeño del crecimiento del arroz bajo condiciones de temperaturas subóptimas y óptimas**

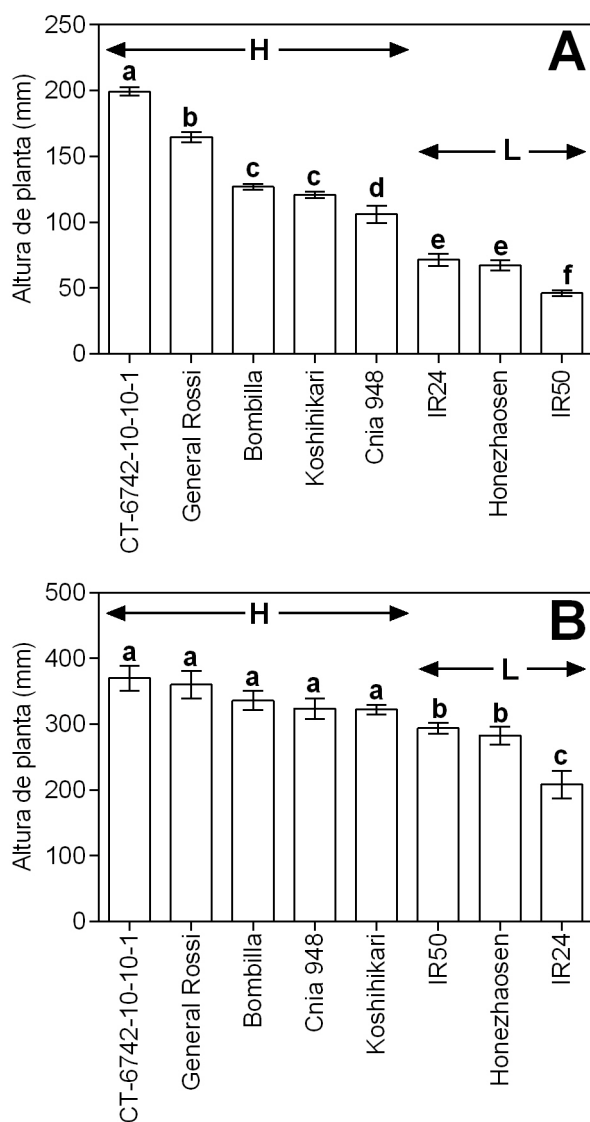
Realizamos un método de tamizado para identificar cultivares de arroz con desempeño contrastante en el crecimiento bajo ST. Con este propósito, un sistema de cultivo hidropónico de tiempo corto fue establecido en el laboratorio, exponiendo plántulas a condiciones ST u OT durante la expansión de la tercera hoja. Los resultados revelaron variación entre los 18 cultivares testeados de acuerdo a la elongación neta de la hoja de las plántulas crecidas bajo condiciones ST durante tres días (Figura 1-5 A). El porcentaje de reducción de la elongación neta de la hoja, relacionado con la elongación neta de la hoja registrada en condiciones OT, promedió un 70% para todos los cultivares (Figura 1-5 B). Los cultivares Cnia 948, Oro, Cini 745, IR28, General Rossi, Japonesito Prolífico, CT-6742-10-10-1 y Koshihikari presentaron los menores porcentajes de reducción de la elongación neta de la hoja, en ese orden, mientras que la secuencia de cultivares que presentó los mayores valores de este parámetro fue Honezhaosen, H313-1-2, Japonesito 8 meses, IR24, H 313-26-2, Cala P.A. IR50 y Bombilla.



**Figura 1-5.** Elongación neta de la hoja de cultivares de arroz. Las plántulas fueron crecidas hidropónicamente en ensayos de laboratorio de corto tiempo bajo ST y OT. La elongación neta de la tercera hoja fue determinada por análisis de imágenes digitalizadas de las plántulas. **A)** Elongación neta de la hoja bajo ST. **B)** Porcentaje de reducción de la elongación neta de la hoja en condiciones ST respecto de OT. La línea punteada representa el promedio del porcentaje de reducción de la elongación neta de la hoja a lo largo de todos los cultivares. Barras con la misma letra no son estadísticamente significativas (test DGC;  $P < 0.01$ ; los datos representan promedios  $\pm$  EE;  $n = 15$ ).

Luego, plantas de ocho cultivares representativos de los dos grupos delimitados por este promedio (por encima y por debajo) fueron sometidos a condiciones ST en dos experimentos a tiempo largo (24 d), llevados a cabo en el laboratorio o al aire libre. Los resultados de estos experimentos mostraron que los cultivares de arroz variaban en su respuesta a ST respecto de la altura de la planta (Figura 1-6), siendo el patrón de esta variación similar al encontrado para los valores de elongación neta de la hoja

en el experimento previo (Figura 1-5): cultivares IR24, Honezhaosen, e IR50 (desde aquí, grupo L) presentaron altura de planta y elongación neta de la hoja menores que CT-6742-10-10-1, General Rossi, Bombilla, Koshihikari, y Cnia 948 (desde aquí, grupo H).



**Figura 1-6.** Altura de planta de cultivares de arroz seleccionados. Las plántulas fueron crecidas en condiciones **A)** de laboratorio y **B)** al aire libre, bajo condiciones ST durante tiempos largos. H: grupo H de cultivares; L: grupo L de cultivares. Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes (test DGC;  $P < 0.01$ ; los datos representan el promedio  $\pm$  EE;  $n = 15$ ).

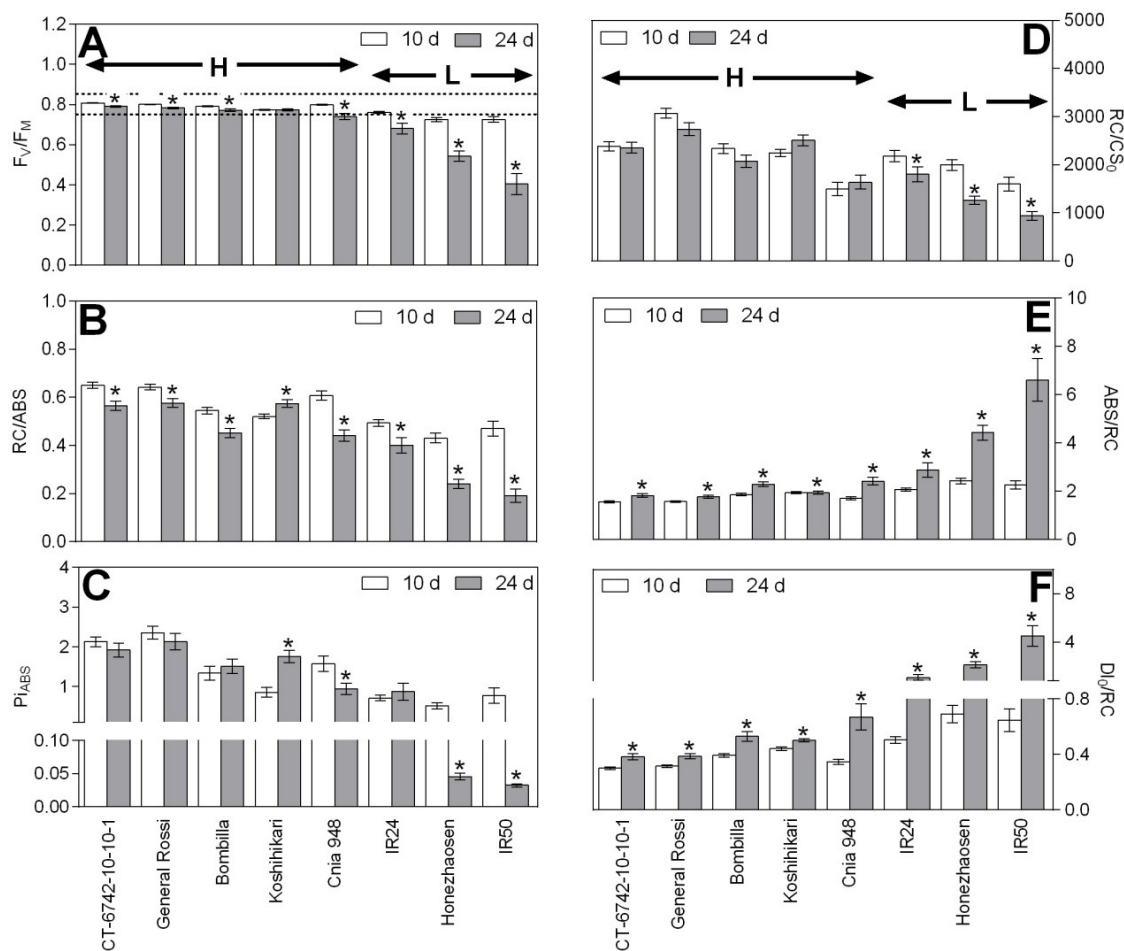
#### 1.4.2 Efecto del tratamiento de temperaturas subóptimas sobre el desempeño del fotosistema II

Luego desarrollamos un experimento de laboratorio en donde los parámetros  $F_V/F_M$ ,  $RC/ABS$ ,  $PI_{ABS}$ ,  $RC/CS_0$ ,  $ABS/RC$  and  $DI_0/RC$  fueron evaluados mediante el test JIP en los días 10 y 24 luego de iniciar el tratamiento por temperaturas. Los cultivares del grupo H mostraron valores de  $F_V/F_M$  que mayormente se mantenían dentro del rango establecido como óptimo (0.75 – 0.85, de acuerdo a Bolhàr-Nordenkamp et al.,

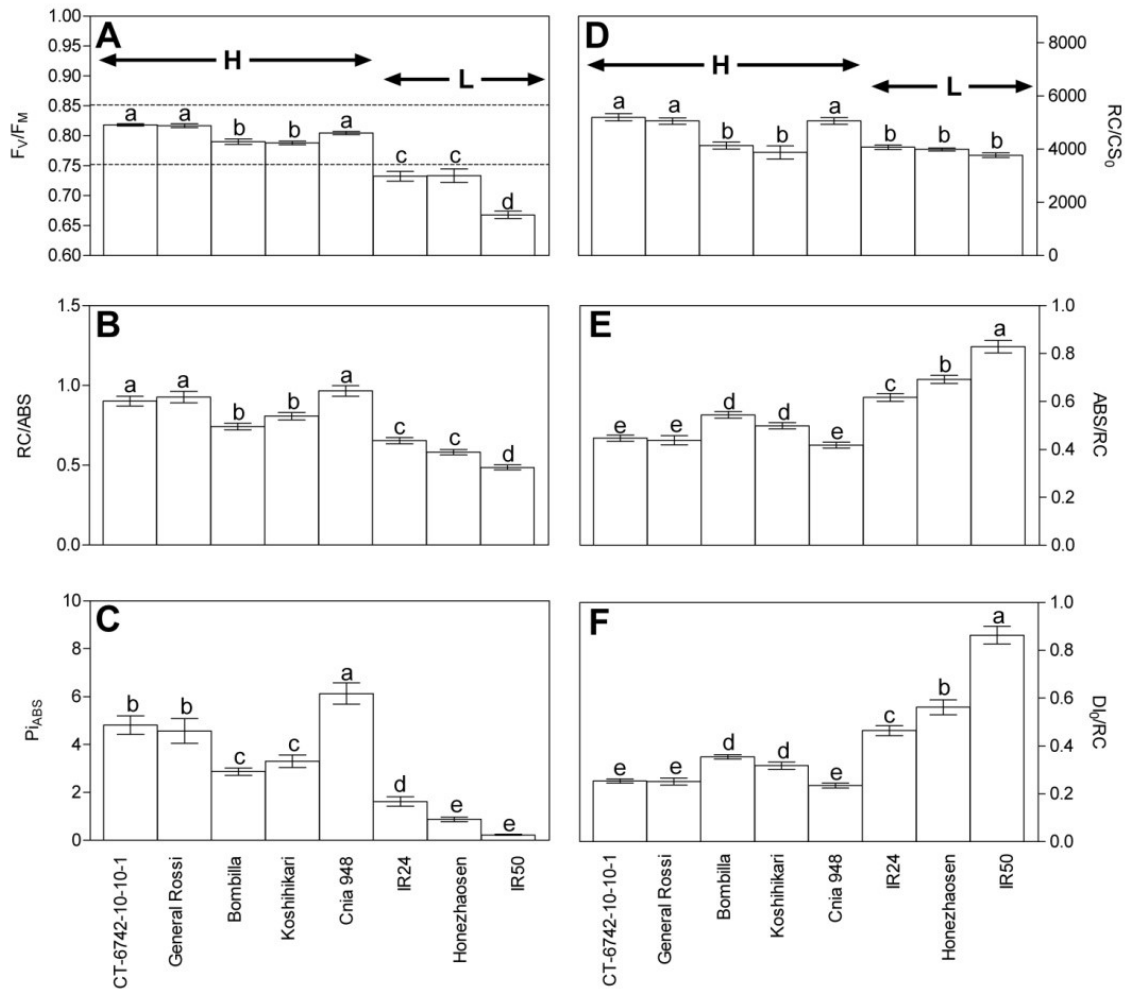


1989) hasta el final del experimento (con la excepción de una pequeña disminución observada para el cultivar Cnia 948 en el día 24). En contraste, los cultivares del grupo L presentaron valores de  $F_V/F_M$  iguales o menores al valor óptimo de 0.75 en el día 10 (Figura 1-7 A), con la excepción del cultivar IR24. Sin embargo, en el día 24 todos los cultivares del grupo L mostraron valores de  $F_V/F_M$  por debajo de ese límite. Nuestros resultados revelaron que RC/ABS aumentó con el tiempo para todos los cultivares con la excepción de Koshihikari, para el cual se encontró un incremento de este valor (Figura 1-7 B). El índice de rendimiento  $PI_{ABS}$  combina criterios estructurales y funcionales del PSII con lo cual es considerado un buen índice vital (González Moreno et al., 2008). El  $PI_{ABS}$  disminuyó con el tiempo para los cultivares Cnia 948, Honezhaosen e IR50, mientras que aumentó en Koshihikari y no se vio significativamente modificado en el resto de los cultivares (Figura 1-7 C). Por otro lado, para todos los cultivares del grupo L el valor de  $RC/CS_0$  se redujo con el tiempo (Figura 1-7 D), mientras que para los cultivares del grupo H no se modificó significativamente. Esto sugiere que los RCs podrían estar inactivados en el grupo L pero no en el grupo H. Bajo condiciones de estrés todos los cultivares incrementaron el valor de  $ABS/RC$  con el tiempo (Figura 1-7 E). Sin embargo, estos aumentos tendían a ser menores en el grupo H en comparación con el grupo L. El valor de  $ABS/RC$  depende de la proporción entre los RCs activos y los no-activos y representa, en promedio, el tamaño de antena aparente (Strasser et al., 2000). Estos resultados en conjunto con los obtenidos sobre la proporción  $RC/CS_0$  (Figura 1-7 D) indicarían que algunos RCs estarían inactivados en el grupo L. De igual manera, la proporción  $DI_0/RC$ , que indica la cantidad de energía absorbida que no es atrapada por los RC sino que es disipada, tendió a aumentar en ambos grupo de cultivares a pesar de que la magnitud de este incremento fue mayor para el grupo L que para el H (Figura 1-7 F). Luego se midieron los valores de  $F_V/F_M$ ,  $RC/ABS$ ,  $PI_{ABS}$ ,  $RC/CS_0$ ,  $ABS/RC$ , y  $DI_0/RC$  en estos mismos cultivares al final del experimento de tiempo largo en el cual estaban sometidos a ST al aire libre (día 24, Figura 1-8). Nuevamente se encontraron valores de  $F_V/F_M$  óptimos para el grupo H y subóptimos para el grupo L (Figura 1-8A). Además, el grupo H mostró valores mayores de  $RC/ABS$  y  $PI_{ABS}$  que el grupo L (Figuras 1-8 B y C). Inversamente, los valores de  $ABS/RC$  y  $DI_0/RC$  en el grupo de cultivares H fueron menores que aquellos del grupo L (Figuras 1-8 E y F). Los grupos no se diferenciaron en cuanto a sus valores de  $RC/CS_0$  (Figura 1-8 D). Resulta interesante que los valores de crecimiento y de la mayoría de los parámetros JIP arriba descritos obtenidos en el ensayo de laboratorio y el desarrollado al aire libre tuvieron altos y significativos coeficientes de correlación (Tabla 1-2).

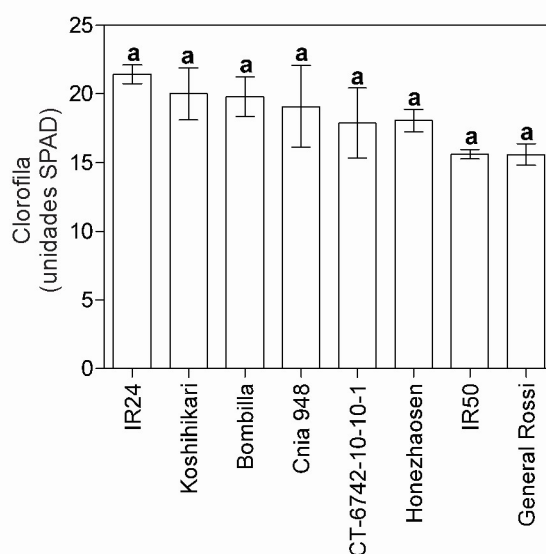
En contraste con la fluorescencia de la clorofila, el contenido de Chl no mostró diferencias significativas entre los cultivares en el ensayo al aire libre (Figura 1-9).



**Figura 1-7.** Test JIP en cultivares de arroz seleccionados cultivados bajo condiciones ST en el experimento de laboratorio. Las plántulas fueron cultivadas durante 24 d. El test JIP se realizó con un fluorómetro de clorofila portátil en los días 10 y 24. Los parámetros JIP analizados fueron: **A)**  $F_v/F_M$ , **B)**  $RC/ABS$ , **C)**  $PI_{ABS}$ , **D)**  $RC/CS_0$ , **E)**  $ABS/RC$  y **F)**  $DI_0/RC$ . Las líneas punteadas en A representan el máximo (0.85) y mínimo (0.75) valor de  $F_v/F_M$  que determina el rango óptimo. H: grupo de cultivares H; L: grupo de cultivares L. Barras (promedio  $\pm$  EE;  $n = 15$ ) con la misma letra no son significativamente diferentes (test DGC;  $P < 0.01$ ). Letras blancas y grises corresponden a los días 10 y 24, respectivamente. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los días de muestro (T test;  $P < 0.01$ ).



**Figura 1-8.** Test JIP en cultivares de arroz seleccionados cultivados bajo condiciones ST en el experimento al aire libre. El test JIP se realizó con un fluorómetro de clorofila portátil al final del experimento (24 d). Los parámetros JIP analizados fueron: **A)**  $F_v/F_M$ , **B)**  $RC/ABS$ , **C)**  $PI_{ABS}$ , **D)**  $RC/CS_0$ , **E)**  $ABS/RC$  y **F)**  $DI_0/RC$ . Las líneas punteadas en A representan el máximo (0.85) y mínimo (0.75) valor de  $F_v/F_M$  que determina el rango óptimo. H: grupo de cultivares H; L: grupo de cultivares L. Barras (promedio  $\pm$  EE;  $n = 15$ ) con la misma letra no son significativamente diferentes (test DGC;  $P < 0.01$ ). Letras blancas y grises corresponden a los días 10 y 24, respectivamente. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los días de muestro (T test;  $P < 0.01$ ).



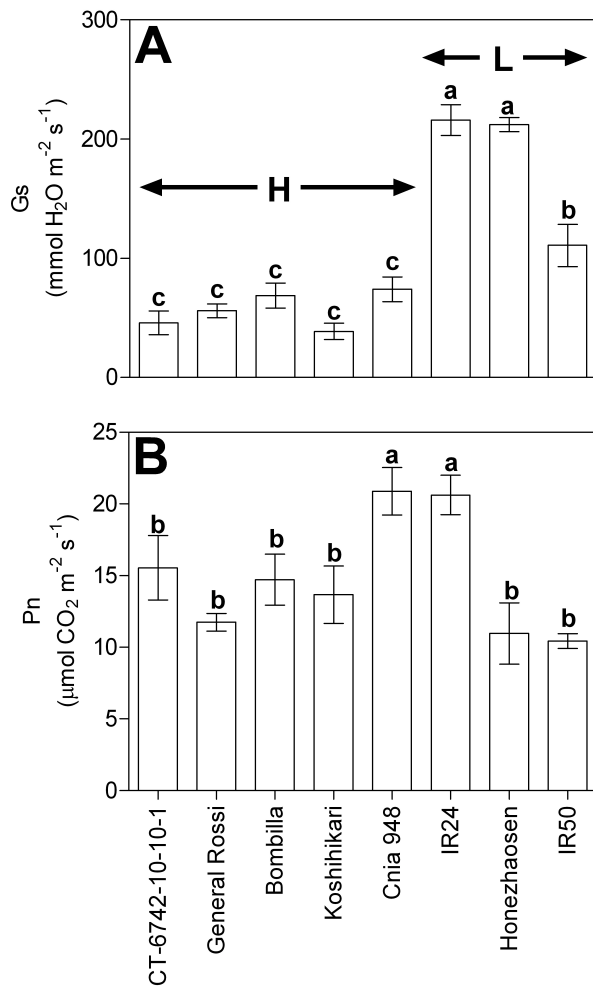
**Figura 1-9.** Contenido de clorofila (Chl) de cultivares de arroz seleccionados sometidos a ST en el experimento al aire libre. El contenido de Chl se determinó con un espectrofotómetro para clorofila portátil al final del experimento (24 d). H: grupo de cultivares H; L: grupo de cultivares L. Barras (promedio  $\pm$  EE; n = 15) con la misma letra no son significativamente diferentes (test DGC; P < 0.01).

**Tabla 1-2.** Valores de correlación obtenidos entre la altura de planta y los parámetros JIP del ensayo de laboratorio y el ensayo al aire libre.

Parámetro	R de Pearson	Valor P
Altura de planta	0.78	0.0160
$F_v/F_m$	0.94	0.0005
RC/ABS	0.86	0.0160
$PI_{ABS}$	0.70	0.0350
RC/ $CS_0$	0.49	0.2210
ABS/RC	0.94	0.0006
$DI_0/RC$	0.97	<0.0001

### 1.4.3 Influencia del tratamiento de temperaturas subóptimas en los parámetros de intercambio de gases

Los análisis de intercambio de gases fueron realizados en el experimento al aire libre sobre plántulas del mismo grupo de cultivares contrastantes descritos arriba. Se encontró una variación diferencial de  $G_s$  y  $P_n$  entre los cultivares: bajo condiciones ST



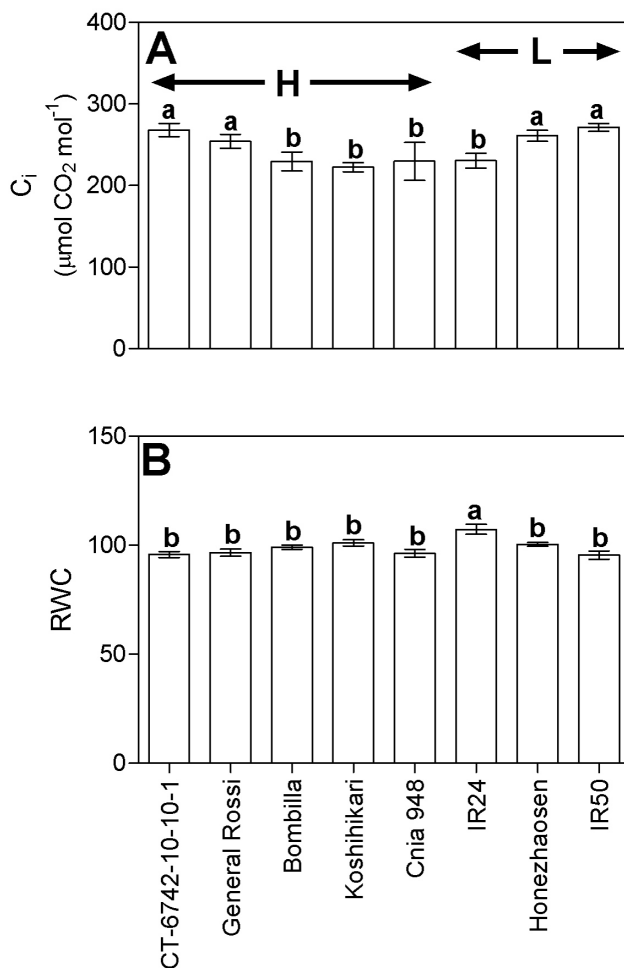
**Figura 1-1.** Parámetros de intercambio de gases en cultivares seleccionados sometidos a condiciones ST en el experimento al aire libre. Gs (A) y Pn (B) fueron determinados con un sistema portable de fotosíntesis al final del experimento (24 d). H: grupo H de cultivares; L: grupo L de cultivares. Barras (promedio  $\pm$  EE; n = 15) con la misma letra no son significativamente diferentes (test DGC; P < 0.01).

otro lado, los valores de Pn también tendían a disminuir con la temperatura en todos los cultivares y, en concordancia con lo encontrado en el ensayo al aire libre, no se evidenció un comportamiento diferencial entre los grupos de cultivares (Figura 1-12 B).

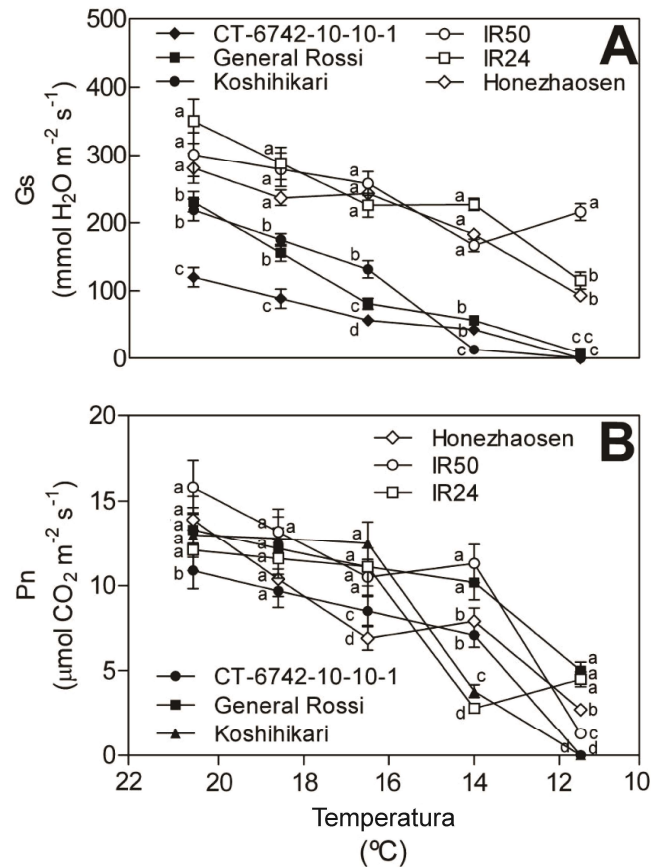
Finalmente, calculamos la eficiencia instantánea del uso del agua ( $WUE_i = Pn/Gs$ , Ripullone et al., 2004) en nuestras plantas de arroz basándonos en los valores obtenidos en el experimento al aire libre (Figura 1-10) y en el laboratorio (Figura 1-12)

los cultivares del grupo L tuvieron valores significativamente superiores de Gs que los cultivares del grupo H (Figura 1-10 A). Sin embargo, los grupos de cultivares no se diferenciaron en cuanto a los valores de Pn (Figura 1-10 B), Ci y RWC (Figura 1-11). Se realizó un ensayo adicional en el laboratorio a tiempo largo para describir los valores de intercambio de gases en un rango de ST. Plántulas de los grupos H y L se cultivaron bajo condiciones OT durante 24 d. El día 2 al comienzo del fotoperiodo se estableció la temperatura a 24 °C durante 2 h y luego fue disminuida de manera gradual hasta alcanzar los 11.5 °C en un periodo de 3 h. Nuestros resultados mostraron que Gs tendía a disminuir con la disminución de la temperatura y que los cultivares del grupo H tenían menores valores de Gs que los del grupo L en todo el rango de temperaturas evaluadas (Figura 1-12 A). Por

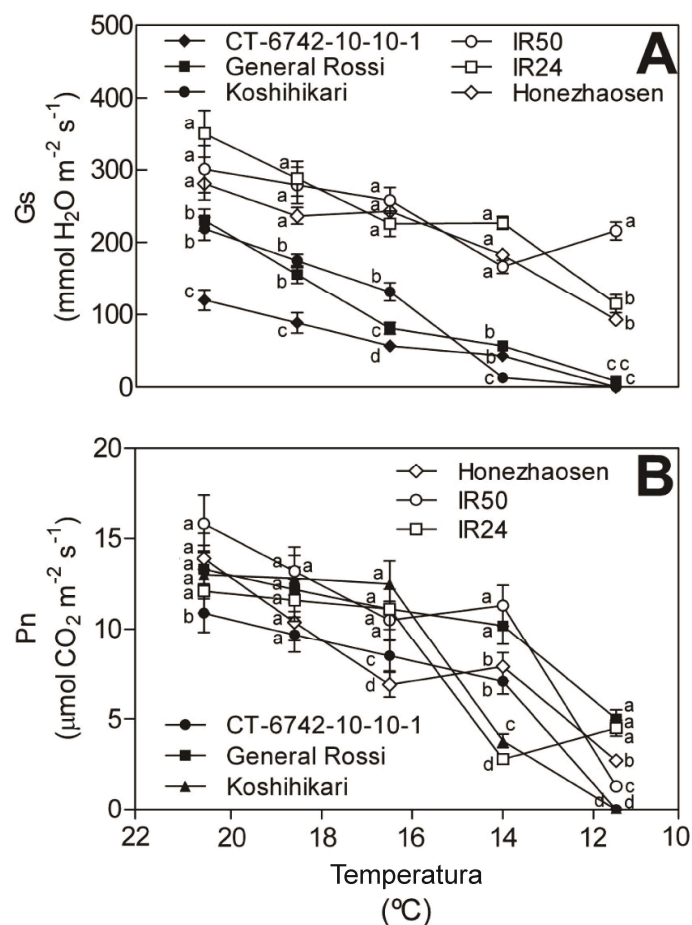
descriptos arriba. Los resultados del experimento al aire libre indicaron que los cultivares del grupo H tenían mayores valores de  $WUE_i$  que aquellos del grupo L (Figura 1-13 A). Esto podría estar relacionado con los reducidos valores de  $G_s$  descriptos para estos cultivares respecto de los cultivares del grupo L. Del mismo modo, el ensayo de laboratorio mostró valores de  $WUE_i$  que aumentaban progresivamente con la disminución de la temperatura para temperaturas por debajo de 20 °C exclusivamente en los cultivares del grupo H (Figura 1-13 B).



**Figura 1-11.** Concentración de  $\text{CO}_2$  intracelular ( $C_i$ ) y contenido relativo de agua (RWC) en cultivares seleccionados sometidos a condiciones ST en el experimento al aire libre.  $C_i$  (**A**) y RWC (**B**) se determinaron al final del experimento (24 d). H: grupo H de cultivares; L: grupo L de cultivares. Barras (promedio  $\pm$  EE;  $n = 15$ ) con la misma letra no son significativamente diferentes (test DGC;  $P < 0.01$ ).



**Figura 1-12.** Parámetros de intercambio de gases cuantificados en cultivares de arroz seleccionados cultivados en condiciones ST en el ensayo de laboratorio. Las plántulas fueron cultivadas durante 24 d en condiciones OT. El día 25 la temperatura de la cámara de crecimiento se disminuyó gradualmente durante 3 h desde 24 °C hasta 11.5 °C. Gs (**A**), Pn (**B**) fueron determinados en el rango de 21-11.5 °C. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los cultivares a cada temperatura ensayada (test DGC; P < 0.01; los datos representan el promedio ± EE; n = 6).



**Figura 1-13.** Eficiencia instantánea del uso del agua de cultivares de arroz seleccionados cultivados en el laboratorio (A) y al aire libre (B) en condiciones ST durante tiempos largos. WUE<sub>i</sub> se calculó a partir de los datos de G<sub>s</sub> y P<sub>n</sub> (Figura 1-10 y Figura 1-12). H: grupo H de cultivares; L: grupo L de cultivares. Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes en A. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los cultivares a cada temperatura ensayada en B (test DGC; P < 0.01; los datos representan el promedio ± EE; n=15 y 6 para A y B, respectivamente).

## 1.5 CONCLUSIONES

Uno de los objetivos del presente trabajo era detectar cultivares de arroz con comportamiento contrastante en condiciones ST. Los resultados que aquí expusimos mostraron que existió una variación significativa entre los 18 cultivares ensayados en cuanto al grado de reducción del crecimiento inducido por ST. Esto nos permitió asignar los cultivares más extremos a diferentes grupos, H (mayor altura de planta en condiciones ST) y L (menor altura de planta en condiciones ST), que luego consideramos como tolerantes y sensibles, respectivamente. Esta división en grupos



se vio respaldada por la mayoría de los parámetros JIP cuantificados en los ensayos de laboratorio y al aire libre que sugirieron un mayor efecto perjudicial en la funcionalidad del PSII en el grupo L en comparación con el grupo H, como consecuencia del tratamiento ST. Por un lado, el resultado de las mediciones en el experimento de laboratorio indicaron que el desempeño del PSII en el grupo L de cultivares tendía a disminuir del día 10 al 24 cuando se los trataba en condiciones ST, en contraste con los resultados del grupo H. Por el otro lado, los resultados de  $F_V/F_M$ , contenido de Chl, RC/ABS,  $PI_{ABS}$ , RC/ $CS_0$ , ABS/RC y  $DI_0/RC$ , obtenidos en el experimento al aire libre indicaron que la cantidad de clorofila activa disminuía progresivamente con la disminución de la temperatura. El hecho de que dicha reducción fuese más obvia en el grupo L posiblemente contribuye a su mayor tolerancia a ST.

Los resultados de  $F_V/F_M$  de los experimentos en el laboratorio y al aire libre están en concordancia con trabajos previos que estudiaron el efecto del estrés por frío (*chilling*) en arroz y reportaron mayores valores de  $F_V/F_M$  en cultivares tolerantes que en sensibles (Guo-li and Zhen-fei, 2005; Li et al., 2010b; Bonnacarrère et al., 2011). Sin embargo, nuestros resultados estaban en contraposición con otros reportes que indicaban que la medición de  $F_V/F_M$  es frecuentemente insensible al frío (van Heerden et al., 2003). Además, en otros trabajos se reportó una reducción en el contenido de Chl en cultivares sensibles cultivados en condiciones de estrés por *chilling*, no así en tolerantes, en contraposición a nuestros resultados (Li et al., 2010b; Kim et al., 2012). Tal aparente contradicción entre nuestros resultados y la bibliografía podría estar explicada por la diferente naturaleza fisiológica entre el estrés por *chilling* y por ST.

Los resultados de los experimentos de laboratorio y al aire libre mostraron que los grupos de cultivares L y H podían ser discriminados de acuerdo a sus valores de  $F_V/F_M$ , RC/ABS,  $PI_{ABS}$ , ABS/RC y  $DI_0/RC$ . Es de destacar que los cultivares se encontraron ordenados de manera similar para cada uno de estos parámetros (Figura 1-7 y Figura 1-8), lo cual nos incentiva a proponer que las mediciones en el laboratorio de estos parámetros podrían ser parte de un método válido para predecir la respuesta de los cultivares de arroz en condiciones ST en el campo. Con respecto a esto, los resultados del análisis de correlación entre los parámetros medidos en el laboratorio y al aire libre sugirieron que este método sería válido ya que los coeficientes encontrados fueron positivos y significativos. Del mismo modo, los grupos H y L pudieron ser claramente diferenciados por sus perfiles de valores de  $G_s$ ,  $C_i$  y RWC, no así de  $P_n$ . El hecho de que en el experimento al aire libre los cultivares del grupo H

mostraron valores de  $WUE_i$  mayores que los del grupo L, sugiere que el ajuste de  $WUE_i$  mediante una reducción en  $G_s$  podría ser parte de los mecanismos que contribuyen en este grupo de cultivares a mantener el crecimiento durante el estrés por ST.

Los métodos de selección de cultivares frecuentemente identifican a los cultivares japónica e indica como tolerantes y sensibles al frío, respectivamente (Mackill and Xiaomao, 1997). Los resultados aquí expuestos sugieren que los cultivares japónica también tienen un mejor comportamiento bajo condiciones ST que los cultivares indica. Es así que los cultivares Koshihikari y Bombilla descritos como cultivares del tipo japónica (Takeuchi et al., 2001; Giarrocco et al., 2007) se posicionaron en nuestro ensayo en el grupo de cultivares más tolerantes, mientras que IR50 y IR24 que son típicos cultivares indica (Andaya and Mackill, 2003) descritos en la literatura como sensible al estrés por frío (Ghosh and Singh, 1983; Andaya and Mackill, 2003; Guo-li and Zhen-fei, 2005; Kim and Tai, 2011; Kim et al., 2012), se encontraron entre los cultivares más sensible a ST.

Las mediciones de  $G_s$  realizadas en un rango de temperaturas indicaron diferencias intrínsecas entre los cultivares tolerantes y sensible, ya que los valores de  $G_s$  eran ya mayores para el grupo L que para el grupo H en temperaturas cercanas a la óptima. Esto podría ser explicado por la naturaleza genotípica de los cultivares, los cultivares indica usualmente tienen mayor densidad estomática y muestran valores altos de  $G_s$ , mientras que los cultivares japónica suelen mostrar el patrón contrario (Chen et al., 1990). Además, ha sido reportado que altos valores de  $G_s$  correlacionan con alta densidad estomática en arroz (Ohsumi et al., 2007) pero también se reveló que las diferencias genotípicas entre japónica e indica en cuanto a  $G_s$  se relacionan más con la apertura estomática (Maruyama and Tajima, 1990). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que estas diferencias se incrementaron al disminuir la temperatura sugiriendo que deben existir mecanismos diferentes entre los grupos para el control de  $G_s$ . En paralelo, los resultados de  $G_s$  aquí obtenidos concuerdan con otros estudios que muestran que los estomas de cultivares de maíz sensible a *chilling* se mantienen abiertos, mientras que aquellos de cultivares tolerantes se mantienen cerrados, bajo condiciones de estrés por *chilling* (Aroca et al., 2003). Un fenómeno similar fue observado en cultivares sensible y tolerantes a *chilling* de tomate sometidos a estrés por *chilling* (Bloom et al., 2004). Esto último sería congruente con la noción de que las bajas temperaturas provocan deshidratación de la hoja en plantas sensibles (Pardossi et al., 1992; Janowiak and Markowski, 1994; Aroca et al., 2011). En

consecuencia, es posible que los cultivares del grupo H tengan una mayor habilidad para reducir Gs que les lleve a mejorar su balance de agua y obtener así una mayor tolerancia a ST. Desafortunadamente, pocos reportes en la bibliografía fueron encontrados en los que se estudien los efectos de las bajas temperaturas sobre Gs y Pn en arroz, y los que se encontraron son específicos de estrés por *chilling* (e.g.: Li et al., 2010; Aghaee et al., 2011; Hassibi et al., 2011), lo cual no nos permite discutir más ampliamente nuestros resultados.

Koshihikari es la variedad líder en Japón (40 %; Uehara, 2003) y es utilizada como donante de características de tolerancia a frío en mejoramiento (Ashikari et al., 2007). Se puede destacar de nuestro informe que se encontraron al menos dos cultivares con tolerancia a ST superior a Koshihikari, CT-6742-10-10-1 and General Rossi, que podrían ser usados como padres o donantes de tolerancia en mejoramiento para generar nuevas variedades de cultivo. Además, proponemos que estos cultivares en conjunto con aquellos más sensible estudiados aquí (e.g.: Honezhaosen o IR50) podrían ser útiles para estudios futuros orientados a dilucidar los mecanismos fisiológicos que podrían mejorar el crecimiento en condiciones de ST.

***CÁPITULO 2: Análisis del crecimiento de la planta***



Este capítulo consiste de dos partes diferentes que discuten el mismo tema a diferentes niveles: el crecimiento de órganos de la planta. La primer parte está enfocada en la regulación del tamaño de órganos de la planta entre especies. Para poder resolver la pregunta de cómo la división celular y la expansión celular contribuyen a las diferencias de tamaño entre las diferentes especies, se realizó un meta-análisis de los parámetros de crecimiento de raíces y hojas de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se utiliza el análisis cinemático del crecimiento de órganos en este meta-análisis como un método cuantitativo para descifrar las bases celulares de las diferencias en las velocidades de crecimiento de los órganos. La segunda parte se enfoca en las bases celulares de la respuesta del crecimiento de la hoja de arroz al estrés por temperaturas subóptimas y se utilizó el mismo enfoque del análisis cinemático. De manera general, la primera parte da una introducción al análisis cinemático en un contexto más amplio mientras que la segunda parte describe directamente qué pasa respecto del tema de interés de esta Tesis: el efecto del estrés por temperaturas subóptimas en las plántulas de arroz.

***CÁPITULO 2 PARTE 1: ¿Qué determina las diferencias de tamaño de órgano entre especies? Un meta-análisis de las bases celulares***

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Cómo las plantas regulan su crecimiento es una pregunta central en el desarrollo de una planta. Las diferencias en el tamaño de los órganos entre las especies son asombrosas: las hojas de *Arabidopsis thaliana* son de tan solo 10-20 mm<sup>2</sup> (Kalve et al., 2014a), mientras que aquellas de *Helianthus annuus* llegan a 18.000 - 30.000 mm<sup>2</sup> (Granier and Tardieu, 1998b); 1500 veces mayor. Superpuesto a esto, efectos ontogénicos y ambientales causan diferencias sustanciales, incluso en un único genotipo: la quinta hoja de las plántulas de trigo es sólo 3x el largo de la primera (Beemster and Masle, 1996) y las hojas de árboles bonsai son hasta 25x más pequeñas que aquellas de su misma especie cultivadas en condiciones normales (Körner et al., 1989).

Las células son los bloques de construcción del cuerpo de la planta y por lo tanto una pregunta obvia para hacerse es “¿cuál proceso celular es ante todo responsable y cómo es modulado para generar diferencias en el tamaño de los órganos?” Para contestar esta pregunta es crucial examinar la división y la expansión celular en paralelo. Órganos creciendo en estado estacionario, linealmente, tal como la punta de la raíz y las hojas de las *Graminae*, han sido analizados por décadas (Goodwin and Stepka, 1945) utilizando marcos cuantitativos rigurosos (Silk and Erickson, 1979). En estos sistemas lineales, la velocidad de crecimiento del órgano es una consecuencia directa del número de células producidas por unidad de tiempo debido a la división celular (producción celular, P) y del largo de las células que entran en la zona madura del órgano ( $l_{mat}$ ; Tabla 2-1, Eqs. 2 & 3). Además, P está determinado por el número de células en la zona de división ( $N_{div}$ ) y la velocidad promedio de división celular (D; Tabla 2-1, Eq. 4), mientras que  $l_{mat}$  es definido por el largo de las células que abandonan el meristema ( $l_{div}$ ), la velocidad promedio (RER) y al duración de la expansión celular ( $T_{el}$ ; Tabla 2-1, Eq. 5).

A pesar de que las hojas de Eudicotiledóneas también exhiben un gradiente de desarrollo espacial (Donnelly et al., 1999; Kazama et al., 2010; Andriankaja et al., 2012), no crecen en estado estacionario y son descritas de manera más conveniente en una base temporal considerando a la hoja en su totalidad, esencialmente ignorando las variaciones en los patrones de desarrollo a lo largo de la hoja (Das Gupta and Nath, 2015). El área madura de la hoja (LBA) es una función del número de células ( $N_{mat}$ ) y el área celular en maduración ( $A_{mat}$ ; Tabla 2-1, Eq. 7).  $N_{mat}$ , sucesivamente, es determinado por el número inicial de células que son reclutadas en el primordio ( $N_{prim}$ ), la duración de la fase de división ( $T_{div}$ ), y la velocidad promedio de división celular (D;

Tabla 2-1, Eq. 8). Análogamente,  $A_{mat}$  es una función del área de las células que abandonan la fase de división ( $A_{div}$ ), la duración de la fase de expansión celular ( $T_{exp}$ ), y el promedio (relativo) de la velocidad de expansión celular (RER; Tabla 2-1, Eq. 9).

Las relaciones entre estos parámetros celulares y el crecimiento del órgano completo han sido utilizadas para estudiar las diferencias genéticas, de condiciones ambientales y tratamientos fisiológicos en una misma especie. En estos estudios, no se puede reconocer un único parámetro que sea responsable de las diferencias observadas en cuanto al tamaño del órgano, indicando que las diferencias genotípicas y de tratamiento afectan de manera diferente los procesos celulares. Sin embargo, estos estudios nos permiten identificar los parámetros principales que determinan las diferencias entre las especies, a través de un más amplio rango de tamaños de órganos que los estudios individuales. Por lo tanto, nosotros extrajimos los datos de todos los análisis cinemáticos que pudimos encontrar para tres tipos de órganos, las puntas de las raíces, y las hojas de las *Graminae* y las Eudicotiledóneas, y realizamos un meta-análisis para determinar los mecanismos celulares que controlan las diferencias en tamaños de órganos características entre las especies de plantas.



**Tabla 2-1.** Fórmulas y parámetros utilizados para el análisis cinemático de los diferentes tipos de órganos.

<b>Parámetros del análisis cinemático del crecimiento</b>			
	<b>Símbolo</b>	<b>Relaciones entre los parámetros</b>	<b>Ecuación N°</b>
<b>Raíces y hojas de <i>Graminae</i></b>			
Largo final de hoja (mm)	FLL	=LER.T <sub>LE</sub>	Ecuación 1
Tiempo de elongación de la hoja (h)	T <sub>LE</sub>		
Velocidad de elongación de la hoja (mm.h <sup>-1</sup> )	LER	=(P.l <sub>mat</sub> )/1,000	Ecuación 2
Velocidad total de elongación de raíz (mm.h <sup>-1</sup> )	LER	=(P.l <sub>mat</sub> )/1,000	Ecuación 3
Tasa de producción celular (cells.h <sup>-1</sup> )	P	=N <sub>div</sub> .D	Ecuación 4
Número de células en zona de división	N <sub>div</sub>		
Velocidad de división relativa (cell.cell <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	D		
Largo de célula madura (μm)	l <sub>mat</sub>	=l <sub>div</sub> .e <sup>RLI</sup>	Ecuación 5
Incremento relativo del largo	RLI	=RER.T <sub>el</sub>	Ecuación 6
Velocidad de expansión relativa (μm.μm.h <sup>-1</sup> )	RER		
Largo de las células que dejan el meristema (μm)	l <sub>div</sub>		
Tiempo de residencia de las células en la zona de elongación celular (h)	T <sub>el</sub>		
<b>Hojas de Eudicotiledóneas</b>			
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	LBA	=(N <sub>mat</sub> .A <sub>mat</sub> )/1e <sup>8</sup>	Ecuación 7
Número de células en maduración	N <sub>mat</sub>	=N <sub>prim</sub> .e <sup>T<sub>div</sub>.D</sup>	Ecuación 8
Número de células en el primordio	N <sub>prim</sub>		
Tiempo que las células invierten dividiéndose (h)	T <sub>div</sub>		
Velocidad de división relativa (cell.cell <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	D		
Área de célula en maduración (μm <sup>2</sup> )	A <sub>mat</sub>	=A <sub>div</sub> .e <sup>RLA</sup>	Ecuación 9
Incremento relativo del área	RLA	=RER.T <sub>exp</sub>	
Área de las células en división (μm <sup>2</sup> )	A <sub>div</sub>		
Tiempo que las células invierten expandiéndose (h)	T <sub>exp</sub>		
Velocidad de expansión relativa (μm <sup>2</sup> .μm <sup>2</sup> .h <sup>-1</sup> )	RER		

## 2.2 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue detectar qué procesos celulares son principalmente responsables por el tamaño de las raíces y hojas de especies de *Graminae* y Eudicotiledóneas.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Extracción de los datos

Extrajimos los parámetros celulares cuantitativos (Tabla 2-1) del texto principal, tablas y figuras de estudios cinemáticos publicados. Si no estaban explícitamente dados, los calculamos, basándonos en las ecuaciones cinemáticas y los datos del mismo artículos (destacados con color rojo en las tablas suplementarias). En total, se analizaron 21 manuscritos para raíces (Tabla Suplementaria 1), 20 para hojas de *Graminae* (Tabla Suplementaria 2), y 17 para hojas de Eudicotiledóneas (Tabla Suplementaria 3).

### 2.3.2 Análisis estadístico

Realizamos análisis de Regresión Lineal Múltiple para investigar las relaciones entre los parámetros de crecimiento celulares y de órgano completo (Tabla 2-1) con el software estadístico SPSS para Windows (v22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las ecuaciones 1 a 9 descritas en la Tabla 2-1 fueron linearizadas por transformación logarítmica constituyendo las ecuaciones 10 a 16, respectivamente, que fueron ajustadas a los datos obtenidos o derivados de la literatura.

Para las puntas de raíz (usando los datos de la Tabla Suplementaria 1):

$$\log(\text{ORER}) = C_0 + C_1 \times \log(P) + C_2 \times \log(I_{\text{mat}}) \text{ (Ecuación 10)}$$

$$\log(P) = C_0 + C_1 \times \log(N_{\text{div}}) + C_2 \times \log(D) \text{ (Ecuación 11)}$$

$$\log(I_{\text{mat}}) = C_0 + C_1 \times \log(I_{\text{div}}) + C_2 \times \text{RLI} \text{ (Ecuación 12)}$$

$$\log(\text{RLI}) = C_0 + C_1 \times \log(\text{RER}) + C_2 \times \log(T_{\text{el}}) \text{ (Ecuación 13)}$$

Para las hojas de *Graminae* (usando los datos de la Tabla Suplementaria 2):

$$\log(\text{FLL}) = C_0 + C_1 \times \log(\text{LER}) + C_2 \times \log(T_{\text{LE}}) \text{ (Ecuación 14)}$$

$$\log(\text{LER}) = C_0 + C_1 \times \log(P) + C_2 \times \log(I_{\text{mat}}) \text{ (Ecuación 15)}$$

Las ecuaciones 11, 12 y 13 fueron también utilizadas para las hojas de *Graminae*.

Para las hojas de Eudicotiledóneas (usando los datos de la Tabla Suplementaria 3):

$$\log(\text{LBA}) = C_0 + C_1 \times \log(N_{\text{mat}}) + C_2 \times \log(A_{\text{mat}}) \text{ (Ecuación 16)}$$

Los datos y regresiones fueron graficados utilizando el paquete de software OriginPro software para Windows (v9.1.0, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## **2.4 RESULTADOS**

### **2.4.1 Raíces**

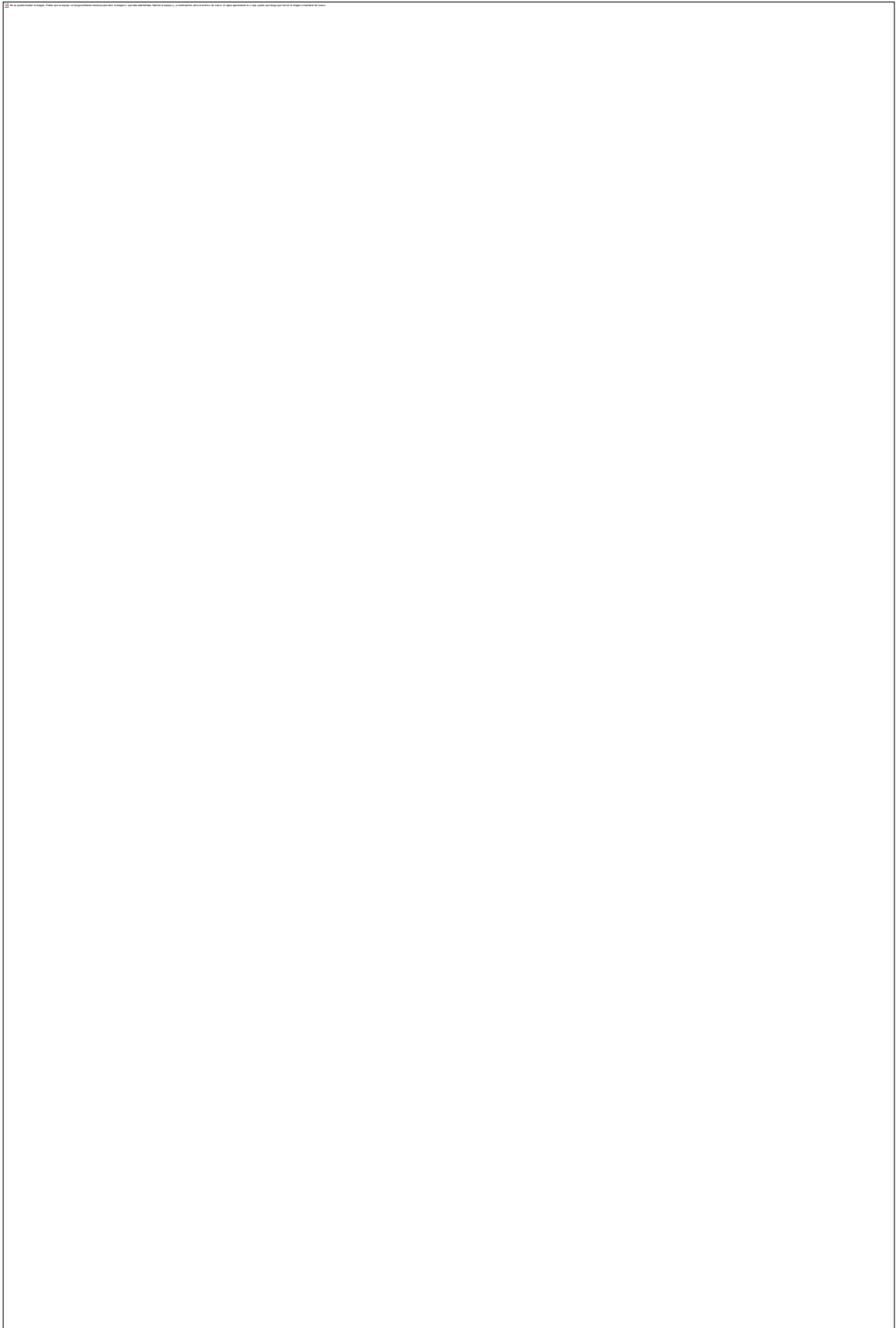
El desarrollo lineal indeterminado de las raíces es idealmente adecuado para estudiar las bases celulares de las diferencias de crecimiento de los órganos. En consecuencia, los primeros estudios, así como el mayor número total de estudios cinemáticos, (21; ver la Tabla Suplementaria 1), han sido realizados en las puntas de raíces. Estos estudios incluyeron seis especies diferentes: *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Phleum pratense*, *Triticum aestivum* y *Zea mays*. A pesar de que se reportaron datos de células del metaxilema y epidérmicas en algunos estudios, la mayoría de los datos involucraron células corticales.

Primero determinamos la contribución de la variación el largo de la célula madura ( $I_{\text{mat}}$ ) y de la producción celular (P) a las diferencias en velocidad total de elongación de la raíz (ORER; Tabla 2-1, Eq. 3). Como estos dos parámetros determinan directamente la velocidad de crecimiento del órgano, variaciones en  $I_{\text{mat}}$  y P explicaron el 100% de la variación entre especies y tipos celulares (Eq. 10; Figura Suplementaria 1 A). Ambos parámetros contribuyeron significativamente, pero los coeficientes estandarizados (Beta) sugirieron que el impacto de P sobre ORER fue mayor que el de  $I_{\text{mat}}$ . Para comparar sus contribuciones en más detalle, analizamos los modelos de ORER vs.  $I_{\text{mat}}$  y P, de manera individual. Dado que los diferentes tipos celulares poseen características diferentes, estas fueron analizadas de manera separada. Para los tres tipos celulares representados en el set de datos, hubo una correlación positiva fuerte entre P y ORER ( $R^2$  entre 0.78 y 0.90; Figura 2-1 A). En contraste, la correlación entre  $I_{\text{mat}}$  y ORER fue significativa sólo en el caso de las células corticales ( $R^2$  de 0.33; Figura 2-1 B). No hubo correlación entre P y  $I_{\text{mat}}$ , sugiriendo que la producción y expansión celular son independientes y que altos valores de producción celular no conllevan a células de menor tamaño o que ambos varíen en paralelo (datos no mostrados). Así, estos resultados muestran que diferencias en velocidad de crecimiento de la raíz entre especies son principalmente dirigidas por variaciones en el número de células producidas en el meristema.

La producción celular ( $P$ ), a su vez, está directamente determinada por el número de células en división ( $N_{div}$ ) y la velocidad a la cual estas células se dividen ( $D$ ), permitiéndonos realizar un análisis similar de regresión (Tabla 2-1, Eq. 4). Debido a que había datos insuficientes para los otros tipos celulares, restringimos este análisis a las células corticales. Como esperábamos,  $N_{div}$  y  $D$  en conjunto explicaron el 99% de la variación en  $P$  (Eq. 11; Figura Suplementaria 1 B). Ambos parámetros contribuyeron significativamente y casi equitativamente. Consecuentemente,  $N_{div}$  explicó el 73% y  $D$  el 74% de la variación en  $P$  (Figuras 2-1 C y D). Dado que el número de células en el meristema determinan en gran parte el largo del meristema ( $L_{mer}$ , la distancia entre las células madres y la posición en donde las células de un dado tipo celular detienen su división y comienzan a expandirse), el largo del meristema también correlacionó positivamente con  $P$  ( $R^2$  de 0.67; recuadro en la Figura 2-1 C). No hubo correlación entre la velocidad de división celular y el número de células en el meristema (datos no mostrados). Estos resultados indican que variaciones en velocidades de división celular y el número de células en división contribuyen equitativa e independientemente a diferencias en la producción total de células.

A pesar de no contribuir mucho en la variación de ORER, hubo diferencias significativas en  $I_{mat}$ . Por lo tanto, exploramos las bases de esta variación enfocándonos en las células corticales, usando la relación entre  $I_{mat}$ , el largo de las células que dejan el meristema ( $I_{div}$ ) y el incremento relativo del largo en la zona de elongación (RLI; Tabla 2-1, Eq. 5). En efecto, estos dos parámetros explicaron el 100% de la variación en el largo de la célula madura (Eq. 12; Figura Suplementaria 1 C). Tanto  $I_{div}$  como RLI contribuyeron significativamente, pero RLI tuvo un coeficiente Beta mayor. Sin embargo, individualmente el largo de las células que abandonan el meristema no mostraron correlación significativa (Figura 2-1 E), mientras que RLI correlacionó positivamente y explicó el 39% de la variación en  $I_{mat}$  (Figura 2-1 F). Curiosamente,  $I_{div}$  y RLI correlacionaron negativamente entre sí ( $R^2 = 0.80$ ; Figura Suplementaria 1 D). Dado que la mayor parte de la variación en  $I_{mat}$  se explicó por RLI, que sucesivamente es una función de RER y  $T_{el}$  (Tabla 2-1, Eq. 6), investigamos la relación entre estos tres parámetros más detalladamente. Como se esperaba, RER y  $T_{el}$  explicaron el 100% de la variación de RLI y ambos parámetros tuvieron un impacto comparable (Eq. 13; Figura Suplementaria 1 E). Sin embargo, solamente  $T_{el}$  mostró una correlación significativa con RLI, a pesar de que la correlación fue débil ( $R^2$  de 0.21; Figuras 2-1 G y H). En conjunto, estos parámetros muestran que diferencias en el tamaño de célula madura son mayormente explicados por el tiempo que las células

continúan expandiéndose y que células pequeñas típicamente se expanden por mayor tiempo.



**Figura 2-1.** Las bases celulares de las diferencias en la velocidad de crecimiento de la raíz en un rango de especies. **A)** la relación entre la velocidad de elongación de la raíz (ORER) y la producción celular (P). **B)** la relación entre ORER y el largo de célula madura ( $l_{mat}$ ). **C)** la relación entre P y el número de células en el meristema ( $N_{div}$ ). **D)** la relación entre P y la velocidad promedio de división celular (D). **E)** la relación entre  $l_{mat}$  y el largo de las células al final del meristema ( $l_{div}$ ). **F)** la relación entre  $l_{mat}$  y el incremento relativo del largo (RLI). **G)** la relación entre RLI y la velocidad relativa de elongación (RER). **H)** la relación entre RLI y el tiempo que las células están en la zona de elongación ( $T_{el}$ ). Las figuras A y B muestran modelos para células corticales (CC), células epidérmicas (EC), y células del mesófilo (MC). El recuadro en la figura C muestra la correlación entre P y el largo del meristema ( $L_{mer}$ ). Detalles de los parámetros de regresión se muestran en cada figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$  el coeficiente de correlación;  $n = 63$  para CC, 6 par EC y MC en A y B; 47 en figuras C y D; 27 en el recuadro de la figura C; y 23 en las figuras E, F, G y H. Significancia: \*  $0.01 < \text{valor-}p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS,  $p$  no significativo. T-test.

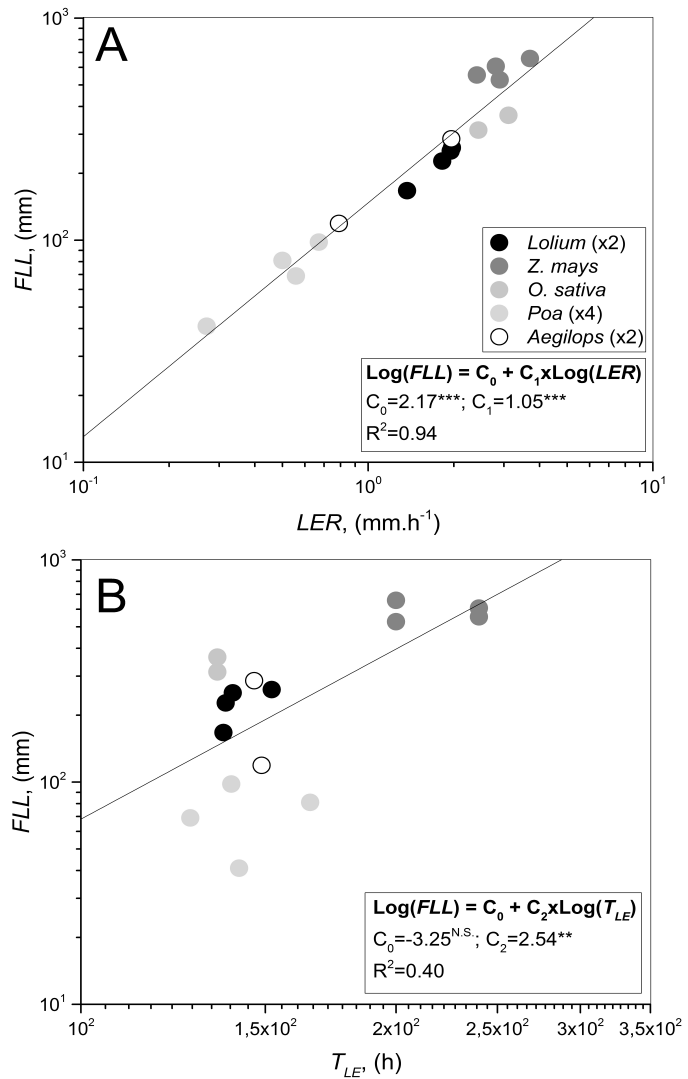
#### 2.4.2 Hojas de Graminae

El crecimiento de las hojas de *Graminae* tiene similitudes fuertes con el de las puntas de las raíces: es lineal y las células se organizan en filas con un gradiente espacial de proliferación, expansión y células maduras. A pesar de que el crecimiento de estas hojas, en contraste con las raíces, es determinado, luego de la emergencia suele haber una fase de crecimiento en estado estacionario que han sido extensivamente usadas para el análisis cinemático. Para estudiar las diferencias en el largo de la hoja y la velocidad de crecimiento de la hoja entre las especies de *Graminae*, extrajimos datos de 20 estudios cinemáticos publicados, involucrando diferentes especies: *Aegilops caudata*, *Aegilops tauschii*, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Oryza sativa*, *Poa annua*, *Poa trivialis*, *Poa compressa*, *Poa alpine*, *Triticum aestivum*, y *Zea mays* (Tabla Suplementaria 2). A través de estos estudios dos tipos diferentes de células fueron analizadas con más frecuencia: células epidérmicas en la fila adyacente a los estomas (células hermanas); y células localizadas en la parte más central entre líneas de células estomáticas que son sustancialmente más largas (Beemster and Masle, 1996).

Para explicar las diferencias en FLL, primero analizamos la contribución de la velocidad de elongación de la hoja (LER) y la duración de esa elongación ( $T_{LE}$ ; Tabla 2-1, Eq. 1). En concordancia con la Eq.1, LER y  $T_{LE}$  en conjunto explicaron el 100% de la variación de FLL (Eq. 14). Ambos parámetros contribuyeron a la variación de FLL, sin embargo los coeficientes Beta sugieren que el efecto de LER fue mayor (Figura Suplementaria 2 A). Consistentemente, el LER por sí solo explicó el 94% de la

variación de FLL y  $T_{LE}$  solamente el 40% (Figura 2-2). Este análisis sugirió que diferencias en el área de la hoja madura correlacionaron principalmente con la velocidad de crecimiento de la hoja, con una contribución menor de la duración del proceso de crecimiento.

**Figura 2-2.** La diferencia en los patrones de crecimiento determinando el tamaño de la hoja en un rango de especies de *Graminae*. **A)** la relación entre FLL y LER. **B)** la relación entre FLL y  $T_{LE}$ . Detalles de los parámetros de regresión se muestran en cada figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$  el coeficiente de correlación;  $n = 16$ . Significancia: \*  $0.01 < \text{valor-}p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS,  $p$  no significativo. T-test.



Basándonos en los datos cinemáticos luego investigamos el rol de la producción celular y del largo maduro de las células en la determinación de la variación de LER. Análogamente a las raíces, la producción celular ( $P$ ) y el largo de célula madura ( $l_{mat}$ ) en conjunto explicaron completamente la variación de LER (Eq. 15; Figura Suplementaria 2 B). A pesar de que ambos parámetros contribuyeron significativamente a la velocidad de crecimiento de la hoja, los coeficientes Beta sugirieron que el impacto de la producción celular fue mayor. En efecto, la producción celular de las células hermanas y de las células alargadas entre las filas estomáticas por sí sola explicó el 89% y 47 % de la variación de LER, respectivamente (Figura 2-3 A), mientras que no se encontró correlación significativa para el largo de célula madura

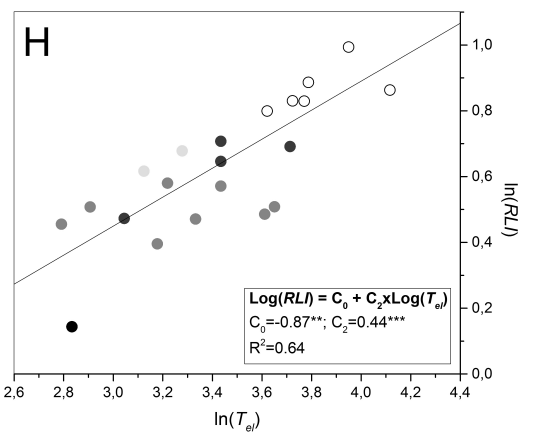
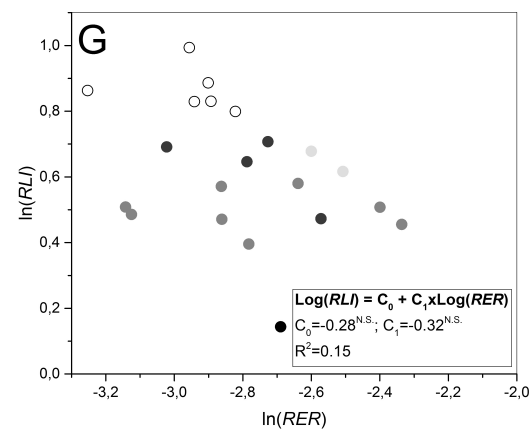
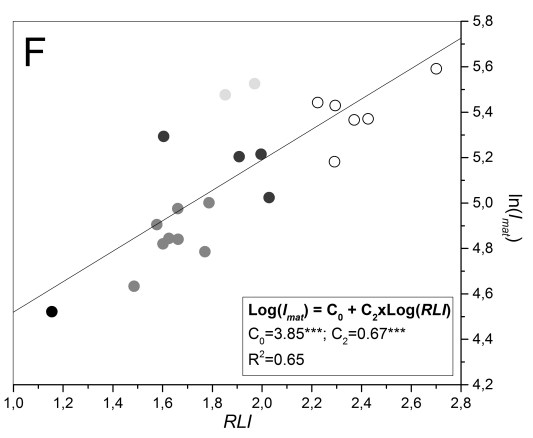
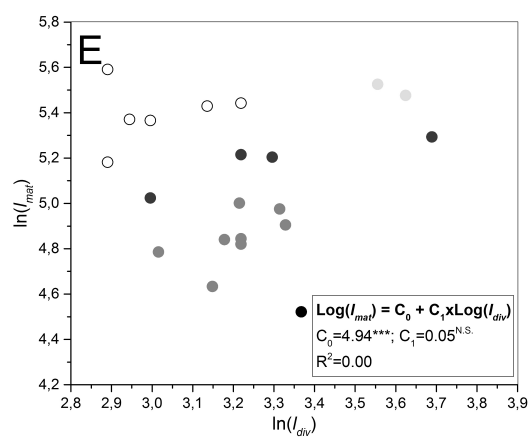
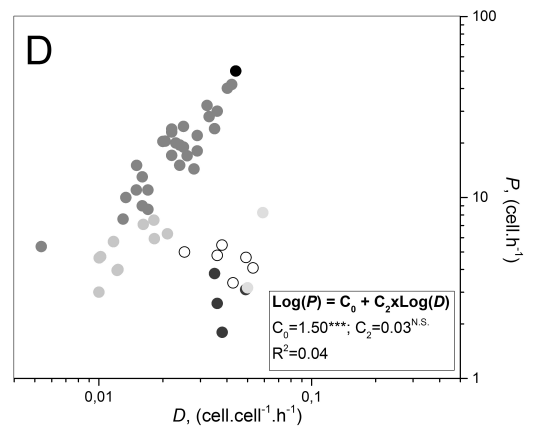
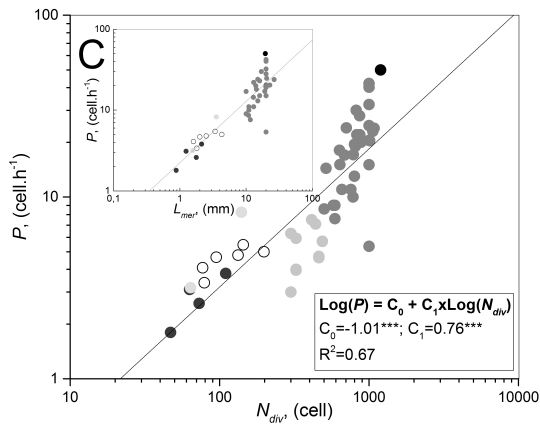
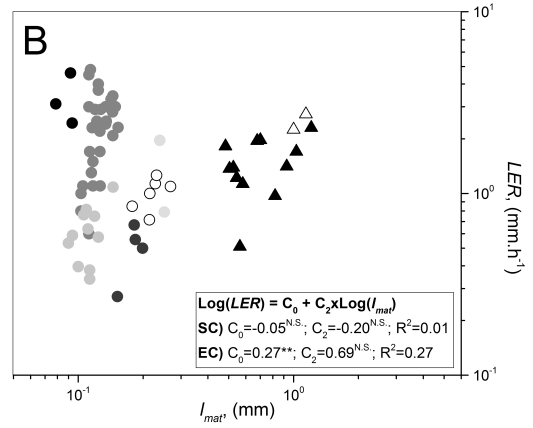
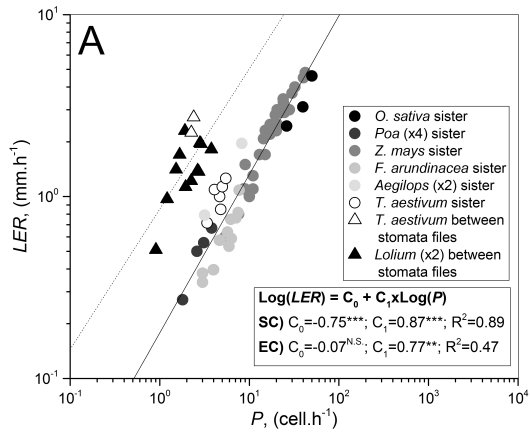
en ninguno de los tipos celulares (Figura 2-3 B). No se encontraron evidencias que sugieran que  $I_{mat}$  y  $P$  correlacionaran (datos no mostrados). Así, de manera análoga a lo observado en las puntas de raíces, diferencias en velocidad de crecimiento de la hoja entre especies son mayormente controladas por la producción celular en el meristema.

Con motivo de investigar si esta analogía entre estos órganos se extiende a los mecanismos subyacentes, investigamos la relación entre  $P$ ,  $N_{div}$  y  $D$  en las hojas de *Graminae* (ver Tabla 2-1), enfocándonos en las células hermanas para las cuales había suficientes datos disponibles. Como se esperaba,  $N_{div}$  y  $D$  en conjunto explicaron por complete la variación en la producción celular (Eq. 11; Figura Suplementaria 2 C). A pesar de que ambos parámetros contribuyeron significativamente a la producción celular,  $N_{div}$  tuvo un coeficiente Beta mayor que  $D$ . En consecuencia,  $N_{div}$  por sí mismo explicó el 67% de las diferencias en la producción celular (Figura 2-3 C). En contraste a lo encontrado par a las puntas de raíces,  $D$  no correlacionó significativamente con  $P$  en las hojas de *Graminae* (Figura 2-3 D). Dado que el tamaño del meristema está relacionado con el número de células en él,  $L_{mer}$  explicó un 79% de las diferencias en  $P$  (recuadro en Figura 2-3 C). No se encontró correlación entre  $N_{div}$  o  $L_{mer}$  y  $D$  (datos no mostrados). En conjunto, estos datos indican que en las hojas de *Graminae* el tamaño del meristema (y por lo tanto el número de células en división) es el mayor determinante de la velocidad de crecimiento de la hoja y del tamaño final de la hoja.

A pesar de que la variación en  $I_{mat}$  no contribuyó significativamente a LER, analizamos los parámetros de expansión celular en detalle para entender si la variación en el tamaño celular en la hoja es conseguida en un modo similar a lo obtenido para las raíces. Al igual que las puntas de raíces,  $I_{div}$  y RLI en conjunto explicaron el 100% de las diferencias en  $I_{mat}$  (Tabla 2-1, Eq. 5) y a pesar de que ambos parámetros tuvieron un efecto significativo, el de RLI fue mayor que el de  $I_{div}$  (Eq. 12; Figura Suplementaria 2 D). Esto fue confirmado con los modelos parciales (Figuras 2-3 E y F): mientras que la correlación entre  $I_{mat}$  y  $I_{div}$  no fue significativa, RLI explicó un 65% de las diferencias en  $I_{mat}$ . En analogía con las raíces, encontramos una correlación negativa entre  $I_{div}$  y RLI (Figura Suplementaria 2 E). Finalmente, como se esperaba, la variación en RLI fue completamente explicada por RER y  $T_{el}$  (Eq. 13; Figura Suplementaria 2 F). De manera similar a la situación de las raíces, solamente  $T_{el}$  explicó un 64% de las diferencias en RLI, mientras que RER no correlacionó (Figuras 2-3 G y H). Estos resultados muestran que en las hojas de *Graminae* también



se manifiesta que diferencias en el tamaño de las células maduras se deben a variaciones en la duración de la fase de expansión y que las células que son más pequeñas al abandonar el meristema se expanden por un periodo de tiempo mayor para compensar.

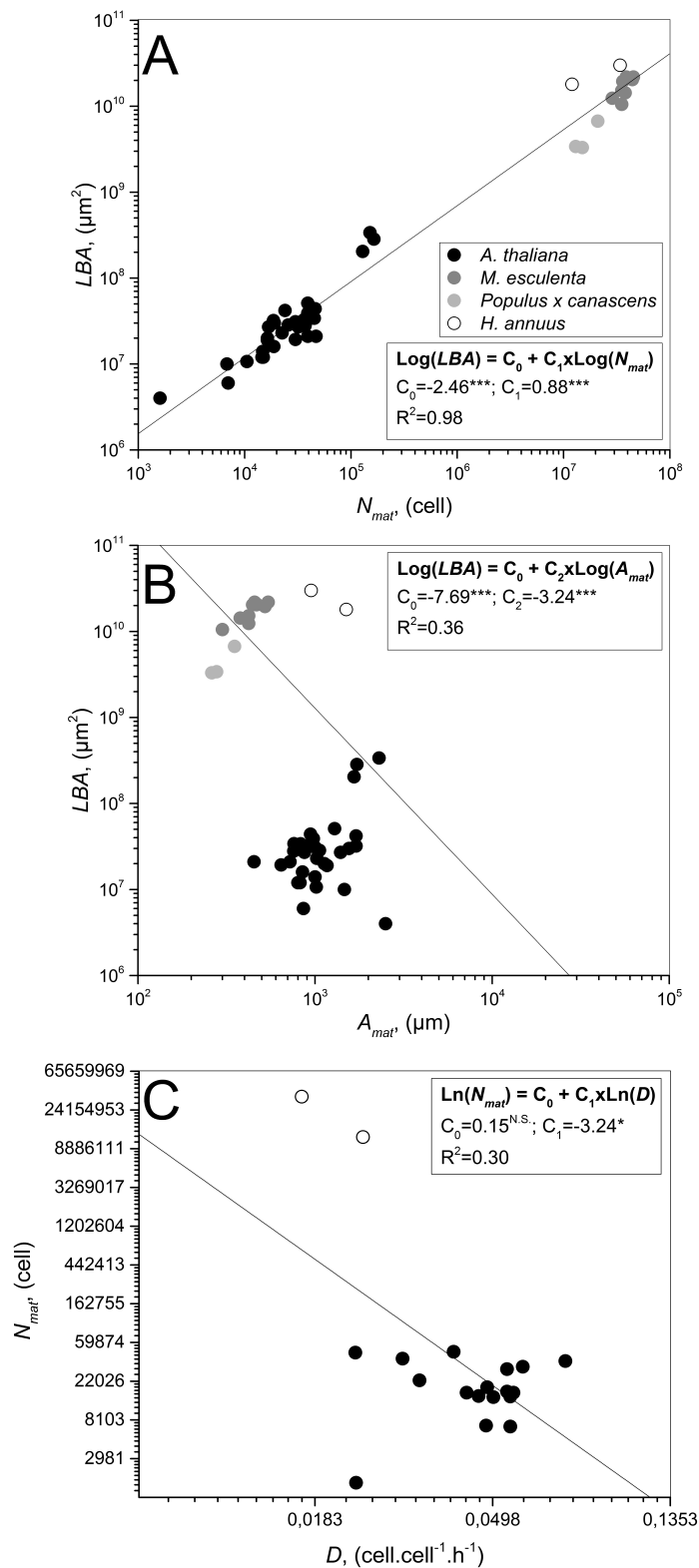


**Figura 2-3.** Las bases celulares de las diferencias en la velocidad de crecimiento de la hoja en un rango de especies de *Graminae*. **A)** la relación entre la velocidad de crecimiento de la hoja (LER) y la producción celular (P). **B)** la relación entre LER y el tamaño de la célula madura ( $I_{mat}$ ). **C)** la relación entre P y el número de células en el meristema ( $N_{div}$ ). **D)** la relación entre P y la velocidad promedio de división celular (D). **E)** la relación entre  $I_{mat}$  y el largo de las células al final del meristema ( $I_{div}$ ). **F)** la relación entre  $I_{mat}$  y el incremento relativo del largo (RLI). **G)** la relación entre RLI y la velocidad relativa de elongación (RER). **H)** la relación entre RLI y el tiempo que las células invierten en la zona de elongación ( $T_{el}$ ). Las figuras A y B muestran modelos para las células hermanas (SC), y las células elongadas ubicadas entre las filas de células estomáticas (EC). El recuadro en la figura C muestra la correlación entre P y el largo del meristema ( $L_{mer}$ ). Detalles de los parámetros de regresión se muestran en cada figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$  el coeficiente de correlación;  $n = 60$  para SC, y 14 para EC en A y B; 56 en figuras C y D; 44 en el recuadro de la figura C; y 21 en figuras E, F, G y H. Significancia: \*  $0.01 < \text{valor-}p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS,  $p$  no significativo. T-test.

### 2.4.3 Hojas de Eudicotiledóneas

El análisis cinemático *sensu-strictu* no es útil para estudiar las bases celulares del crecimiento de las hojas de Eudicotiledóneas. En su lugar, las mediciones del tamaño del órgano y sus células en función del tiempo son un modo más eficiente para describir esto (Fiorani and Beemster, 2006). Nosotros encontramos 17 publicaciones sobre 4 especies, incluyendo *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Manihot esculenta* y el híbrido *Populus x canadensis* donde tales estudios fueron desarrollados (Tabla Suplementaria 3). Nos enfocamos en las células epidérmicas debido a que las células de la empalizada fueron estudiadas en una única especie (*A. thaliana* (Ferjani et al., 2007; Hisanaga et al., 2013)).

Primero analizamos la contribución del número de células ( $N_{mat}$ ) y el área de las células maduras ( $A_{mat}$ ) a la variación en el área de la hoja (LBA; Tabla 2-1, Eq. 7). En conjunto,  $N_{mat}$  y  $A_{mat}$  explicaron el 100% de las diferencias en LBA (Eq. 16; Figura Suplementaria 3). Los datos se dividieron en dos grupos, un grupo con pequeña área de hoja correspondió a datos de *Arabidopsis thaliana* y el otro grupo con mayor área de hoja incluyó las tres especies restantes. Tanto  $N_{mat}$  como  $A_{mat}$  contribuyeron a la variación en el área de hoja dado que sus coeficientes parciales fueron significativos. Sin embargo, el coeficiente Beta de  $N_{mat}$  fue mayor que el de  $A_{mat}$ . En efecto, de manera similar a la situación de las raíces y de las hojas de *Graminae*, el número de células fue más importante en determinar el crecimiento del órgano que el tamaño de las células, dado que  $N_{mat}$  explicó un 98% de las diferencias en el área de hoja (Figura 2-4 A). Curiosamente,  $A_{mat}$  correlacionó negativamente con LBA explicando un 36% de



la variación (Figura 2-4 B). No se encontró correlación entre  $N_{mat}$  y  $A_{mat}$ , implicando independencia de estos dos parámetros (datos no mostrados). Las relaciones entre  $N_{mat}$ ,  $N_{prim}$ ,  $T_{div}$  y  $D$ , y  $A_{mat}$ ,  $A_{div}$ ,  $T_{exp}$  y RER no pudieron ser analizadas dado que estos parámetros no son típicamente determinados. Únicamente  $D$  para *Arabidopsis thaliana* y *Helianthus annuus* de células epidérmicas pudo correlacionar significativamente con  $N_{mat}$  mostrando una correlación negativa, pero con un ajuste pobre (Figura 2-4 C).

**Figura 2-4.** Las bases celulares de las diferencias en tamaño de hoja en un rango de especies de Eudicotiledóneas. **A)** la relación entre LBA y  $A_{mat}$ . **B)** la relación entre LBA y  $N_{mat}$ . **C)** la relación entre  $N_{mat}$  y  $D$ . Detalles de los parámetros de regresión se muestran en cada figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$  el coeficiente de correlación;  $n=46$  en A y B,  $n=16$  en C. Significancia: \*  $0.01 < \text{valor-}p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS,  $p$

no significativo. T-test.

Estos datos muestran que, de manera consistente a la situación de las raíces y a las hojas de *Graminae*, la producción celular más que el tamaño de célula madura determina las diferencias en el tamaño de la hoja.

## 2.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Abordamos aquí la cuestión sobre cuáles mecanismos celulares determinan la variación en tamaño de órganos entre especies de plantas. Con este propósito desarrollamos un meta-análisis cuantitativo de los datos cinemáticos obtenidos para puntas de raíces y hojas de *Graminae*, y estudios de desarrollo de hojas de Eudicotiledóneas disponibles en la literatura. A pesar de que se compararon datos provenientes de diferentes laboratorios y diferentes condiciones, la variación en tamaño de órgano entre especies excedió la variación experimental con lo cual las diferencias interespecies pudieron efectivamente ser estudiadas basándose en la combinación de datos. Mediante el análisis de los tres órganos a lo largo de un amplio rango de especies emergió una imagen consistente: primero que todo, la proliferación celular (variaciones en el número de células) más que la expansión celular (el tamaño de las células maduras) determina el tamaño final de los órganos de la planta. Segundo, el número de células en división (y el tamaño del meristema), y no la velocidad con que estas células se dividen, determina la producción celular. Tercero, células que son pequeñas cuando dejan el meristema compensan con un periodo de expansión más largo. Cuarto, variaciones en el tamaño de célula madura son principalmente determinadas por la duración de la expansión celular.

Entonces, las bases celulares de la variación en el tamaño de órgano entre especies son remarcadamente similares para los tres órganos estudiados. El análisis de la regulación molecular de estos parámetros subyacente por comparación entre especies no ha sido estudiado hasta la fecha, a nuestro conocimiento. Sin embargo, los descubrimientos dentro de una especie nos proveyeron una buena base. En primer lugar, dichos estudios confirman ampliamente la importancia del tamaño del meristema como un punto de control crucial en la regulación del crecimiento de órgano tanto en raíces (Baskin, 2000; West et al., 2004) y hojas de *Graminae* (Bultynck et al., 2003; Barrôco et al., 2006; Powell and Lenhard, 2012; Czesnick and Lenhard, 2015). La importancia de este mecanismo de control ha sido ampliamente reconocida y esto ha llevado a realizar estudios en donde el tamaño del meristema es el único parámetro celular determinado (Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Tsukagoshi et al., 2010). Además, enfoques para extraer este parámetro a partir de los datos del perfil celular (French et al., 2012; Bizet et al., 2014; Voorend et al., 2014), perfiles de velocidad (van der Weele et al., 2003), la expresión de marcadores de ciclo celular (Ferreira et al., 1994; Donnelly et al., 1999; West et al., 2004) e imágenes infrarrojas (Bizet et al., 2014) han sido desarrollados. En hojas de dicotiledóneas es virtualmente imposible utilizar el tamaño de meristema como una base para determinar la producción celular,

dado que el grupo de células reclutadas en el SAM para formar la hoja crecen de manera exponencial durante el desarrollo proliferativo de la hoja. El equivalente al tamaño de meristema de sistemas lineales es por lo tanto la duración de la fase proliferativa, dado que ambos parámetros representan esencialmente la transición entre la proliferación y la expansión. En efecto, los estudios cinemáticos de *Arabidopsis thaliana* han mostrado que a través de un rango de perturbaciones genéticas que causan variación en el tamaño de hoja, la duración de la proliferación celular estuvo frecuentemente involucrada (Gonzalez et al., 2012). Esto ha facilitado el descubrimiento de una red hormonal que controla la posición en donde las células abandonan la proliferación. Curiosamente, no solo las bases celulares del crecimiento de órganos es muy similar en distintos órganos, como nosotros mostramos aquí, sino que la regulación molecular también muestra similitudes fuertes (Nelissen et al., 2016).

Un estudio de modelado reciente ha demostrado que la regulación autónoma de las células no puede explicar los patrones de crecimiento observados en raíces y que el control espacial por parte de hormonas es requerido (De Vos et al., 2014). La auxina se acumula en tejidos proliferativos de raíces (Grieneisen et al., 2007; Brunoud et al., 2012) y en hojas de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (Nelissen et al., 2012), rápidamente cayendo a bajos niveles en células en expansión. De hecho, perturbaciones genéticas en la señalización de auxina en raíces (Sabatini et al., 1999; Swarup et al., 2005), y hojas de *Zea mays* (Tsiantis et al., 1999; Guo et al., 2014) y *Arabidopsis thaliana* (Schruff et al., 2006; Bilsborough et al., 2011; Kasprzewska et al., 2015) afecta la transición entre la proliferación y la expansión celular.

En la zona de crecimiento de hojas de *Zea mays* las giberilinas muestran un patrón de acumulación importante en la posición en donde las células dejan la zona de proliferación (Nelissen et al., 2012). De hecho, niveles alterados de giberilinas resultan en marcadas diferencias en tamaño de órganos, relacionadas con el tamaño del meristema (Nelissen et al., 2012). Además, también en hojas de *Arabidopsis thaliana* la sobreproducción de giberilinas resultó en un tamaño de hoja incrementado (Huang et al., 1998) que estaban relacionadas con el incremento de la producción celular (a pesar de que el tamaño celular también se vio incrementado (Gonzalez et al., 2010)) y también en las raíces las giberilinas controlaron directamente la transición entre el meristema y la zona de elongación celular (Ubeda-Tomás et al., 2008; Achard et al., 2009; Perilli et al., 2012). Por lo tanto, parece que la red de señalización molecular que controla el crecimiento de órganos tiene una arquitectura similar en otros órganos. Por lo tanto, una pregunta obvia para abordar es si y cómo la regulación hormonal está

involucrada en la regulación de las diferencias en tamaño de órgano entre especies. Nuestros resultados demuestran claramente que tales investigaciones deberían enfocarse en la regulación de la salida de la proliferación.

Un descubrimiento interesante e inesperado fue la fuerte correlación negativa entre el tamaño de las células que abandonan el meristema y la duración la subsiguiente fase de expansión celular. En teoría, esto podría deberse a un artefacto técnico relacionado con la determinación de la posición del final de la zona de proliferación. En la raíz de *Arabidopsis thaliana* que contienen zonas de expansión de tamaños muy diferentes, la duración es marcadamente estable (Beemster and Baskin, 1998). Sin embargo, los diferentes métodos empleados en la determinación de tamaño de meristema en los estudios que utilizamos puede fácilmente resultar en una sobre- o sub-estimación de este límite. Esto llevaría a una sobre- o sub-estimación de la salida de las células dado que el tamaño celular se incrementa rápidamente en esta región (Beemster and Baskin, 1998). Sin embargo también afectó de manera inversa el tamaño estimado de la zona de elongación y, en consecuencia, el tiempo de residencia en ella. No obstante, también es posible que los mecanismos de control de salida de la proliferación celular y salida de la zona de expansión sean completamente independientes. Esto implica que en algunos genotipos/especies las células salen de la mitosis a tamaños más pequeños, pero dado que el tamaño de las células maduras es independientemente regulado y las velocidades de expansión celular no contribuyen a un incremento en las diferencias de tamaño (Figs. 2-1 E and G), células más pequeñas se estarían, en promedio, expandiendo por períodos de tiempo más largos.

En contraste con la transición entre la proliferación y expansión celular, poco se sabe a cerca de la regulación de la transición entre la expansión y la maduración. Una hipótesis podría ser que el tamaño celular en sí es censado y dispara la terminación de la expansión celular. Sin embargo, perturbaciones de la división celular frecuentemente llevan a ajustes del tamaño de célula madura que contrarrestan los efectos en el número de células maduras, un fenómeno llamado compensación (Tsukaya, 2002; Beemster et al., 2003; Ferjani et al., 2007; Horiguchi and Tsukaya, 2011). Por lo tanto, una segunda señal especial aún desconocida parece ser la más probable explicación.

Estudios de la respuesta a estreses abióticos sugieren que los mecanismos por los cuales el crecimiento responde al estrés abiótico dependen en la duración a su exposición. En raíces de *Arabidopsis thaliana* trasplantadas a 0.5% NaCl la adaptación

involucró dos fases: primero, una rápida inhibición transitoria del ciclo celular durante el cual las actividades de la ciclina dependiente de quinasa (CDK) y del promotor CYCB1;2 fueron reducidas, resultando en menos células permaneciendo en el meristema. Sin embargo, luego de que el tamaño del meristema se ajustó, la duración del ciclo celular volvió a los valores de control (West et al., 2004). Notablemente, una respuesta similar se encontró en plántulas de trigo respondiendo a compactación del suelo. En la primera hoja que se expuso, la producción celular se vio reducida debido a las células en un meristema de tamaño normal que se dividían más despacio. Sin embargo, en las hojas subsecuentes, una reducción similar en la producción celular se debió a un tamaño de meristema reducido y las células se dividían a velocidades similares a las de las plantas control (Beemster et al., 1996). Estos descubrimientos indican que las respuestas a tiempo corto son principalmente mediadas por cambios en la velocidad de división, mientras que a tiempos largos la respuesta más estructural involucra el ajuste del tamaño del meristema, permitiendo una reducción similar en la producción celular con células proliferando a velocidades control. Estos ejemplos de respuestas celulares contrastantes responden a la misma condición adverse, que a pesar de resultar en respuestas de crecimiento general similares, indican flexibilidad de los parámetros de crecimiento celular dentro de una misma planta. Contrariamente, el incremento de la expansión celular en respuesta a mutaciones que inhiben la división celular demuestra que estos parámetros pueden ser ajustados para limitar los efectos sobre el tamaño general del órgano (Ferjani et al., 2007) bajo una dada condición ambiental. Esta flexibilidad dentro de especies individuales remarca la importancia de nuestro estudio sobre las variaciones que ocurren en el contexto más general de la variación entre especies, en donde las diferencias en crecimiento son mucho mayores que las observadas en una única especie. Además, esto permite identificar los parámetros preferencialmente seleccionados por la evolución que determinan las diferencias en crecimiento de órgano y especula en por qué este es el caso.

Podría hipotetizarse que a velocidades normales los procesos de división celular son más eficientes y tienen posibilidades óptimas de ser ajustados a la respuesta a fluctuaciones en el ambiente. El mismo argumento hasta cierto punto sería aplicable a diferencias en tamaño celular. A pesar de que los tamaños celulares se ven generalmente reducidos por las condiciones ambientales, estos cambios son limitados. Nuestro descubrimiento de que el tamaño maduro de célula no contribuye a diferencias en tamaño en los tres tipos de órganos en un amplio rango de especies



también sugiere que existe un tamaño celular óptimo, probablemente para su funcionamiento fisiológico.

Otro argumento que apoya que la salida de la proliferación es el mecanismo de control primario de las variaciones en tamaño de órgano, es que la división celular es un proceso exponencial. Una ronda adicional de división celular antes de comenzar la expansión, dobla la producción celular a escala de órgano, doblando potencialmente el tamaño de órgano.

Por estas razones, el principal resultado de este estudio, que el tamaño del meristema/salida de la proliferación es el principal parámetro que controla el tamaño de órgano, se ve como una solución lógica desde una perspectiva evolutiva.

***CAPÍTULO 2 PARTE 2: Análisis cinemático de la respuesta del crecimiento de la hoja de cultivares de arroz con sensibilidad contrastante a temperaturas subóptimas***

## 2.6 INTRODUCCIÓN

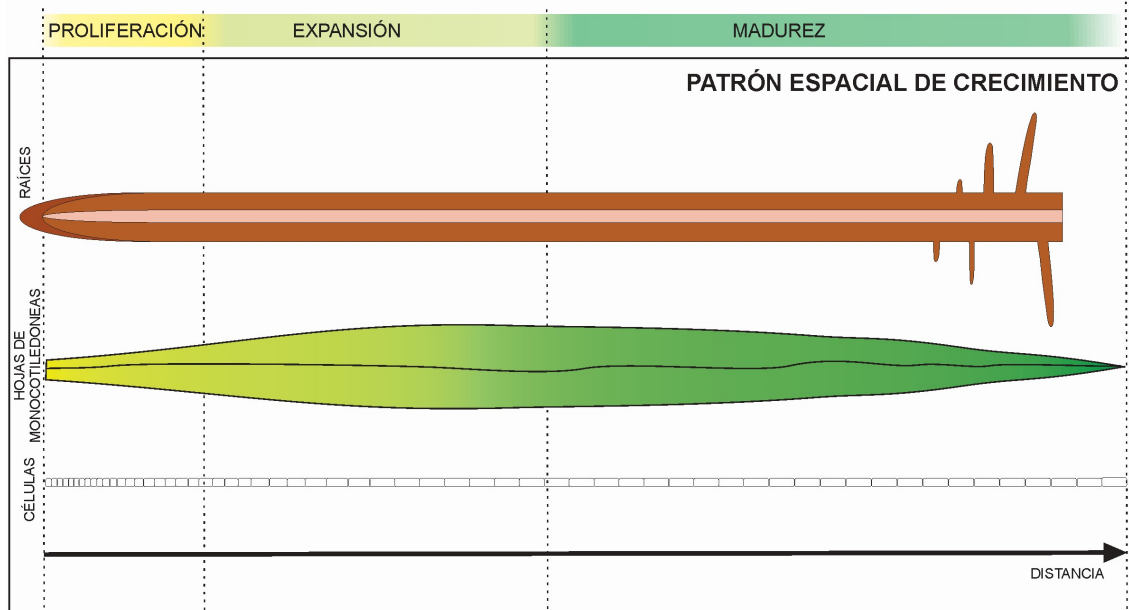
En el capítulo anterior describimos los efectos principales del arroz sometido a estrés por ST y demostramos que cultivares diferentes tenían diferentes respuestas fisiológicas. Especialmente, el efecto sobre el crecimiento de la hoja disparó las preguntas ¿cómo regula el arroz el crecimiento de la hoja bajo este estrés? y ¿es esto diferente entre los cultivares? Aquí se utilizaron seis cultivares representativos que mostraron un desempeño diferente, tres pertenecían al grupo tolerante, Koshihikari, CT-6742-10-10-1 y General Rossi, y tres al grupo sensible, IR50, IR24, y Honezhaosen. Koshihikari e IR50 fueron incluidos en este estudio ya que son cultivares elite. Koshihikari es bien conocido por su tolerancia a estrés por frío y es un cultivar del tipo japonica (Takeuchi et al., 2001) mientras que IR50 es sensible al estrés por frío y pertenece a la subespecie indica (Andaya and Mackill, 2003; Guo-li and Zhen-fei, 2005).

Las células son los bloques de construcción del cuerpo de la planta y las unidades reguladoras que integran las señales químicas y fisiológicas percibidas localmente por redes de regulación molecular codificadas genéticamente que finalmente controlan el proceso de crecimiento (Gonzalez et al., 2012; Kalve et al., 2014b; Czesnick and Lenhard, 2015). A nivel de la célula, solamente dos procesos contribuyen al crecimiento del órgano: la división celular (el acto de duplicar el genoma y formar una nueva célula mediante la citoquinesis) y la expansión celular (el incremento del volumen celular). Es importante destacar que las células en división también se someten a expansión celular doblar aproximadamente su tamaño previamente a la citoquinesis (Green, 1976). La regulación del crecimiento de la hoja en el arroz es, por lo tanto, el resultado de la modulación de estos dos procesos celulares, resultando en diferencias en el tamaño del órgano. Por lo que las preguntas “¿cómo regula el arroz el crecimiento de sus hojas cuando es sometido a estrés por ST?” y “¿es esto diferente entre cultivares?” puede ser contestada examinando los parámetros de división celular y expansión celular. Comprender cómo la división y la expansión son coordinadas en el crecimiento de un órgano puede llevarnos a dilucidar los mecanismos detrás de esto. El análisis cinemático del crecimiento de las hojas provee un marco matemático para obtener estos parámetros.

El enfoque cinemático considera el crecimiento del órgano en términos de células o “elementos de tejido” en movimiento. Posee la ventaja de permitir la descripción de los procesos de crecimiento de un modo matemático en términos de patrones de división y expansión. La división y la expansión celular son procesos independientes, pero

usualmente están sincronizados durante el desarrollo. Los órganos con crecimiento lineal y de estado estacionario, como las puntas de raíces y las hojas de monocotiledóneas, han sido analizados por décadas (Goodwin and Stepka, 1945) utilizando un marco cuantitativo estricto (Silk and Erickson, 1979). En estos sistemas lineales las células están típicamente organizadas en filas discretas a lo largo del órgano. Esto permite simplificar el análisis desde la perspectiva de una sola fila de células representativa, en la base (hoja) o punta (raíz) donde las células están en división activa. La división impulsa un flujo de células a través de un límite, en donde dejan de dividirse y comienzan a expandirse hasta cruzar un Segundo límite, en donde dejan de expandirse y alcanzan, por lo tanto, su tamaño maduro, creando un gradiente espacial de desarrollo (Fiorani and Beemster, 2006; Figura 2-5). Desde esta simple perspectiva se puede fácilmente visualizar que el crecimiento del órgano es una función del número de células producidas por la división celular en la región meristemática de cada fila de células y el largo de célula madura establecido por la expansión en la zona de elongación. En el caso particular de las hojas de monocotiledóneas, que tienen un patrón de crecimiento determinado, el largo final (FLL) es una función de la velocidad de crecimiento de la hoja (LER) y el tiempo que esa hoja continúa elongándose ( $T_{LE}$ ; Tabla 2-2, Eq. 1). LER es una función del número de células producidas por la división celular (producción celular,  $P$ ) y el largo de las células en la zona madura del órgano ( $l_{mat}$ ; Tabla 2-2, Eqs. 2). Además,  $P$  es una función del número de células en la zona de división ( $N_{div}$ ) y la velocidad promedio de división celular ( $D$ ; Tabla 2-2, Eq. 3), mientras que  $l_{mat}$  es determinado por el largo de las células que abandonan el meristema ( $l_{div}$ ), la velocidad promedio ( $RER$ ) y la duración de la expansión celular ( $T_{el}$ ; Tabla 2-2, Eq. 4).

## ANÁLISIS CINEMÁTICO DE CRECIMIENTO



**Figura 2-5.** Representación esquemática del patrón de crecimiento de hojas de monocotiledóneas y de raíces.

**Tabla 2-2.** Ecuaciones y definiciones usadas para el análisis cinemático.

Parámetros del análisis cinemático del crecimiento			
	Símbolo	Relación entre los parámetros	Ecuación N°
Largo final de hoja (mm)	FLL	$=LER \cdot T_{LE}$	Ecuación 1
Tiempo de elongación de la hoja (h)	$T_{LE}$		
Velocidad de crecimiento de hoja ( $mm \cdot h^{-1}$ )	LER	$=(P \cdot l_{mat})/1,000$	Ecuación 2
Velocidad de producción celular ( $cells \cdot h^{-1}$ )	P	$=N_{div} \cdot D$	Ecuación 3
Número de células en zona de división	$N_{div}$		
Velocidad relativa de división ( $cell \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1}$ )	D		
Largo de célula madura ( $\mu m$ )	$l_{mat}$	$=l_{div} \cdot e^{RER \cdot T_{el}}$	Ecuación 4
Velocidad relativa de expansión ( $\mu m \cdot \mu m \cdot h^{-1}$ )	RER		
Largo de las células que abandonan el meristema ( $\mu m$ )	$l_{div}$		
Tiempo de residencia de las células en la zona de elongación (h)	$T_{el}$		

El impacto de la temperatura en el desarrollo de la planta es usualmente modelado utilizando el concepto del tiempo termal que presupone que el crecimiento de la planta está linealmente relacionado a la temperatura o a la cantidad total de calor a la que ha sido expuesta (Granier and Tardieu, 1998a; Granier et al., 2002). Esta teoría provee una medida del tiempo fisiológico que puede ser aplicado al crecimiento de las

plántulas, la aparición de influorescencias, y cualquier otro estadio de la planta. Se basa en asumir que existe una temperatura base de crecimiento y que los parámetros de crecimiento que están siendo analizados tienen una relación lineal con las temperaturas que estén por encima de la base. El tiempo termal, grados día de crecimiento (GDD), determina la fecha óptima para plantar/cosechar/rociar (Trudgill et al., 2005). Sin embargo, ha sido utilizado también para modelar el efecto de las condiciones climáticas y por lo tanto puede ser utilizado para modelar el efecto del estrés por ST en el crecimiento de hojas de plántulas de arroz.

## **2.7 OBJETIVO**

Este capítulo busca entender los mecanismos a nivel celular que determinan el crecimiento de la hoja de cultivares de arroz sometidos a estrés por ST. Para descifrar esto, se realiza un análisis cinemático del crecimiento de la hoja para cuantificar cambios en la división, expansión y morfología de la hoja de arroz inducidos por ST. Para poder distinguir entre mecanismos tolerantes y sensibles, se utilizaron dos grupos de cultivares representativos: tres cultivares tolerantes, y tres cultivares sensibles.

## **2.8 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.8.1 Material de plantas y condiciones de crecimiento**

Semillas de los cultivares de arroz (*Oryza sativa*) Koshihikari, CT-6742-10-10-1, General Rossi, IR50, IR24, y Honezhaosen fueron amablemente provistas por el Programa de Mejoramiento de Arroz de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Semillas de estos cultivares fueron colocadas en places de Petri sobre dos capas de papel de filtro Whatman N° 5 con 7 mL de carbendazim 0.025 %p/v (Yoshida, 1981) e incubadas en cámara de crecimiento a 30 °C en oscuridad hasta germinación. Las plántulas resultantes fueron trasplantadas a macetas con turba (Jiffy, The Netherlands; volumen de los potes: 1.6 l, dimensiones: 13 cm alto y 5" de diámetro) y saturadas con agua. Las plántulas fueron luego crecidas en cámaras de crecimiento (Conviron, Adaptis A1000) bajo condiciones controladas con 12 h fotoperiodo, 80% humedad y 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Las temperaturas día/noche para el tratamiento de temperaturas óptimas de crecimiento (OT) fueron 28/24 °C (d/n). Cuando emergió la tercer hoja (Yoshida, 1981), las temperaturas fueron modificadas para realizar el tratamiento de temperaturas subóptimas de crecimiento (ST) a 21/13 °C (d/n). Las plántulas fueron

luego cultivadas y cosechadas dos días luego de la emergencia de la cuarta hoja, cuando la elongación de la hoja estaba en estado estacionario.

### **2.8.2 Análisis cinemático y de crecimiento**

Para determinar la velocidad de elongación de la hoja (LER) se midió diariamente el largo de la cuarta hoja (Yoshida, 1981) con una regla, usando el tope superior de la tierra como punto de referencia. Las medidas se realizaron en 23 plantas por cultivo/tratamiento 2 h luego de que el fotoperiodo empezó a lo largo de todo el crecimiento de la cuarta hoja, desde su emergencia hasta alcanzar su largo final (FLL). Las velocidades de elongación de la hoja se calcularon como la diferencia en el largo de hoja dividido por el intervalo de tiempo entre dos medidas sucesivas. Se realiza un análisis cinemático en la cuarta hoja de cinco plantas representativas de cada cultivar/tratamiento cultivadas en el segundo día luego de su emergencia desde el interior de las hojas más viejas (durante su crecimiento en estado estacionario) siguiendo el protocolo descrito por Pettkó-Szandtner et al. (2015) y Rymen et al. (2010) con modificaciones menores. Brevemente, la cuarta hoja se cosechó luego de 48 h de su aparición removiendo cuidadosamente las hojas más viejas con la ayuda de pinzas y bisturí. Se realizaron impresas de la epidermis abaxial de los 4 y 5 cm basales de la hoja de los tratamientos OT y ST, respectivamente, utilizando esmalte de uñas transparente. Teniendo especial cuidado de no dañar la hoja, estas impresas fueron transferidas por medio de cinta de celofán a portaobjetos para microscopio. Los primeros dos centímetros de la parte basal de la misma hoja utilizada para realizar las impresiones fueron analizados para determinar el tamaño de su meristema. Para tal fin, fueron cortados con bisturí y colocados en una solución 3:1 v/v etanol absoluto:ácido acético para fijación de las paredes celulares y para eliminar la clorofila. Las muestras se mantuvieron a 4 °C desde 24 h hasta varias semanas hasta su uso. Estas muestras fueron luego lavadas durante 20 min en un buffer de lavado conteniendo 0.05 M Tris-HCl pH 7.0 y 0.5% Triton X-100 e incubadas con 1 µg.ml<sup>-1</sup> DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en buffer de lavado durante 5-7 min. Los núcleos fluorescentes fueron observados en un microscopio de fluorescencia (AxioScope A1, AxioCam ICm1, Zeiss) con una magnificación de 20X. El largo de la zona meristemática de estas hojas se estimó por la localización de la mitosis más distante en las células de la epidermis abaxial y luego determinando la distancia entre la base de la hoja y dicha posición contando el número de campos necesarios para atravesar esa distancia y multiplicándolos por el correspondiente ancho de esos campos (Fiorani et al., 2000). Para las mediciones del largo celular se midió el largo de las células alargadas aledañas a filas de células estomáticas (Luo et al., 2012) en intervalos de 1

mm a partir de las improntas de las hojas usando un microscopio óptico (Scope A1, AxioCam ICm1; Zeiss) utilizando un módulo de mediciones en tiempo real del software Axiovision (Rel. 4.8, Zeiss). Para las células meristemáticas se utiliza el objetivo 40X y para las células en elongación y maduras el 20X (Plan). Los datos crudos obtenidos de las hojas individuales fueron suavizados e interpolados a puntos espaciados por 1 mm usando la función kernel loconv de suavizado del paquete Kern Smooth (Wand and Jones, 1995) para el paquete estadístico R (R Foundation for Statistically Computing), que permitió promediar entre las hojas y comparar entre cultivares/tratamientos. Los cálculos de los parámetros de división y expansión celular se basaron en estos datos (Tabla 2-2), como se describió previamente (Rymen et al., 2010).

### **2.8.3 Cálculo del tiempo termal**

El parámetro de grados día de crecimiento fue calculado por la integración de la temperatura de la hoja diaria de acuerdo a Bonhomme (2000):

$$GDD = \left[ \left[ \frac{(T_{MAX} - T_{MIN})}{2} \right] - T_{BASE} \right]$$

En donde  $T_{MAX}$  es la temperatura del aire máxima diaria,  $T_{MIN}$  es la temperatura del aire mínima diaria,  $T_{BASE}$  es la temperatura por debajo de la cual la hoja no crece. La  $T_{BASE}$  se estableció en 10 °C (Lee, 1979; Gao et al., 1992; Sánchez et al., 2014).

### **2.8.4 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron usando ANOVA y un test *post-hoc* Tukey con el paquete de software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2016).

## **2.9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Estudiamos el efecto del estrés por frío sobre el crecimiento de plántulas de arroz para determinar las bases celulares de las diferencias en la respuesta de crecimiento entre cultivares con tolerancia contrastante. Para tal fin, se llevó a cabo un análisis del crecimiento de la cuarta hoja de seis cultivares diferentes sometidos a temperaturas subóptimas (ST) y temperaturas óptimas (OT; Tabla Suplementaria 4). La respuesta general de estos cultivares al estrés por frío fue descrita en el capítulo previo, en donde estudios del crecimiento de la tercer hoja de los cultivares llevó a definir dos grupos con características marcadamente diferentes: Koshihikari, CT-6742-10-10-1 y General Rossi pertenecen al grupo tolerante (H: grupo con alto crecimiento); IR50, IR24 y Honezhaosen pertenecen al grupo sensible (L: grupo con bajo crecimiento). En



este informe, plántulas de los mismos cultivares se crecieron a 24/28 °C día/noche hasta la emergencia de la tercer hoja. En esa etapa, plántulas del tratamiento control se mantuvieron creciendo bajo esas temperaturas mientras que las temperaturas para las plántulas bajo el tratamiento de temperaturas subóptimas se cambiaron a 13/21 °C día/noche.

### **2.9.1 El efecto de las temperaturas subóptimas en el crecimiento de la hoja**

Se analizó la cuarta hoja dado que es la primer hoja en desarrollarse por completo bajo condiciones de estrés y porque la tercer hoja era muy pequeña para el análisis cinemático. El efecto general del estrés por ST en el crecimiento del arroz puede expresarse por su efecto en el largo final de la hoja (FLL). Los seis cultivares aquí estudiado redujeron su FLL de la cuarta hoja en un -41% en promedio (Tabla 2-3) en respuesta al estrés por ST. Este cambio en FLL es determinado por la velocidad de elongación de la hoja (LER) y por el tiempo que esta hoja está elongándose ( $T_{LE}$ ; Tabla 2-2, Eq. 1). Ambos parámetros se encontraron afectados en respuesta a ST (Tabla 2-3): LER se redujo un -76%, mientras que  $T_{LE}$  se incrementó un 98%, lo que compensa ampliamente la reducción de LER. La coordinación de una baja velocidad de elongación de hoja con mayor duración de la elongación en respuesta a bajas temperaturas ya fue descrita en plantas de maíz para temperaturas que iban desde 28/23 °C a 13/8 °C día/noche en donde la reducción del LER fue de 88% mientras que  $T_{LE}$  se incrementó más de siete veces de modo que la reducción final del largo de hoja fue del 70% (Bos et al., 2000). No se vio tal efecto sobre  $T_{LE}$  en otros estreses así como se observó en estreses por temperaturas frías. Por ejemplo, la deficiencia en fósforo en *Lolium perenne* causó una disminución de LER de alrededor del 40% y la compensación con mayor  $T_{LE}$  fue de solo alrededor del 32% (Kavanová et al., 2006). Youssef et al. (2016) estudiaron la respuesta de crecimiento de hipocótilos de 14 genotipos de *Medicago truncatula* a condiciones óptimas (17 °C y 0 MPa), bajas temperaturas (8 °C), y déficit de agua (-0.5 MPa) y encontraron que mientras que la reducción del largo final de los hipocótilos fue similar entre los tratamientos de bajas temperaturas (20%) y déficit de agua (24%) en comparación con el control, las bajas temperaturas produjeron mayor reducción de la velocidad de crecimiento -70%- con mayores incrementos del tiempo de crecimiento -156%- que en el caso del déficit por agua -56% y 44%, respectivamente-. Otro estudio realizado en maíz mostró que la reducción de FLL por el estrés por sequía se debió mayormente por una fuerte reducción en el LER con solo una compensación parcial por parte de la duración del crecimiento (Avramova et al., 2015). Se sabe que los procesos especiales y temporales que regulan el crecimiento lo hacen de manera independiente, implicando

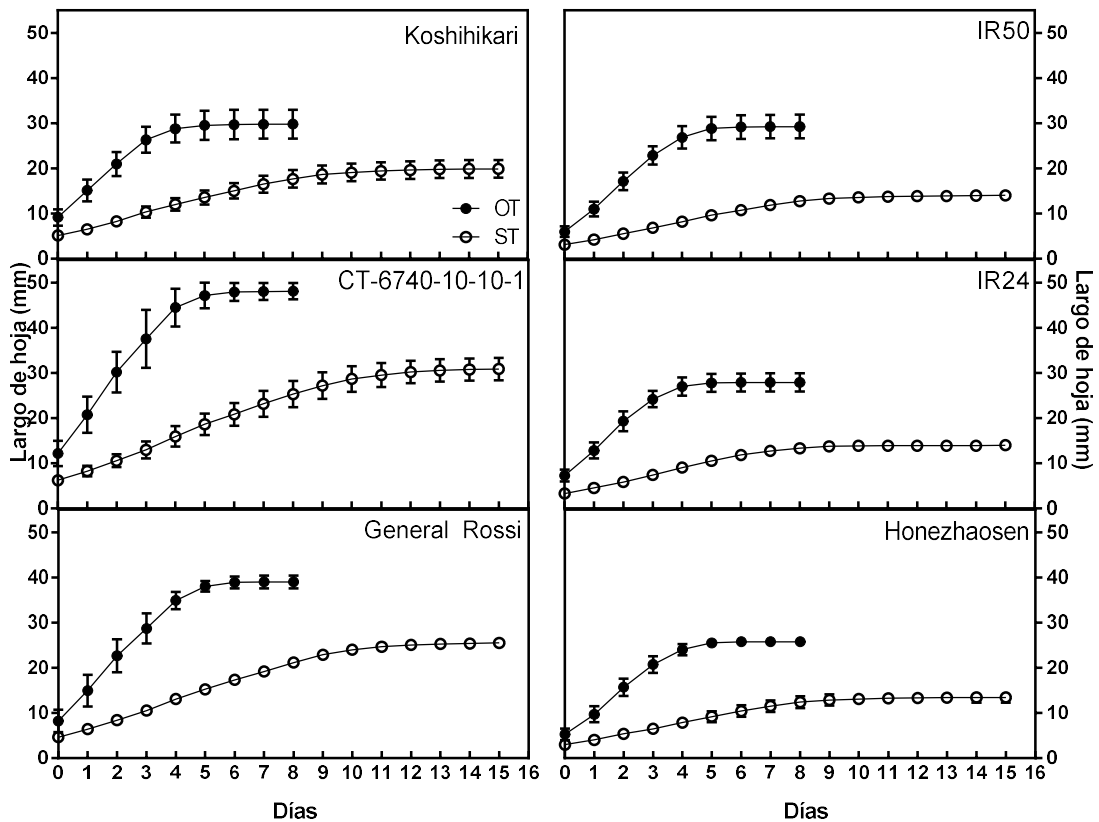
que LER y  $T_{LE}$  están sometidos a mecanismos de control diferentes (Nelissen et al., 2016). Un análisis realizado en poblaciones de maíz vinculó la duración del crecimiento al transcriptoma de la parte basal de la zona de división durante el estado estacionario del crecimiento y se encontró una compleja red de genes que no se compartían entre los parámetros LER y  $T_{LE}$  (Baute et al., 2015; Baute et al., 2016).

Luego analizamos las bases celulares del efecto de ST sobre el LER usando el análisis cinemático durante el estado estacionario de crecimiento de la hoja (Figura 2-6), el cual se basa en medir el perfil del largo celular (Figura Suplementaria 4) a lo largo de la zona de crecimiento, y la determinación del largo del meristema por localización de las células mitóticas. La reducción del LER en respuesta a ST se explicó mayormente por una reducción del -67% en la velocidad de producción celular ( $P$ ), con sólo una reducción menor del -25% en el largo de la célula madura ( $l_{mat}$ ; Tabla 2-2, Eq.2; Tabla 2-3). Resultados similares se encontraron en un estudio de maíz sometido a estrés por noches de frío (4 °C) en donde la reducción del LER se debió mayormente a la reducción de la velocidad de división que afectó la producción celular y no se encontraron diferencias en el largo de las células maduras (Rymen et al., 2007). Generalmente, es la proliferación celular lo que determina el tamaño de un órgano sin importar el órgano que está siendo estudiado (hoja o raíz) o la especie (ver la Parte 1 de este capítulo).

**Tabla 2-3.** Análisis del efecto del estrés por ST en el crecimiento de la cuarta hoja de arroz. Los datos son promedios de seis cultivares  $\pm$  DE de tratamientos OT y ST. Se utiliza el ANOVA como test estadístico con los factores *Tratamiento*, *Sensibilidad*, y *Tratamiento\*Sensibilidad*, se presentan aquí solamente los valores-*p* para el factor *Tratamiento* para todos los parámetros. Cuando el valor-*p* < 0.05 se marca en negrita y se muestran los valores de porcentaje de ST sobre OT, de lo contrario se marca como no significativo (NS). Se realizó un test *post-hoc* Tukey para el parámetro  $T_{LE}$  dado que la interacción de factores fue significativa (valor-*p* = 0.0214), el resto de los parámetros tuvo un valor-*p* > 0.05 para la interacción de factores. Parámetros: *FLL*, largo final de hoja; *LER*, velocidad de elongación de la hoja;  $T_{LE}$ , tiempo de elongación de la hoja; *P*, producción celular;  $I_{mat}$ , largo de célula madura;  $N_{div}$ , número de células en el meristema;  $L_{mer}$ , largo del meristema; *D*, velocidad promedio de división celular;  $T_C$ , duración del ciclo celular;  $T_{div}$ , tiempo de residencia de las células en el meristema;  $I_{div}$ , largo de las células que abandonan el meristema; *RER*, velocidad relativa de elongación;  $T_{el}$ , tiempo de residencia de las células en la zona de elongación;  $L_{gz}$ , largo de toda la zona de crecimiento;  $L_{el}$ , largo de la zona de elongación;  $N_{gz}$ , número de células en toda la zona de crecimiento;  $N_{el}$ , número de células en la zona de elongación.

Parámetro	OT	ST	%	Tratamiento valor- <i>p</i>
<b>FLL (cm)</b>	33.5 $\pm$ 8.3	19.7 $\pm$ 7.2	-41	<b>0.002</b>
<b>LER (mm.h<sup>-1</sup>)</b>	2.9 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.2	-76	<b>&lt;0.0001</b>
<b>T<sub>LE</sub> (d)</b>	6.7 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 1.4	98	<b>&lt;0.0001 *</b>
<b>P (cells.h<sup>-1</sup>)</b>	38.38 $\pm$ 5.34	12.75 $\pm$ 2.08	-67	<b>&lt;0.0001</b>
<b>I<sub>mat</sub> (μm)</b>	75.51 $\pm$ 7.12	56.39 $\pm$ 6.00	-25	<b>0.0016</b>
<b>N<sub>div</sub> (células)</b>	520.30 $\pm$ 137.06	388.76 $\pm$ 59.63	NS	0.0731
<b>L<sub>mer</sub> (mm)</b>	5.10 $\pm$ 0.95	4.07 $\pm$ 0.65	-20	<b>0.0274</b>
<b>D (cells.cells<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.07869 $\pm$ 0.02066	0.03529 $\pm$ 0.00755	-55	<b>0.0022</b>
<b>T<sub>C</sub> (h)</b>	9.49 $\pm$ 2.35	21.75 $\pm$ 4.31	129	<b>0.0003</b>
<b>T<sub>div</sub> (h)</b>	85.92 $\pm$ 24.39	187.85 $\pm$ 39.64	119	<b>0.0008</b>
<b>I<sub>div</sub> (μm)</b>	15.07 $\pm$ 3.23	11.94 $\pm$ 1.26	NS	0.0809
<b>RER (μm.μm<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.09487 $\pm$ 0.01190	0.03063 $\pm$ 0.00244	-68	<b>&lt;0.0001</b>
<b>T<sub>el</sub> (h)</b>	17.78 $\pm$ 2.37	53.99 $\pm$ 5.84	204	<b>&lt;0.0001</b>
<b>L<sub>gz</sub> (mm)</b>	29.30000 $\pm$ 3.84240	21.60000 $\pm$ 4.07070	-26	<b>0.0064</b>
<b>L<sub>el</sub> (mm)</b>	24.20057 $\pm$ 3.61432	17.53189 $\pm$ 4.25057	-28	<b>0.0106</b>
<b>N<sub>gz</sub> (células)</b>	1205.80 $\pm$ 222.37	1065.53 $\pm$ 191.72	NS	0.2520
<b>N<sub>el</sub> (células)</b>	685.50 $\pm$ 135.85	676.77 $\pm$ 148.98	NS	0.9068

\* test *post-hoc* Tukey mostró que el efecto del tratamiento difieren en los grupos tolerantes y sensible de cultivares y entre cultivares con un valor-*p* < 0.05. No hubo diferencias entre cultivares bajo condiciones OT.



**Figura 2-6.** Largo de hoja durante el tiempo de crecimiento de la cuarta hoja de los seis cultivares de arroz. Círculos rellenos representan mediciones durante la condición OT; círculos abiertos representan mediciones durante la condición ST. Cada punto es el promedio  $\pm$  EE,  $n=23$ .

Los parámetros relacionados con los procesos de división, número de células en división ( $N_{div}$ ) y velocidad promedio de división celular ( $D$ ), explican mejor los cambios en  $P$  (Tabla 2-2, Eq. 3).  $N_{div}$  no estuvo significativamente afectado por el estrés por ST (Tabla 2-3) pero el largo del meristema ( $L_{mer}$ ), que es determinado por  $N_{div}$ , se vio ligeramente afectado (-20%).  $P$  estuvo muy influenciado por la reducción en -55% de  $D$ . El tiempo que las células residen en el meristema ( $T_{div}$ ) se incrementó un 119% en respuesta al estrés para contrarrestar la disminución de  $D$ . La expansión de las células en la zona de elongación depende del largo de las células que dejan el meristema ( $l_{div}$ ), de la velocidad relativa de expansión (RER), y del tiempo que pasan elongándose ( $T_{el}$ ) para alcanzar  $l_{mat}$  (Tabla 2-2, Eq. 4).  $l_{div}$  no se vio afectado por el tratamiento ST (Tabla 2-3). El efecto principal del estrés por ST respecto a la expansión de las células fue sobre el RER que se vio reducido en -68%.  $T_{el}$  se elevó un 204% en respuesta a

ST para compensar el efecto sobre el RER. El largo de la zona de elongación ( $L_{el}$ ) se vio levemente reducido en un -28% y su número de células ( $N_{el}$ ) no se modificó. Como resultado,  $I_{mat}$  disminuyó solo un -25% en promedio entre los cultivares.

### **2.9.2 Diferentes respuestas del crecimiento foliar de cultivares tolerantes y sensibles a temperaturas subóptimas**

A pesar de que el estrés por ST afecta extremadamente el FLL de la cuarta hoja de las plántulas de arroz, diferencias entre cultivares tolerantes y sensibles fueron encontradas. Mientras que los cultivares sensible redujeron su FLL en un -51%, los tolerantes tuvieron un FLL -35% menor (Tabla 2-4) confirmando que las diferencias en sensibilidad se relacionan con el crecimiento de la tercer hoja (Capítulo 1). Estas diferencias en la reducción de FLL entre los grupos se explicaron parcialmente por su reducción en LER: los cultivares tolerantes disminuyeron su LER un -74% mientras que los sensibles lo hicieron un -79%. La causa principal de esta diferencia del 16% en la reducción de FLL fue  $T_{LE}$ , este parámetro se incrementó un 80% en el grupo sensible y un 116% en el grupo tolerante.

Como se discutió previamente, la respuesta general del incremento de  $T_{LE}$  puede explicarse con la teoría del tiempo termal. Sin embargo, la diferencia de ajuste del  $T_{LE}$  por la reducción del LER en respuesta a ST entre tolerantes y sensibles no pudo ser explicada por el tiempo termal dado que los GDD necesarios para alcanzar el FLL fueron menores para los cultivares sensibles bajo condiciones ST que bajo condiciones OT y difirió con los cultivares tolerantes (Tabla 2-5). La suma de temperatura que el arroz necesita para alcanzar cierto estado de desarrollo es conocida por variar de cultivar a cultivar en parte porque la temperatura base ( $T_{BASE}$ ) para variedades adaptadas a climas cálidos son mayores que las de cultivares tolerantes a frío (Yoshida, 1981; Gao et al., 1992; Trudgill et al., 2005; Counce et al., 2015). Además, la red regulatoria génica del maíz que está detrás del control de LER y de  $T_{LE}$  demostró ser diferente (Baute et al., 2015; Baute et al., 2016): a nivel génico, el LER se encontró más relacionado con la señalización mientras que el  $T_{LE}$  se relacionó más con el metabolismo primario. El grupo de cultivares aquí analizado se desempeñó de manera diferente bajo ST respecto del PSII (Capítulo 1), con lo cual se puede sugerir que puede existir una regulación diferente en el balance del suministro de carbón y su utilización que conlleve a una diferencia en el crecimiento foliar de los grupos.

**Tabla 2-4.** Análisis del efecto del estrés por ST en el crecimiento de la cuarta hoja de cultivares de arroz tolerantes y sensibles. Los datos son promedios de tres cultivares  $\pm$  DE para los tratamientos OT y ST. Un ANOVA se utilizó como test estadístico usando como factores *Tratamiento*, *Sensibilidad*, y *Tratamiento\*Sensibilidad*, se presentan aquí los valores-*p* para el factor *Sensibilidad* para todos los parámetros. Cuando el valor-*p* < 0.05 se marca en negrita y se muestran los valores de porcentaje de ST sobre OT para cada grupo de cultivares si el valor-*p* para *Tratamiento* es <0.05, de lo contrario se marca como no significativo (NS). Se realizó un test *post-hoc* Tukey para el parámetro  $T_{LE}$  dado que la interacción de factores fue significativa (valor-*p*= 0.0214), el resto de los parámetros tuvo un valor-*p*>0.05 para la interacción de factores. Parámetros: *FLL*, largo final de hoja; *LER*, velocidad de elongación de la hoja;  $T_{LE}$ , tiempo de elongación de la hoja; *P*, producción celular;  $I_{mat}$ , largo de célula madura;  $N_{div}$ , número de células en el meristema;  $L_{mer}$ , largo del meristema; *D*, velocidad promedio de división celular;  $T_C$ , duración del ciclo celular;  $T_{div}$ , tiempo de residencia de las células en el meristema;  $I_{div}$ , largo de las células que abandonan el meristema; *RER*, velocidad relativa de elongación;  $T_{el}$ , tiempo de residencia de las células en la zona de elongación;  $L_{gz}$ , largo de toda la zona de crecimiento;  $L_{el}$ , largo de la zona de elongación;  $N_{gz}$ , número de células en toda la zona de crecimiento;  $N_{el}$ , número de células en la zona de elongación.

Parámetros	Cultivares tolerantes		Cultivares sensibles		% Sensibilidad		
	OT	ST	OT	ST	T	S	
FLL (cm)	38.9 ± 9.0	25.5 ± 5.3	28.2 ± 1.9	13.9 ± 0.5	-35	-51	<b>0.0066</b>
LER (mm.h <sup>-1</sup> )	3.3 ± 0.7	0.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	-74	-79	<b>0.0373</b>
T <sub>LE</sub> (d)	6.7 ± 0.8	14.4 ± 0.3	6.7 ± 0.5	12.1 ± 1.0	116	80	<b>0.0275 *</b>
P (cells.h <sup>-1</sup> )	41.80 ± 5.59	14.47 ± 0.51	34.96 ± 2.22	11.02 ± 1.30	-65	-68	<b>0.0204</b>
I <sub>mat</sub> (µm)	75.64 ± 6.44	58.76 ± 7.99	75.37 ± 9.23	54.01 ± 3.04	-22	-28	0.5554
N <sub>div</sub> (células)	566.29 ± 106.13	404.16 ± 68.90	474.31 ± 171.34	373.35 ± 58.59	NS	NS	0.3639
L <sub>mer</sub> (mm)	5.78 ± 0.78	4.29 ± 0.88	4.42 ± 0.51	3.85 ± 0.35	-26	-13	<b>0.0463</b>
D (cells.cells <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.07610 ± 0.01456	0.03872 ± 0.00760	0.08128 ± 0.02890	0.03187 ± 0.00703	-49	-61	0.9341
T <sub>c</sub> (h)	9.48 ± 1.62	19.67 ± 3.15	9.49 ± 3.35	23.83 ± 4.85	108	151	0.3245
T <sub>div</sub> (h)	86.83 ± 16.57	171.20 ± 31.50	85.01 ± 34.79	204.50 ± 45.87	97	141	0.4439
I <sub>div</sub> (µm)	15.42 ± 3.31	11.69 ± 0.90	14.73 ± 3.84	12.19 ± 1.73	NS	NS	0.9554
RER (µm.µm <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.09845 ± 0.00661	0.03016 ± 0.00303	0.09129 ± 0.01648	0.03111 ± 0.00224	-69	-66	0.5697
T <sub>ei</sub> (h)	16.59 ± 2.46	55.35 ± 8.62	18.97 ± 1.93	52.63 ± 2.31	234	177	0.9522
L <sub>gz</sub> (mm)	31.53333 ± 4.62310	24.66667 ± 5.53655	27.06667 ± 0.75719	18.53333 ± 0.70238	-22	-32	<b>0.0358</b>
L <sub>ei</sub> (mm)	25.75263 ± 4.88644	20.37806 ± 4.77450	22.64851 ± 1.24668	14.68572 ± 0.51420	-21	-35	0.0601
N <sub>gz</sub> (células)	1266.21 ± 229.09	1194.18 ± 184.02	1145.38 ± 245.33	936.88 ± 91.53	NS	NS	0.1347
N <sub>ei</sub> (células)	699.93 ± 185.58	790.02 ± 118.05	671.07 ± 105.22	563.53 ± 55.48	NS	NS	0.1149

\* test *post-hoc* Tukey mostró que el efecto del tratamiento difieren en los grupos tolerantes y sensible de cultivares y entre cultivares con un valor  $p < 0.05$ . No hubo diferencias entre cultivares bajo condiciones OT.

**Tabla 2-5.** Tiempo termal acumulado para alcanzar el largo final de la hoja (FLL) de la cuarta hoja del arroz. Los datos son el promedio de tres cultivares  $\pm$  DE en condiciones OT y ST. Un ANOVA se utilizó como test estadístico usando como factores *Tratamiento*, *Sensibilidad*, y *Tratamiento\*Sensibilidad*, cuando el valor- $p < 0.05$  se marca en negrita. Se realizó un test *post-hoc* Tukey dado que la interacción fue significativa, promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (valor- $p > 0.05$ ).

	Cultivares tolerantes		Cultivares sensibles		Tratamiento valor- $p$	Sensibilidad valor- $p$	Tratamiento* Sensibilidad valor- $p$
	OT	ST	OT	ST			
<b>GDD para alcanzar FLL</b>	106.7 <sup>A</sup> $\pm$ 13.4	100.8 <sup>A</sup> $\pm$ 1.9	107.7 <sup>A</sup> $\pm$ 7.2	<b>84.7<sup>B</sup> <math>\pm</math> 7.3</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0002</b>

Las variaciones en el LER fueron estudiadas utilizando el análisis cinemático y se encontró que se explicaban por variaciones en P (Tabla 2-4); los cultivares sensibles redujeron P un -68% mientras que los tolerantes lo hicieron en un -65%. El análisis también mostro que hubo una reducción del  $L_{mer}$  del -13% en el grupo sensible y de un -26% en el grupo tolerante, y el efecto sobre el largo de toda la zona de crecimiento ( $L_{gz}$ ) fue de un -32% para el grupo sensibles y de un -22% para el grupo tolerante. A pesar de no ser significativo, el menor efecto de ST sobre D en los cultivares tolerantes en comparación con los sensible podría ser la causa de la reducción en P.

## 2.10 CONCLUSIONES

Entender las bases celulares sobre cómo la planta regula de manera predictiva y reproducible su crecimiento en respuesta a condiciones ambientales adversas provee una base para análisis futuros sobre la regulación molecular de esta respuesta y es, por lo tanto, indispensable para el desarrollo de variedades de cultivo más tolerantes. El largo final de la cuarta hoja se encontró fuertemente afectado en respuesta a ST, sin embargo se encontraron grandes diferencias entre tolerantes y sensible confirmando lo que se encontró en el capítulo anterior sobre el crecimiento de la tercer hoja. Esta diferencia se debió principalmente a diferencias en la capacidad de los cultivares de incrementar el tiempo en el que la hoja crecía en respuesta a ST. A pesar de que esto pudo ser parcialmente explicado por el tiempo termal, las diferencias en sensibilidad necesitan más investigación. Desafortunadamente,  $T_{LE}$  no es fácil de estudiar a nivel celular, dado que es controlado por la actividad del meristema intercalar profundamente dentro del espiral de las hojas circundantes. Los mecanismos detrás del LER y el  $T_{LE}$  son diferentes y se controlan de manera



independiente por la planta (Baute et al., 2015; Baute et al., 2016; Nelissen et al., 2016) explicando tal pequeña diferencia en el efecto de ST sobre el LER entre el grupo tolerante y el sensible, y tal gran diferencia en  $T_{LE}$ . La relación de  $T_{LE}$  con el balance de carbohidratos en maíz, y el hecho de que los cultivares sensible de arroz aquí analizados mostraron un mal desempeño del PSII (Capítulo 1), sugiere que la diferencia en sensibilidad podría depender de un desbalance entre la fuente y destino afectando más el FLL del grupo sensible. Diferencias en  $T_{LE}$  podrían ser investigadas en más detalle obteniendo el perfil del largo celular a diferentes tiempos durante la duración de la elongación foliar, por ejemplo. El análisis cinemático se utilizó aquí para determinar las bases celulares de la reducción del LER. La velocidad de producción celular fue la principal causa de la reducción del crecimiento en respuesta a ST como consecuencia de un gran efecto en la velocidad de división celular. Además, el efecto de ST sobre la producción celular también difirió entre genotipos tolerantes y sensibles siendo mayor en los primeros. Esta diferencia pudo ser atribuida a una diferente inhibición de la velocidad de división celular. El tamaño maduro de las células no se vio reducido tan fuertemente en respuesta al estrés. A pesar de que las velocidades relativas de expansión fueron fuertemente reducidas, existió una fuerte compensación con el tiempo que las células invirtieron elongándose.

***CAPÍTULO 3: Análisis transcripcional de la respuesta a temperaturas subóptimas de cultivares de arroz con sensibilidad contrastante***



### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Muchas especies de plantas han desarrollado una colección de mecanismos que les permite minimizar los efectos negativos del estrés por frío. La habilidad de soportar el frío al aclimatarse, *i.e.*, de incrementar su tolerancia a frío, es un rasgo multigénico que resulta de un proceso complejo que involucra un número de cambios fisiológicos y bioquímicos. Esto incluye cambios en la expresión de genes, en la estructura y función de membranas, en el contenido de agua, proteínas, lípidos, y metabolitos primarios y secundarios (Basuchaudhuri, 2014). A pesar de que numerosos estudios de expresión génica sobre la respuesta de las plantas al frío han sido publicados (Rabbani et al., 2003; Cheng, 2006; Zhang et al., 2012; Basu and Roychoudhury, 2014), ninguno de ellos se ha enfocado en ST.

En el primer capítulo, dos grupos de cultivares fueron definidos como sensible y tolerantes sobre la base de su crecimiento y de parámetros fisiológicos determinados durante la respuesta de la planta al estrés por ST, bajo condiciones de laboratorio y de campo. Dentro de los grupos tolerante y sensible se encuentran Koshihikari (*O. sativa* L. spp japónica; Takeuchi et al., 2001; Giarrocco et al., 2007) e IR50 (*O. sativa* L. spp indica; Andaya and Mackill, 2003), respectivamente, en consonancia con su anterior descripción como sensible a frío (IR50; Guo-li and Zhen-fei, 2005) y tolerante (Koshihikari; Takeuchi et al., 2001). El presente trabajo provee una perspectiva transcriptómica de la respuesta de estos dos cultivares representativos que contrastan en su respuesta al estrés por ST.

### **3.2 OBJETIVO**

Este capítulo tiene como objetivo obtener información sobre la respuesta general del transcriptoma de dos cultivares contrastantes a ST.

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1 Material de plantas y condiciones de crecimiento**

Los cultivares de arroz Koshihikari e IR50 fueron amablemente proporcionados por el Programa de Mejoramiento de Arroz de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Semillas de estos cultivares fueron colocadas en placas de Petri sobre dos capas de papel de filtro Whatman N° 5 con 7 mL de carbendazim 0.025 %p/v (Yoshida, 1981) e incubadas en cámara de crecimiento a 30 °C en oscuridad hasta germinación. Las plántulas fueron trasplantadas a redes plásticas dentro de bandejas

negras de 4 L que contenían 3 L de agua destilada. Las bandejas negras con las plántulas de ambos cultivares fueron colocadas en dos cámaras para crecimiento de plantas (Percival E-30B, Percival Scientific, IA, USA) con 12 h de fotoperiodo, 80% humedad, y  $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Las temperaturas día/noche para el tratamiento de temperaturas óptimas de crecimiento (OT) fueron 28/24 °C (d/n). Luego de tres días de cultivo, el agua fue reemplazada por 3 L de solución Yoshida (Rachoski et al., 2015). De ahí en más, la solución Yoshida fue renovada cada tres días hasta el final del experimento. Cuando emergió la tercer hoja (Yoshida, 1981), las temperaturas de una de las cámaras fueron modificadas para realizar el tratamiento de temperaturas subóptimas de crecimiento (ST) a 21/13 °C (d/n). Las plántulas fueron luego cultivadas y cosechadas luego de 24 h de tratamiento.

### **3.3.2 Extracción de RNA total**

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de 24 h de tratamiento, tres brotes de plántulas de cada cultivar y tratamiento fueron cosechados, agrupados y guardados a -80 °C hasta la extracción del RNA. Cada grupo de tres plántulas representó una réplica biológica. La integridad del RNA extraído fue verificada visualmente en un gel de agarosa al 1.5%. La calidad del RNA fue analizada usando un fluorómetro (BioTek Synergy H1 Multi-Mode Reader con un Take3 Micro-Volume Plate, VT, USA). Solamente RNA total de alta calidad (con relación 260/280 = 1.7- 2.1) fue utilizado.

### **3.3.3 Análisis de los microarreglos y los datos**

Las muestras de RNA fueron analizadas con la técnica de microarreglos usando soluciones de microarreglos de Affymetrix. Las muestras de RNA de IR50 y Koshihikari RNA fueron procesadas usando los microarreglos Affymetrix Rice Gene 1.0 ST diseñados específicamente para cultivares indica (RCnGene-1\_0-st) y japónica (RJpGene-1\_0-st), respectivamente. RCnGene-1\_0-st tenía 610,417 sondas, 15 sondas/gen, y 40,987 sets de sondas; y fue diseñado en base al BGI genebuild. RJpGene-1\_0-st tenía 521,299 sondas, 17 sondas/gen, y 29,664 sets de sondas; y fue diseñado en base al RAP2 genebuild. Cinco replicas biológicas del mismo experimento fueron usadas por cultivar y por tratamiento. El análisis de microarreglo fue realizado de acuerdo a los protocolos de Affymetrix (GeneChip Expression Wash, Stain and Scan User Manual P/N 702731 Rev.3, GeneChip WT Terminal Labeling y Hybridization user manual P/N 702808 Rev. 6 y The Ambion WT Expression Kit protocol P/N

4425209C) utilizando un sistema Affymetrix GeneChip Scanner (Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G con Fluidics Station 450, Hybridization Oven 645 y estación de trabajo de computadora con Affymetrix GeneChip Command Console Software, CA, USA). Los datos crudos se encuentran disponibles en Datos Suplementarios 1. Los sets de datos de los microarreglos fueron normalizados con el algoritmo RMA usando el software Affymetrix Expression Console v1.4.0. Un análisis *post-hoc* de componentes principales realizado con todos los sets de datos descartó uno set de datos del tratamiento ST en ambos cultivares. Los sets de datos normalizados fueron analizados y filtrados usando el software Affymetrix Transcriptome Analysis Console v2.0. Los transcritos con expresión diferencial (DET) entre las muestras ST y OT fueron identificados usando un ANOVA de una vía con un FDR < 0.1. Una razón de cambio (FC) de  $\pm 2$  en la expresión del transcrito fue usada como valor umbral.

### **3.3.4 Validación de microarreglos**

Un análisis de qPCR fue utilizado para validar los sets de datos de microarreglos. Un tratamiento de DNase y remoción de reactivos fue aplicado a todas las muestras de RNA total usando el Ambion® DNA-free™ Kit (Life Technologies), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó usando 2  $\mu\text{g}$  de cada muestra de RNA total y 200 unidades de la enzima Promega M-MLV Reverse Transcriptase en un volumen de reacción total de 25  $\mu\text{L}$ , de acuerdo a las condiciones del fabricante. La mezcla de reacción para la qPCR contenía 5  $\mu\text{L}$  de una dilución de cinco veces de la muestra de cDNA, 7.5  $\mu\text{L}$  de FastStart Universal SYBR Green Master Mix (ROX; Roche), 10  $\mu\text{L}$  de una solución 600 nM de cebadores directos e inversos y agua destilada hasta el volumen final. Los cebadores fueron diseñados con el software Primer3Plus (Untergasser et al., 2012; Tabla Suplementaria 5) y chequeados por inespecificidad usando la búsqueda BLAST de la base de datos de Gramene (Ware et al., 2002). Las reacciones de qPCR fueron realizadas utilizando el qPCR System (Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR system, CA, USA). La cuantificación relativa fue realizada por el método comparativo de ciclos umbral usando el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2016) con el gen *actine-1* (*ACT1*) como gen de control interno, reportado como el gen de referencia más adecuado, en conjunto con *eIF-4a*, para qPCR en arroz (Li et al., 2010a).

### **3.3.5 Asignación de ID de genes a los transcritos con expresión diferencial**

Las secuencias DET fueron asociadas a locus de genes (ID del gen) y se obtuvieron genes con expresión diferencial (DEG) a partir de cada DET usando una técnica fuera de línea de BLAST de acuerdo a Camacho et al., (2009). Las secuencias

DET de Koshihikari e IR50 fueron buscadas por medio del BLAST en los archivos de las bases de datos de arroz del International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP; Genome assembly IRGSP v.1/MSU7 basado en *O. sativa* grupo japonica cv. Nipponbare; Sakai et al., 2013) y el Beijing Genome Institute (BGI; Genome assembly BGI-RIS ASM465 v.1 basado en *O. sativa* grupo indica cv 93-11; Zhao et al., 2004), respectivamente. Para las búsquedas BLAST se utilizó el software BLAST+ (NCBI-BLAST v.2.2.31, ND, USA) y el manual BLAST Command Line Applications User Manual (NCBI, ND, USA). Las búsquedas BLAST incluyeron un algoritmo que fue especialmente diseñado con el siguiente criterio de asignación de ID de gen: corte de valor-e de  $1e^{-9}$  y cuando dos o más grupos de transcritos emparejaban el mismo gen ambos fueron eliminados.

### **3.3.6 Anotación de genes y enriquecimiento funcional**

Se asignaron MapMan Bins a las secuencias protéicas de los DEGs usando la aplicación web Mercator (Lohse et al., 2014). Estas secuencias se obtuvieron de la herramienta GrameneMart de la base de datos de Gramene con las listas de anotación de IRGSP (para el caso de Koshihikari) o BGI (para el caso de IR50), presentadas a la aplicación web Mercator y buscadas contra las proteínas de Arabidopsis TAIR (versión 10), Swiss Prot/UniProt Plant Proteins, proteínas de arroz TIGR5, Cluster de ortólogos de genes eucariotas, y la base de datos Conserve Domain, el umbral de blast se seteó en 80, y se permitió la asignación de múltiples bins. Se obtuvo información de UniProtKB/TrEMBL de los DEGs de la base de datos de UNIPROT mediante la búsqueda de los IDs de genes de los DEGs con la anotación IRGSP (para Koshihikari) o BGI (para IR50). La descripción de GrameneMart se obtuvo de BioMart, mediante la búsqueda de los IDs de los genes en las anotaciones IRGSP (para Koshihikari) o BGI (para IR50). Se utilizó la herramienta de búsqueda Batch web ConserveDomain-search del sitio web de NCBI (Marchler-Bauer et al., 2011) para buscar las secuencias protéicas de ambos microarreglos que fueron obtenidas desde GrameneMart, el umbral E-Value se seteó en 0.01, se permitió el puntaje corregido por la composición, no se aplicó filtro por baja complejidad, el número máximo de hits se seteó en 500 y la búsqueda se realizó contra la base de datos CDD 46675 PSSMs. La asignación de ortólogos KEGG (Tanabe and Kanehisa, 2012) fue realizada usando la aplicación web de KAAS (Moriya et al., 2007), la búsqueda de las secuencias de cDNA de los DEGs se realizó contra las bases de datos de KEGG de *Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata*, *Theobroma cacao*, *Glycine max*, *Fragaria vesca*, *Vitis vinifera*, *Solanum lycopersicum*, y *O. sativa* japonica, utilizando un algoritmo de BBH por el mejor hit. Con esta información los DEGs fueron asignados a vías metabólicas de KEGG, esto fue

manualmente curado utilizando información de las bases de datos de RiceCyc v3.3 (<http://pathway.gemne.org/>) y BRENDA (Chang et al., 2009). Se realizó una búsqueda de literatura para cada DEG a partir de su ID de IRGSP y BGI para ambos microarreglos usando los motores de búsqueda de Ricewiki (Zhang et al., 2014) y Shigen (Kurata and Yamazaki, 2006). Se realizó una breve descripción de la asignación funcional integrando toda esta información.

Los DEGs de Koshihikari e IR50 fueron funcionalmente analizados utilizando el algoritmo de anotación 1D (Cox and Mann, 2012) con el software Perseus ([http://141.61.102.17/perseus\\_doku/doku.php?id=start](http://141.61.102.17/perseus_doku/doku.php?id=start); Version 1.5.5.3). Los archivos de anotación fueron descargados de la bases de datos de Perseus ([annotations.perseus-framework.org](http://annotations.perseus-framework.org)) basados en Uniprot. Las bases de datos *Oryza sativa subsp. Japonica* y *Oryza sativa subsp. Indica* fueron utilizadas para Koshihikari e IR50, respectivamente. Las redes manualmente curadas y la clasificación de las vías metabólicas de KEGG también fueron incluidas en este análisis.

### **3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.4.1 Perfil de los transcriptomas**

Para analizar comprensivamente la respuesta del arroz a ST, la expresión génica de dos cultivares contrastantes fue evaluada. Con este propósito, se utilizaron microarreglos especialmente diseñados para cultivares indica y japonica. Muestras de plántulas de IR50 y Koshihikari sometidas durante 24 h a los tratamientos ST y OT fueron analizadas con la técnica de microarreglos luego validados por qPCR. Para la validación por qPCR se analizaron genes seleccionados (Tabla Suplementaria 5). Los coeficientes de correlación de Pearson promedio entre los microarreglo y los resultados de qPCR fueron de 0.86 y 0.92 para Koshihikari e IR50, respectivamente (Figura Suplementaria 5).

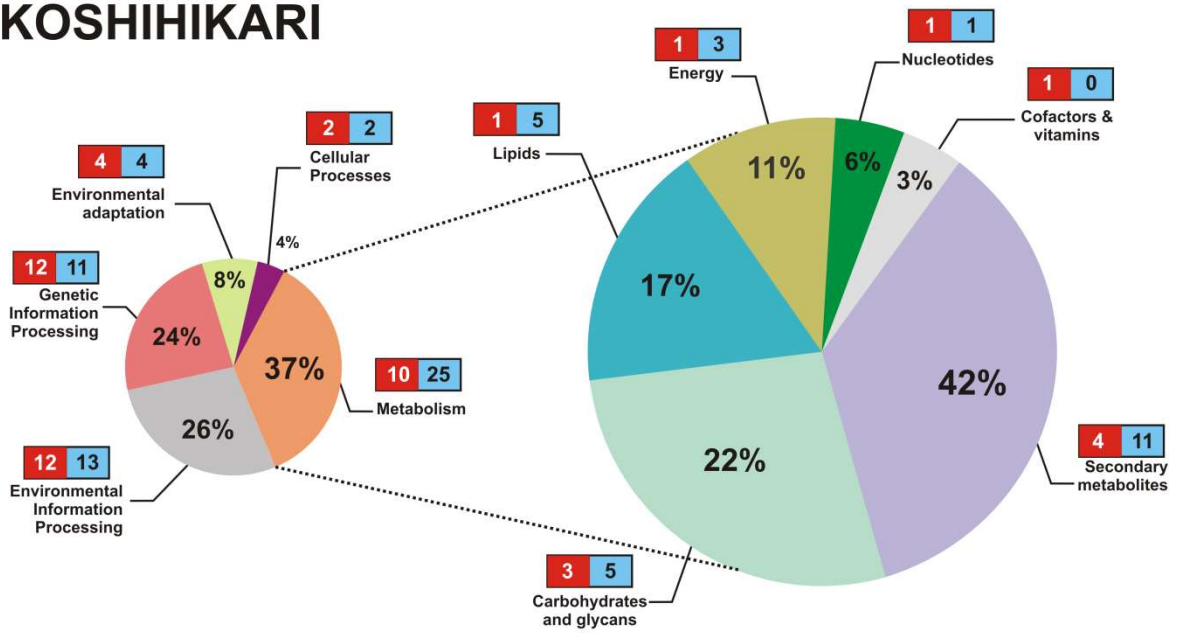
El efecto de ST sobre las plántulas ocasionó 178 y 331 transcriptos diferencialmente expresados (DETs) en Koshihikari e IR50, respectivamente (Tabla Suplementaria 6). Dado que Koshihikari pertenece a los cultivares de tipo japonica e IR50 a los de tipo indica, la anotación de los genes se realizó con dos modelos de genes diferentes basados en cultivares de diferente tipo para obtener los genes diferencialmente expresados (DEGs). En IR50, se identificaron 327 DEGs basados en 2012-07-BGI (cv. 93-11, cultivar indica) mientras que 175 fueron encontrados en las plántulas de Koshihikari basados en el modelo de genes IRGSP-1.0/MSU7 (cv.

Nipponbare, cultivar japónica). Aproximadamente 40 DEGs se regularon de igual manera en ambos cultivares. Con el fin de mostrar una visión global de los DEGs, se realizó una clasificación funcional de acuerdo a la ortología KEGG. Pudimos asignar una función al 80% de los DEGs en cada cultivar, en promedio. Además, 198 y 92 DEGs de IR50 y Koshihikari, respectivamente, pudieron ser clasificados en alguna categoría de vías metabólicas de KEGG. El perfil de distribución de funciones de estos DEGs en cada vía de KEGG (metabolismo, procesamiento ambiental, procesamiento de la información genética, sistemas del organismo, y procesos celulares) fue similar entre los cultivares (Figura 3-1). Se realizó una descripción más detallada del metabolismo generada dado que fue la categoría más representada en ambos microarreglos. Cada subcategoría de las vías del metabolismo mostró grandes diferencias entre los cultivares, particularmente en el caso de los carbohidratos, lípidos y metabolitos secundarios.

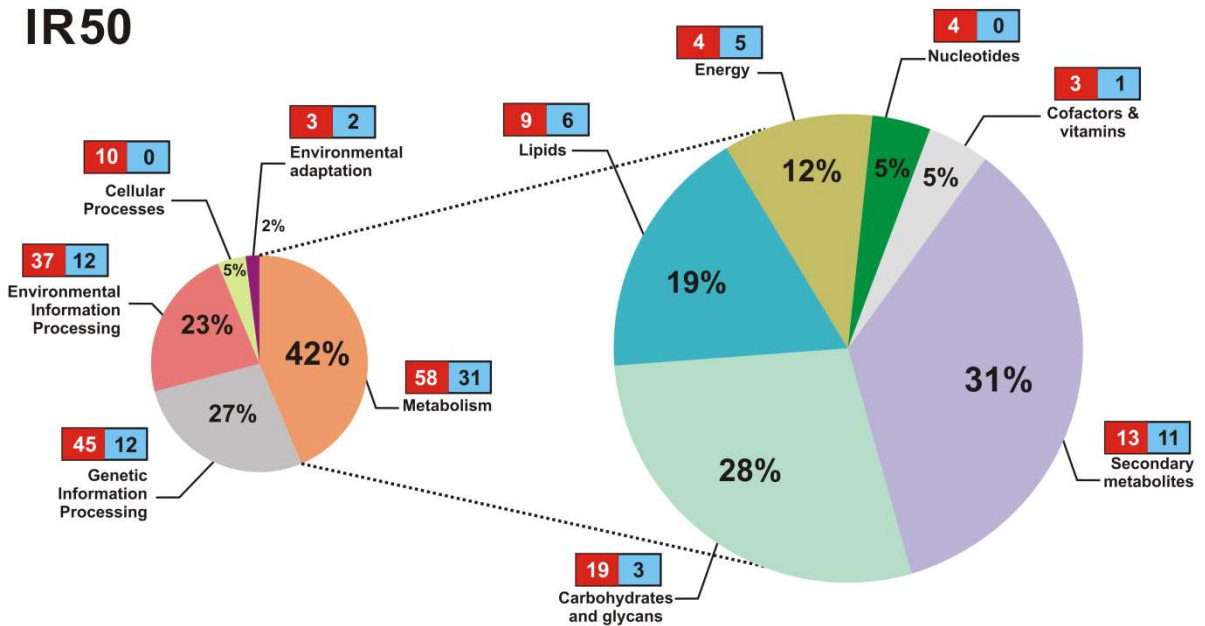
Para incrementar el poder de comparación de resultados entre los cultivares, se realizó un análisis de enriquecimiento con el algoritmo de enriquecimiento 1D (Cox and Mann, 2012). Este análisis mostró un único término enriquecido, receptores quinasas, en el transcriptoma de Koshihikari subregulado (Tabla 3-1). IR50 tuvo 34 términos enriquecidos, 17 de ellos estaban sistemáticamente sobrerregulados y 17 subregulados. Entre los términos sobrerregulados, algunos de ellos se relacionaron con el metabolismo de carbohidratos, transporte, replicación y reparación, y partes celulares. Los términos subregulados agruparon unión de iones, algunos receptores, y metabolismo secundario. En general, estos resultados sugirieron grandes diferencias entre las respuestas de los cultivares a ST que serán descritas en mayor detalle.



# KOSHIHIKARI



# IR50



**Figura 3-1.** Distribución de los DEGs entre las diferentes vías de KEGG y las subvías de la vía Metabolismo de KEGG. El porcentaje de distribución de DEGs en cada vía KEGG se muestra en el gráfico de torta izquierdo para cada cultivar. El gráfico de torta de la derecha representa la distribución de los DEGs en cada subvía dentro de la vía Metabolismo de KEGG. Los números en cuadrados rojos y azules representan sobrerregulación y subregulación de los DEGs, respectivamente.

**Tabla 3-1.** Análisis de enriquecimiento funcional 1D de los datos del transcriptome de los cultivares de arroz Koshihikari e IR50 sometidos a estrés por ST. Las siguientes categorías fueron utilizadas para el análisis: nombres de los Mapman BINs, redes de interacción y reacción molecular de KEGG, subclases de las redes de interacción y reacción molecular de KEGG, vías KEGG, ontología del gen (GO) en procesos biológicos (GOBP), GO en funciones moleculares (GOMF), y GO en componentes celulares (GOCC). Sólo se muestran en la tabla términos con FDR < 0.15.

Tipo de categoría	Nombre	Número de DEGs dentro del término	Puntaje	Valor-p	Valor FDR	Promedio de FC
<b>Koshihikari</b>						
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Receptor quinasa	7	-0.754386	0.0007273	0.119277	-3.33
<b>IR50</b>						
<b>GOMF</b>	Actividad del reservorio de nutrientes	4	-0.931957	0.00135441	0.11016	-11.3
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Repetición rica en leucina VIII	5	-0.811656	0.00183824	0.09375	-4.67
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	terpenoides	6	-0.751282	0.00161138	0.13697	-3.23
<b>GOMF</b>	Actividad carbono-oxígeno liasa	6	-0.751282	0.00161138	0.09829	-3.23
<b>GOMF</b>	Actividad carbono-oxígeno liasa.actuando sobre fosfatos	6	-0.751282	0.00161138	0.07864	-3.23
<b>GOMF</b>	Actividad terpeno sintasa	6	-0.751282	0.00161138	0.06553	-3.23
<b>GOCC</b>	Región extracelular	8	-0.653251	0.00159518	0.05583	-5.92
<b>GOMF</b>	Unión a iones de hierro	9	-0.582471	0.00287435	0.07793	-1.54
<b>GOMF</b>	Unión de iones de metal de transición	15	-0.58038	0.00014553	0.03551	-3.62
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Receptor quinasa	18	-0.522009	0.00019545	0.04984	-2.09
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Abiótico	13	-0.5	0.00224201	0.09529	-3.88
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Metabolismo secundario	16	-0.416071	0.0049845	0.12711	-1.03

<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Estrés	22	-0.363636	0.00436902	0.12379	-2.64
<b>GOMF</b>	Unión de iones metálicos	41	-0.296215	0.00213658	0.06517	-1.52
<b>GOMF</b>	Unión catiónica	42	-0.264294	0.00563862	0.13758	-1.39
<b>GOMF</b>	Unión iónica	42	-0.264294	0.00563862	0.12508	-1.39
<b>GOMF</b>	Unión	112	-0.185217	0.00582279	0.1184	-0.25
<b>GOCC</b>	Parte de membrana	30	0.280731	0.0112119	0.13081	2.12
<b>GOCC</b>	Integral a la membrana	29	0.312286	0.00546497	0.12752	2.272
<b>GOCC</b>	Intrínseco a la membrana	29	0.312286	0.00546497	0.09564	2.272
<b>GOCC</b>	Parte celular	82	0.312763	2.15E-05	0.00151	2.054
<b>GOMF</b>	Actividad hidrolasa	36	0.314218	0.00208175	0.07256	1.682
<b>subclases de las redes de interacción y reacción molecular de KEGG</b>	Transporte de membrana	31	0.32871	0.00258242	0.03745	2.389
<b>GOMF name</b>	Actividad de transportador	18	0.386226	0.00585239	0.10985	2.471
<b>GOCC name</b>	Membrana	16	0.387302	0.00895236	0.12533	2.392
<b>GOCC name</b>	Parte citoplasmática	14	0.392519	0.0129245	0.12925	2.339
<b>subclases de las redes de interacción y reacción molecular de KEGG</b>	Metabolismo de carbohidratos	17	0.442488	0.00211681	0.06139	2.419
<b>subclases de las redes de interacción y reacción molecular de KEGG</b>	Replicación y reparación	7	0.657848	0.00289865	0.02802	3.211
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Transporte	9	0.677019	0.00053077	0.06767	3.086
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Principal metabolismo CHO	6	0.713333	0.00274866	0.10013	2.995
<b>patwhay maps (or hierarchy)</b>	Metabolismo de almidón y sacarosa	8	0.716331	0.00053694	0.04564	3.018
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Sistemas de transportadores ABC transporters and resistencia multidroga	6	0.747179	0.0017091	0.10896	3.382

<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Azúcares	5	0.778528	0.00280769	0.0895	3.558
<b>Nombres de los Mapman BINs</b>	Familia JUMONJI	3	0.928862	0.00560694	0.12998	3.717

### 3.4.2 Síntesis y degradación de carbohidratos

En promedio, el 25% de los DEGs dentro de metabolismo fueron categorizados en la subclase de metabolismo de carbohidratos y glicanos en ambos cultivares (Figura 3-1). Mientras que Koshihikari subreguló la mayoría de los DEGs dentro de esta vía (Figura 3-2), IR50 los sobreguló (Figura 3-3). Koshihikari sobreguló una isoamilasa que degrada almidón (EC 3.2.1.68) y subreguló una  $\alpha$ -galactosidasa (EC 3.2.1.22) involucrada en el metabolismo de galactosa. La subregulación de la  $\alpha$ -galactosidasa se relacionó en otros trabajos con un aumento en la tolerancia a frío de la petunia, aparentemente atribuible a un acumulación de rafinosa (Pennycooke, 2003). Además, un cultivar de arroz sensible a frío transformado con galactinol sintasa de trigo, presentó un incremento en su tolerancia al estrés por frío (5 °C) relacionado con acumulación de galactinol y rafinosa (Shimosaka and Ozawa, 2015). Por otra parte, el tipo salvaje de este cultivar incremento su contenido de rafinosa en respuesta a exposiciones largas a frío (Saito and Yoshida, 2011). Otro informe en el cual se estudiaron plántulas de arroz bajo condiciones de estrés por frío también mostró un incremento en el contenido de galactosa en un cultivar tolerante (Morsy et al., 2007). El rol de la rafinosa y el galactinol en el estrés por frío no es claro pero se ha sugerido que podría funcionar como osmoprotector, estabilizador de membranas, y como eliminador de las especies reactivas del oxígeno (Nishizawa et al., 2008; Sengupta et al., 2015). La síntesis de almidón estaba sobregulada en IR50 en respuesta a ST en nuestro ensayo por medio de un DEG de la almidón sintasa (Figura 3-3). Sin embargo, este cultivar también subreguló un DEG asociado con el ciclo de Calvin cercanamente relacionado con la síntesis de almidón (fructosa 1,6-bifosfato aldolasa; EC 4.1.2.13). El cultivar sensible también sobreguló numerosos DEGs pertenecientes a la vía de degradación de carbohidratos, incluyendo la misma isoamilasa que se encontraba sobregulada en Koshihikari. Muchos otros DEGs de la degradación de almidón y sacarosa, glicolisis y metabolismo de galactosa estaban sobregulados, concordando con la subregulación del término enriquecido *actividad del reservorio de nutrientes* y la sobregulación del término *actividad hidrolasa* (Tabla 3-1). Estos sacáridos son las moléculas de mayor almacenamiento energético en las hojas y sus productos de regulación pueden server como fuentes de carbono y energía para crecer si la planta

lo necesita (Brouns et al., 2006; Ling et al., 2013). Además, IR50 también sobrerreguló un DEG de la monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4) relacionado con la respuesta redox.

La modificación de la pared celular también se vio regulada a nivel de expresión génica en ambos cultivares. IR50 sobrerreguló DEGs relacionados con la degradación de celulosa, la modificación de las redes de xiloglucanos, y la generación de pectina (Figura 3-3), mientras que Koshihikari sobrerreguló DEGs del catabolismo de pectina y subreguló la xiloglucano:xiloglucósido transferasa (Figura 3-2). En general, esto sugiere una posible transformación en la pared celular.

### **3.4.3 Respuesta energética**

Las plantas que crecen bajo condiciones de frío necesitan conservar su capacidad para realizar fotosíntesis (Huner et al., 1998). La fotostásis se logra mediante el balance entre la energía suministrada por los electrones generados por el complejo liberador de oxígeno (OEC) y la energía consumida por la asimilación del dióxido de carbono en el ciclo de Calvin (Ensminger et al., 2006). Los genes relacionados con energía representaron un 11.5% de todos los DEGs, en promedio, en ambos cultivares (Figura 3-1). Ambos cultivares subregularon la proteína 2 del complejo liberador de oxígeno del PSII (PsbP), la proteína producto de este gen en conjunto con la PsbQ constituyen subunidades del OEC y facilitan la retención de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ , cofactores esenciales para las reacción de la ruptura de agua del PSII (Seidler, 1996; Figura 3-2 y Figura 3-3). IR50 también subreguló PsbR, una subunidad del PSII que podría estar involucrado en la unión de PsbP al PSII (Suorsa et al., 2006; Liu et al., 2009). Todos estos eventos podrían llevar a un desacople e inactivación del OEC. Además, IR50 modificó la expresión de otros tres genes importantes relacionados con el aparato fotosintético (Figura 3-3): **a**) subreguló la ferredoxina (PetF), la proteína hierro-azufre del PSI que transfiere electrones a la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa; **b**) sobrerreguló el gen de la PsbS, una subunidad de PSII necesaria para la fotoprotección de la disipación termal (qE) del exceso de energía lumínica absorbida por las plantas (Ishida et al., 2011); **c**) subregulación de la glutamil-tRNA reductasa (HemA, EC 1.2.1.70), una enzima de un paso limitante dentro de la biosíntesis de Chl. Estos eventos sugirieron que el tratamiento ST alteró el funcionamiento normal del fotosistema en IR50, que pudo haber reducido en consecuencia la velocidad de transporte de electrones y la producción de NADPH por el ciclo de Calvin. Además, la subregulación de la aldolasa descrita en la sección anterior también pudo comprometer pasos limitantes en el ciclo de Calvin dado que se sugiere que esta

enzima tiene el potencial de controlar el flujo de carbono fotosintético por medio del ciclo (Uematsu et al., 2012).

Se encontraron genes relacionados con la fosforilación oxidativa sobrerregulados solamente en el cultivar sensible. La oxidación del glutatión estaba genéticamente sobrerregulada en IR50 mientras que el cultivar tolerante lo subreguló. Finalmente, el metabolismo del sulfuro estaba regulado por ST sólo en Koshihikari.

#### **3.4.4 Biosíntesis y degradación de ácidos grasos**

La subcategoría de metabolismo de lípidos agrupó el 18% de los DEGs de metabolismo en ambos cultivares (Figura 3-1). Uno de los mayores efectos del estrés por frío en plantas es la remodelación de la fluidez de membrana por alteración de la composición de sus ácidos grasos (Upchurch, 2008). Este efecto es mayormente regulado por la actividad de las desaturasas de ácidos grasos a nivel transcripcional y post-transcripcional (De Palma et al., 2007; Upchurch, 2008). La síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) estaba genéticamente aumentada por la sobrerregulación de diferentes genes de desaturasas en Koshihikari (Figura 3-2) y en IR50 (Figura 3-3). Muchos autores reportaron que la tolerancia a frío en arroz se relaciona con un incremento los ácidos grasos insaturados (Majumder et al., 1989; Bertin et al., 1998; Maeda et al., 1999). Por otra parte, una relación positiva entre la composición de ácidos grasos insaturados de la membrana cloroplástica y la tolerancia fotosintética al frío fue reportada (Peoples et al., 1978; Ariizumi et al., 2002; Zhu et al., 2007).

Además, IR50 mostro sobrerregulados genes asociados a la degradación de ácidos grasos en el retículo endoplasmático y el peroxisoma (Figura 3-3). La vía de  $\beta$ -oxidación peroxisomal podría ser otra estrategia para obtener energía extra y poder así mantener la homeostasis celular, como se demostró en una línea de Arabidopsis sin almidón bajo oscuridad extensa (Kunz et al., 2009). Respecto de los triacilgliceroles, ambos cultivares exhibieron DEGs subregulados en la vía de degradación (Figura 3-2 y Figura 3-3). Algunos de estos genes se relacionaron con la producción de ácido jasmónico (JA).

#### **3.4.5 Metabolismo secundario**

El metabolismo secundario representó un porcentaje algo del total de DEGs en ambos cultivares (Figura 3-1). IR50 expuso muchos DEGs relacionados con flavonoides, isoflavonoides, terpenoides y poliquétidos citoplasmáticos, y poliaminas

sobrerregulados, mientras que aquellos relacionados con sesquiterpenoides plastídicos estaban subregulados (Figura 3-3), en concordancia con los resultados de enriquecimiento de función. El análisis del transcriptome mostró la subregulación de la biosíntesis de luteína en Koshihikari. Esto apoya la idea previamente discutida de que Koshihikari mantiene un PSII saludable dado que hay evidencias de que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en luteína tuvieron mejor desempeño del fotosistema cuando se las expuso a estrés por frío (Pérez-Bueno and Horton, 2008). Adicionalmente, un DEG de una peroxidasa que forma parte de la síntesis de lignina a partir de fenilpropanoides se encontró subregulada en ambos cultivares (Figura 3-2 y Figura 3-3).

Las poliaminas son metabolitos secundarios conocidos por estar involucrados en múltiples procesos fisiológicos como el crecimiento y desarrollo de la célula, y la respuesta contra diferentes condiciones ambientales (Calzadilla et al., 2014), incluyendo estrés por frío (Menéndez et al., 2013). Se ha reportado que diferentes especies de plantas, incluyendo arroz, incrementan el contenido de poliaminas cuando se encuentran bajo estrés por frío, particularmente la putrescina (Lee et al., 1997; Berberich et al., 2015). La relación entre el contenido de poliaminas y el grado de tolerancia de la planta a un estrés es bastante controversial en la literatura, sin embargo han sido relacionadas con un incremento de la capacidad antioxidante en la homeóstasis redox (Liu et al., 2015). Nuestros resultados mostraron que DEGs de la vía de biosíntesis de poliaminas estaban sobrerregulados en IR50. Dado que la síntesis *de novo* de las poliaminas usualmente causa una acumulación de poliaminas en la planta y que está altamente regulada a nivel transcripcional, las poliaminas podrían verse incrementadas en cantidad en respuesta a ST en el cultivar sensible (Liu et al., 2015).

Respecto a las hormonas, los genes de la producción de etileno (ET) se encontraron subregulados en ambos cultivares (Figura 3-2 y Figura 3-3). El ET funciona como un represor del crecimiento de la planta y de su desarrollo, pero si usualmente incrementa o disminuye en respuesta a frío no está bien establecido aún (Eremina et al., 2016). Por otro lado, se ha reportado en arroz que cuando se lo somete a estrés por frío rápidamente incrementa los niveles endógenos de JA (Du et al., 2013). Nuestros resultados mostraron que el ST sobrerregula los genes perteneciente a la biosíntesis de JA en el caso de IR50 (Figura 3-3). Curiosamente, Wingler (2015) incluyó los efectos del JA en su modelo de interacción de señales en el cual se muestra cómo las bajas temperaturas restringen el crecimiento principalmente

por la inhibición de la división celular (Świątek et al., 2002; Noir et al., 2013). Además, los resultados mostraron que IR50 también sobrerreguló DEGs de enzimas claves de las vías de biosíntesis de fitoesteroles y brasinoesteroides (BRs). Los BRs son hormonas implicadas en la promoción del crecimiento y desarrollo de la planta. Han demostrado junto con sus precursores, los fitoesteroles, incrementar la tolerancia a frío en las plantas (Kagale et al., 2007; Bajguz and Hayat, 2009; Senthil-Kumar et al., 2013). Por ejemplo, en arroz se reportó que la adición de BRs promovía la elongación celular en plántulas cultivadas a 15 °C (Fujii and Saka, 2001) probablemente mediante la modulación del metabolismo de giberilinas (Tong et al., 2014).

#### **3.4.6 Respuesta del procesamiento de la información genética**

La regulación de las funciones respecto del procesamiento de la información genética, como es la replicación y reparación del DNA, la transcripción, post-transcripción, traducción, degradación y plegado de proteínas, transporte vesicular, y citoesqueleto es conocida por ser de gran importancia en la respuesta a un estrés, como se vio también en nuestro análisis de enriquecimiento de funciones (Tabla 3-1). Todos estos procesos se encontraron más regulados a nivel de expresión génica en IR50 que en Koshihikari (Figura 3-4). IR50 mostró la mayoría de los DEGs relacionados con estas funciones sobrerregulados, mientras que Koshihikari subreguló la mayoría. IR50 subreguló UIP1, el transcripto de una proteína asociada a la regulación post-transcripcional del mRNA de la subunidad S de de la Rubisco. La sobreexpresión de UIP1 se conoce por contribuir a la tolerancia del arroz frente a estréses abióticos, incluyendo el estrés por frío (Park et al., 2012). Por lo tanto, la subregulación de este gen en conjunto con las implicancias en el metabolismo de carbohidratos y sobre el aparato fotosintético antes descritas, podría tener un efecto negativo en la síntesis de almidón y la fijación de CO<sub>2</sub> en el cultivar sensible.

Como se comentó en la sección previa, las bajas temperaturas suelen afectar la homeostasis de las hormonas (Miura and Furumoto, 2013; Eremina et al., 2016). Nuestros resultados evidenciaron que genes relacionados con las hormonas se regularon a nivel transcripcional en respuesta a ST. Entre ellos, un gen represor de la transcripción relacionado con la hormona ácido indolacético estaba sobrerregulado en IR50, AUX/IAA (Figura 3-4). Este gen es conocido por regular la expresión de genes que alteran la morfología y desarrollo de la planta (Liscum and Reed, 2002; Jain et al., 2006) por medio de la inducción del factor de respuesta a auxina (ARF; Jain and Khurana, 2009; Lyzenga and Stone, 2011; Vanneste and Friml, 2012). Además de la subregulación de la vía de biosíntesis de ET descrita arriba, IR50 también subreguló



CTR1. CTR1 es un regulador de la cascada de ET que inhibe la inducción de EIN3, un factor de transcripción que al final induce las proteínas NAC relacionadas con la hipersensibilidad al congelamiento (Eremina et al., 2016). En consecuencia, los DEGs de las proteínas NAC (OsNAC1 and NAC131) se encontraron sobrerregulados en este cultivar. Los factores de transcripción NAC han sido relacionados con la reprogramación transcripcional asociada con la respuesta al estrés (Nuruzzaman et al., 2013). Sin embargo, los DEGs de WRKY que también forman parte de la cascada de ET, se encontraron subregulados (OsWRKY50 and WRKY). Estos genes han sido relacionados con la tolerancia a múltiples estreses abióticos en distintas plantas (Banerjee and Roychoudhury, 2015). En arroz, la expresión incrementada de WRKY50 fue relacionada con una mayor tolerancia a estrés abióticos y bióticos (Kumar and Sinha, 2014).

De todos modos, la compleja conexión entre la cascada de señalización del estrés y los estreses abióticos no puede ser completamente comprendida sin analizar el reloj circadiano. El frío afecta la expresión de genes relacionadas con el reloj circadiano (Hofmann, 2012) en donde respuestas claves a los estrés abióticos son desencadenadas a tiempos específicos del día (Seo and Mas, 2015). Los factores de transcripción *late elongated hypocotyl* (LHY) y *timing of cab expression 1* (TOC1) del núcleo del reloj circadiano (Murakami et al., 2003) han sido descritos en el proceso de señalización del cierre estomático (Pokhilko et al., 2013; Zhang et al., 2013; Grundy et al., 2015). Además, LHY indirectamente regula positivamente los genes de la respuesta regulada por frío (COR) de la vía canónica de la respuesta a frío (Gilmour et al., 1998; Dong et al., 2011; Lee and Thomashow, 2012) y cambios rítmicos de JA (Goodspeed et al., 2012; Zhang et al., 2013), en donde TOC1 regula la respuesta de ABA por medio de la proteína de unión a ABA, ABAR (Grundy et al., 2015). ABA es también usualmente relacionado con la tolerancia a frío en diferentes especies dado que dispara el cierre estomático (Robertson et al., 2009; Shi and Yang, 2014). Por otro lado, los genes *calmodulin/calmodulin like* (CaMs/CMLs) que codifican para sensores de flujo de  $Ca^{2+}$  juegan un rol bajo estrés por frío durante el cierre estomático, entre otras funciones (Miura and Furumoto, 2013). A su vez, se ha descrito que una proteína *calmodulin-like* de *Arabidopsis thaliana* (AtCML9) está involucrada en la tolerancia al estrés abiótico mediante su efecto sobre las vías mediadas por ABA (Magnan et al., 2008). Nuestros resultados mostraron diferencias entre los cultivares respecto a la inducción de cambios en la expresión de los genes LHY y TOC1 por el estrés ST, y genes relacionados con las cascadas de señalización de ABA y CaMs/CMLs. En conjunto, estos resultados plantean la noción de que diferentes

relaciones entre los genes implicados en el reloj circadiano y en las cascadas de señalización de ABA y  $\text{Ca}^{2+}$  podrían tener lugar en las respuestas de Koshihikari e IR50.

Además, muchos genes relacionados con el transporte de membrana y la catálisis estaban sobrerregulados en IR50, principalmente relacionados con el transporte de iones y péptidos, como también se señaló en el análisis de enriquecimiento (Figura 3-3). Koshihikari también mostró algunos DEGs sobrerregulados bajo esta categoría, aunque menos que IR50 (Figura 3-2). Los receptores quinasa se encontraron subregulados en ambos cultivares, al igual que en el enriquecimiento.

CARBOHYDRATES & GLYCANS
NUCLEOTIDES
ENERGY
COFACTORS & VITAMINS
LIPIDS
SECONDARY METABOLITES
UPREGULATED
DOWNREGULATED

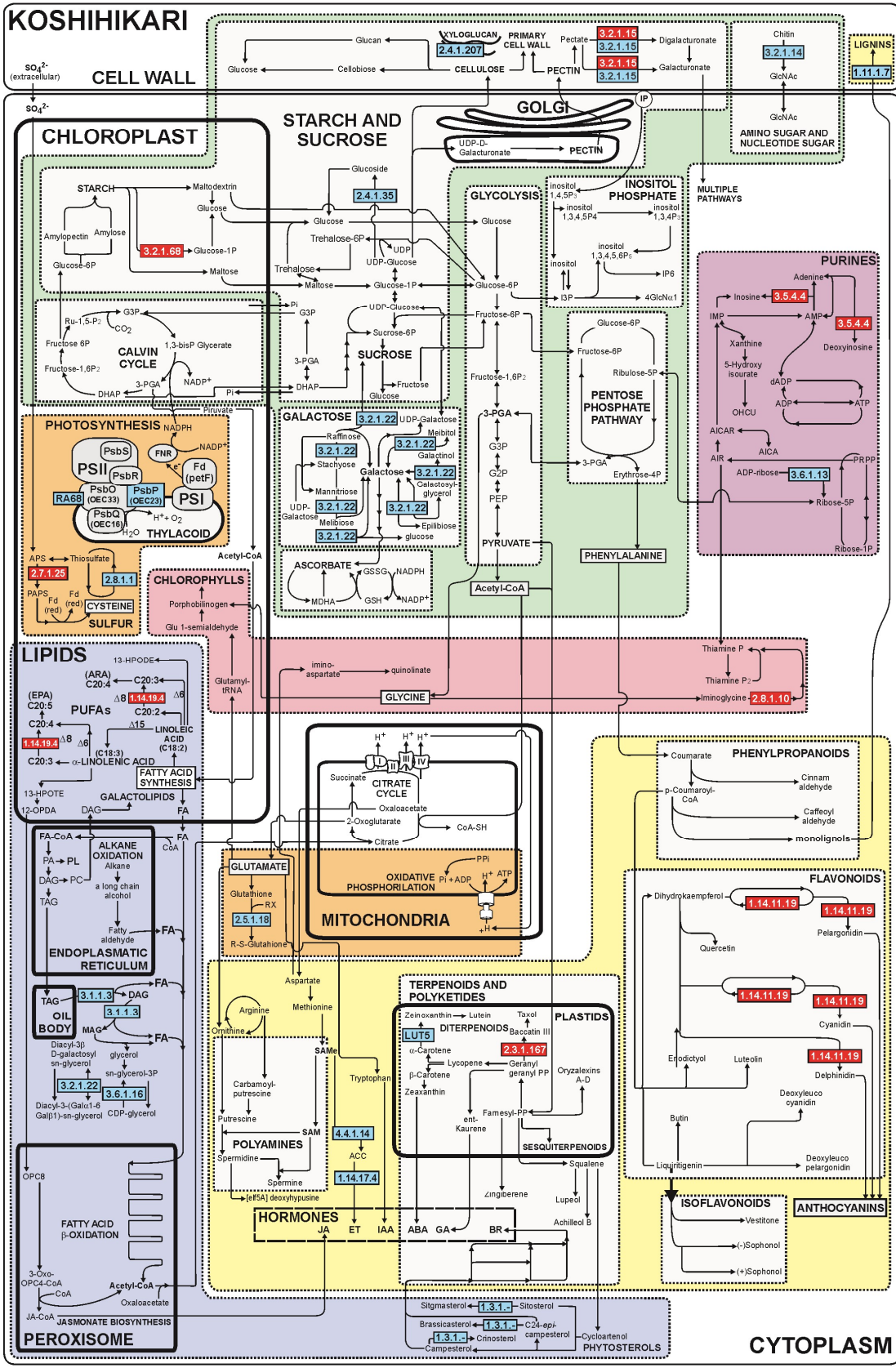


Figura 3-1. Distribución esquemática de DEGs en subvías de las vías de KEGG del Metabolismo en Koshihikari.

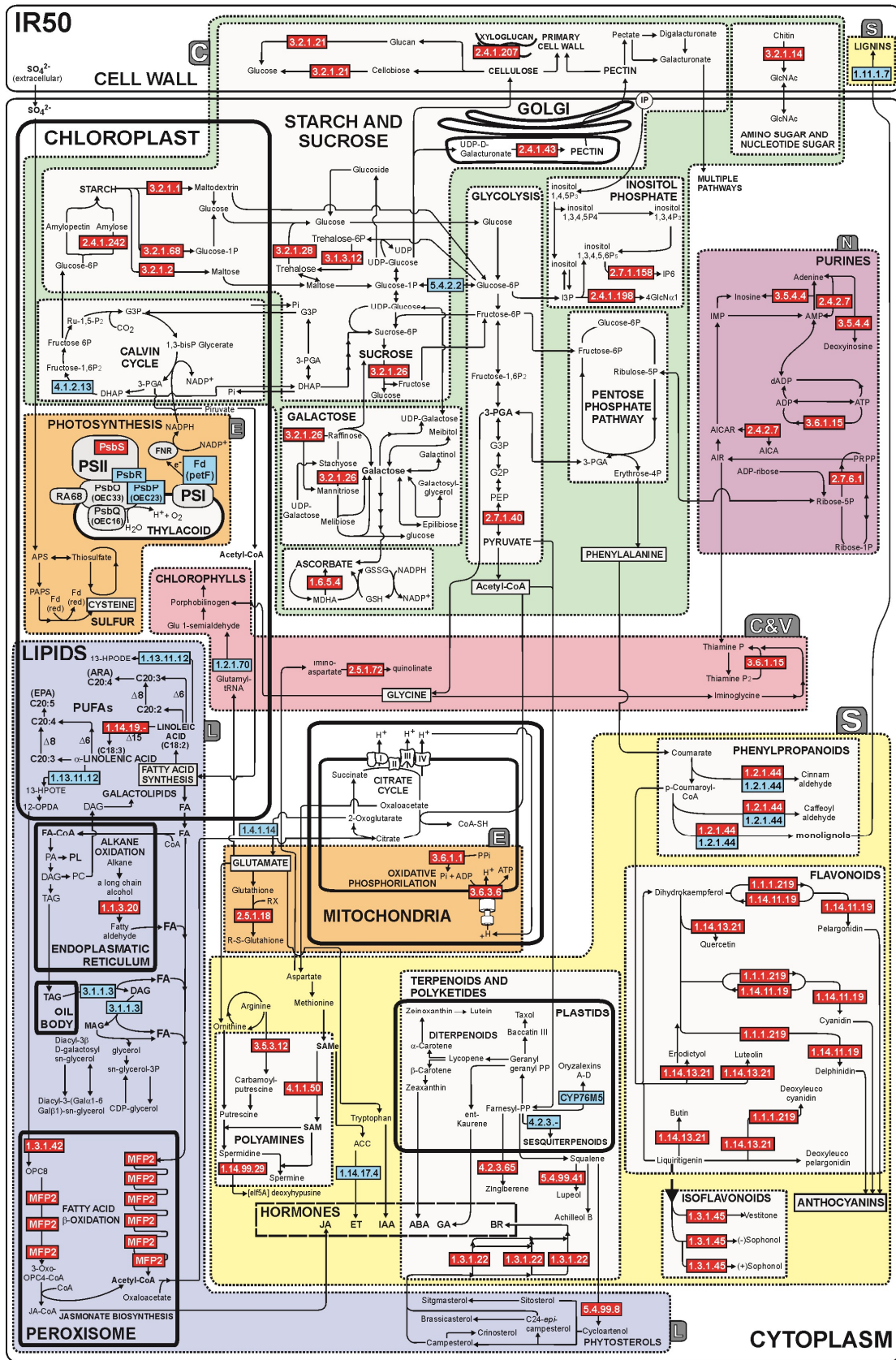


Figura 3-2. Distribución esquemática de DEGs en subvías de las vías de KEGG del Metabolismo en IR50.

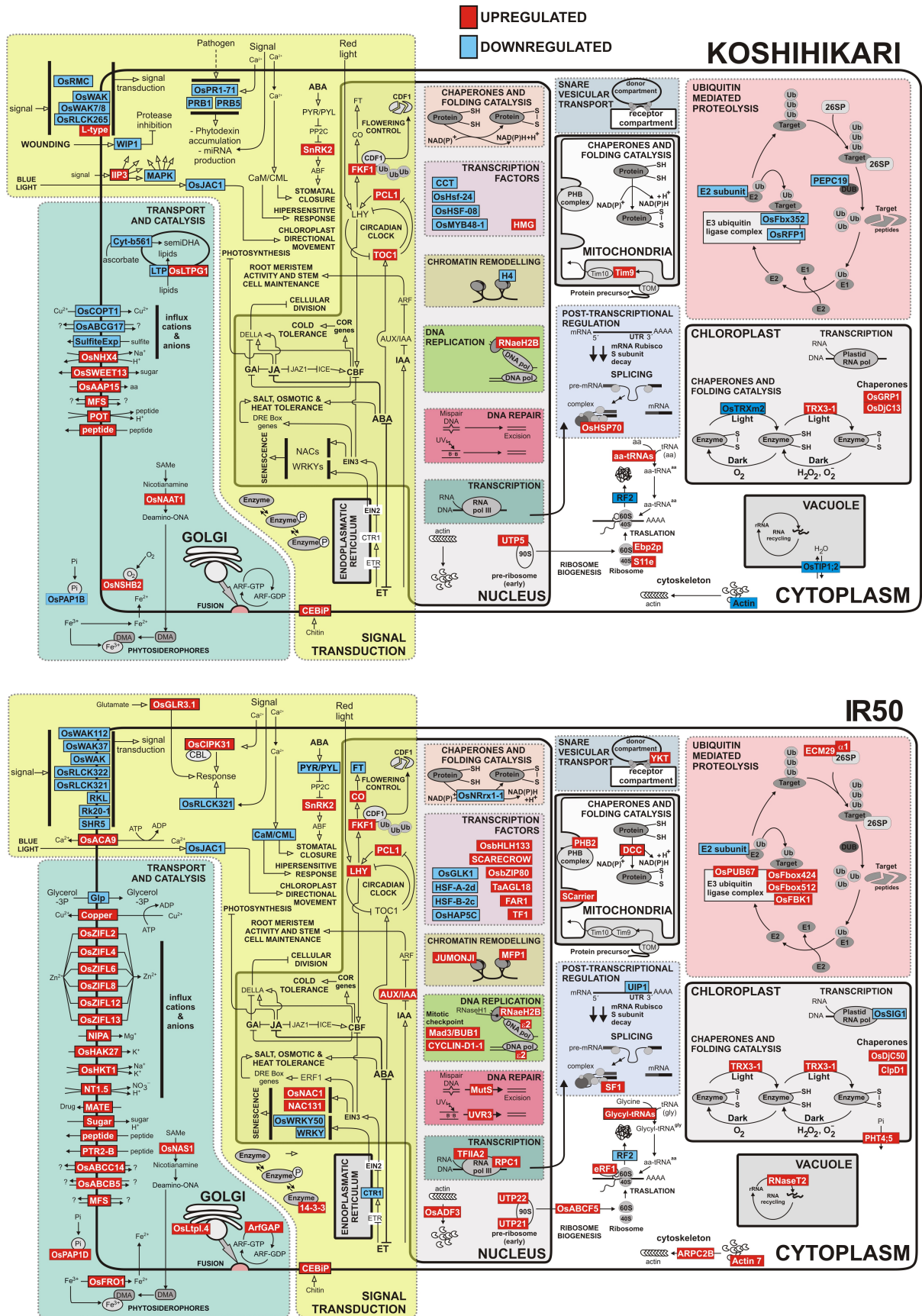


Figura 3-4. Distribución esquemática de los DEGs en subvías de las vías KEGG: Procesamiento de la información genética. *Procesamiento de la información ambiental.*

*Procesos celulares y adaptación ambiental.* Una parte de las subvías de cada vía KEGG se organizó en dos grandes grupos delimitados por líneas discontinuas: Transporte y catálisis, y traducción de señales. Las otras subvías, también delimitadas por líneas discontinuas, se localizaron en diferentes organelas y compartimientos celulares .

### **3.5 CONCLUSIONES**

Nuestros resultados proveen evidencias de que ambos cultivares presentaron respuestas contrastantes tempranas a nivel transcripcional. El metabolismo de carbohidratos estuvo muy regulado. Ambos cultivares sobrerregularon la degradación de almidón en respuesta a ST. Además, IR50 sobrerreguló DEGs relacionados con el catabolismo de sacáridos probablemente como una estrategia para obtener energía extra para contrarrestar el desbalance energético resultante del daño del PSII evidenciado a nivel transcripcional y de esa manera mitigar el efecto del estrés por ST. Además, la sobrerregulación de la vía de la  $\beta$ -oxidación peroximal podría constituir otra estrategia para obtener energía y mantener la homeostasis celular de IR50. Koshihikari sobrerreguló una  $\alpha$ -galactosidasa relacionada con la acumulación de rafinosa descrita en la literatura por otorgar tolerancia a frío. Una transformación de la pared celular también se sugirió en ambos cultivares desde el análisis transcripcional. Finalmente, diferencias en tolerancia a la condición ST entre los cultivares pueden ser asignadas en parte a variación en la comunicación entre los genes de las vías del ritmo circadiano, y de las cascadas de señalización de ET, ABA y  $Ca^{2+}$ .

***CAPÍTULO 4: Análisis proteómico de la respuesta a temperaturas subóptimas en cultivares de arroz con sensibilidad contrastante***



## 4.1 INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales alteran varios procesos fisiológicos que están directamente controlados por los genes y llevados a cabo por cambios a nivel del proteoma (Kosová et al., 2011; Hakeem et al., 2012; Barkla et al., 2013). Por lo tanto, comparar cambios en el proteoma de genotipos con respuestas contrastantes a un estrés puede llevar a la identificación de genes y sus proteínas subyacentes a las diferencias observadas entre los cultivares tolerantes y sensible. El arroz tiene sus ventajas por sobre otros cultivos en cuanto a los análisis transcripcionales y proteómicos dado que su genoma completo ha sido secuenciado y están disponibles bases de datos de secuencias de proteínas (Kosová et al., 2011; Singh and Jwa, 2013). A pesar de que análisis proteómicos han sido llevados a cabo en plántulas de arroz sometidas a estrés por frío, estos han sido mayormente enfocados en temperaturas de *chilling* o en la respuesta de la raíz (Yan et al., 2006; Hashimoto and Komatsu, 2007; Komatsu et al., 2009; Lee et al., 2009; Chen et al., 2012; Neilson et al., 2013). Sin embargo, tres estudios analizaron la composición del proteoma de la hoja de arroz en el estadio de plántula sometidas a períodos cortos de temperaturas subóptimas similares a las que nos enfocamos en este trabajo (Cui et al., 2005; Gammulla et al., 2011; Neilson et al., 2011).

En el capítulo 2 mostramos que el estrés por ST inhibe fuertemente el crecimiento foliar por la disminución de la velocidad de elongación de la hoja. A nivel celular, la división y expansión en las zonas de crecimiento de la hoja determinó el crecimiento de la hoja bajo condiciones ST. Además, el efecto del ST en los parámetros de crecimiento fue diferente entre los cultivares contrastantes en sensibilidad al estrés siendo más agresivo sobre los cultivares sensibles. En consecuencia, aquí decidimos tomar muestras por posición, y no del órgano completo, para poder identificar cambios específicos relacionados con la inhibición de la división y expansión celular. Análogamente a los análisis previos de crecimiento (capítulo 2) y del transcriptome (capítulo 3), las plántulas de arroz se sometieron a temperaturas control (24/28 °C, día/noche, tratamiento OT) y a temperaturas subóptimas de crecimiento (13/21 °C, día/noche, tratamiento ST) y se tomaron muestras del meristema y de la zona de elongación de la cuarta hoja durante su estado estacionario de crecimiento. Otros estudios proteómicos han mostrado que tomar las muestras basándose en la posición de la hoja ha sido exitoso en el estudio de hojas de maíz (Majeran et al., 2010; Facette et al., 2013; Ponnala et al., 2014) y raíces (Marcon et al., 2015), y también en el estudio de la respuesta al estrés por sequía (Avramova, 2016). A nuestro conocimiento, este es el primer intento de utilizar la proteómica para capturar



gradientes proteómicos asociados con la transición de los desarrollos celulares de proliferación a expansión relacionados con la respuesta a ST y la sensibilidad del arroz.

## **4.2 OBJETIVO**

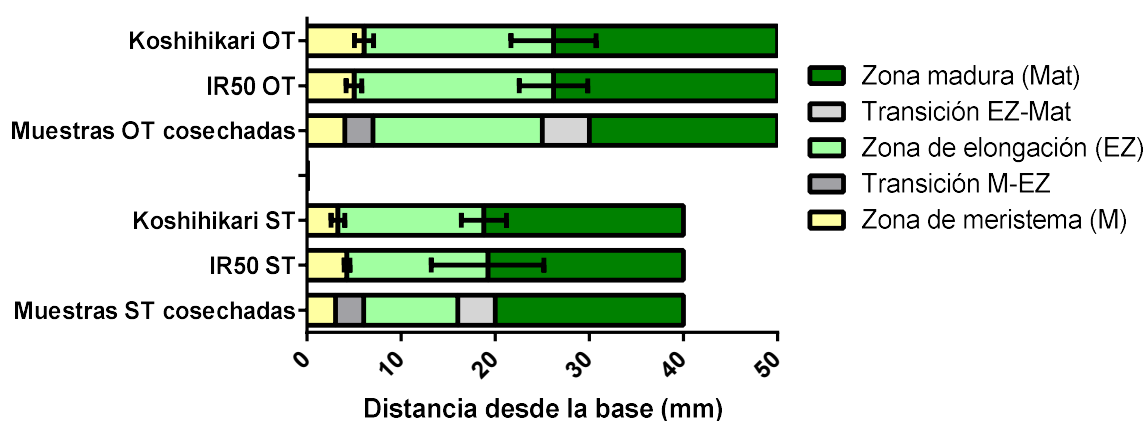
Aquí analizamos la regulación de dos cultivares contrastantes en su respuesta a ST a nivel proteómico para complementar los capítulos anteriores de esta tesis en los cuales analizamos las respuesta fisiológicas y transcripcionales. Además, la toma de muestras se realizó por posición y no con el órgano entero para ver si las diferencias en el proteoma podían identificarse asociaciones con la división y expansión celular a lo largo de la zona de crecimiento de la hoja de arroz en respuesta a ST, y si pueden asociarse con diferencias en sensibilidad.

## **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.3.1 Material de plantas y condiciones de crecimiento**

Los cultivares de arroz Koshihikari e IR50 fueron amablemente proporcionados por el Programa de Mejoramiento de Arroz de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Semillas de estos cultivares fueron colocadas en placas de Petri sobre dos capas de papel de filtro Whatman N° 5 con 7 mL de carbendazim 0.025 %p/v (Yoshida, 1981) e incubadas en cámara de crecimiento a 30 °C en oscuridad hasta germinación. Las plántulas resultantes fueron trasplantadas a macetas con turba (Jiffy, The Netherlands; volumen de los potes: 1.6 l, dimensiones: 13 cm alto y 5" de diámetro) y saturadas con agua. Las plántulas fueron luego crecidas en cámaras de crecimiento (Conviron, Adaptis A1000) bajo condiciones controladas con 12 h fotoperiodo, 80% humedad y 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Las temperaturas día/noche para el tratamiento de temperaturas óptimas de crecimiento (OT) fueron 28/24 °C (d/n). Cuando emergió la tercer hoja (Yoshida, 1981), las temperaturas fueron modificadas para realizar el tratamiento de temperaturas subóptimas de crecimiento (ST) a 21/13 °C (d/n). Dos días luego de la emergencia de la cuarta hoja, 10 plantas elegidas al azar de cada cultivar y tratamiento fueron cosechadas y la zona de crecimiento de la cuarta hoja de cada planta fue cortada en cinco segmentos como se describe a continuación de acuerdo con los resultados del capítulo 2: desde la base de la hoja 4 mm (meristema), 3 mm (transición entre el meristema y la zona de elongación), 18 mm (zona de elongación), 5 mm (transición entre la zona de elongación y la madura), y 20 mm (zona madura)

fueron consecutivamente cortados de las plantas bajo condiciones OT; desde la base de la hoja 3 mm (meristema), 3 mm (transición entre el meristema y la zona de elongación), 10 mm (zona de elongación), 4 mm (transición entre la zona de elongación y la madura), y 20 mm (zona madura) fueron consecutivamente cortados de las plantas bajo condiciones ST (Figura 4-1). Las muestras fueron guardadas a -80 °C para luego hacer las extracciones de las proteínas. Sólo el meristema (M) y la zona de elongación (EZ) fueron utilizados para este análisis, las zonas de transición y la zona madura (Mat) fueron descartadas. Las plantas restantes (10) fueron usadas para determinar el largo final de la hoja hasta alcanzar la madurez.



**Figura 4-1.** Largo de las zonas de desarrollo de Koshihikari e IR50 en temperaturas óptimas y subóptimas. El largo de cada zona de desarrollo (meristema, elongación, maduración) y las zonas de transición (transición M-EZ, transición E-Mat) está marcado para cada condición (OT para temperaturas óptimas, ST para temperaturas subóptimas) y cada cultivar (Koshihikari, IR50). Las muestras cosechadas en OT y ST muestran cómo se realizaron las muestras para el análisis proteómico para cada combinación temperatura/genotipo. Los datos son promedios  $\pm$  DE (n=5).

#### 4.3.2 Extracción y digestión de proteínas

Tres grupos de muestras marcadas con etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) fueron preparadas para este estudio. Cada uno de los grupos contenía 8 muestras biológicas de 10 secciones de hojas, marcadas con un kit iTRAQ 8-plex. Los extractos de proteínas fueron preparados de acuerdo a Méchin et al. (2007) con modificaciones. Las muestras fueron molidas en nitrógeno líquido y se adhirieron 10 volúmenes de 0.07% 2- $\beta$ -mercapto-etanol y 10% ácido tricloroacético en acetona fría. Luego de una incubación durante toda la noche a -20 °C, las muestras fueron centrifugadas durante 30 min a 4 °C y 10,000 g y se realizaron dos lavados consecutivos de acetona. Los precipitados de proteínas fueron diluidos en 0.5 M

bicarbonato de trimetilamonio (TEAB). Las concentraciones de proteínas fueron determinadas con el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific. Belgium) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific. Belgium). Para cada muestra, un total de 100 µg de proteínas fueron desnaturalizadas y reducidas con los reactivos suministrados con el kit de etiquetado iTRAQ (AB Sciex), en un volumen de 20 µl de 100 nM TEAB e incubadas a 60 °C por 1 h. Luego del bloqueo de las cisteínas por medio del tratamiento con Cysteine Blocking Reagent del mismo kit por 10 min en oscuridad, 6 volúmenes de acetona fría fueron adicionados y las muestras fueron incubadas durante toda la noche a -20 °C. Luego de centrifugar, las proteínas fueron disueltas en 20 µl de 100 nM TEAB y digeridas con la enzima MS-grade Trypsin Gold (relación enzima:proteína = 1:10; Promega) durante toda la noche a 37 °C de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al día siguiente las muestras fueron desalinizadas con una columna Pierce C18 Spin Columns de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific) antes de llevar a cabo el etiquetado de las proteínas.

#### **4.3.3 Etiquetado iTRAQ de las proteínas**

Se utilizaron los reactivos iTRAQ Reagents-8plex kit (AB Sciex) para el etiquetado de las muestras. Para la reconstitución de las etiquetas iTRAQ, las mismas fueron disueltas en 50 µl de isopropanol de acuerdo con el protocolo del fabricante. Luego los péptidos digeridos fueron etiquetados con los reactivos iTRAQ e incubados por 2 h a temperatura ambiente. Se preparó cada grupo de muestras (*pool*) a partir de las muestras individuales etiquetadas (Tabla 4-1) con una proporción equimolar de concentración de péptidos para todas las muestras.

**Tabla 4-1.** Diseño experimental del análisis proteómico de iTRAQ de los cultivares de arroz Koshihikari e IR50. Un total de tres grupos (*pool*) de muestras fueron utilizados para el análisis de espectrometría de masas. Cada *pool* contenía ocho muestras (cada una sucesivamente provenía de 10 plantas) que fueron marcadas de acuerdo con las etiquetas contrastantes 8-plex iTRAQ. *M*, meristema. *EZ*, zona de elongación. *OT*, tratamiento de temperaturas óptimas. *ST*, tratamiento de temperaturas subóptimas.

Etiqueta iTRAQ	Pool 1	Pool 2	Pool 3
113	IR50 M OT	IR50 EZ OT	IR50 M OT
114	IR50 M OT	IR50 EZ OT	IR50 M ST
115	IR50 M ST	IR50 EZ ST	Koshihikari M OT
116	IR50 M ST	IR50 EZ ST	Koshihikari M ST
117	Koshihikari M OT	Koshihikari EZ OT	IR50 EZ OT
118	Koshihikari M OT	Koshihikari EZ OT	IR50 EZ ST
119	Koshihikari M ST	Koshihikari EZ ST	Koshihikari EZ OT
121	Koshihikari M ST	Koshihikari EZ ST	Koshihikari EZ ST

#### 4.3.4 Cromatografía líquida en fase nano-reversa y espectrometría de masas

Para reducir la complejidad general de las muestras marcadas con iTRAQ, se realizó una cromatografía en fase reversa en un sistema Easy-nLCsystem (Thermo Scientific). Se utiliza una columna RP-C18 PepMap 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75x20 mm y una columna analítica RP-C18 PepMap 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 50x150 mm. Se disolvió 1  $\mu\text{g}$  de péptido marcado con iTRAQ en 10  $\mu\text{l}$  de fase móvil A, conteniendo 2% acetonitrilo y 0.1% ácido fórmico, se cargó. Se utilizó un gradiente lineal de la fase móvil B (98% acetonitrilo y 0.1% ácido fórmico) en la fase móvil A desde 2 a 40% en 300 min con una velocidad de flujo de 400  $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se acopló en línea el nano-LC con el espectrómetro de masas Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific). El equipo se seteo en modo MS/MS donde se realizó un espectro completo (350 – 2000  $m/z$ ). Se seleccionaron iones peptídicos para mayor análisis por MS en tándem de los cinco picos más intenso para un escaneo completo del espectro de masas. La fragmentación se seteo en un escaneo High Energy Collision Activated Dissociation (HCD) en el Orbitrap.

#### 4.3.5 Análisis de datos del proteoma

Se utilizó el software Proteome Discoverer 1.3.0.339 (Thermo Scientific) para realizar la búsqueda en bases de datos contra las bases de datos *Uniprot Oryza sativa subsp. Indica* (39946) y *Uniprot Oryza sativa subsp. Japonica* (39947) usando los algoritmos SEQUEST y Mascot (Matrix Science) con los siguientes ajustes: rango de espectro de masas de 300 – 8000 Da, tolerancia de las masas precursoras de 10 ppm,

y tolerancia de fragmento de masas de 0.01 Da. Se especificó la tripsina como enzima digestora y se permitieron 2 escisiones incorrectas. iTRAQ 8-plex (N-terminal y residuos de lisina) y metiltionina (C) se definieron como modificaciones fijas, y la oxidación de metionina y tirosina iTRAQ 8-plex como modificaciones variables. Los resultados se filtraron por parejas péptido-a-espectro confiables (PSMs) basado en una base de datos señuelo no-concatenada. La base de datos señuelo es una versión reversa de la base de datos blanco. Sólo los péptidos clasificados con un FDR global menor al 1% se incluyeron en los resultados. Todas las secuencias e intensidades de los iones reporteros del PSMs que coincidieron con los requerimientos de confianza fueron exportados en una hoja de cálculo de valores separados por comas para su posterior análisis de datos (Datos Suplementarios 2). Los datos de los tres *pools* de iTRAQ fueron normalizados en conjunto usando el método CONSTANd (Maes et al., 2016) para que los péptidos pudiesen ser comparados dentro y entre los experimentos multimuestra sin la necesidad de utilizar una muestra de referencia dentro de cada uno de ellos. Para el análisis estadístico y bioinformático además de visualización se utilizó el software de código abierto Perseus 1.5.5.3 (Tyanova et al., 2016). Todos los péptidos listados con múltiples entradas fueron removidos y sólo secuencias de péptidos pertenecientes a un único identificador de proteína fueron retenidos para su posterior análisis. Las abundancias relativas de los péptidos se transformaron con  $\log_2$  y los valores faltantes fueron reemplazados a partir de una distribución normal con la configuración por defecto, ancho de 0.3 y cambio hacia abajo de 1.8. Los datos de IR50 fueron analizados basándose en la base de datos *Uniprot Oryza sativa subsp. Indica* (39946), y los de Koshihikari en *Uniprot Oryza sativa subsp. Japonica* (39947). Todos los péptidos que pertenecían a una misma proteína fueron promediados y se realizó un análisis ANOVA de dos vías en cada cultivar utilizando como factores *tratamiento* y *zonas* con la función integrada ANOVA del Perseus, se aplicó FDR para corrección por multitesteo.

Para la descripción general de los proteomas, las proteínas resultantes significativas en cada factor y en la interacción con un valor- $p < 0.05$  sin corregir fueron normalizadas por Z-score y se armaron clústeres utilizando las distancias Euclidianas, vinculación promedio, preprocesamiento con agrupación K, número de clústeres de 300, número máximo de iteraciones en 10, y número de reinicios en 1 utilizando Perseus. Un análisis de enriquecimiento fue realizado en cada clúster utilizando Perseus y los archivos de anotaciones de Perseus descargados del repositorio <http://annotations.perseus-framework.org/>. Para el análisis del proteoma de Koshihikari se utilizó el archive de anotaciones para cultivares de tipo japónica, y para IR50 el de

cultivares tipo indica (actualizados al 20/06/2015). Se preparó manualmente un archive extra de anotaciones con información de las anotaciones de KEGG y MapMan BIN, con este propósito las secuencias de proteínas de las proteínas significativas fueron descargadas de la herramienta GrameneMart de la base de datos de Gramane utilizando IRGSP (para el caso de Koshihikari) o BGI (para el caso de IR50) o, en el caso de que las asignaciones IRGSP/BGI faltasen, se utilizó Uniprot. La asignación de ortologías KEGG (Tanabe and Kanehisa, 2012) se realizó utilizando la aplicación web KAAS (Moriya et al., 2007), la búsqueda de las secuencias de proteínas se hizo contra la base de datos de KEGG de *Oryza sativa* japonica (no existe actualmente base de datos específica para cultivares indica) usando el algoritmo de mejor hit bidireccional BBH. Lo MapMan BINs (Thimm et al., 2004) fueron asignados utilizando la aplicación web Mercator (Lohse et al., 2014) y se buscó en las bases de datos de proteínas de Arabidopsis TAIR (versión 10), proteínas de plantas de Swiss Prot/UniProt, proteínas de arroz de TIGR5, Cluster de genes ortólogos eucariotas, y Conserve Domain, el punto de corte para el blast se estableció en 80, y se permitieron asignaciones de bin múltiples. En el caso de las proteínas que cambiaron su abundancia en respuesta al estrés en cada zona, se realizó un estudio de enriquecimiento utilizando PageMan (Usadel et al., 2009) con el test Wilcoxon .

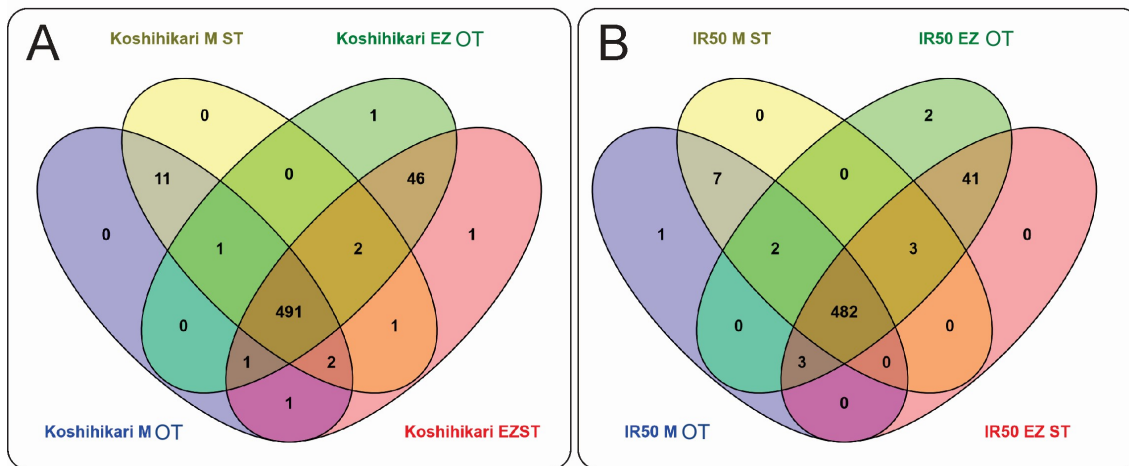
Para descripciones en más detalle, aquellas proteínas con  $FDR < 0.10$  fueron analizadas utilizando información de los términos de las bases de datos listadas arriba y dos búsquedas extra fueron realizadas: se utilizó la herramienta web de búsqueda dominios conservados Batch web Conserved Domain del sitio web de NCBI (Marchler-Bauer et al., 2011) para buscar las secuencias de proteínas obtenidas de GrameneMart y obtener los dominios conservados de las proteínas, se estableció el valor de corte del valor-E en 0.01, se permitió la corrección del puntaje por composición, no se aplicó filtro de baja complejidad, se estableció el número máximo de hits en 500 y se buscó contra la base de datos CDD 48963 PSSMs (v 3.15); la aplicación web TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson et al., 2007) se utilizó para asignar la localización subcelular de las secuencias proteicas, no se utilizó valor de corte.

## **4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.4.1 Perfil de los proteomas**

Se utilizó el etiquetado de proteínas por 8-plex iTRAQ para comparar el proteoma de cultivares (IR50 y Koshihikari), tratamientos (OT y ST), y zonas (meristema y

elongación). Con el fin de obtener una identificación más precisa de las proteínas, los péptidos de cada cultivar fueron analizados de acuerdo a su base de datos específica, *i.e.*, el proteoma de Koshihikari se analizó con la base de datos de Uniprot para cultivares japónica y el proteoma de IR50 se analizó con la base de datos de Uniprot para cultivares indica. Luego de la normalización, se identificaron 1909 y 1874 péptidos únicos cuando se usaron las bases de datos de Uniprot para japónica e indica, respectivamente (Datos Suplementarios 3). Los péptidos que fueron asociados a múltiples entradas (94 en cada base de datos) fueron removidos y solo secuencias peptídicas correspondientes a un único identificador de proteínas se mantuvieron para su posterior análisis estadístico con el motivo de incrementar la confianza en la cuantificación. Algunas secuencias peptídicas no tuvieron entrada en la base de datos y por lo tanto fueron ignorados (200 en la base de datos de japónica, y 303 en la de indica). Los valores faltantes fueron imputados a partir de una distribución Gaussiana con cambio hacia debajo de 1.8 y ancho de 0.3 al nivel de péptido (Figuras Suplementarias 8 y 9; Lazar et al., 2016; Tyanova et al., 2016). Los péptidos obtenidos luego del filtro y la imputación generaron un máximo número de 558 (Tabla Suplementaria 7) y 541 (Tabla Suplementaria 8) proteínas identificadas en las bases de datos de japónica e indica, respectivamente. A pesar de que la mayoría de las proteínas se compartieron entre las zonas y tratamientos en ambos cultivares (Figura 4-2), muchas de ellas estuvieron exclusivamente presentes en el meristema (11 y 8 para Koshihikari e IR50, respectivamente) o en la zona de elongación de cada cultivar (48 y 13 para Koshihikari e IR50, respectivamente). Así, las diferencias entre las zonas pueden atribuirse parcialmente a proteínas ausentes en el meristema y presentes en la zona de elongación, y viceversa. Además, Koshihikari tuvo pocas proteínas que estuvieron exclusivamente presentes en la condición ST (Figura 4-2 A) mientras que IR50 mostró una exclusiva en la condición OT (Figura 4-2 B). Entonces, las diferencias entre los tratamientos pueden subyacer en la abundancia de las proteínas más que en la ausencia/presencia.



**Figura 4-2.** Diagramas de Venn de todas las proteínas detectadas en el análisis. “Presente” es definido para aquella proteína que fue detectada al menos una vez en una réplica. La etiqueta de cada muestra está marcada como sigue: nombre del cultivar (Koshihikari o IR50), zonas (M: meristema; EZ: zona de elongación), tratamientos (OT: temperaturas óptimas; ST: temperaturas subóptimas). **A)** proteomas de Koshihikari. **B)** proteomas de IR50.

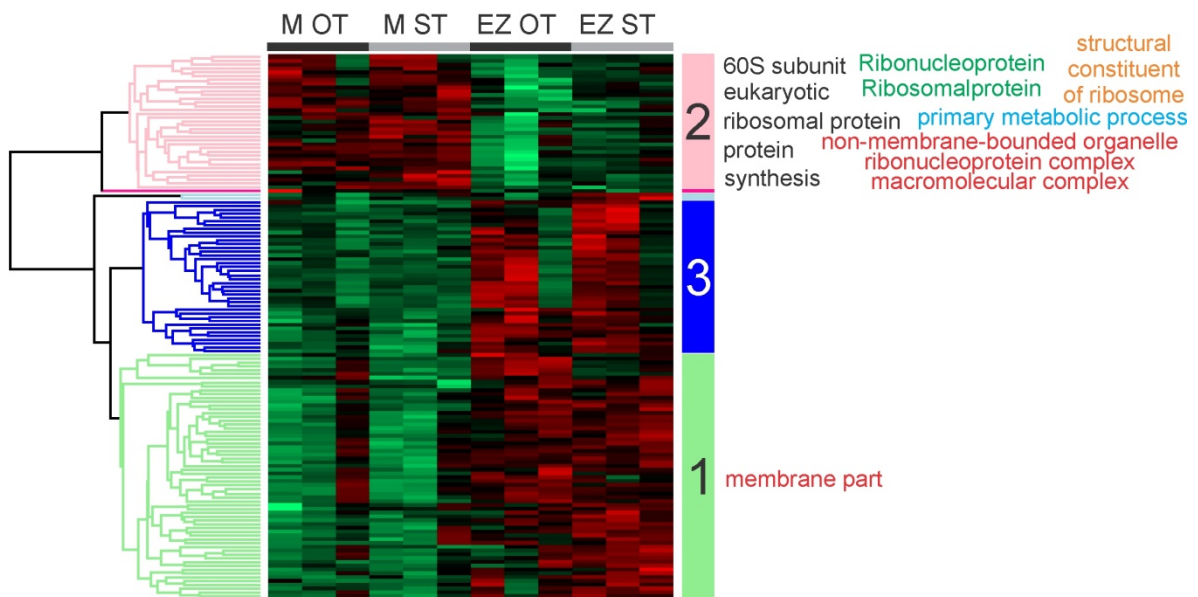
Un análisis ANOVA de dos vías fue realizado para cada cultivar utilizando como factores los tratamientos (OT y ST) y las zonas (meristema y elongación; Tabla Suplementaria 7 y Tabla Suplementaria 8). Cuando se aplicó la corrección FDR a los valores-*P* del ANOVA y se realizó un *post-hoc* test LSD Fisher a las proteínas que mostraron interacción entre los factores, un número pequeño de proteínas cambió su abundancia en respuesta al estrés. Cuando se usó un valor de corte menos restrictivo de  $FDR < 0.10$ , 11 proteínas cambiaron su abundancia en la hoja de Koshihikari (Tabla Suplementaria 9), 7 proteínas incrementaron su abundancia en ambas zonas en respuesta al estrés, 3 estuvieron reprimidas, y una incrementó su abundancia únicamente en la zona de elongación. En el caso de IR50 (Tabla Suplementaria 9) 8 abundancias de proteínas cambiaron significativamente: 6 se sobrerregularon en ambas zonas en respuesta al estrés, y 2 se reprimieron. Para caracterizar los patrones globales de expresión de las proteínas utilizando una sobrerrepresentación de las funciones, una restricción de selección más baja se aplicó al ANOVA de dos vías con lo cual se tomaron en cuenta aquellas proteínas con un valor- $p < 0.05$  para el análisis. El análisis del proteoma de Koshihikari resultó en 46 proteínas que cambiaron su abundancia en respuesta al estrés, 142 a lo largo de las zonas de crecimiento, y 50 que mostraron interacción de los factores. IR50 mostró 47 proteínas que cambiaron su abundancia en respuesta a ST, 198 a lo largo de las zonas, y 21 que interaccionaron. Es de destacar que el efecto sobre las zonas fue mayor que el efecto sobre el tratamiento en ambos cultivares.



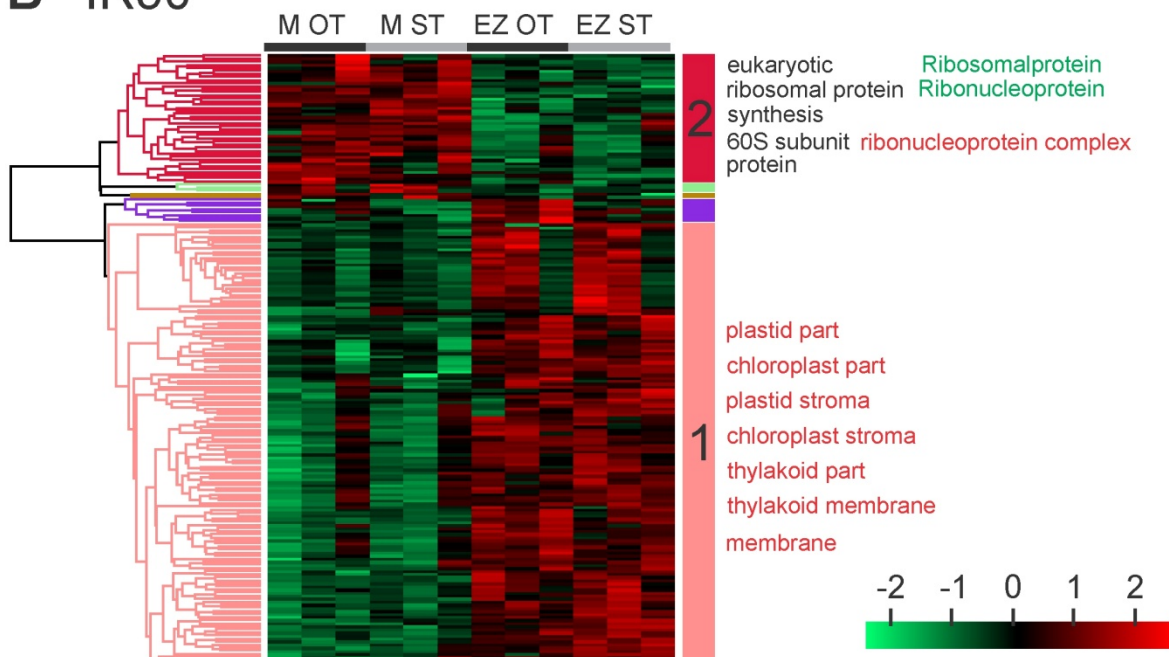
#### **4.4.1.1 El efecto de la zona**

Para identificar las proteínas enriquecidas en cada zona, realizamos un clustering jerárquico y un análisis de enriquecimiento de función de las proteínas cuyo valor-*p* no corregido fue  $<0.05$  para el factor *zonas* de cada cultivar (Figura 4-3). Las proteínas de Koshihikari se organizaron en 5 clústeres formando perfiles diferentes (Figura 4-3 A). El primer clúster agrupó 64 proteínas sobrerreguladas en la zona de elongación que estaban relacionadas con partes de membrana. El segundo clúster mostró 35 proteínas más abundantes en el meristema que representaban mayormente términos de ribonucleoproteínas. Las proteínas de IR50 también se clasificaron en 5 perfiles diferentes (Figura 4-3 B). El primer clúster con 143 proteínas sobrerreguladas en la zona de elongación estaba significativamente enriquecido en términos relacionados con el cloroplasto y sus componentes. Un segundo clúster agrupó 42 proteínas más abundantes en el meristema relacionadas con ribonucleoproteínas. El resto de los clústeres no mostró términos enriquecidos. Así, ambos cultivares mostraron términos enriquecidos relacionados con ribonucleoproteínas en el meristema, lo cual es consistente con las células de esta zona que están experimentando división activa. La zona de elongación estuvo más relacionada con membranas y partes de cloroplasto, relacionado con la expansión celular y la diferenciación que ocurre en esta zona. Estos resultados validan parcialmente nuestro análisis dado que las proteínas pudieron distinguir entre zonas y acuerdan con análisis proteómicos previos realizados en la zona de crecimiento de las hojas de maíz (Majeran et al., 2010; Facette et al., 2013; Ponnala et al., 2014).

## A Koshihikari



## B IR50



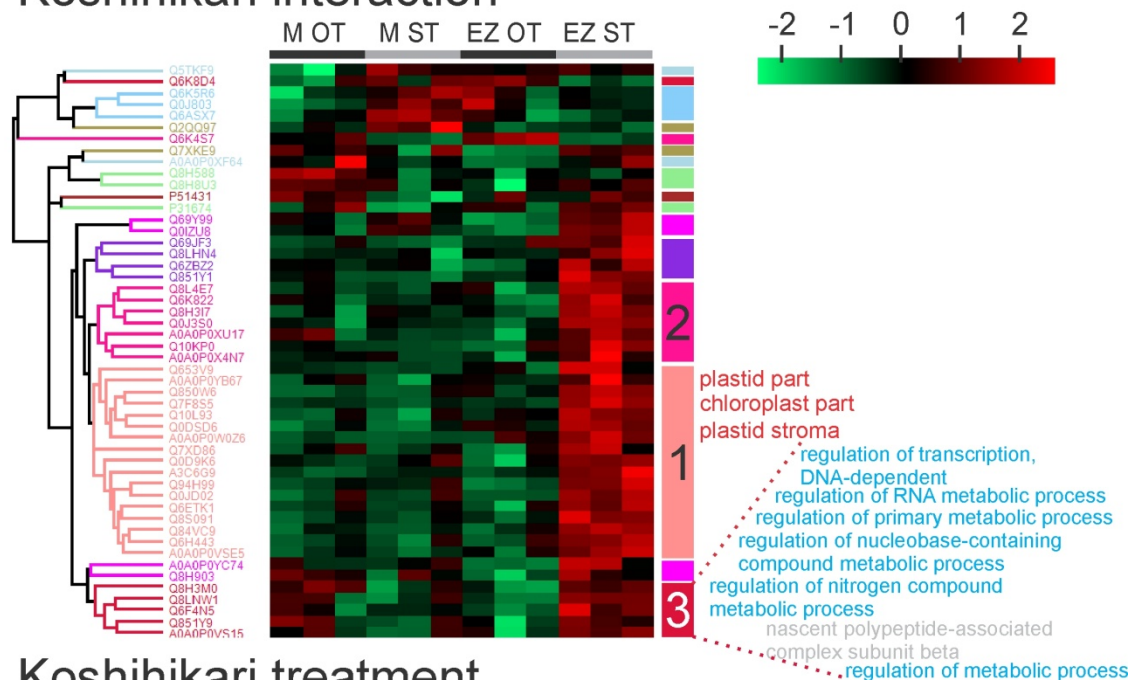
**Figura 4-3.** Mapa de calor y clustering jerárquico de las proteínas significativas de acuerdo al efecto de las *zonas* del ANOVA de dos vías (valores-*p* sin corregir <0.05) entre el meristema (M) y la zona de elongación (EZ) de cada cultivar. Las muestras están etiquetadas en la parte superior representando las zonas (M: meristema; EZ: zona de elongación) y tratamientos (OT: temperaturas óptimas; ST: temperaturas subóptimas). Cada nombre de muestra representa tres muestras biológicas. La escala de color en la parte inferior de la figura representa la abundancia de las proteínas luego de la normalización por Z-score a lo largo de las filas del mapa de calor. Los clústeres más grandes están numerados y sus términos enriquecidos están escritos a la derecha, cada color representa una categoría de términos diferente: GO Biological

Processes (proceso biológicos de GO) en celeste, GO Molecular Function (funciones moleculares de GO) en naranja, GO Cellular Component (componentes celulares de GO) en rojo, MapManBIN en negro, y palabras claves de Uniprot en verde. El enriquecimiento fue realizado con el software Perseus, FDR<0.15. **A)** Cluster jerárquico de las proteínas de Koshihikari, umbral de distancia de 3.43. **B)** Cluster jerárquico de las proteínas de IR50, umbral de distancia de 3.58.

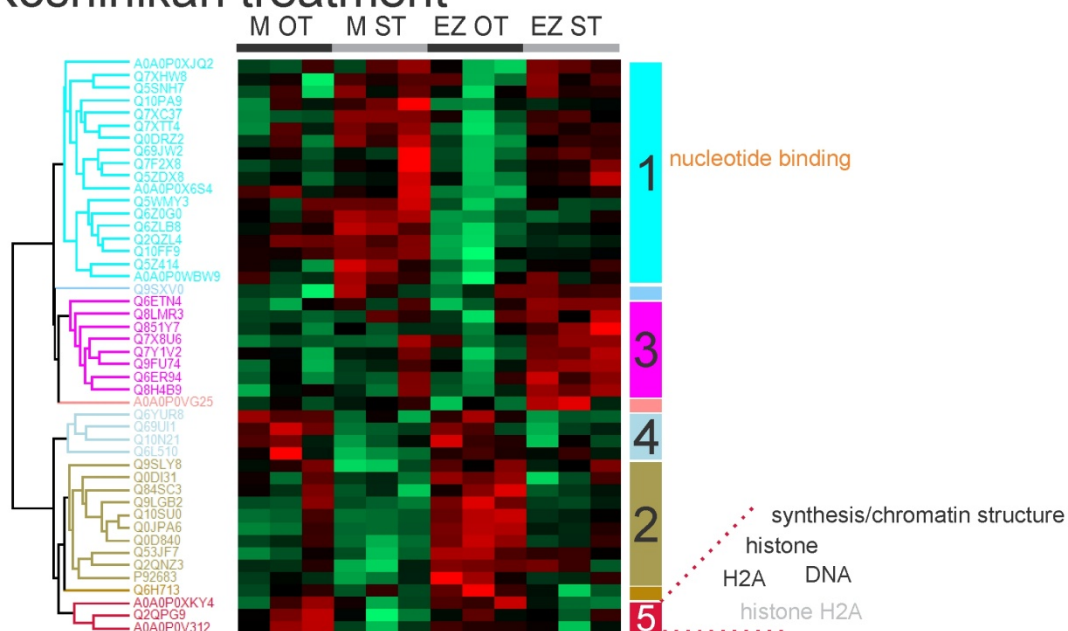
#### **4.4.1.2 El efecto del tratamiento**

Realizamos un clúster jerárquico para proteínas con valores-*p* sin corregir <0.05 en respuesta al factor *tratamientos* o la interacción *tratamientos\*zonas* para cada cultivar (Figuras 4-4 y 4-5). Para poder identificar los procesos más importantes representados en los perfiles de proteínas en los diferentes clústeres, se realizó un análisis de enriquecimiento de proteínas. Koshihikari mostró 16 clústeres de proteínas que interactuaron (Figura 4-4 A). El clúster 1 agrupó 17 proteínas que fueron exclusivamente sobrerreguladas en la zona de elongación en respuesta a ST y se vieron sobrerrepresentadas en partes de cloroplasto (partes plastídicas, partes cloroplásticas, y estroma plastídico). El clúster 3 agrupó 5 proteínas que se vieron subreguladas en el meristema y sobrerreguladas en la zona de elongación en respuesta al estrés y estaban relacionadas con la regulación transcripcional y los procesos del metabolismo primario. El resto de los clústeres no mostraron términos enriquecidos. Cuando se analizaron proteínas que respondían de igual manera en el meristema y en la zona de elongación al ST, se encontraron 8 clústeres diferentes (Figura 4-4 B). El clúster más grande agrupó 18 proteínas que estaban sobrerreguladas en respuesta al estrés y representaban proteínas de unión a nucleótidos. El clúster 5 agrupó 3 proteínas subreguladas en respuesta a ST en ambas zonas que se caracterizaron por histonas, proteínas relacionadas con la síntesis y estructura de la cromatina y con el DNA. El resto de los clústeres no mostró términos enriquecidos. En el caso de IR50, la interacción mostró 6 clústeres con perfiles diferentes (Figura 4-5 A). Únicamente el clúster mayor que contenía 7 proteínas sobrerreguladas en la zona de elongación en condiciones OT mostró términos enriquecidos. Proteínas de unión a iones y del metabolismo primario estaban sobrerrepresentadas en este clúster. El análisis realizado para proteínas que mostraron el mismo perfil para el meristema y la zona de elongación resultó en 8 clústeres (Figura 4-5 B). El clúster 1 tuvo 8 proteínas subreguladas en respuesta a ST en ambas zonas. El análisis de enriquecimiento de este clúster mostró sobrerrepresentación de proteínas relacionadas con organelas, el núcleo y la interacción con DNA. El resto de los clústeres no mostraron términos enriquecidos.

## A Koshihikari interaction



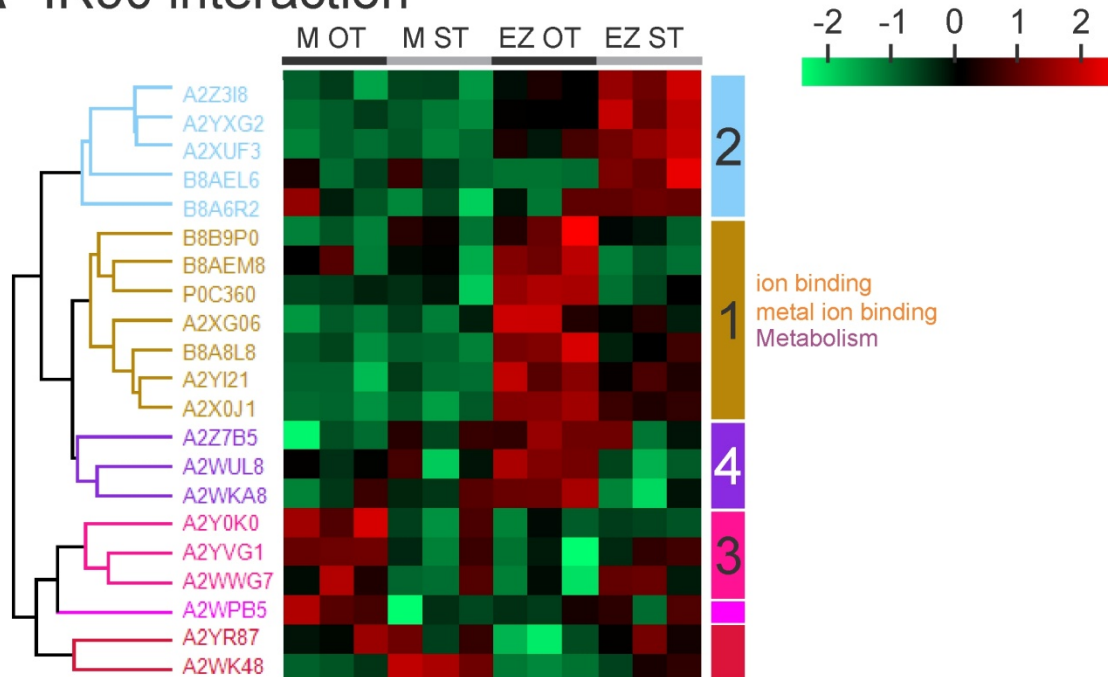
## B Koshihikari treatment



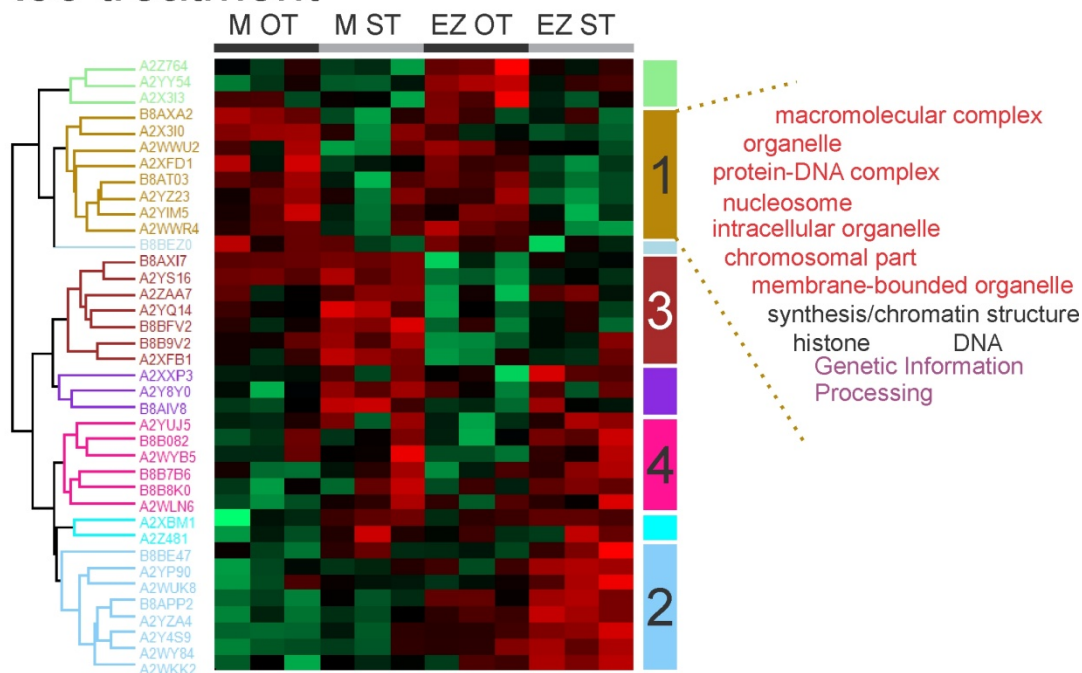
**Figura 4-4.** Mapa de calor y clustering jerárquico de las proteínas significativas de acuerdo al efecto de *tratamientos* y *tratamientos\*zonas* del ANOVA de dos vías (valores-*p* sin corregir <0.05) de Koshihikari. Las muestras están etiquetadas en la parte superior de igual manera que la figura 4-3. Cada nombre de muestra representa tres muestras biológicas. Se marcan las identificaciones según Uniprot para cada proteína. La escala de color en la parte superior de la figura representa la abundancia de las proteínas luego de la normalización por Z-score a lo largo de las filas del mapa de calor. Los clústeres más grandes están numerados y sus términos enriquecidos están escritos a la derecha, cada color representa una categoría de términos diferente: GO Biological Processes (proceso biológicos de GO) en celeste, GO Molecular Function (funciones moleculares de GO) en naranja, GO Cellular Component

(componentes celulares de GO) en rojo, MapManBIN en negro, y funciones KEGG en gris. El enriquecimiento fue realizado con el software Perseus,  $FDR < 0.15$ . **A)** Cluster jerárquico de las proteínas de Koshihikari que interaccionaron entre las zonas y los tratamientos, umbral de distancia de 2.58. **B)** Cluster jerárquico de las proteínas de Koshihikari que fueron significativas únicamente para el efecto *tratamiento*, umbral de distancia de 3.15.

## A IR50 interaction



## B IR50 treatment



**Figura 4-5.** Mapa de calor y clustering jerárquico de las proteínas significativas de acuerdo al efecto de *tratamientos* y *tratamientos\*zonas* del ANOVA de dos vías (valores-*p* sin corregir <0.05) de IR50. Las muestras están etiquetadas en la parte superior de igual manera que la figura 4-3. Cada nombre de muestra representa tres muestras biológicas. Se marcan las identificaciones según Uniprot para cada proteína. La escala de color en la parte superior de la figura representa la abundancia de las proteínas luego de la normalización por Z-score a lo largo de las filas del mapa de calor. Los clústeres más grandes están numerados y sus términos enriquecidos están escritos a la derecha, cada color representa una categoría de

términos diferente: GO Biological Processes (proceso biológicos de GO) en celeste, GO Molecular Function (funciones moleculares de GO) en naranja, MapManBIN en negro, y redes KEGG en púrpura. El enriquecimiento fue realizado con el software Perseus, FDR<0.15. **A)** Cluster jerárquico de las proteínas de IR50 que interaccionaron entre las zonas y los tratamientos, umbral de distancia de 3.31. **B)** Cluster jerárquico de las proteínas de IR50 que fueron significativas únicamente para el efecto *tratamiento*, umbral de distancia de 3.43.

En general, no se encontraron muchos términos enriquecidos posiblemente debido al bajo número de proteínas diferencialmente expresadas en ambos cultivares. Sin embargo, ambos cultivares mostraron proteínas relacionadas con el DNA, la estructura de cromatina y las histonas subreguladas en ambas zonas en respuesta a ST que podrían estar reflejando la disminución en la velocidad de división celular (capítulo 2 parte 2). Otro trabajo realizado en plántulas de arroz bajo temperaturas frías de 12-14 °C durante tres días indicó que las histonas cumplían un rol en la respuesta a frío ya que estaban subreguladas en la hoja (Neilson et al., 2011). La subregulación de histonas también fue reportada en otras especies sometidas a estrés por frío como la petunia (Zhang et al., 2016). La regulación de la cromatina y las histonas y sus modificaciones juegan un rol importante en la regulación de la transcripción en respuesta a estreses ambientales así que podrían ser un objetivo para iniciar la respuesta al estrés (Kim et al., 2015; Asensi-Fabado et al., 2017).

#### **4.4.2 Respuesta diferente de los cultivares**

Para ver la tendencia global en la función de las proteínas en respuesta a ST, aquellas proteínas que mostraron interacción positiva entre *tratamientos\*zonas* fueron testeadas con un test *post-hoc* Fisher (valor- $p$ <0.05) para diferencias entre tratamientos en cada zona y cultivar, y fueron luego sumadas a las proteínas que respondían sólo al efecto del *tratamiento* para constituir una lista de proteínas que cambiaban su abundancia en respuesta al estrés (Tablas Suplementarias 10 y 11).

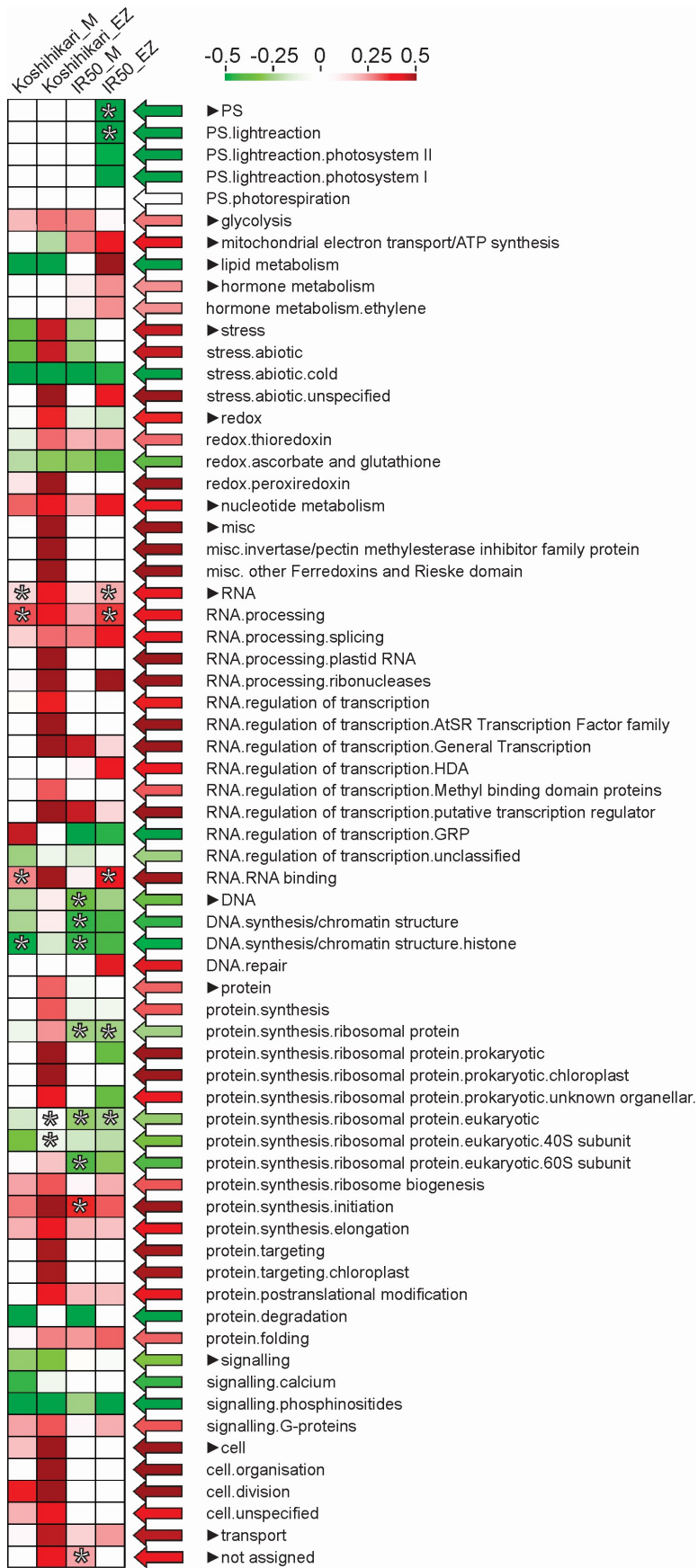
Para describir el efecto del estrés en cada zona y cultivar se realizó una clasificación funcional de todas las proteínas de acuerdo a los términos de MapMan (Figura 4-6). Se pudieron detectar algunas diferencias entre las respuestas de los cultivares y las zonas. Términos relacionados con fotosíntesis fueron encontrados subregulados en la zona de elongación de IR50 en respuesta a ST. Esto acuerda con resultados previos del capítulo 1 en donde IR50 mostró un rendimiento pobre del PSII cuando se exponía a ST, y del capítulo 3 en donde el análisis transcriptómico mostró subregulación de genes relacionados con el aparato fotosintético, mientras que Koshihikari pudo mantener la fotosíntesis como otras plantas tolerantes (Kosová et al.,

2011). Proteínas del transporte de electrones mitocondrial estaban sobrerreguladas en ambas zonas de IR50 y subreguladas en ambas zonas de Koshihikari. El metabolismo de lípidos mostró el mismo patrón. Los términos del metabolismo hormonal estaban sobrerregulados solamente en la zona de elongación de IR50. Los términos de peroxiredoxinas estaban sobrerregulados únicamente en la zona de elongación de Koshihikari. Términos relacionados con síntesis proteica estaban sobrerregulados en la zona de elongación de Koshihikari, mientras que IR50 mayormente los subreprimió. Finalmente, términos relacionados con la célula, particularmente la división celular, estaban solamente sobrerregulados en Koshihikari.

Un análisis de enriquecimiento de las funciones de las proteínas fue realizado para cada zona y cultivar para probar si alguna función se encontraba sobrerrepresentada en respuesta a ST (asteriscos en la Figura 4-6). La subregulación de la fotosíntesis en la zona de elongación de IR50 mostró ser un término enriquecido. El procesamiento y unión del RNA también fueron términos enriquecidos y sobrerregulados en el meristema de Koshihikari y la zona de elongación de IR50. Términos relacionados con el DNA, la cromatina y las histonas estaban enriquecidos y subregulados en el meristema de ambos cultivares, como se discutió arriba. Proteínas ribosomales se encontraron enriquecidas y subreguladas en ambas zonas de IR50 y en la zona de elongación de Koshihikari, mientras que la iniciación de síntesis estaba enriquecidas y sobrerregulada en el meristema de IR50.

En general, este análisis mostró que el ST y el estado de desarrollo celular inducen una reprogramación del proteoma de la hoja de arroz de manera diferente dependiendo la sensibilidad del cultivar al estrés.





Wilcoxon realizado en PageMan y están marcados con un asterisco cuando corresponde.

**Figura 4-6.** Categorías funcionales de proteínas identificadas en el meristema y zona de elongación de hojas de Koshihikari e IR50 de las cuales su abundancia cambió en respuesta al estrés de acuerdo a los términos MapMan. Las categorías están promediadas. Las muestras se nombran en la parte superior: razón de cambio de proteínas del meristema de IR50 (IR50\_M); razón de cambio de proteínas de la zona de elongación de IR50 (IR50\_EZ); razón de cambio de proteínas del meristema de Koshihikari (Koshihikari\_M); razón de cambio de proteínas de la zona de elongación de Koshihikari (Koshihikari\_EZ). Las categorías principales están marcadas con una cabeza de flecha. La escala de color en la parte superior representa la razón de cambio de las proteínas. Los términos enriquecidos son según el test de

#### **4.4.3 La homeostasis redox fue regulada de manera diferente entre los cultivares**

Bajo condiciones de estrés el poder reductor producido por la fotosíntesis usualmente excede la demanda del ciclo de Calvin, con lo cual la energía es liberada como calor o los electrones son capturados por otros metabolitos llevando a la generación de ROS que finalmente dañan proteínas y lípidos con lo cual estrategias de detoxificación actúan como sumideros de esta energía extra (Ensminger et al., 2006; You and Chan, 2015). La descripción de los proteomas realizada arriba indicó diferencias en el efecto del ST sobre las proteínas fotosintéticas de cada cultivar (Figura 4-6) que podrían haber llevado a un desbalance del estado energético de la planta y, en consecuencia, a una de-regulación redox. IR50 mostró términos enriquecidos relacionados con la fotosíntesis en la zona de elongación. En más detalle, las proteínas subreguladas pertenecen a subunidades del PSI y a proteínas del complejo liberador de oxígeno (OEC; Tabla 4-2). A pesar de que el efecto sobre el desempeño del PSII en este cultivar ya fue descrito en el capítulo 1 y ha sido ampliamente reportado en especies sensibles a frío (Huner et al., 1998), poco se sabe sobre el PSI. Bajo condiciones de estrés el PSI es afectado de manera irreversible y esto puede causar daño generado por ROS (Sonoike, 2011). En segundo lugar, la subregulación de proteínas pertenecientes al OEC también fue reportada a nivel del transcriptome en el análisis realizado en el capítulo 3 y a nivel de proteoma de otras especies sometidas a estrés por frío (Kosová et al., 2011). En general, la vía de fotosíntesis en IR50 estuvo afectada a nivel de proteína. Contrariamente, Koshihikari no mostró ningún efecto sobre los fotosistemas a nivel de proteína, apoyando la hipótesis de que parte de su tolerancia a ST se debe a su capacidad de mantener un aparato fotosintético sano y activo. A pesar de que dos proteínas relacionadas con la fotosíntesis que forman parte del sistema de clivaje de glicina de la vía de fotorespiración cambiaron su abundancia en Koshihikari, su implicancia en la respuesta será discutida más adelante.

La respuesta del sistema redox de las plantas puede ser generalmente descrito por las siguientes estrategias (Voss et al., 2013): (i) la prevención de la limitación del aceptor por el sistema de la válvula de malato; (ii) en caso de que exista una limitación por aceptor en el PSI, entonces se previene la acumulación de ROS por medio de la activación del ciclo de flujo de electrónico disminuyendo la generación de NADPH e incrementando el ATP; (iii) en el caso de que las ROS se encuentran ya a niveles altos entonces se activan los sistemas de detoxificación, *i.e.*, vía del ascorbato-glutatión, reductasa NADPH-tioredoxina (NTRC), y fotorespiración; (iv) la señalización por ROS

dispara otras estrategias llevando a la aclimatación al estrés. Koshihikari e IR50 mostraron respuestas diferentes a nivel de proteína relacionados con diferentes estrategias de homeostasis redox especialmente relacionadas con la estrategia *iii*. Dado la importancia de la regulación del sistema antioxidante para la respuesta del estrés en general y a temperaturas subóptimas, analizamos en más detalle la expresión de proteínas relacionadas con ROS en nuestro set de datos (Tabla 4-2).

**Tabla 4-2.** Razón de cambio y descripción de las proteínas correspondientes a las categorías fotosíntesis (PS) y redox de MapMan. Sólo razones de cambio con valores- $p < 0.05$  sin corregir para el factor *tratamientos*, y la interacción *tratamientos\*zonas* sometidos a test *post-hoc* Fisher (valor- $p < 0.05$ ) se muestran en la tabla. Proteínas con FDR < 0.10 se marcan con negrita.

Cultivar	ID de proteína	FC Meristema	FC Zona de elongación	Descripción de la proteína
<b>PS</b>				
Koshihikari	<b>A3C6G9</b>		0,66549333	glycine cleavage system H protein
	Q6H713	-0,07592	-0,70802	putative glycine cleavage system H protein
IR50	P0C360		-1,43531	photosystem I subunit VII
	B8A8L8		-0,636163	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1
	A2YI21		-0,339493	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2
	A2YY54	-0,0550467	-0,42299	photosystem I subunit II
<b>Redox</b>				
Koshihikari	Q6ER94	0,24247667	0,70296	<b>BAS1</b> , 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic
	Q7F8S5		0,80441333	<b>PRXII-E-2</b> , Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic
	Q8S091		0,99011	Thioredoxin F, chloroplastic
	<b>Q0D840</b>	-0,26354	-0,39242333	<b>OsTrx23</b> , thioredoxin H1, cytosolic
	Q10N21	-0,22205333	-0,29684667	L-ascorbate peroxidase
IR50	<b>A2WY84</b>	0,214233	0,236643	Thioredoxin F, chloroplastic
	<b>A2XFC7</b>	-0,140213	-0,282367	<b>OsAPX1</b> , L-ascorbate peroxidase
	A2XFD1	-0,446577	-0,489693	<b>OsAPX1</b> , L-ascorbate peroxidase

Ambos cultivares subregularon L-ascorbato peroxidasas citosólicas en ambas zonas en respuesta a ST. Hay ocho ascorbato peroxidasas (APX) descritas en el arroz tipo japónica de las cuales dos se encuentran en el citosol, *OsAPX1* (Entrada: Q10N21) y *OsAPX2* (Entrada: Q9FE01; Teixeira et al., 2006). Los cultivares indica tienen dos homólogos para *OsAPX1* (Entradas: A2XFC7 y A2XFD1) y uno para *OsAPX2* (Entrada: B8B6B6; <http://gramene.org/>). *OsAPX2* fueron detectadas en

ambos proteomas de los cultivares (ver Tablas Suplementarias 7 y 8) pero no cambiaron sus abundancias, mientras que todos los homólogos de *OsAPX1* estaban subregulados en Koshihikari e IR50. Muchos estudios fueron realizados con mutantes de arroz que eran *knockdown* para APX citosólicas y se encontraron evidencias de compensación por medio de otras vías, por ejemplo, se incrementaron proteínas de la fotorespiración, otras peroxididasas respondieron en la ausencia de APX citosólicas (Rosa et al., 2010; Bonifacio et al., 2011; Carvalho et al., 2014). En el mismo sentido, dos peroxiredoxinas cloroplásticas se encontraron sobrerreguladas en el cultivar tolerante. *PRXIIIE-2* se encontró sobrerregulada únicamente en la zona de elongación (Q7F8S5) mientras que *BAS1* (Q6ER94) estaba sobrerregulada en ambas zonas. Este tipo particular de tioredoxina es conocida por jugar un rol en el contexto de la fotosíntesis en la detoxificación de la producción fotoquímica de  $H_2O_2$ , menos reactivo que otros ROS pero que puede ser reducido a especies ROS más dañinas (Rhee et al., 2001; Dietz et al., 2006; Pérez-Ruiz et al., 2006). La vía de las peroxiredoxinas presenta una alternativa al ciclo agua/agua y protege las proteínas del estroma asociadas a la membrana interna de peróxidos probables de escapar de los tilacoides o entrar desde el citoplasma, actuando como antioxidante (Dietz et al., 2002). Koshihikari también incrementó la abundancia de una proteína crucial que forma parte del sistema de clivaje de glicina (GCS), la *GDCSH* (A3C6G9), en ambas zonas en respuesta al estrés (Douce et al., 2001). Esta proteína forma parte de la vía de fotorespiración. La fotorespiración ayuda a minimizar la producción de ROS por medio de la utilización directa de ATP y NADPH cuando re-asimila  $NH_4^+$  de la glicina por el GCS en plantas  $C_3$ , protegiendo a la planta de la fotoinhibición (Peterhansel et al., 2010; Voss et al., 2013; Keech et al., 2016). Un *knockdown* de esta proteína en arroz mostró un fenotipo deficiente en fotorespiración que inducía ROS (Zhou et al., 2013). Dado que las bajas temperaturas incrementan la solubilidad del oxígeno más que la del dióxido de carbono y que el estrés por frío puede generar ROS, la fotorespiración funcionaría como un sumidero del poder reductor extra (Huang et al., 2013). Otra proteína putativa H del GCS estaba subregulada en ambas zonas de Koshihikari (Q6H713) pero su actividad no está probada.

Koshihikari también subreguló una tioredoxina *h*, *OsTrx23*, en el meristema así como también en la zona de elongación (Q0D840). Esta proteína se encuentra en el citosol pero también ha sido descrita por ser la proteína más abundante de la savia del floema siendo sintetizada en las células acompañantes antes de ser transferida por medio del transporte célula-a-célula en los plasmodesmata hacia los tubos cribosos en el floema maduro (Ishiwatari et al., 1995; Ishiwatari et al., 1998). También se encontró

en el espacio apoplástico en donde la generación de ROS es requerida para inducir el cierre estomático por medio de la señal del ácido abscísico (Zhang et al., 2011; Sierla et al., 2013; Kaushik and Roychoudhury, 2014). *OsTrx23* interactúa con el sistema de NADPH/tioredoxina que genera ROS en el apoplasto requerido para el cierre estomático mediante la señal de ácido abscísico (Zhang et al., 2011; Shaykholeslam Esfahani and Shahpiri, 2015). La importancia de *OsTrx23* en el cierre estomático fue demostrada cuando líneas sobreexpresoras de esta proteína se encontraron sensibles al estrés salino dado que no podían acumular ROS en el apoplasto. Esto sugiere que *OsTrx23* participa activamente de la regulación de ROS en el espacio apoplástico y su represión permitiría la señal de ROS para desatar el cierre estomático en Koshihikari en respuesta al estrés por bajas temperaturas. Esta hipótesis también apoyada por la descripción previa de diferentes cultivares respecto de la conductancia estomática en el capítulo 1. Cuando los cultivares de arroz se sometieron a bajas temperaturas la conductancia estomática fue menor en los cultivares tolerantes, incluyendo a Koshihikari, que en los cultivares sensibles, incluido IR50 (Figuras 1-10 y 1-12), evidenciando el cierre estomático en las tolerantes. Se ha reportado la sobrerregulación de *OsTrx23* a nivel transcripcional en un cultivar japonica en respuesta a un tratamiento a 12 °C, no se han realizado estudios a nivel de proteína (Xie et al., 2009; Xie et al., 2012). Además, una tioredoxina *f* del cloroplasto estaba sobrerregulada en ambos cultivares, en la zona de elongación en el caso de Koshihikari (Q8S091) y en ambas zonas en el caso de IR50 (A2WY84). La familia de tioredoxinas *f* es conocida por regular las enzimas del ciclo de Calvin y procesos asociados activando el metabolismo de carbono (Balmer et al., 2003; Nuruzzaman et al., 2008), actuando de este modo como un mecanismo de señalización redox (Michelet et al., 2005). Las tioredoxinas estarían participando en la estrategia *iv* del sistema ROS.

#### **4.4.4 Regulación de la transcripción, la traducción y el plegamiento de proteínas**

Las regulaciones transcripcionales y traduccionales son la clave para la respuesta de las plantas al estrés por frío (Heidarvand and Maali Amiri, 2010) y por lo tanto términos relacionados con estos procesos se encontraron enriquecidos en ambos cultivares aquí analizados (Figura 4-6). Términos relacionados con la interacción con DNA estaban enriquecidos especialmente en la respuesta del meristema de ambos cultivares. Estas proteínas correspondieron mayormente a histonas y estaban subreguladas en ambos cultivares y zonas (Tabla 4-3). Como se comentó más arriba, las histonas se sabe son modificadas en el estrés por frío dado que se encuentran

involucradas en la regulación de la transcripción y su subregulación ha sido reportada y podría estar relacionada con la disminución de la velocidad de división celular.

**Tabla 4-3.** Razón de cambio y descripción de proteínas pertenecientes al término DNA de MapMan. Sólo razones de cambio con valores- $p < 0.05$  sin corregir para el factor *tratamientos*, y la interacción *tratamientos\*zonas* sometidos a test *post-hoc* Fisher (valor- $p < 0.05$ ) se muestran en la tabla. Proteínas con FDR $<0.10$  se marcan con negrita.

Cultivar	ID de proteína	FC Meristema	FC Zona de elongación	Descripción de la proteína
<b>DNA</b>				
Koshihikari	Q69JW2	0.26127666	0.6381767	template-activating factor I
	A0A0P0V312	-0.48028	-0.25429666	histone H2A
	Q2QPG9	-0.50226665	-0.07192	histone H2A
IR50	A2YVG1		0.43288	UV excision repair protein RAD23
	B8AXA2	-0.5685833	-0.16455667	histone H2A
	A2WWU2	-0.46364668	-0.42670667	histone H2B
	A2WWR4	-0.32943332	-0.7050267	Histone H4

Las proteínas asociadas con los ribosomas estaban sobrerreguladas en ambos cultivares (Tabla 4-4), así como proteínas de unión a RNA y factores de *splicing*. Esto ha sido reportado también en otras especies sometidas a estrés por frío (Kosová et al., 2011) dado que la regulación transcripcional y post-transcripcional del metabolismo de RNA es un paso esencial para la regulación de la expresión génica (Kwanuk and Hunseung, 2016). La *cold shock protein OsCSP1* estaba reprimida en ambas zonas de Koshihikari (Q6YUR8). Esta proteína es aparentemente capaz de unirse a ácidos nucleicos y de complementar a la cepa de *E. coli* con cuádruple delección de *cold shock domain proteins* (proteínas CSD) cuando se expone a frío. Sin embargo, no se sobrerreguló en respuesta a tratamiento por *chilling* en plántulas de cultivares tipo japónica y su inducción transcripcional se evidenció solo durante la primer media hora de tratamiento (Chaikam and Karlson, 2008). *OsCSP1* se encontró acumulada en los tejidos reproductivos en otros reportes, lo cual está en línea con el hecho de que el estado reproductivo de arroz es también sensible a bajas temperaturas (Imin et al., 2004; Chaikam and Karlson, 2008). A diferencia del arroz, en los cultivares de trigo de invierno, las proteínas CSD como *WCSP1* estaba altamente expresada tejido de la corona bajo estrés por *chilling* (Karlson et al., 2002), a pesar de que sólo de manera transiente en la hoja (Radkova et al., 2014). Es posible de que en el arroz, *OsCSP1* tendría un rol en los estadios más tardíos, o que las proteínas CSD no son capaces de conferir aclimatación a bajas temperaturas como lo hacen en el trigo de invierno.

**Tabla 4-4.** Razón de cambio y descripción de proteínas pertenecientes al término RNA de MapMan. Sólo razones de cambio con valores- $p < 0.05$  sin corregir para el factor *tratamientos*, y la interacción *tratamientos\*zonas* sometidos a test *post-hoc* Fisher (valor- $p < 0.05$ ) se muestran en la tabla. Proteínas con  $FDR < 0.10$  se marcan con negrita.

Cultivar	ID de proteína	FC Meristema	FC Zona de elongación	Descripción de la proteína
<b>RNA</b>				
Koshihikari	Q10PA9	0.69879	0.28461334	small nuclear ribonucleoprotein D3
	Q6ETN4	0.48309666	0.99534	small nuclear ribonucleoprotein F
	Q0J803	0.43197		small nuclear ribonucleoprotein E
	Q5ZDX8	0.37218666	0.73875	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1-like
	Q2QQ97	0.52638		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/A3
	Q69JF3		0.75412333	ribonuclease T2
	Q5TKF9	1.0235367		U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8
	Q0DRZ2	0.26336	0.26721334	splicing factor, arginine/serine-rich 1/9
	Q2QZL4	0.073026665	0.32748666	Splicing factor U2af large subunit B
	Q8L4E7		0.6348067	SAP-like protein BP-73
	Q8H4B9	0.11618666	0.5620033	Putative translational inhibitor protein
	Q851Y9		0.56799	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta
	Q8LNW1		0.67068	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta
	A0A0P0VS15		0.9220267	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta
	Q10KP0		0.79014665	nucleolin
	A0A0P0XJQ2	0.14323667	0.37117666	polyadenylate-binding protein
	Q6H443		0.6674567	polyadenylate-binding protein
	Q6F4N5		0.70558	Aspartyl protease 25
	Q851Y1		0.5225833	Ankyrin repeat domain protein 2, putative, expressed
	Q6ASX7	0.46618667		Glycine-rich RNA binding protein
	<b>Q0J3S0</b>		0.76565665	Similar to Nucleic acid-binding protein precursor
	Q7F2X8	0.5113533	0.5370567	
	Q8LHN4		0.64607334	
	A0A0P0YC74		0.31729665	
	<b>Q6YUR8</b>	-0.7245233	-0.7200633	Cold shock protein, <i>OsCSP1</i>
	Q10SU0	-0.32459	-1.05496	
IR50	B8AIV8	0.82024	0.45398667	small nuclear ribonucleoprotein F
	A2YR87		0.40006	small nuclear ribonucleoprotein E
	A2Z3I8		0.85685664	ribonuclease T2
	<b>B8APE3</b>	0.26823333	0.39204332	Serine/arginine rich splicing factor, mitochondrial
	A2YZA4	0.18809	0.35664666	polyadenylate-binding protein
	B8AEL6		0.2619	far upstream element-binding protein

A2XBM1	0.46166667	0.15539333	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta
B8B082	0.0567	0.33499667	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein
B8AXI7	0.06073	0.41566333	
A2WUK8	0.09325667	0.42326668	
A2WYB5	0.20530333	0.46652666	
B8B9P0		-0.38203666	polyadenylate-binding protein
B8AGK8	-0.5329267	-0.46398333	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein

Koshihikari e IR50 regularon de manera diferenciada las proteínas que participaban de los procesos de traducción (Tabla 4-5). Koshihikari incrementó el nivel de varias proteínas de subunidades ribosomales en ambas zonas en respuesta al estrés, mientras que IR50 las subreguló. Este tipo de proteínas tienen distintos elementos de respuesta en sus promotores, incluyendo elementos de respuesta a bajas temperaturas. El efecto particular sobre el estrés por frío puede ser la inducción de la síntesis de polipéptidos a bajas temperaturas (Kim et al., 2004). Las proteínas celulares en el cloroplasto podrían dañarse por el incremento de ROS que escape a los sistemas de eliminación y por lo tanto las chaperonas deberían actuar para asegurar el plegamiento correcto de las proteínas (Wang et al., 2004). Unas pocas chaperoninas se encontraron sobrerreguladas en la zona de elongación de Koshihikari y en ambas zonas del cultivar sensible. El plegamiento correcto de las proteínas para el buen funcionamiento de la célula es crucial para el crecimiento de la planta y esto se vio evidenciado en la sobrerregulación de chaperoninas en ambos cultivares en respuesta al frío. El cultivar sensible también sobreexpresó dos factores de iniciación de la traducción en ambas zonas, conocidos como factor de iniciación de la traducción 5A *eIF5A* (B8B833 y A2YHI1; Tabla 4-5). Las proteínas *eIF5A* participan en diferentes etapas desde el inicio de la traducción, un paso limitante en este proceso (Dutt et al., 2015). Chou et al. (2004) analizaron dos *eIF5A* de arroz y encontraron que su expresión a nivel transcripcional era mayor en hojas más viejas, estaban más expresadas en las zonas de división y elongación que en la zona madura, y estaban sobrerreguladas en respuesta a diferentes estreses ambientales. En algunas plantas *eIF5A* pareció estar relacionado con la senescencia prematura inducida por estreses ambientales por medio de la facilitación de la traducción de especies de mRNA requeridas para la muerte celular programada (Wang et al., 2001; Thompson et al., 2004; Parkash et al., 2014). Por otro lado, *eIF5A* también estaba relacionado con la adaptación de la planta a cambios de las condiciones ambientales y la xilogénesis en *Arabidopsis* (Liu et al., 2008; Ma et al., 2010; Xu et al., 2011; Wang et al., 2012).



**Tabla 4-5.** Razón de cambio y descripción de proteínas pertenecientes al término Proteínas de MapMan. Sólo razones de cambio con valores- $p < 0.05$  sin corregir para el factor *tratamientos*, y la interacción *tratamientos\*zonas* sometidos a test *post-hoc* Fisher (valor- $p < 0.05$ ) se muestran en la tabla. Proteínas con FDR $<0.10$  se marcan con negrita.

Cultivar	ID de proteína	FC Meristema	FC Zona de elongación	Descripción de la proteína
<b>Proteins</b>				
Koshihikari	Q10L93		0.52825665	large subunit ribosomal protein L6
	A0A0P0VSE5		0.61778	large subunit ribosomal protein L11
	Q653V9		0.72164667	large subunit ribosomal protein L24
	Q5WMY3	0.34140667	0.25058666	large subunit ribosomal protein L18e
	<b>Q6ZLB8</b>	0.40118	0.42088667	60S ribosomal protein L4/L1
	Q0DSD6		0.38768	small subunit ribosomal protein S1
	Q850W6		0.64033	small subunit ribosomal protein S5
	Q7XHW8	0.31454	0.32609335	translation initiation factor 2 subunit 2
	Q7Y1V2	0.32786	0.95992	translation initiation factor 1A
	Q6Z0G0	0.37155333	0.17052333	molecular chaperone GrpE
	<b>Q69Y99</b>		0.55468	chaperonin GroES
	Q8H3I7		0.39826667	chaperonin GroES
	Q8H903		0.27647	chaperonin GroEL
	Q8LMR3	0.21553333	0.37254667	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
	Q6K5R6	0.67737		
	Q7XTT4	0.23430666	0.32001	
	Q0JD02		0.49144334	
	Q6K822		0.6341633	
	Q69UI1	-0.67852664	-0.40966332	small subunit ribosomal protein S13e
	Q8H588	-0.5328067		small subunit ribosomal protein S18e
	P51431	-0.8020167		small subunit ribosomal protein S27Ae
	Q6L510	-0.60182333	-0.10566	large subunit ribosomal protein L36e
	Q6K8D4		-0.38052332	peptidylprolyl isomerase
IR50	A2Y8Y0	0.37901	0.08707	small subunit ribosomal protein S20e
	B8B7B6	0.24657667	0.29134333	small subunit ribosomal protein S12e
	A2XXP3	0.07485667	0.21757667	nucleolin
	A2YS16	0.06128	0.22338	nucleolin
	<b>A2YHI1</b>	0.35956	0.34610334	Eukaryotic translation initiation factor 5A, <i>eIF5A</i>
	<b>B8B833</b>	0.26076666	0.39830333	Eukaryotic translation initiation factor 5A, <i>eIF5A</i>
	B8B8K0	0.20676	0.18975	elongation factor 1-beta
	<b>B8B537</b>	0.19935	0.19505666	chaperonin GroES
	<b>A2XAA0</b>	0.30108333	0.29007667	chaperonin GroES
	B8B9V2	0.24317667	0.43737	molecular chaperone GrpE
	A2WLN6	0.46192333	0.19885333	
	<b>B8BAC6</b>	-0.61974	-0.51312333	40S ribosomal protein S13-2, <i>rps13</i>

A2Z764	-0.22964333	-0.39825332	small subunit ribosomal protein S17e
A2YIM5	-0.32617334	-0.40566334	small subunit ribosomal protein S18e
A2XIT5	-0.30577	-0.18207666	large subunit ribosomal protein L13e
A2YZ23	-0.18497667	-0.4671	large subunit ribosomal protein L17e
A2X3I0	-0.39258	-0.23938666	large subunit ribosomal protein L27e
B8AT03	-0.48683667	-0.59354335	large subunit ribosomal protein L35e
A2Y0K0	-0.74587667		large subunit ribosomal protein L18e
A2WPB5	-0.69289666		small subunit ribosomal protein S27Ae
A2XG06		-0.3706	small subunit ribosomal protein S1
A2WUL8		-0.54714	small subunit ribosomal protein S24e

#### 4.5 CONCLUSIONES

El análisis proteómico de la respuesta al estrés por ST a lo largo de la zona de crecimiento mostró diferencias entre cultivares de arroz contrastantes. La mayoría de las proteínas que cambiaron su abundancia en respuesta al estrés estaban relacionadas con procesos de información genética. A pesar de que el número total de proteínas que cambiaron su abundancia en respuesta a ST no difirieron tanto entre Koshihikari e IR50, si lo hicieron sus funciones. El análisis de sobrerrepresentación mostró grandes diferencias entre las zonas de Koshihikari. Se encontraron sobrerrepresentadas las proteínas relacionadas con transcripción y *splicing* en el meristema y con partes de cloroplastos y la vía de metabolitos de fosfolípidos en la zona de elongación. IR50 también mostró algunas diferencias entre las respuestas de las zonas: en el meristema se encontraron sobrerrepresentadas proteínas ribosomales y de partes de organelas, en la zona de elongación se encontraron reprimidas proteínas relacionadas con la fotosíntesis y los ribosomas. Estos resultados sugieren diferencias entre las respuestas de los cultivares, especialmente relacionadas con el aparato fotosintético y, en consecuencia, con la homeóstasis redox.

***CAPÍTULO 5: Análisis bioquímico de cultivares de arroz contrastantes en la respuesta a temperaturas subóptimas***



## **5.1 INTRODUCCIÓN**

Los resultados de los capítulos anteriores dispararon la necesidad de estudiar procesos metabólicos particulares que puedan explicar la respuesta del arroz al estrés por ST y las diferencias entre cultivares contrastantes representativos, Koshihikari e IR50. El desempeño fotosintético demostró ser una diferencia clave en la sensibilidad al estrés por ST a largas exposiciones (capítulo 1) y esto también se vio evidenciado en los análisis de las ómicas (capítulos 3 y 4). El análisis transcripcional realizado luego de 24 h de exposición a ST a nivel del tallo de la planta mostró que el OEC estaba regulado sugiriendo que el efecto de ST sobre el PSII estaría implicado desde el comienzo de la respuesta. A nivel de la zona de crecimiento de la hoja, el análisis proteómico también mostró que proteínas del OEC estaban realmente subreguladas en el cultivar sensible. Dado que el desempeño del PSII ya se evaluó (capítulo 1), quedaría verificar si es que el OEC es uno de los primeros sistemas en ser afectado como los análisis transcripcionales y proteómicos sugieren en IR50.

Varios síntomas del estrés por ST sugieren que diferencias a nivel ultraestructural de las células fotosintéticamente activas podrían estar implicadas en las respuestas diferentes de Koshihikari e IR50. El análisis del transcriptome mostró diferencias en el aparato fotosintético a cortos tiempo (capítulo 3) entre los cultivares, y a tiempos largos (capítulo 1) se vio que Koshihikari era capaz de mantener un fotosistema sano que permitía un mejor crecimiento en comparación con IR50 bajo condiciones de estrés (ver capítulos 1 y 2). Se sabe que el cloroplasto es comúnmente la primer ultraestructura en verse afectada por el estrés por frío (Kimball and Salisbury, 1973; Kratsch and Wise, 2000) con lo cual tiene sentido analizar si es que estas diferencias son visible en el estrés por ST o no, particularmente a tiempos largos cuando el desempeño de PSII demostró estar afectado en cultivares sensibles. Además, tanto el análisis transcripcional (capítulo 3) como el proteómico (capítulo 4), se vieron enriquecidos en términos relacionados con las partes de cloroplastos, membranas, y metabolismo de carbohidratos en la respuesta al estrés y fue diferente entre Koshihikari e IR50.

La composición de ácidos grasos puede ser alterada por el estrés por frío debido a la necesidad de remodelar la fluidez de membrana (Upchurch, 2008). En análisis transcriptómico sugirió que un balance diferente de los ácidos grasos podría ser parte de la respuesta de los cultivares a ST (capítulo 3) ya que las desaturasas estaban sobrerreguladas en ambos cultivares y la degradación de lípidos estaba sobrerregulada en IR50. Para constatar si la regulación transcripcional surtió algún efecto en las

membranas, es necesario realizar un análisis lipidómico a mayores tiempos de exposición al estrés por ST en ambos cultivares.

Se han discutido a largo de todo este manuscrito las consecuencias del estrés por ST sobre el aparato fotosintético. El poder redactor extra que este sistema genera y la planta no utilizó para crecer, necesariamente tiene que ser liberado como calor o los electrones deben usarse en vías alternativas (Ensminger et al., 2006). Múltiples evidencias de que la homeostasis redox se vio alterada en respuesta a ST han sido descritas a nivel transcripcional (capítulo 3) y proteómico (capítulo 4). El crecimiento (capítulo 2) y el análisis proteómico mostraron que Koshihikari e IR50 tuvieron respuestas diferentes dependiendo de la zona de muestreo tomada de la hoja, por lo tanto un análisis de metabolitos y enzimas relacionadas con el sistema redox debería realizarse a lo largo de la zona de crecimiento de ambos cultivares.

Estreses ambientales diferentes son conocidos por alterar los metabolitos secundarios de la planta dado que juegan un rol importante en la adaptación de la al ambiente (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Los metabolitos secundarios representaron un alto porcentaje de los DEGs en la respuesta transcripcional de ambos cultivares (capítulo 3). En particular, DEGs de la vía de las poliaminas fueron diferencialmente expresados solamente en IR50. Dado que las poliaminas están relacionadas con el estrés abiótico y su biosíntesis es conocida por ser mayormente regulada a nivel transcripcional (Calzadilla et al., 2014; Liu et al., 2015), debería realizarse un análisis más detallados de los metabolitos de esta vía.

## **5.2 OBJETIVO**

Este capítulo busca estudiar procesos metabólicos específicos para encontrar evidencias sobre la respuesta diferente entre cultivares de arroz tolerantes y sensible al estrés por ST que fueron propuestos en estudios realizados en diferentes niveles de complejidad en los capítulos anteriores.

## **5.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.3.1 Material de plantas y condiciones de crecimiento**

Los cultivares de arroz Koshihikari e IR50 fueron amablemente proporcionados por el Programa de Mejoramiento de Arroz de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Semillas de estos cultivares fueron colocadas en placas de Petri sobre dos capas de papel de filtro Whatman N° 5 con 7 mL de carbendazim 0.025 %p/v

(Yoshida, 1981) e incubadas en cámara de crecimiento a 30 °C en oscuridad hasta germinación. Las plántulas fueron transplantadas a redes plásticas dentro de bandejas negras de 4 L que contenían 3 L de agua destilada (cultivo hidropónico) o a macetas con turba (Jiffy, The Netherlands; volumen de los pots: 1.6 l, dimensiones: 13 cm alto y 5" de diámetro) y saturadas con agua (cultivo en suelo). Los cultivos hidropónicos de ambos cultivares fueron colocados en la cámara de cultivo Percival E-30B (Percival E-30B, Percival Scientific, IA, USA) y los cultivos en suelo de ambos cultivares fueron colocados en la cámara de cultivo Conviron (Conviron, Adaptis A1000). Todas las cámaras se establecieron en las mismas condiciones: 12 h fotoperiodo, 80% humedad y 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Las temperaturas día/noche para el tratamiento de temperaturas óptimas de crecimiento (OT) fueron 28/24 °C (d/n). Luego de tres días de cultivo, el agua del cultivo hidropónico fue reemplazada por 3 L de solución Yoshida (Rachoski et al., 2015). Desde ese momento en adelante, la solución Yoshida fue renovada cada tres días hasta el final del experimento. Cuando emergió la tercer hoja (Yoshida, 1981), las temperaturas fueron modificadas para realizar el tratamiento de temperaturas subóptimas de crecimiento (ST) a 21/13 °C (d/n). Las plántulas fueron cultivadas hasta su cosecha a diferentes tiempos dependiendo del análisis.

### **5.3.2 Determinación del desacoplamiento del complejo liberador de de oxígeno y de los centros reductores de quinona B**

El desacoplamiento del complejo liberador de oxígeno (OEC) y de los centros reductores de la quinona B ( $Q_B$ ) se determinó por la prueba no invasiva de la fluorescencia rápida transitoria de la Chl (test JIP) utilizando un fluorómetro (Handy PEA fluorometer, Hansatech Instruments<sup>®</sup> Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) en plántulas del cultivo hidropónico. Se utilizó el software PEA (PEA plus v1.1, Hansatech Instrument Ltd., UK) de acuerdo con Chen et al., (2014). Luego de 24 h de tratamiento, una sección de la lámina de la tercera hoja en expansión fue cubierta con clips para adaptarla a oscuridad durante 20 min. Luego, los clips fueron abiertos y se determinó la fluorescencia inicial ( $F_0$ ) a los 20  $\mu\text{s}$  (paso O). Las muestras fueron expuestas durante 1 s a un primer pulso de luz roja saturante (650 nm, 3000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Se determine la fluorescencia rápida transitoria de la Chl a: 20 ms ( $F_j$ ; paso J o  $V_j$ ), 300  $\mu\text{s}$  ( $F_k$ ; paso K), 30 ms ( $F_i$ ; paso I); la intensidad máxima de la fluorescencia ( $F_M$ ) es igual a  $F_P$  (paso P) dado que el pulso de luz fue saturante. La cinética de la fluorescencia fue normalizada por  $F_0$  y  $F_j$  como  $W_{OJ}$  a partir de la ecuación:

$$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$$

y  $\Delta W_{OJ}$  se calculó a partir de la ecuación:

$$\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{tratado})} - W_{OJ(\text{control})}$$

La banda K se determine como la diferencia en las cinéticas  $\Delta W_{OJ}$ . Lugo del paso P, las muestras se mantuvieron durante 10 s en oscuridad y luego se expusieron durante 1 s a un segundo pulso de luz roja saturante. La fracción de centros de reacción llamada lenta o centros de reacción no- $Q_B$  ( $\Delta V_0$ ) fue calculada como sigue:

$$\Delta V_0 = [1 - (F_0/F_M)_{(2^\circ \text{ exposición})} / 1 - (F_0/F_M)_{(1^\circ \text{ exposición})}]$$

Y los centros de reductores de  $Q_B$  fueron calculados a partir de la ecuación:

$$\text{Centros reductores de } Q_B = 1 - \Delta V_0$$

### **5.3.3 Análisis ultrastuctural**

La parte madura de la última hoja completamente expandida (tercera o cuarta hoja) de cada cultivar y tratamiento crecido en suelo durante 10 o 24 d fue cosechada luego del comienzo del fotoperiodo y cortada en trozos de 2 mm<sup>2</sup>. Las muestras se fijaron en glutaraldehído 2% en un buffer de fosfato de potasio pH 7.2-7.4 durante 2 h a 4 °C. Una segunda fijación se realizó con tetróxido de osmio 1% (p/v) durante 1 h a 4 °C. Luego, las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de alcoholes (desde 50% hasta 100%) en una cámara de vacío e incluidas en resina Spurr. Cortes ultrafinos (90 nm) fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, examinados con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y fotografiados con una cámara digital Erlangshen ES1000W (Model 785, Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) en la *Central de Microscopía Electrónica* de la *Facultad de Ciencias Veterinarias* (UNLP, Argentina).

### **5.3.4 Análisis lipídomico**

La extracción total de lípidos y purificación fue realizada de acuerdo con Bligh et al., (1959) con modificaciones en plántulas del cultivo hidropónico. 3 tallos fueron cosechados luego de 6 d de tratamiento y agrupados, constituyendo una muestra biológica. 5 grupos de cada tratamiento y cultivar fueron analizados. Las muestras fueron molidas en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y 100 mg del polvo resultante fueron mezclados con cloroformo:metanol 1:2 v/v, y 15 ppm del estándar interno (IS) ácido pentadecanóico (SIGMA). Luego de centrifugar a 6000 g durante 5 min, el

sobrenadante fue descartado y los lípidos del precipitado fueron re-extraídos con 0.3 mL de cloroformo:metanol 1:2 v/v y 0.08 mL de 1% KCl. Ambos sobrenadantes fueron mezclados y se adhirieron 0.2 mL de cloroformo y 1.2 mL de 1% KCl. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 10000 g y 150  $\mu$ L de la fase orgánica se secaron en una atmósfera de nitrógeno líquido.

La preparación de los metal ésteres de ácido graso para la cromatografía gas-líquido (GC) fue realizada de acuerdo al protocolo de metanólisis/metilación suave de Ichihara and Fukubayashi, (2010). Las muestras fueron disueltas en 0.05 mL de tolueno y 0.375 mL de 8% HCl fueron adheridos. Luego de mezclar, la muestra fue transferida a un tubo a rosca e incubada a 45 °C durante toda la noche. Luego de enfriarse, la muestra se mezcló con 0.25 mL de hexano y 0.25 mL de dH<sub>2</sub>O. Los tubos fueron homogeneizados utilizando un agitador mecánico, luego la fase de hexano fue analizada por GC/MS (Clarus SQ 8. Perkin Elmer. MA. USA), en modo SIM, usando una columna DB-23 (30 m X 0.250 mm X 0.25  $\mu$ m), He como gas portador (1.5 mL min<sup>-1</sup>), inyección en modo split (270 °C, relación 50:1), y rampa de temperatura 130 °C 1 min, 6.5 °C min<sup>-1</sup> hasta 170 °C, 2.75 °C min<sup>-1</sup> hasta 215 °C, 40 °C min<sup>-1</sup> hasta 230 °C 3 min. La cuantificación se realizó de acuerdo al método de IS. Una mezcla de estándares de ácidos grasos (Accustandard) se utilizó para realizar las curvas estándar. Los ácidos grasos analizados con sus respectivos tiempos de retención se muestran en la Tabla Suplementaria 12.

### **5.3.5 Mediciones relacionadas con el estado redox de las plantas**

Dos días luego de la emergencia de la cuarta hoja de plántulas cultivadas en suelo, 10 plantas elegidas al azar de cada cultivar y tratamiento fueron cosechadas y la zona de crecimiento de la cuarta hoja de cada planta fue cortada en cinco segmentos como se describe a continuación de acuerdo con los resultados del capítulo 2 (Figura 4-1): desde la base de la hoja 4 mm (meristema), 3 mm (transición entre el meristema y la zona de elongación), 18 mm (zona de elongación), 5 mm (transición entre la zona de elongación y la madura), y 20 mm (zona madura) fueron consecutivamente cortados de las plantas bajo condiciones OT; desde la base de la hoja 3 mm (meristema), 3 mm (transición entre el meristema y la zona de elongación), 10 mm (zona de elongación), 4 mm (transición entre la zona de elongación y la madura), y 20 mm (zona madura) fueron consecutivamente cortados de las plantas bajo condiciones ST. Para cada cultivar y tratamiento, tres grupos de cada segmento (cada grupo a partir de 10 plantas) pesando entre 15 y 100 mg fueron homogeneizados con 500  $\mu$ L de buffer K-fosfato (0.05 M pH 7.0), conteniendo polivinil



pirrolidona 2% p/v, EDTA (0.4 mM) y PMSF (0.2 mM), utilizando un MagNALyser (Roche, Vilvoorde, Bélgica). Los homogenatos fueron centrifugados (14000 g, 45 min). Una alícuota de 25 µl fue separada para el análisis de FRAP y al resto se le agregó ácido ascórbico (1 mM). Los homogenatos fueron guardados a -80 °C para las próximas determinaciones. Las plantas restantes se utilizaron para determinar el largo de la cuarta hoja hasta alcanzar madurez.

#### **5.3.5.1 Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se adhirieron 25 µl del reactivo colorante naranja xilenol (Bellincampi et al., 2000) a 25 µl de sobrenadante. Luego de 45 min de incubación, el complejo Fe<sup>3+</sup>-naranja xilenol fue cuantificado a 600 nm. Las curvas estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se obtuvieron adicionando cantidades variables de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reactivo colorante naranja xilenol. Los datos fueron normalizados y expresados como µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por gramo de peso de tejido fresco.

#### **5.3.5.2 Determinación de malondialdehído**

El malondialdehído (MDA) fue medido indirectamente por medio de las sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBA; Hodges et al., 1999). 25 µl de sobrenadantes fueron calentados con 25 µl de TBA 0.5% p/v en ácido tricloroacético 20% p/v (TCA) a 95 °C por 1 h. Las muestras fueron luego centrifugadas, colocadas en una placa de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 440, 532 y 600 nm en un lector de microplacas Synergy H1 (BioTek). Los datos se expresaron como equivalentes de MDA (nmol/g peso fresco) de acuerdo con Du and Bramlage, (1992).

#### **5.3.5.3 Capacidad antioxidante no-enzimática**

El ensayo de capacidad de reducción férrica del plasma (*Ferric Reducing Ability of Plasma*, FRAP) fue utilizado para estimar la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas (Benzie and Strain, 1996). 25 µl de sobrenadante fueron mezclados con igual cantidad de buffer acetato 0.3 M (pH 3.6), conteniendo 2,4,5-tris-(2-piridil)-s-triazina 10 mM (TPTZ) y FeCl<sub>3</sub> 200 mM. Se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Synergy H1, BioTeK). Se utilizó ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) para la curva estándar. Los datos se expresaron como equivalentes de Trolox (µM/g peso fresco).

#### **5.3.5.4 Concentración de polifenoles**

La concentración de polifenoles se determinó mediante el uso del reactivo Folin-Ciocalteu (Zhang et al., 2006). La absorbancia se midió a 765 nm en un lector de

microplacas (Synergy H1, BioTeK). Se utilizó el ácido gálico (GA) para preparar las curvas estándar. Los datos se expresaron como equivalentes de GA (mg/g peso fresco).

#### **5.3.5.5 Concentración de flavonoides**

La estimación del contenido de flavonoides total se realizó mezclando 20 µl de sobrenadante con 60 µl de etanol absoluto, 10 µl cloruro de aluminio 10% (p/v), 10 µl acetato de potasio 1M y 120 µl agua destilada. Luego de mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 30 min, la absorbancia se midió a 415 nm en un lector de microplacas (Synergy H1, BioTeK). Se utilizó quercetina (QE) para preparar la curva estándar. Los datos se expresaron como equivalentes de QE (µg/g peso fresco) de acuerdo con Chang et al., (2002).

#### **5.3.5.6 Concentración de ascorbato y glutatión**

Los niveles de ascorbato (ASC) y glutatión (GSH) se determinaron por medio de un análisis en HPLC (Potters et al., 2004). Los antioxidantes se separaron en una columna de fase reversa (100 x 4.6 mm Polaris C<sub>18</sub>-A, tamaño de partícula 3 mm; 40 °C) con una velocidad de flujo isocrática de 1 ml.min<sup>-1</sup> de buffer de elusión (KCl 2 mM, pH 2.5 ajustado con ácido O-fosfórico). Los componentes se cuantificaron usando un detector electroquímico personalizado y la purificación e identidad de los picos se confirmó con un The componentes fueron cuantificados usando un DAD en línea (SPD-M10AVP, Shimadzu). El ASC se midió a 242 nm y el GSH a 196 nm. El análisis de los cromatogramas se realizó con el paquete de software Class VP (ClassVP 5.0, Shimadzu). Las concentraciones de antioxidante reducido se determinaron luego de reducir todo 0.04 DTT.

#### **5.3.5.7 Ensayos de extracción enzimática y de actividad enzimática**

La actividad peroxidasa (POX) se midió por supervisión de la producción de purpurogallin a 430 nm (Kumar and Khan, 1982). La actividad catalasa (CAT) se calculó a partir de la disminución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medida a 240 nm (Aebi, 1984). La medición de la inhibición de la reducción de NBT a 550 nm se utilizó para ensayara la actividad superóxido dismutasa (SOD; Dhindsa et al., 1981). La actividad ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), y dehidroascorbato reductasa (DHAR) se ensayó de acuerdo con Murshed et al., (2008). La actividad glutaredoxina (GRx) se midió supervisando la reducción de GSH en presencia de NADPH (Lundberg et al., 2001). La actividad tioredoxina (TRx) se midió indirectamente como la habilidad de

reducir NADP-malato dehidrogenasa, cuya actividad se midió como la capacidad de reducir NADPH, previamente TRx se redujo con ditiotreitól (Wolosiuk et al., 1979). Todas las determinaciones fueron escaladas para ser realizadas con 25  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y poder ser medidas en lector de microplacas (Synergy H1, BioTek).

#### **5.3.5.8 Contenido de proteínas solubles**

Las proteínas soluble se determinaron de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al., 1951) con un lector de microplacas (Synergy H1, BioTek).

#### **5.3.6 Determinación de poliaminas libres**

Se determinaron las poliaminas libres de las plántulas de arroz del cultivo hidropónico de acuerdo con Rodríguez et al., (2009) con modificaciones. Para extraer las poliaminas libres, seis tallos de planta sometidos durante seis días al tratamiento fueron congelados en  $\text{N}_2$  líquido y homogeneizados. El homogenato (50 mg) fue resuspendido en 150  $\mu\text{L}$  de PCA 5% (v/v), incubado en hielo por 30 min y centrifugado a 15000 g (15 min). El precipitado fue descartado y el sobrenadante se guardó a -20 °C. Para la dansilación, 60  $\mu\text{L}$  de sobrenadante fueron adheridos a 6  $\mu\text{L}$  de heptanodiamina 0.1 mM (estándar interno, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA), 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturado y 75  $\mu\text{L}$  de cloruro de dansilo-acetona 1% (p/v). Luego de 90 min a 70 °C en oscuridad, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de prolina 10% (p/v) para detener la reacción. Las poliaminas dansil-derivadas fueron extraídas con 200  $\mu\text{L}$  tolueno. La fase orgánica (175  $\mu\text{L}$ ) se evaporó en vacío y la muestra fue resuspendida en 40  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. Las poliaminas dansil-derivadas fueron separadas por HPLC (HPLC, Waters 1525 Binary HPLC Pump, Milford, MA, USA) con una columna de fase reversa Sephasil C18 (Amersham Pharmacia) y detectadas con un espectrofluorómetro (Waters 2475, detector de fluorescencia Multi  $\lambda$ ). La mezcla solvente se obtuvo con un flujo de 1.5  $\text{mL min}^{-1}$  como sigue: 0-4.5 min, acetonitrilo: $\text{H}_2\text{O}$  70:30 v/v; 4.5-9 min, acetonitrilo 100; 9-15 min, acetonitrilo: $\text{H}_2\text{O}$  70:30 v/v. El área de los picos fue integrada, normalizada con heptanodiamina e interpolada en una curva de calibración estándar de poliaminas.

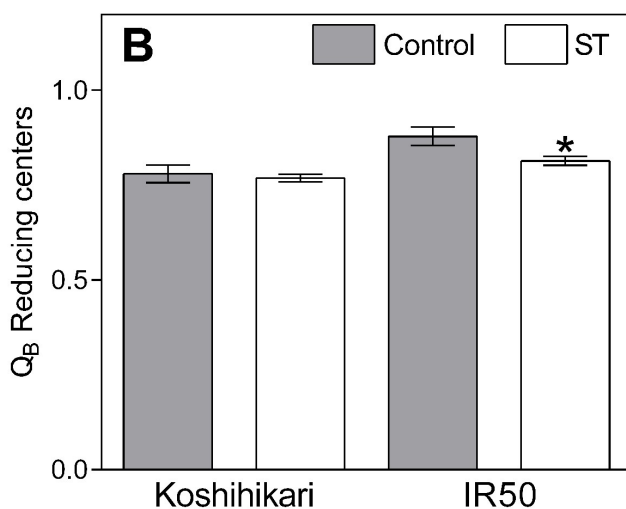
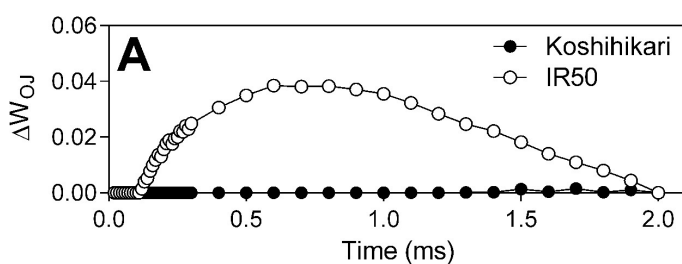
#### **5.3.7 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con el paquete de software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2016).

## 5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.4.1 El cultivar tolerante puede mantener un aparato fotosintético sano

Un posible daño del aparato fotosintético causado por el estrés por ST podría haber llevado a un desacople e inactivación del complejo liberador de oxígeno (OEC). Esto se evidenció con la subregulación de transcritos a tiempos cortos en el tallo (capítulo 3) y la subregulación de proteínas en la zona de elongación de la cuarta hoja (capítulo \$) que forman parte del OEC de IR50. El OEC está a cargo de la oxidación del agua a  $O_2$  molecular en el PSII y es la estructura que más transforma energía en el cloroplasto (Shutilova, 2010). El desacoplamiento del OEC puede ser identificado por la presencia de una pendiente positiva de la banda K mediante la prueba no invasiva OJIP (Chen et al., 2014; Gururani et al., 2015). Una prueba JIP a corta exposición a ST (24 h) determine que solamente IR50 presentaba la banda K con una pendiente incrementada (Figura 5-1 A). Chen et al., (2014), también indicaron que el desacoplamiento del OEC es acompañado por la reducción de los centros de reacción del PSII capaces de reducir a  $Q_B$ . Esta fracción de centros reactivos, también la fracción más activa en la oxidación del agua por el OEC, es denominada centros reductores de  $Q_B$  (Mamedov et al., 2000). La prueba OJIP también indicó que los



centros reductores de  $Q_B$  disminuían solamente en IR50 bajo condiciones de ST respecto de la condición control (Figura 5-1 B).

**Figura 5-1.** Determinación del desacoplamiento del complejo liberador de oxígeno y de los centros reductores de quinona B. Las plántulas fueron crecidas bajo condiciones OT y ST durante 24 h. El desacoplamiento del OEC y los centros reductores de  $Q_B$  se determinó por medio de la prueba no invasiva de OJIP. **A)** El desacoplamiento del OEC se

determine por la presencia de una banda K con pendiente positiva determinada como las diferencias cinéticas de  $\Delta W_{OJ}$ . **B)** Los centros reductores de  $Q_B$  se calcularon en los 10 segundos en oscuridad posterior al paso P por medio de un segundo pulso de luz roja saturante durante 1 s. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los tratamientos (T test;  $P < 0.05$ ;  $n = 9$ ).

#### **5.4.2 Consecuencias sobre la ultraestructura de las células del mesófilo**

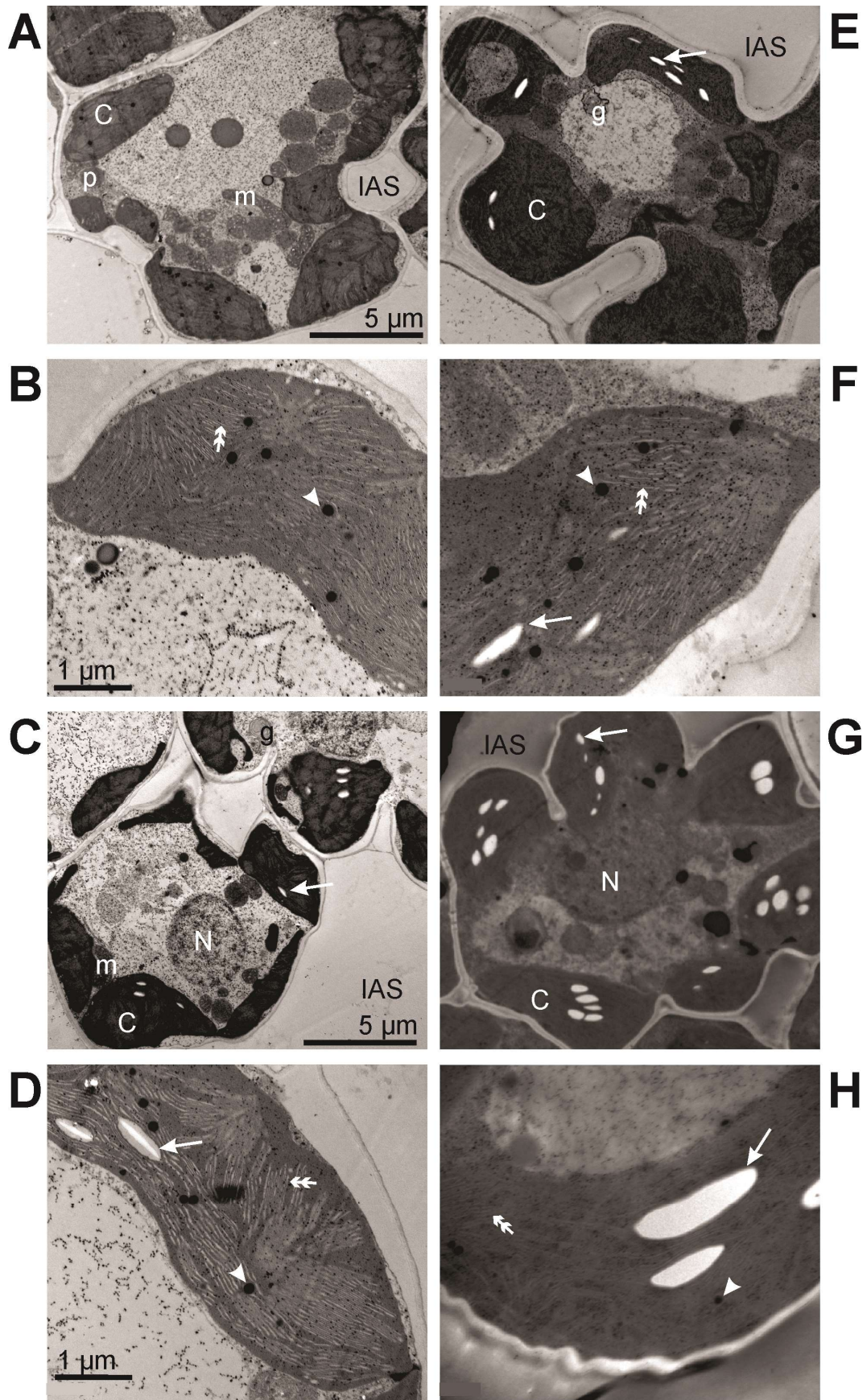
Hojas totalmente expandidas de Koshihikari e IR50 tratadas durante 10 o 24 d bajo condiciones OT o ST fueron cortadas y secciones ultrafinas se obtuvieron, 5 h luego de que el fotoperiodo haya comenzado. Las células del mesófilo de la parte apical de la hoja fueron observadas en un TEM con el objetivo de describir los cambios ultraestructurales en respuesta a exposiciones largas a ST en el estadio de plántula. Bajo condiciones óptimas luego de 10 d, las micrografías de ambos cultivares revelaron células sanas con muchas mitocondrias regulares, ovales o elongadas y densas capas de cloroplastos a lo largo de la pared celular (Figuras 5-2 A y 5-3 A). Los cloroplastos estaban bien desarrollados, no mostraban gránulos de almidón, los tilacoides de la grana estaban muy compactados, y se visibilizaron pequeños plastoglobulos entre los tilacoides (Figuras 5-2 B y 5-3 B). Luego de 24 d bajo el tratamiento OT, ambos cultivares mostraron células normales similares a las visualizadas a 10 d, con la diferencia de que pequeños gránulos de almidón aparecieron en los cloroplastos (Figuras 5-2 C y D, y Figuras 5-3 C y D). Las células de las plántulas de Koshihikari que crecieron durante 10 d en condiciones de estrés por ST (Figura 5-2 E) también eran saludables con organelas como las mitocondrias y los peroxisomas ubicadas cerca de los cloroplastos a lo largo de la célula. En contraste con lo encontrado a 10 d en condiciones OT, los cloroplastos mostraban algunos pequeños gránulos de almidón y la grana tenía generalmente menos discos tilacoides, pero la presencia de plastoglobulos fue similar a en la condición OT (Figura 5-2 F). El cultivar sensible IR50 mostró células saludables a 10 d bajo el estrés por ST (Figura 5-3 E) y cloroplastos con grana muy compacta. A diferencia de las células visualizadas en condiciones OT o las descritas en Koshihikari, muchos gránulos grandes de almidón fueron encontrados en los cloroplastos de este cultivar (Figura 5-3 E y F). Luego de 24 d bajo condiciones ST, las células de Koshihikari contenían organelas densamente empaquetadas y se presentaban gránulos de almidón de tamaño medio, la grana contenía un pequeño número de discos tilacoides y el estroma estaba oscurecido (Figuras 5-2 G y H). En cambio, las células de IR50 también mostraban organelas densamente empaquetadas pero sus cloroplastos contenían

muchos gránulos de almidón de gran tamaño y un estroma oscurecido (Figuras 5-3 G y H).

Las especies que están adaptadas al estrés por frío generalmente muestran organelas densamente empaquetadas y clústeres de plastoglobulos, como se describió en el caso de Koshihikari bajo ST, para que las interacciones metabólicas entre organelas puedan suceder y se evite el gasto de energía en el transporte de largas distancias dentro de la célula (Lütz, 2010; Gielwanowska et al., 2014; Gielwanowska et al., 2015). La presencia de más grana con menor cantidad de tilacoides y la disminución de granas grandes también fue descrita en una variedad de trigo tolerante a frío (Venzhik et al., 2013). Esto podría estar relacionado con una estrategia para evitar el daño dado que los tilacoides de la grana son más sensibles que los tilacoides del estroma y, por lo tanto, son los primeros en padecer desintegración potenciada por la presencia de ROS que se produce en células bajo estrés (Holá et al., 2008). Además, los cloroplastos de Koshihikari tenían grana más densamente empacada en respuesta a ST, posiblemente esto contribuya a una mayor capacidad fotosintética dado que ha sido demostrado que el PSII se encuentra de manera exclusiva en las regiones más comprimidas de la grana (Armond and Arntzen, 1977; Daum et al., 2010).

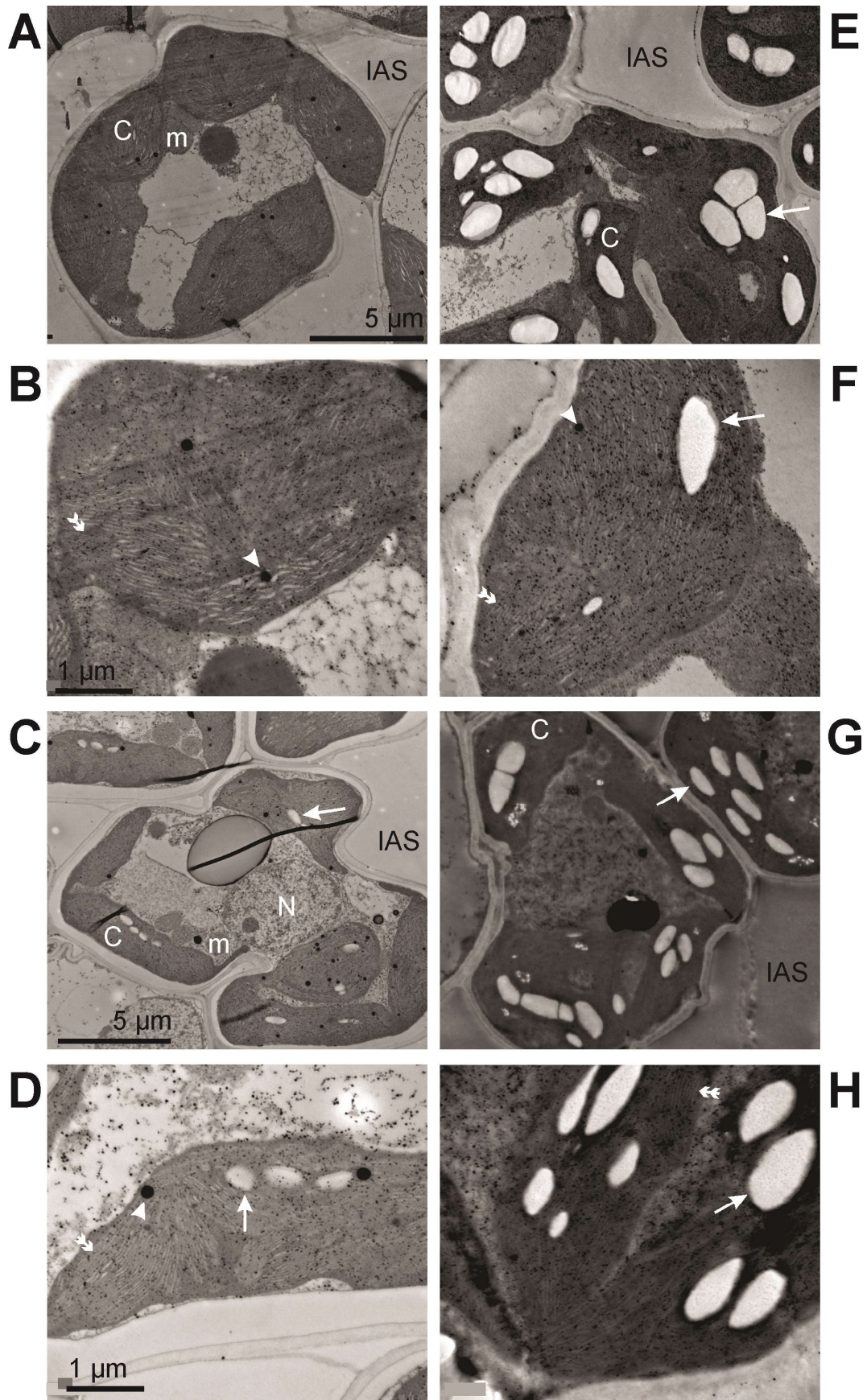
Las plantas deben alcanzar un balance entre la asimilación de carbón, su almacenamiento y el crecimiento. Los cortes ultrafinos mostraron que a largo plazo ambos cultivares acumulaban almidón pero IR50 mostró más y más grandes gránulos de almidón. Las especies sensibles al estrés por frío usualmente acumulan gránulos de almidón mientras que aquellas que pueden tolerar este estrés reducen el tamaño de los gránulos y por último los eliminan luego de largas exposiciones, probablemente debido a un eficiente transporte e hidrólisis de los productos fotosintéticos (Ma et al., 1990; Mostowska, 1999; Peng et al., 2015). Además, otros reportes mostraron que el arroz sometido a *chilling* durante 24 h también acumulaba múltiples grandes gránulos de almidón mientras que una mutante deficiente en fitocromo-B tolerante al estrés no los acumulaba y mostraba un mayor rendimiento del PSII bajo el estrés (Yang et al., 2013). La disponibilidad de almidón en las hojas es esencial para el crecimiento de la planta ya que provee fuente de carbón durante la noche cuando la planta no puede fotosintetizar pero todavía necesita mantener su crecimiento (Smith and Stitt, 2007). Un estudio realizado en hojas de maíz reveló que las líneas que podían mantener altas velocidades de crecimiento (LER) durante mayores periodos de tiempo ( $T_{LE}$ ) tenían un balance modificado entre la fuente de carbono y el crecimiento en comparación con

otras líneas dado que correlacionaban con genes involucrados en la biosíntesis de carbono (Baute et al., 2015; Baute et al., 2016). Además,  $T_{LE}$  fue el parámetro principal que podía distinguir entre cultivares de arroz tolerantes y sensible en la determinación del largo final de la cuarta hoja descrita en el capítulo 2 de esta Tesis. Por lo tanto, los mejores valores de LER y  $T_{LE}$  de Koshihikari en comparación con IR50 podrían estar asociados con un mayor manejo de los carbohidratos que son utilizados durante el día para crecer y la síntesis de almidón que provee fuente de carbono en la noche subsecuente.





**Figura 5-2.** Micrografías electrónicas de transmisión de secciones transversales de una hoja completamente expandida de Koshihikari sometida a temperaturas óptimas (A, B, C, y D) o temperaturas subóptimas (E, F, G, y H) durante 10 d (A, B, E, y F) o 24 d (C, D, G, y H). La barra de escala de las imágenes de la izquierda (A, B, C, y D) también corresponde a sus vecinos respectivos de la derecha (E, F, G, y H). Los plastoglobulos se indican por puntas de fleche, los gránulos de almidón por flechas y los tilacoides de la grana por doble puntas de flecha. Cloroplastos (C), mitocondria (m), peroxisomas (p), núcleo (N) y aparato de Golgi (g) se encuentran localizados en el interior de las células. Los espacios intercelulares (IAS) también se indican.



**Figura 5-3.** Micrografías electrónicas de transmisión de secciones transversales de una hoja completamente expandida de IR50 sometida a temperaturas óptimas (A, B, C, y D) o temperaturas subóptimas (E, F, G, y H) durante 10 d (A, B, E, y F) o 24 d (C, D, G, y H). La barra de escala de las imágenes de la izquierda (A, B, C, y D) también corresponde a sus vecinos respectivos de la derecha (E, F, G, y H). Los plastoglobulos se indican por puntas de fleche, los gránulos de almidón por flechas y los tilacoides de la grana por doble puntas de flecha. Cloroplastos (C), mitocondria (m), peroxisomas (p), núcleo (N) y aparato de Golgi (g) se encuentran localizados en el interior de las células. Los espacios intercelulares (IAS) también se indican.

#### **5.4.3 El efecto del estrés por temperaturas subóptimas sobre la composición de lípidos**

La composición de lípidos de los cultivares fue analizada luego de 6 d en condiciones OT y ST. El análisis reveló que solo los ácidos grasos saturados totales disminuyeron en el cultivar sensible bajo condiciones ST respecto con el control (Tabla 5-1) pero no se observaron cambios respecto de los ácidos grasos insaturados totales. Sin embargo, Koshihikari no mostró ningún cambio en los ácidos grasos saturados o insaturados. Estos resultados están parcialmente en desacuerdo con el trabajo de Pereira da Cruz et al. (2010), en donde no se evidenciaron cambios en respuesta a un tratamiento a 10 °C en la proporción de ácidos grasos saturados en un cultivar de arroz tolerante mientras que estos se vieron incrementados en el caso de un cultivar sensible. Además, múltiples autores reportaron que la tolerancia del arroz al frío está relacionada con un incremento en ácidos grasos insaturados (Majumder et al., 1989; Bertin et al., 1998; Maeda et al., 1999). Se ha encontrado una relación positiva entre la composición de ácidos grasos insaturados en la membrana cloroplástica y la tolerancia fotosintética en *chilling* (Peoples et al., 1978; Ariizumi et al., 2002; Zhu et al., 2007).

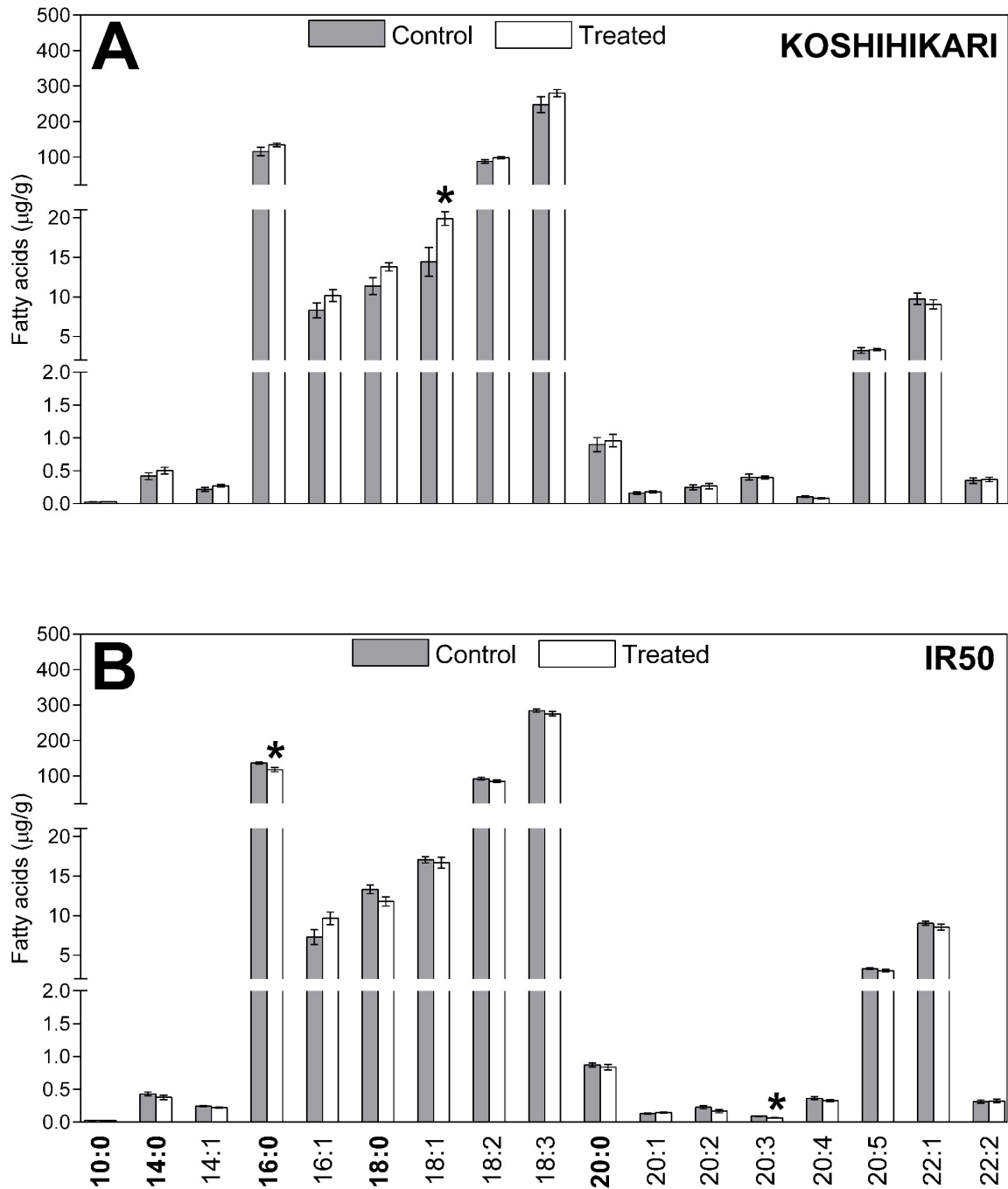
**Tabla 5-1.** Contenido de ácidos grasos saturados e insaturados totales. Las plántulas fueron crecidas en condiciones OT y ST durante 6 días. El contenido de ácidos grasos se calculó a partir de los datos del análisis lipidómico. Los números expresan  $\mu\text{g}$  por g de peso fresco. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos (t-test;  $P < 0.05$ ;  $n = 5$ ).

	OT	ST
Ácidos grasos saturados		
<b>Koshihikari</b>	128 $\pm$ 32	149 $\pm$ 14
<b>IR50</b>	151 $\pm$ 10	<b>131 <math>\pm</math> 15 *</b>
Ácidos grasos insaturados		
<b>Koshihikari</b>	372 $\pm$ 74	422 $\pm$ 32
<b>IR50</b>	417 $\pm$ 24	397 $\pm$ 25

Sin embargo, cambios en algunos ácidos grasos particulares fueron encontrados (Figura 5-4). A pesar de no encontrar cambios en el total de ácidos grasos insaturados en Koshihikari, el contenido del ácido graso insaturado ácido oleico (18:1) incrementó un 30% en respuesta a ST (Figura 5-4 A). Las membranas tilacoides del arroz son ricas en ácido oléico (Jing et al., 2006) con lo cual el incremento descrito podría estar contribuyendo con la conservación de la capacidad de fotosíntesis por medio del mantenimiento de la fluidez de membrana a tiempos largos. Este resultado por lo tanto concuerda con el análisis realizado en el capítulo 1 en donde se encontró un mayor desempeño del PSII en plantas de Koshihikari crecidas bajo ST durante 24 d que en plantas de IR50 bajo las mismas condiciones.

Por otro lado, IR50 mostró una reducción en ácido eicosatrienoico (20:3), detectado en trazas (0.02% del total de ácidos grasos), y del ácido palmítico (16:0; Figura 5-4 B). El ácido palmítico ha sido reportado como el ácido graso saturado más importante y uno de los más abundantes ácidos grasos en el arroz (Bertin et al., 1998; Ariizumi et al., 2002; Cheah et al., 2013). La reducción del ácido palmítico (Figura 5-4 B) en IR50 podría estar relacionada con la sobrerregulación de DEGs de la vía de degradación de ácidos grasos dentro de las vías de  $\beta$ -oxidación y de oxidación de alcanos (capítulo 3). Lo que es más, por medio de la vía de la  $\beta$ -oxidación puede obtenerse energía extra para mantener la homeostasis celular como ha sido descrito para mutantes de *Arabidopsis* carentes de almidón bajo oscuridad extendida (Kunz et al., 2009). Además, el ácido palmítico es uno de los ácidos grasos más importantes de las membranas tilacoides junto con el oleico, esteárico, linoleico y linolenico (Jing et

al., 2006; Ping et al., 2006) con lo que la degradación del ácido palmítico podría tener alguna implicancia negativa en la estabilidad de las membranas tilacoides a tiempos largos.



**Figura 5-4.** Análisis lipídico. Las plántulas fueron crecidas bajo condiciones OT y ST durante 6 d. La composición de ácidos grasos en Koshihikari (A) e IR50 (B) fue determinada en vástagos por GC/MS. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos (T test;  $P < 0.05$ ;  $n = 5$ ).

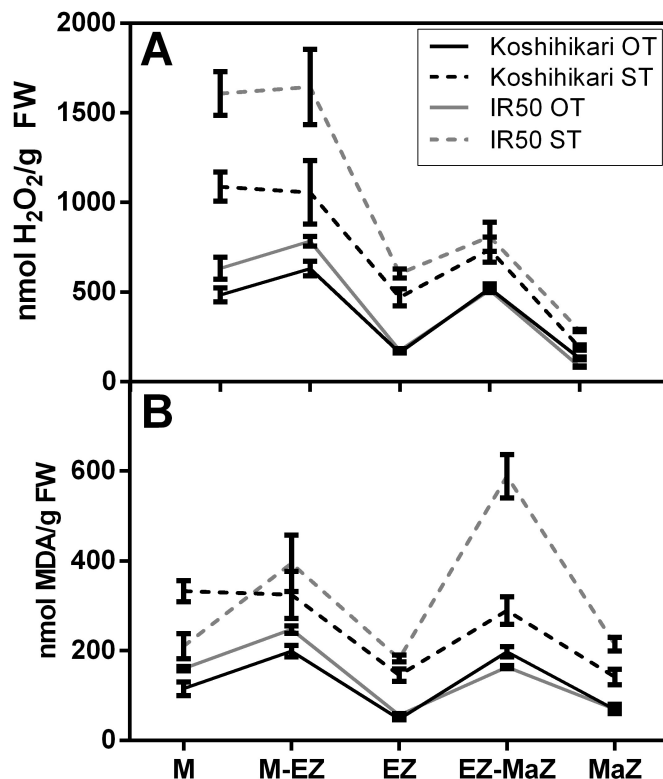
#### 5.4.4 El sistema redox

Una consecuencia del metabolismo aeróbico es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; Sharma et al., 2012). En el capítulo 4, el análisis proteómico mostró que Koshihikari e IR50 modificaron la abundancia de algunas proteínas relacionadas con la respuesta redox. Koshihikari incrementó las proteínas tioredoxina y peroxiredoxinas en la zona de elongación y una peroxiredoxina en el meristema, mientras que IR50 sólo incrementó una tioredoxina en ambas zonas (Tabla 4-2). Además, ambos cultivares disminuyeron proteínas de ascorbato peroxidasa (APXs) citosólicas en ambas zonas. En general, se encontró una respuesta diferenciada de los cultivares y las zonas en cuanto al sistema redox en respuesta a ST en el estudio proteómico. Para este análisis se cosechó la zona de crecimiento de la cuarta hoja durante su estado estacionario de crecimiento y muestras del meristema, zona de elongación, zona madura y las zonas de transición entre ellas fueron tomadas. En cada zona se cuantificaron diferentes metabolitos y actividades enzimáticas relacionadas con el sistema redox y luego se realizó un análisis ANOVA de tres vías con los factores *cultivar*, *tratamiento* y *zona* testeando además la interacción de estos factores. Un test *post-hoc* Duncan fue utilizado cuando las interacciones se encontraron positivas. Todos los detalles del análisis estadístico fueron omitidos en las figuras debido a su extensibilidad y pueden ser encontrados en la Tabla Suplementaria 13.

El peróxido de hidrógeno representa un indicador reconocido del estrés oxidativo de las células que es generado por el fotosistema y otros procesos primarios que suceden en la célula (Shulaev and Oliver, 2006). Se cuantificó el peróxido de hidrógeno en cada zona de la cuarta hoja para verificar si el ST producía un incremento de los niveles de ROS y si el mismo estaba localizado en una zona en particular de los cultivares (Figura 5-5 A). No se encontraron diferencias entre los cultivares cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió en condiciones OT y sólo pequeñas diferencias aparecieron entre las zonas. Cuando las plantas se sometieron al estrés por ST, las concentraciones de este metabolito se incrementaron en todas las zonas, con la excepción de la zona madura (MaZ). Además, grandes diferencias fueron encontradas entre los cultivares en la zona del meristema (M) y la transición entre el meristema y la zona de elongación (M-EZ), siendo mayores en el cultivar sensible que en el tolerante. Si la producción y remoción de ROS no está estrictamente controlada puede ocurrir daño oxidativo y biomoléculas de importancia pueden verse afectadas (Sharma et al., 2012). Se midió aquí la peroxidación lipídica por medio de la detección de un metabolito secundario, el malondialdehído (MDA), aceptado generalmente como un

buen marcador del estrés oxidativo (Shulaev and Oliver, 2006). Los niveles de MDA no observaron diferencias grandes entre los cultivares y las zonas bajo las condiciones OT, pero se vieron incrementados en respuesta al estrés en ambos cultivares. IR50 mostró mayores valores en la zona de transición entre la zona de elongación y la madura (EZ-MaZ) en comparación con Koshihikari (Figura 5-5 B). En general, estrés oxidativo y, en consecuencia, daño oxidativo estuvo presente en respuesta a ST en ambos cultivares y mostró estar localizado en zonas diferentes de la hoja con mayor impacto en el cultivar sensible que en el tolerante. A pesar de que las ROS son necesarias para la división (Livanos et al., 2012) y la expansión celular (Schmidt et al., 2016) para disparar vías de señalización, su desequilibrio puede causar daño celular, como se ha descrito aquí. En el meristema, este daño causado por ROS ha sido asociado con interferencias en la dinámica de la membrana nuclear, desorganización del citoesqueleto de tubulina, e interferencias con los movimientos cromosómicos (Livanos et al., 2012). Estos resultados concuerdan con la subregulación de proteínas relacionadas con la unión a DNA, estructura de cromatina e histonas (capítulo 4) y el hecho de que la velocidad de elongación de la hoja estaba fuertemente reducida como consecuencia de una menor velocidad de producción celular (capítulo 2). La diferencia encontrada entre  $H_2O_2$  y MDA podría estar asociada con el hecho de que el MDA (daño) es relativamente permanente y las células de la parte basal de la hoja se mueven a regiones más distantes llevando consigo el daño incurrido en la región basal por los altos niveles de  $H_2O_2$ .

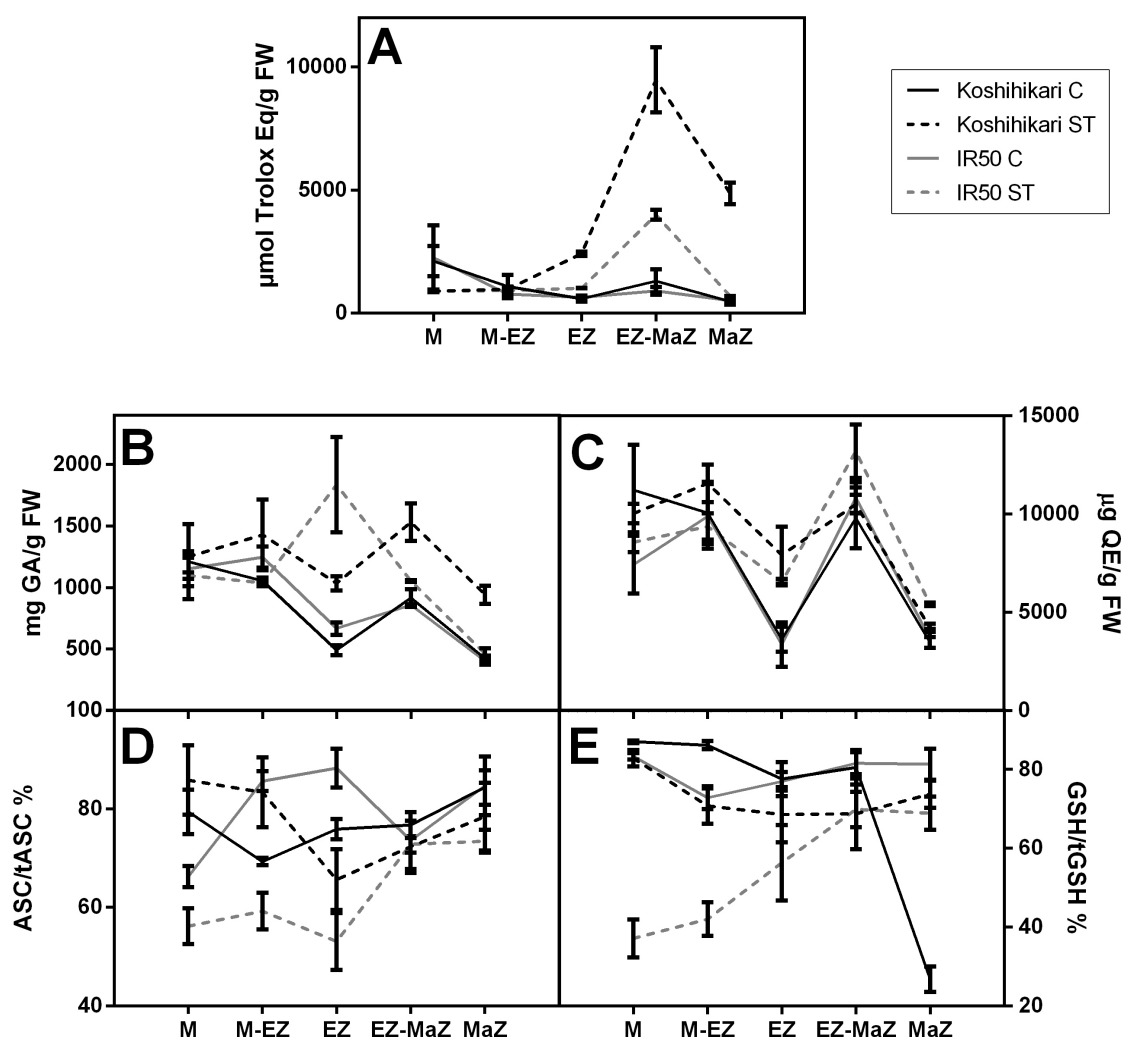
**Figura 5-5.** Mediciones de indicadores de estrés oxidativo a lo largo de la zona de crecimiento de dos cultivares de arroz contrastantes en condiciones OT y ST. Las concentraciones de los metabolitos se determinaron en cada parte de la zona de crecimiento de la cuarta hoja: M, meristema; M-EZ, transición entre M y la zona de elongación; EZ, zona de elongación; EZ-MaZ, transición entre EZ y la zona madura;



MaZ, zona madura. La leyenda en la figura A también corresponde a la figura B. **A)** contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). **B)** Contenido de malondialdehído (MDA). Los datos son promedios  $\pm$  EE (n=3).

Los niveles de ROS necesitan ser controlados por la planta con lo cual estrategias eficientes antioxidantes son usualmente disparadas incluyendo tanto sistemas no-enzimáticos como enzimáticos (Sharma et al., 2012). Para medir el poder total no-enzimático, la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP; Benzie and Strain, 1996) fue cuantificada en cada zona (Figura 5-6 A). En condiciones control, no se evidenciaron diferencias entre los cultivares o las zonas. Sin embargo, un incremento en la zona de transición EZ-MaZ apareció en respuesta al estrés en ambos cultivares, aunque fue mayor en el cultivar tolerante que también evidenció incrementos en las zonas EZ y MaZ. Entre los sistemas de remoción no-enzimáticos, los polifenoles fueron descritos como antioxidantes potentes que representan la mayor clase de moléculas antioxidantes de las plantas (Sharma et al., 2012) con lo cual también fueron cuantificados en este ensayo (Figura 5-6 B). La cantidad total de polifenoles disminuyó a lo largo de la zona de crecimiento desde el M hacia la MaZ en ambos cultivares sin diferencias entre ellos. Cuando se los sometió al estrés, los polifenoles se vieron incrementados en Koshihikari comparados con la condición OT con valores similares a lo largo de la zona de crecimiento mientras que en IR50 sólo se incrementaron en la EZ. Los flavonoides, una clase particular de polifenoles que participa en el control del estrés por ROS (Di Ferdinando et al., 2012), mostraron el mismo patrón entre los cultivares en condiciones OT con menores cantidades en EZ y MaZ (Figura 5-6 C). En respuesta a ST, los flavonoides estaban incrementados en M-EZ y EZ en Koshihikari y en EZ y EZ-MaZ en IR50 mostrando perfiles similares entre los cultivares. En general, flavonoides y polifenoles jugaron un rol activo desde la EZ hasta la MaZ en ambos cultivares aunque no explicaron por complete las diferencias encontradas entre los cultivares en el ensayo de FRAP (Figura 5-6 A). El análisis transcriptómico ya presenta la sobrerregulación de múltiples DEGs relacionados en los flavonoides en la respuesta al estrés, a pesar de que esto fue a nivel de vástago entero y a cortas exposiciones al estrés (capítulo 3). La presencia de metabolitos secundarios antioxidantes en la parte de la hoja en donde las células están en proceso de diferenciación o ya maduras acuerda con otro análisis en el cual proteínas relacionadas con metabolitos secundarios estaban incrementadas hacia la parte madura de la hoja de maíz (Majeran et al., 2010). Además, células en diferenciación o maduras son capaces de producir metabolitos secundarios, no así células del meristema que están enfocadas únicamente en la división.





**Figura 5-6.** Mediciones de antioxidantes no-enzimáticos a lo largo de la zona de crecimiento de dos cultivares contrastantes en condiciones OT y ST. Las concentraciones de los metabolitos se determinaron en cada parte de la zona de crecimiento de la cuarta hoja: M, meristema; M-EZ, transición entre M y la zona de elongación; EZ, zona de elongación; EZ-MaZ, transición entre EZ y la zona madura; MaZ, zona madura. La leyenda para todos los gráficos se encuentra en la esquina superior derecha de la figura. **A)** Capacidad reductora férrica del plasma (FRAP). **B)** Contenido de polifenoles como equivalentes de ácido gálico (GA). **C)** Contenido de flavonoides como equivalentes de quercitina (QE). **D)** Relación entre el acorbato reducido (ASC) y ascorbato total (tASC). **E)** Relación entre el glutatión reducido (GSH) y el glutatión total (tGSH). Los datos son promedios  $\pm$  EE (n=3).

El ascorbato (ASC) y el glutatión (GSH) son antioxidantes de bajo peso molecular que juegan un rol en la eliminación de ROS. Cuando los niveles son suficientemente altos, el balance entre las formas reducidas de estas moléculas, ASC y GSH, y las formas oxidadas, monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA) para ASC

y glutatión disulfuro (GSSC) para GSH, es central para mantener el estado redox celular (Sharma et al., 2012). En este reporte se midieron las relaciones entre los contenidos de ASC y GSH antes (ASC, GSH) y después de su reducción (tASC, tGSH; Figuras 5-6 D y E). En condiciones de OT los cultivares no mostraron grandes diferencias entre ellos o entre las zonas, con la excepción de MaZ de Koshihikari que evidenció valores de GSH/tGSH% menores que el resto y de EZ de IR50 que mostró valores un poco mayores de ASC/tASC% que el resto. Cuando se sometió a los cultivares a ST se encontraron grandes diferencias entre ellos, mientras que Koshihikari no tuvo mayores cambios a excepción de un aumento de GSH/tGSH% en MaZ, IR50 disminuyó marcadamente los porcentajes ASC/tASC% y GSH/tGSH% desde M hasta EZ mostrando los valores más bajos cerca del meristema. Mientras que el ASC estimula la división celular mediando la transición hacia la fase S, sus formas oxidadas bloquean el ciclo celular (Potters et al., 2002). A pesar de que GSH fue también relacionado con la división celular, su contribución no es clara. En general, la respuesta de ASC y GSH y sus moléculas oxidadas en IR50 podría estar relacionado con el mayor efecto que produce ST en la producción celular que reduce consecuentemente el largo final de la hoja, mientras que Koshihikari se ve menos afectado por este fenómeno (capítulo 2).

Además de los metabolitos antioxidantes no-enzimáticos, el estado redox de la hoja depende de la actividad de las enzimas reguladoras de redox como las superóxidos dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR), glutaredoxinas (GRx), y tioredoxinas (TRx) que fueron aquí estudiadas (Sharma et al., 2012; Kaushik and Roychoudhury, 2014). SOD cataliza la dismutación del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) al oxígeno ( $O_2$ ) y al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y constituye la primer línea de defensa contra ROS (Gill and Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012). En condiciones OT, SOD mostró baja actividad en todas las zonas de ambos cultivares (Figura 5-7 A). El cultivar sensible no mostró respuesta alguna cuando se lo sometió a condiciones ST, mientras que Koshihikari incrementó la actividad de SOD en M y en la zona de transición M-EZ. La CAT es indispensable para la detoxificación de ROS en condiciones de estrés dado que posee un número de recambio rápido (Gill and Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012). Esta enzima mostró un patrón similar al encontrado para SOD, sin diferencias entre las zonas o cultivares en las condiciones OT pero con gran aumento de su actividad en M y M-EZ de Koshihikari en respuesta a ST (Figura 5-7 B). GPX, un grupo de enzimas que utiliza GSH para reducir el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos (Gill and

Tuteja, 2010), también mostró el mismo patrón que SOD y CAT (Figura 5-7 C). POX constituye una amplia familia de enzimas que usualmente tienen como sustrato óptimo el peróxido de hidrógeno y por lo tanto están generalmente relacionadas con la eliminación de ROS (Smith and Veitch, 1998; Sharma et al., 2012). La actividad POX fue similar en todas las zonas y en ambos cultivares en condiciones OT (Figura 5-7 D). Cuando se sometieron los cultivares a condiciones ST, la actividad POX se encontró incrementada en M y M-EZ de ambos cultivares. Sin embargo, Koshihikari mostró mayores valores que IR50 en esas zonas y además incrementó la actividad de esta enzima en MaZ.

Las relaciones de ASC/tASC y GSH/tGSH descritas arriba son reguladas por el ciclo ASC-GSH que también detoxifica peróxido de hidrógeno y por lo tanto es crucial para la homeostasis redox (Gill and Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012). Este ciclo puede describirse por las actividades de APX, MDHAR, DHAR y GR que fueron aquí medidas (Figuras 5-7 E, F, G, y H). La actividad APX mostró el mismo perfil que la actividad de SOD, CAT y GPX (Figura 5-7). A pesar de que el análisis proteómico mostró una APX citosólica subregulada en M y EZ, su actividad se encontró en realidad incrementada en respuesta al estrés en M de Koshihikari. No se encontraron diferencias en la actividad MDHAR en cuanto a zonas o cultivares bajo condiciones OT, mientras que en el estrés por ST esta actividad se vio ampliamente incrementada en M-EZ y MaZ de Koshihikari (Figura 5-7 F). La actividad DHAR presentó el mismo perfil para Koshihikari que el descripto para MDAHR en ambas condiciones, mientras que IR50 mostró un incremento de esta actividad desde M hasta MaZ en condiciones OT y ST sin diferencias entre tratamientos o zonas (Figura 5-7 G). La actividad GR mostró diferencias en condiciones OT en EZ-MaZ de Koshihikari pero de manera general no se encontraron grandes diferencias entre zonas o entre los cultivares en esta condición (Figure 5-7 H). En respuesta al estrés, solamente Koshihikari incrementó la actividad GR en las zonas M-EZ y MaZ, mientras que IR50 la incrementó levemente en MaZ.

Las peroxiredoxinas, tioredoxinas (TRx), y glutaredoxinas (GRx) también cumplen un rol importante en la eliminación de peróxido de hidrógeno como una alternativa al ciclo agua-agua en donde el ASC y el GSH se ven involucrados (Dietz et al., 2006; Miyake, 2010; Dietz, 2016). Se midieron aquí las actividades de GRx y TRx y no se encontraron grandes diferencias entre zonas o cultivares bajo condiciones OT más que un incremento leve en la actividad de GRx en MaZ de IR50 en ambas condiciones (Figuras 5-7 I y J). Bajo estrés por ST, la actividad GRx se encontró incrementada en

la transición M-EZ y en MaZ de Koshihikari con el mayor nivel en MaZ respecto a las otras zonas, mientras que IR50 no evidenció respuesta respecto de esta enzima (Figura 5-7 I). La actividad de TRx se vio altamente incrementada en M-EZ de Koshihikari en respuesta al estrés y no se vieron modificaciones en IR50 (Figura 5-7 J).

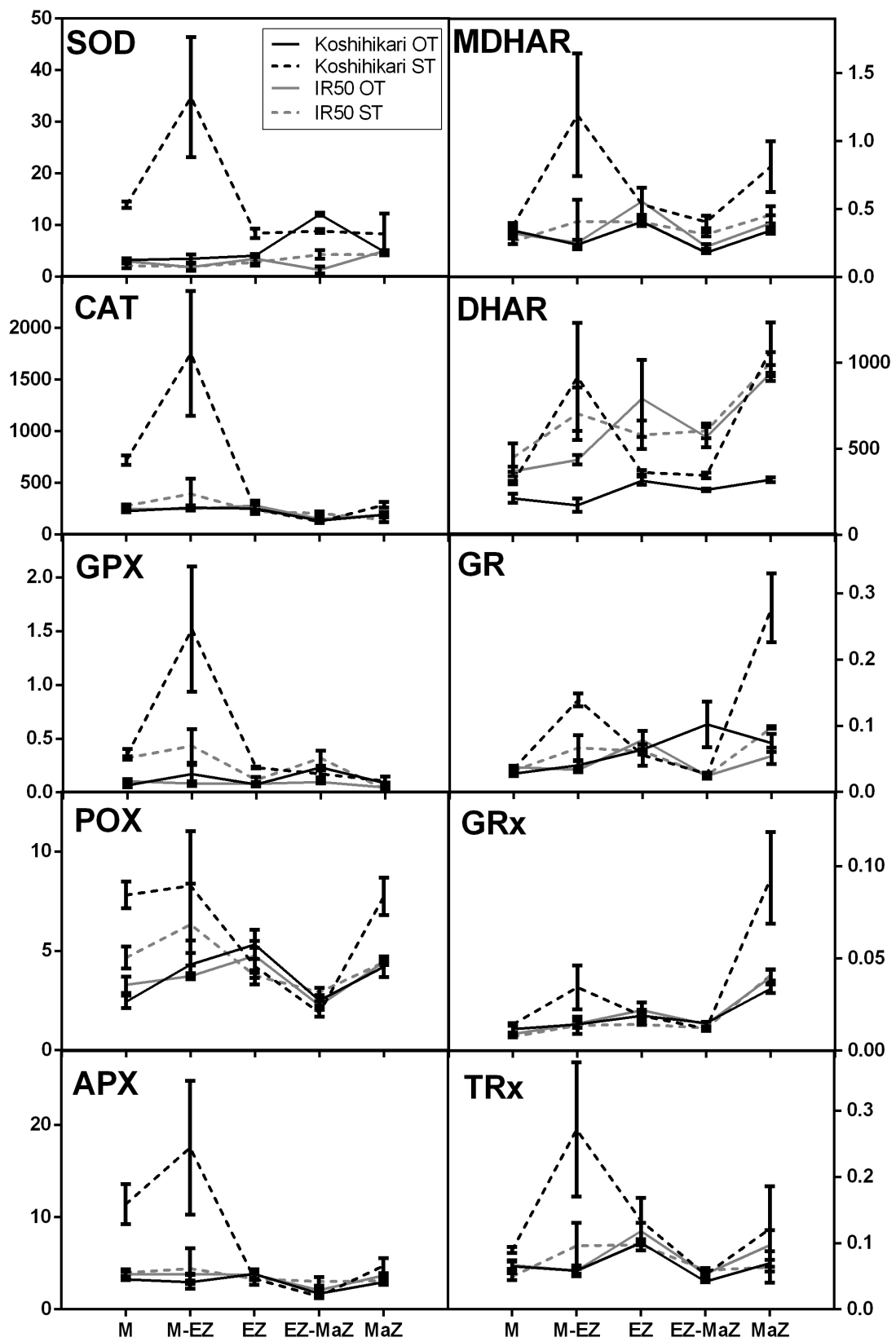
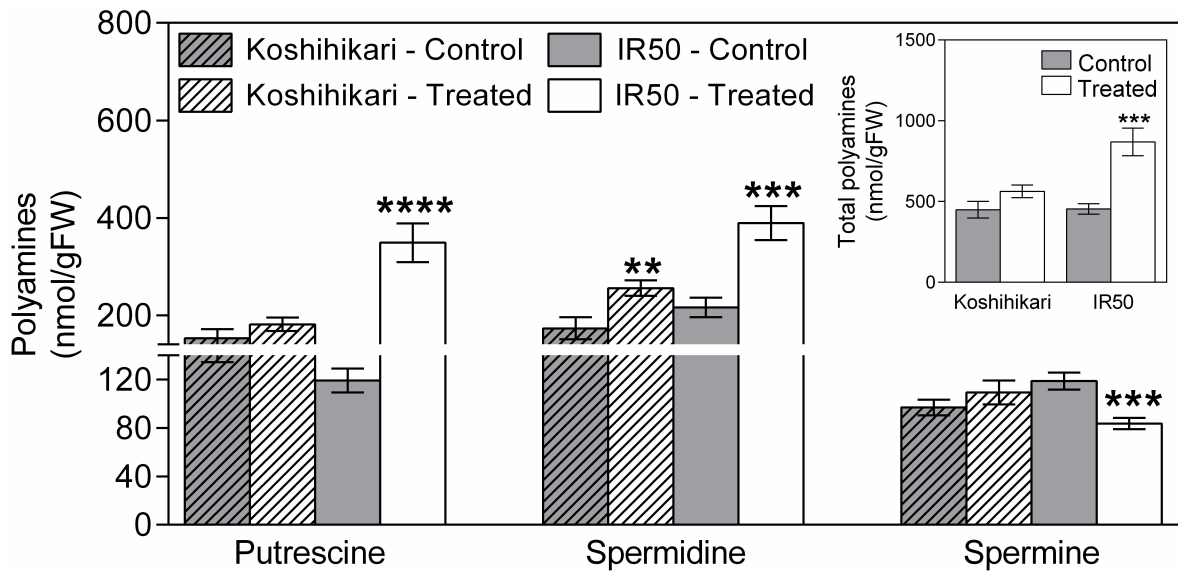


Figura 5-7. Medición de antioxidantes enzimáticos a lo largo de la zona de crecimiento de la hoja de dos cultivares de arroz contrastantes en condiciones OT y ST. Las actividades

enzimáticas fueron determinadas en cada parte de la zona de crecimiento de la cuarta hoja: M, meristema; M-EZ, transición entre M y la zona de elongación; EZ, zona de elongación; EZ-MaZ, transición entre EZ y la zona madura; MaZ, zona madura. Las mediciones son unidades de enzima UE.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. La enzima cuantificada es nombrada en cada panel: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutaredoxinas (GRx), tioredoxinas (TRx). La leyenda está en la figura de SOD y es la misma para el resto de las enzimas. Los datos son promedios ± EE (n=3).

#### **5.4.5 Poliaminas**

Las poliaminas fueron medidas a nivel del vástago completo en plántulas de Koshihikari e IR50 sometidas a condiciones OT y ST durante 6 días. El análisis indicó que IR50 incrementó en un 90% el contenido de poliaminas libres totales en condiciones ST en comparación con el control luego de 6 d (Figura 5-8). Este incremento fue atribuido principalmente a un incremento en putrescina (+190%) y espermidina (+80%). Sin embargo, el nivel de espermina disminuyó un 30%. En el caso de Koshihikari el nivel de espermidina se incrementó un 47% bajo condiciones ST respecto del control. Mientras algunos autores relacionan la tolerancia a *chilling* o *freezing* con altos niveles de putrescina (Nadeau et al., 1987; Lee et al., 1997; Cuevas et al., 2008), otros la han asociado con altos niveles de espermina (Bodapati et al., 2005) o espermidina (Kasukabe et al., 2004). Además, se ha sugerido que la función de las poliaminas en la tolerancia al estrés es participar en la homeostasis de ROS por medio de la inhibición de la auto-oxidación de los metales modificando el sistema antioxidante (Liu et al., 2015). Si este fuese el caso, entonces el incremento de poliaminas en IR50 sería parte de una respuesta a la acumulación de ROS mientras que Koshihikari no sufre tanto daño por ROS como IR50, como se describió arriba. Además, varios estudios mostraron que genotipos tolerantes a estreses abióticos usualmente acumulan más espermidina y espermina mientras que genotipos sensibles de la misma especie acumulan putrescina (Liu et al., 2015). Esto llevó a hipotetizar que dado que la espermidina y la espermina contienen un grupo amino adicional, estas poliaminas serían más eficientes en la ejecución e funciones de protección.



**Figura 5-8.** Determinación del contenido de poliaminas libres. Las plántulas fueron crecidas bajo condiciones óptimas y ST durante 6 días. La composición de poliaminas libres se determine por HPLC en vástagos. El recuadro muestra el total de poliaminas. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos (T test;  $P < 0.05$ ;  $n = 5$ ).

## 5.5 CONCLUSIONES

En este capítulo se investigaron algunas hipótesis que habían sido elaboradas en capítulos anteriores. El balance de carbohidratos mostró ser regulado de manera diferente en Koshihikari e IR50 a tiempos cortos, como indicó el análisis transcriptómico. A tiempos cortos luego se vio que Koshihikari incrementó el nivel de almidón a expensas de los azúcares libres. Sin embargo, a exposiciones más largas a ST las imágenes ultraestructurales mostraron que Koshihikari aparentemente mantuvo el almidón en el tiempo y que fue IR50 el cultivar que incrementó los gránulos en grandes cantidades causando un efecto negativo en la velocidad de crecimiento de la hoja como se describió más arriba. El principal efecto del estrés por ST podría ser sobre el aparato fotosintético dado que incluso a cortas exposiciones a estrés por ST el cultivar sensible ya mostraba efectos sobre el OEC que a largas exposiciones llevaban a peores consecuencias en el desempeño del PSII. Contrariamente, Koshihikari pudo mantener el equilibrio energético manteniendo la eficiencia a PSII. La habilidad de Koshihikari de proteger su aparato fotosintético podría deberse a las granas más compactas y las organelas densamente empacadas además de la capacidad de mantener la fluidez las membranas tilacoides por incremento del contenido de ácido oléico.

Como se describió en el análisis proteómico, hubo un balance del estado redox diferente en las zonas de la hoja en cada cultivar. A pesar de que el daño oxidativo estuvo presente en ambos cultivares, el cultivar sensible presentó niveles mucho más altos al someterlo a estrés por ST con distinto nivel de daño de acuerdo con la zona de crecimiento. Cuando se analizaron los sistemas antioxidantes Koshihikari respondió de manera más radical que IR50 en todos los aspectos. El poder antioxidante no enzimático se vio altamente incrementado en el cultivar tolerante, especialmente desde la zona EZ-MaZ hasta MaZ de acuerdo con el análisis de FRAP y siendo parcialmente atribuible a un incremento de polifenoles. El sistema enzimático fue mayormente activado en las zonas cercanas al meristema, en donde SOD, CAT, GPX, POX y el ciclo ASC-GSH mostraron altos niveles en Koshihikari en respuesta al estrés. Las actividades de GRx y TRx se vieron incrementadas en la transición M-EZ y en MaZ de Koshihikari en respuesta al estrés. De manera general, los datos indicaron que el poder antioxidante enzimático estuvo sobrerregulado para proteger la zona cercana al meristema, particularmente la transición M-EZ, mientras que el poder antioxidante no enzimático se vio sobrerregulado en la zona madura de la hoja.

Finalmente, las poliaminas mostraron estar diferentemente reguladas en los cultivares en respuesta al estrés. El contenido total de poliaminas incrementó en el cultivar sensible, sugiriendo un rol de protección de las poliaminas contra el daño oxidativo desatado por ST. Además, el análisis transcripcional mostró una sobrerregulación de DEGs relacionados con la biosíntesis de flavonoides y otros antioxidantes a tiempos cortos y de hecho la cantidad de polifenoles y flavonoides se incrementó en respuesta al estrés. Esto está de acuerdo con el incremento de poliaminas, particularmente en IR50. Lo que es más, el cultivar tolerante incrementó los niveles de espermidina, una poliamina con más grupos aminos que la putrescina y que ha sido relacionada con funciones protectoras.



## **CONCLUSIONES GENERALES**



Con el propósito de evaluar la hipótesis “*existe una respuesta diferencial a las temperaturas subóptimas entre las plántulas de cultivares de arroz (Oryza sativa L.) diferentes*” fueron estudiados por primera vez los efectos del estrés por temperaturas subóptimas (ST) en el estadio de plántula a diferentes niveles de complejidad en cultivares de arroz contrastantes. En esta sección se describen las principales características de la respuesta analizadas en esta Tesis y se discuten posibles mecanismos de tolerancias.

### ***Efectos de las temperaturas subóptimas en las plántulas de arroz***

El efecto de ST típico de cultivos de arroz del área sur-central de Entre Ríos, Argentina, fue estudiado en plántulas de arroz. Es de destacar que los ensayos realizados en cámaras de crecimiento que estaban bajo nuestro control fueron altamente comparables con los efectos observados a campo, señalando que el sistema diseñado en el laboratorio era capaz de predecir lo sucedido en el campo y por ende funciona como un sistema modelo del estrés.

La primera característica visible del estrés por ST a nivel de la respuesta de la planta entera fue la inhibición del crecimiento del vástago, descrito en el capítulo 1, y particularmente del crecimiento de la hoja, descrito en los capítulos 1 y 2. Incluso durante los primeros días de estrés el retraso del crecimiento de la hoja pudo ser detectado dado que las hojas tres y cuatro redujeron su velocidad de crecimiento en un 70-80%, y el efecto sobre la planta completa a tiempos largos pudo ser correlacionado con los resultados de campo. A nivel de la hoja, la reducción en un 41% del largo final de la cuarta hoja se atribuyó a una fuerte reducción en la velocidad de crecimiento de la hoja de un 76% que fue parcialmente compensada con un aumento en el tiempo de elongación en el que la hoja se elongaba. Dado que tal alta compensación por el tiempo de elongación de la hoja ha sido solo descrito en otros tipos de estreses por frío y no en otros estreses abióticos, podemos sugerir que es una característica particular del estrés por frío. El análisis cinemático del crecimiento de la hoja mostró que este efecto en la velocidad de elongación de la hoja se debió a una fuerte inhibición de la velocidad de producción celular causada por una fuerte inhibición de la velocidad de división celular, más que por una reducción en la expansión celular a pesar de que el largo final de las células se redujo en un 25%.

Los análisis proteómicos y del sistema redox realizados a lo largo de la zona de crecimiento de la cuarta hoja mostraron algunas características de cada zona que podrían estar relacionadas con los procesos que suceden localmente. En el

meristema, las proteínas relacionadas con el DNA, la estructura de la cromatina y las histonas se encontraban disminuidas como consecuencia de la reducida división celular, sugiriendo que una respuesta mayor a nivel transcripcional estaba siendo desatada. Por otro lado, el contenido de  $H_2O_2$  incrementó a lo largo de la zona de crecimiento en respuesta a ST mostrando los mayores valores en la zona del meristema. La presencia de ROS causó daño dado que el contenido de MDA también incrementó, lo que concuerda con la represión de la división celular en el meristema. Por lo tanto, los antioxidantes enzimáticos actuaron en la zona cercana al meristema para proteger esta zona y permitir la división celular.

Otros procesos fisiológicos también contribuyeron con la disminución del crecimiento del vástago en respuesta al estrés. Por ejemplo, el PSII estaba afectado luego de largos periodos bajo ST (10-24 d), como sugirieron los resultados de la prueba JIP. Esta prueba mostró que  $F_V/F_M$  y  $RC/ABS$ , dos parámetros relacionados con el desempeño del PSII, disminuyeron sus valores, mientras que la disminución de energía evidenciada por  $DI_0/RC$  se incrementó en respuesta al estrés mostrando un perjuicio del sistema fotosintético. Esto fue asociado con la reducción de la cantidad de clorofila activa que funciona como centro de reacción. El análisis transcripcional a tiempo corto de exposición (24 h) en el vástago completo mostró que cambios en la respuesta génica estaban sucediendo. El daño del PSII se evidenció a este nivel también ya que múltiples genes relacionados con la estructura del fotosistema se encontraban subregulados. En particular, genes relacionados con el complejo a cargo de la oxidación de las moléculas de agua, el OEC, estaban afectados. El daño del aparato fotosintético también se evidenció cuando plántulas de arroz crecidas en condiciones OT fueron sometidas a un rango de bajas temperaturas y mostraron como consecuencia una disminución en  $P_n$  y  $G_s$ .

El balance entre la fuente de carbón y su almacenamiento es estrechamente gestionado en la planta para asegurar su crecimiento. El análisis transcripcional mostró que los DEGs del metabolismo de carbohidratos estaban regulados luego de 24 h de estrés, sugiriendo que los mecanismos de control y señalización de carbohidratos estaban ya desatados para promover la modulación del crecimiento de la planta. Las plántulas de arroz indujeron enzimas de la degradación de almidón. Sin embargo, los cortes transversales de hoja analizados que se realizaron a mayores tiempos de exposición mostraron que el almidón comenzó a acumularse en grandes gránulos durante el día. Puede sugerirse que problemas en el transporte e hidrólisis de los productos fotosintéticos podría existir y no permitir que la planta utilice los

carbohidratos almacenados para crecer durante la noche. Sin embargo, también podría ser una respuesta de la planta para tratar de acumular almidón y guardar carbón para crecer cuando el estrés se haya terminado.

El metabolismo secundario también juega un rol importante en la respuesta al estrés dado que usualmente participa en el sistema de defensa de la planta (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). El análisis transcripcional a tiempo corto mostró una sobrerregulación de DEGs relacionados con metabolitos secundarios como los flavonoides. Cuando se analizó la cuarta hoja, los contenidos de flavonoides y polifenoles incrementaron cerca de la parte madura de la hoja siendo parte de la respuesta redox.

### ***Cultivares tolerantes vs. sensibles***

A pesar de que el arroz es una especie sensible a temperaturas frías, se puede encontrar un amplio rango de variabilidad entre las accesiones de germoplasma. Nuestro análisis de 18 cultivares reveló una gran variación en la inhibición de crecimiento inducida por ST. Dos grupos con respuestas diferentes pudieron ser detectados a tiempos cortos de exposición a ST y utilizados para ahondar en la descripción de las diferencias entre ellos basadas en el crecimiento de la tercera hoja. Dentro del grupo más tolerante se encontraba Koshihikari y Bombilla, dos cultivares tipo japónica, mientras que en el grupo más sensible estaban IR50 e IR24, descritos como cultivares de la subespecie indica. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que los cultivares japónica probablemente se desempeñan mejor que los cultivares indica bajo ST en el estadio de plántula, como también ha sido descrito para el estrés por *chilling*. El método de evaluación de cultivares aquí diseñado tiene sus ventajas como método de evaluación frente a ST en estadio de plántula respecto de otros métodos usualmente utilizados en la literatura, e.g., Standard Evaluation System. Primero, fue especialmente diseñado para probar el estrés por ST utilizando temperaturas que son comúnmente medidas en el campo. En segundo lugar, porque es un método rápido, fácil de programar en una cámara de cultivo en donde múltiples cultivares pueden caber a la vez, ahorrando tiempo y espacio. Finalmente, es un método cuantitativo que no depende del observador. En general, este método de evaluación puede ser utilizado para detectar de manera rápida aquellos cultivares tolerantes que luego pueden ser evaluados en el campo o con otros métodos de evaluación, e.g., mejoramiento asistido por marcadores.

La inhibición del crecimiento de plántula difirió entre los cultivares, como se discutió arriba. Con el fin de analizar cuáles procesos a nivel celular estaban afectados de manera diferente entre los cultivares, el crecimiento de la cuarta hoja fue estudiado. A pesar de no ser las diferencias en reducción de la elongación foliar tan grandes entre tolerantes y sensibles (5% diferencia), la compensación en la duración de esta elongación fue extremadamente diferente entre ellos. En consecuencia, al final del crecimiento el largo de la hoja se redujo a la mitad en los cultivares sensible y solo en un tercio en los tolerantes. El mayor aumento de la duración de la elongación en respuesta a ST en los cultivares tolerantes podría estar asociado con un mejor desempeño del PSII y un mejor balance entre la asimilación y el uso de las fuentes de carbono. En el marco de la teoría del tiempo termal, los cultivares sensible aparentaban tener temperaturas base mayores que los tolerantes y, por lo tanto, podría suponerse un comportamiento diferente en un rango de temperaturas dado. Por otro lado, las diferencias en la velocidad de elongación foliar fueron relacionadas con una inhibición de la producción celular, estrictamente relacionada con procesos de división celular. Además, esto está en línea con los resultados encontrados en el análisis transcriptómico a 24 h, en donde la vía de biosíntesis del ácido jasmónico se encontraba sobrerregulada en el cultivar sensibles lo cual fue descrito en otros estudios como inhibidor de la división celular. Además de esto, los niveles de  $H_2O_2$  aumentaron en el meristema y la zona de transición hacia la zona de elongación en el cultivar sensible más que en el tolerante, causando daño evidenciado por el aumento de los niveles de MDA. En cambio, el cultivar tolerante disparó el sistema enzimático antioxidante (flavonoides y polifenoles, entre otros) desde la zona de elongación hasta la zona madura protegiendo estas zonas de ROS. La fuerte inhibición de la producción celular en el cultivar sensible concordaba con los altos niveles de las formas oxidadas del ASC y GSH en el meristema, relacionado con el bloqueo del ciclo celular.

La respuesta de cultivares tolerantes y sensible fue fuertemente distinta respecto de otros procesos fisiológicos también. Nuestros resultados mostraron que a largos tiempos de exposición (10 y 24 d) grandes diferencias respecto del desempeño del PSII pudieron ser detectadas. Los cultivares tolerantes fueron capaces de mantener valores de  $F_v/F_m$  aceptables disipando algo de energía. Por el contrario, los cultivares sensible mostraron bajos valores de  $F_v/F_m$  probablemente consecuencia de la inactivación de múltiples centros de reacción y de la alta disipación de energía. El diferente daño del aparato fotosintético entre los cultivares fue también evidenciado en la ultraestructura de las células. El cultivar tolerante mostró menos tilacoides en grana y grana más densamente empacada que el cultivar sensible en respuesta a ST, con lo

que probablemente contribuyó a su mayor desempeño fotosintético aquí descrito. Nuestros resultados sugirieron que los efectos sobre el aparato fotosintético comenzaron temprano en el estrés dado que el análisis transcripcional realizado a 24 h mostró muchos genes subregulados relacionados con la estructura del PSII y el OEC, y de un regulador post-transcripcional del mRNA de la subunidad Rubisco S en el cultivar sensible. Por otro lado, el cultivar tolerante también mostró algunos genes del fotosistema afectados. El análisis proteómico realizado en la cuarta hoja también apoyó lo que se describió a nivel transcripcional dado que el cultivar sensible subreguló proteínas que forman parte del OEC y del PSI en la zona de elongación. Además, el genotipo tolerante sobreguló peroxiredoxinas estrechamente relacionadas con la detoxificación del peróxido de hidrógeno fotoquímicamente producido y, por lo tanto, la protección del aparato fotosintético. Esto se evidenció en el ensayo JIP de doble hit realizado en un cultivar sensible y uno tolerante que demostró que solamente el cultivar sensible desacopló el OEC y afectó la fracción de centros de reacción capaces de reducir  $Q_B$  luego de solamente 24 h de tratamiento.

Las diferencias entre los cultivares también se evidenció cuando estos fueron sometidos a un rango de temperaturas decrecientes. Todos los cultivares disminuyeron  $G_s$  y  $P_n$  en respuesta a este tratamiento. Sin embargo, los tolerantes presentaron valores de  $G_s$  mucho menores que los sensibles en todo el rango de temperaturas analizado. A pesar de que esto podría ser explicado en base a diferencias intrínsecas entre los cultivares como en densidad y apertura estomática, la diferencia entre los cultivares se incrementó cuando las temperaturas bajaban. Esto sugiere que otros mecanismos eran disparados que permitían a los cultivares tolerantes responder más rápidamente que los cultivares sensibles. En el mismo sentido, la subregulación de una proteína tioredoxina particular detectada en la zona de crecimiento de la cuarta hoja del cultivar tolerante podría estar implicada en facilitar la señalización por ROS para disparar el cierre estomático en respuesta a ST y poder bajar  $G_s$ . Es posible que los cultivares tolerantes que tuvieron una mayor habilidad de reducir  $G_s$  en respuesta a las bajas temperaturas fuesen capaces de mejorar el balance de agua, como mostraron los resultados de  $WUE_i$ , y en consecuencia pudieron mantener el crecimiento de la planta.

El balance entre la asimilación de carbón y su utilización es crucial para poder mantener un crecimiento sustentable de la planta. En este sentido, el arroz mostró una sobregulación de transcritos correspondientes a enzimas de la vía de degradación de almidón, a cortos tiempos de exposición a ST. Sin embargo, el cultivar sensible

también mostró sobrerregulación de transcritos relacionados con la degradación de disacáridos, probablemente para ser utilizados como fuente de energía. El cultivar tolerante subreguló una  $\alpha$ -galactosidasa íntimamente relacionada con incrementos de rafinosa y galactinol, metabolitos cuya acumulación ha sido descrita por otorgar tolerancia a bajas temperaturas en arroz y otras especies. Estos metabolitos proporcionan tolerancia aparentemente debido a sus roles como osmoprotectores, estabilizadores de las membranas celulares, y eliminadores de ROS. Sin embargo, el análisis ultraestructural realizado a largas exposiciones a ST (10 y 24 d) mostró que el cultivar sensible acumuló grandes gránulos de almidón mientras que el tolerante lo hizo en menor proporción. Esto podría estar indicando un mejor manejo de uso de carbohidratos y acumulación por parte del cultivar tolerante que además podría estar relacionado con su mayor velocidad de crecimiento y la habilidad para mantenerla por mayores períodos como se describió arriba.

También fueron detectadas algunas diferencias respecto de la composición lipídica de las membranas en respuesta a ST entre cultivares contrastantes. A nivel transcripcional, ambos cultivares sobrerregularon desaturasas, sugiriendo un posible incremento en ácidos grasos insaturados en respuesta a ST. Además, IR50 mostró una sobrerregulación de la vía de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El análisis lipidómico realizado luego de 6 d de exposición al estrés mostró que esto no se tradujo en un mayor contenido de ácidos grasos insaturados o en una disminución de los ácidos grasos totales de IR50. Por el contrario, los ácidos grasos saturados se encontraban disminuidos en el cultivar sensible. Además, el incremento del ácido oléico en Koshihikari en respuesta a ST puede haber estado asociado con su mejor desempeño fotosintético. IR50 redujo el mayor ácido graso del arroz y uno de los principales de la membrana tilacoide, el ácido palmítico, con lo cual esto podría explicar parcialmente el efecto descrito sobre el fotosistema.

El metabolismo secundario también mostró diferencias entre cultivares contrastantes. A nivel transcripcional, IR50 sobrerreguló genes relacionados con la biosíntesis de poliaminas lo cual concordó con las mediciones de poliaminas realizadas a tiempos mayores de exposición (6 d). Particularmente, este cultivar casi duplicó el nivel de putrescina en respuesta al estrés, típico de un genotipo sensible, y redujo sus niveles de espermina. Por otro lado, Koshihikari solamente incrementó el nivel de espermidina que puede estar relacionado con su mayor tolerancia dado que el grupo amino extra de la espermidina actuaría de forma más eficiente en funciones de protección. En general, la respuesta de IR50 respecto de las poliaminas puede estar

relacionada con la necesidad de contrarrestar las ROS generadas por el estrés que no pudieron disminuirse por otros medios como se describió en el análisis redox realizado en la zona de crecimiento de la cuarta hoja.

Por consiguiente, la mayor tolerancia al estrés por ST puede estar relacionada con la capacidad de mantener una alta eficiencia fotosintética y regular la asimilación, guardado y uso del carbono. Además, la inducción de varios sistemas antioxidantes contra ROS a lo largo de la zona de crecimiento permite proteger los procesos celulares necesarios para el crecimiento de la hoja, especialmente en el meristema en donde ocurre la división celular. Entonces, la planta es capaz de mantener tasas razonables de varios procesos metabólicos, particularmente aquellos asociados con el metabolismo energético, y no permitir la inhibición de la producción celular como sucede en cultivares más sensibles. El mantenimiento del aparato fotosintético es crucial para la planta para contrarrestar el estrés, dado que los procesos de aclimatación necesitan energía para sintetizar metabolitos y enzimas que pertenecen al sistema antioxidante para ayudar a evitar el daño.

### ***Conclusiones finales y perspectivas futuras***

Se ha sugerido que la tolerancia a un estrés abiótico puede ser alcanzada únicamente luego de piramidar varias características en un único genotipo (Mittler, 2006). En consecuencia, la adquisición de información sobre los efectos del estrés en estudio es importante para describir aquellas estrategias que estarían relacionadas con la tolerancia. El estrés por ST fue descrito aquí por primera vez en detalle y algunos posibles mecanismos de tolerancia pudieron distinguirse. Sin embargo, múltiples puntos quedan por analizar en detalle para desenmarañar el mecanismo. Algunas de las estrategias descritas pueden medirse por medio de técnicas simples, e.g., LER,  $F_v/F_m$ , análisis JIP de doble hit. Por suerte, en estos días están disponibles muchas bases de datos de acceso abierto conteniendo información sobre miles de cultivares y se puede acceder a sus semillas de manera gratuita (Crowell et al., 2016; McCouch et al., 2016). Se podría realizar un estudio de asociación a nivel de genoma completo con los parámetros nombrados y la información de genotipado de los cultivares con el fin de detectar variables alélicas relacionadas con la tolerancia. Se podrían crear nuevos programas de mejoramiento asistidos por marcadores que ayuden a crear nuevos genotipos de alto rendimiento y tolerantes a estrés por ST.



## **REFERENCIAS**

- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GTS, Genschik P** (2009) Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Curr Biol* **19**: 1188–1193
- Aebi H** (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**: 121–126
- Agati G, Mazzinghi P, Fusi F, Ambrosini I** (1995) The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as a tool in plant physiology: response to physiological and environmental factors. *J Plant Physiol* **145**: 228–238
- Aghaee A, Moradi F, Zare-Maivan H, Zarinkamar F, Irandoost HP, Sharifi P** (2011) Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *African J Biotechnol* **10**: 7617–7621
- Allen DJ, Ort DR** (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci* **6**: 36–42
- Andaya VC, Mackill DJ** (2003) Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *J Exp Bot* **54**: 2579–2585
- Andriankaja M, Dhondt S, DeBodt S, Vanhaeren H, Coppens F, DeMilde L, Mühlenbock P, Skirycz A, Gonzalez N, Beemster GTS, et al** (2012) Exit from Proliferation during Leaf Development in Arabidopsis thaliana: A Not-So-Gradual Process. *Dev Cell* **22**: 64–78
- Arguissain G** (2006) Ecofisiología del cultivo de arroz. *El Arroz su Cultiv. y sustentabilidad en Entre Ríos*.
- Ariizumi T, Kishitani S, Inatsugi R, Nishida I, Murata N, Toriyama K** (2002) An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant Cell Physiol* **43**: 751–8
- Armond PA, Arntzen CJ** (1977) Localization and characterization of photosystem II in grana and stroma lamella. *Plant Physiol* **59**: 398–404
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM** (2011) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* **63**: 43–57
- Aroca R, Vernieri P, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Tognoni F, Pardossi A** (2003) Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Sci* **165**: 671–679
- Asensi-Fabado MA, Amtmann A, Perrella G** (2017) Plant responses to abiotic

- stress: The chromatin context of transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* **1860**: 106–122
- Ashikari M, Matsuoka M, Yano M** (2007) Application of functional genomics tools for crop improvement. *In* NM Upadhyaya, ed, *Rice Funct. Genomics challenges, Prog. Prospect.* Springer, New York, United States of America, pp 411–423
- Avramova V** (2016) An integrated approach to unravel the growth response of maize leaves to drought. Universiteit Antwerpen
- Avramova V, Abdelgawad H, Zhang Z, Fotschki B, Casadevall R, Vergauwen L, Knapen D, Taleisnik E, Guisez Y, Asard H, et al** (2015) Drought Induces Distinct Growth Response, Protection, and Recovery Mechanisms in the Maize Leaf Growth Zone. *Plant Physiol* **169**: 1382–96
- Bajguz A, Hayat S** (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem* **47**: 1–8
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan BB** (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 370–375
- Balzarini M, Di Rienzo J** (2012) InfoGen v.2012. <http://www.info-gen.com.ar>,
- Banerjee A, Roychoudhury A** (2015) WRKY Proteins: Signaling and Regulation of Expression during Abiotic Stress Responses. *Sci World J* **17**
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O** (2013) Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics* **13**: 1801–1815
- Barrôco RM, Peres A, Droual A-M, De Veylder L, Nguyen LSL, De Wolf J, Mironov V, Peerbolte R, Beemster GT, Inzé D, et al** (2006) The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Orysa;KRP1 Plays an Important Role in Seed Development of Rice 1. *Plant Physiol* **142**: 1053–1064
- Baskin TI** (2000) On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Mol Biol* **43**: 545–554
- Basu S, Roychoudhury A** (2014) Expression Profiling of Abiotic Stress-Inducible Genes in response to Multiple Stresses in Rice (*Oryza sativa* L.) varieties with contrasting level of stress tolerance. *Biomed Res Int* **12**
- Basuchaudhuri P** (2014) *Cold Tolerance in Rice Cultivation.* CRC Press, New York, United States of America
- Baute J, Herman D, Coppens F, De Block J, Slabbinck B, Dell'Acqua M, Pè ME, Maere S, Nelissen H, Inzé D** (2015) Correlation analysis of the transcriptome of growing leaves with mature leaf parameters in a maize RIL population. *Genome Biol* **16**: 168

- Baute J, Herman D, Coppens F, De Block J, Slabbinck B, Dell'Aquila M, Pè ME, Maere S, Nelissen H, Inzé D** (2016) Combined large-scale phenotyping and transcriptomics in maize reveals a robust growth regulatory network. *Plant Physiol* **170**: pp.01883.2015
- Beemster GTS, Baskin TI** (1998) Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 1515–1526
- Beemster GTS, Fiorani F, Inzé D** (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci* **8**: 154–158
- Beemster GTS, Masle J** (1996) Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L): kinematic analysis of leaf elongation. *J Exp Bot* **47**: 1651–1662
- Beemster GTS, Masle J, Williamson RE, Farquhar GD** (1996) Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L): kinematic analysis of leaf elongation. *J Exp Bot* **47**: 1651–1662
- Bellincampi D, Dipierro N, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G** (2000) Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol* **122**: 1379–1385
- Benavidez R** (2006) Análisis de conjunto para el diagnóstico del sistema arrocero. *El Arroz su Cultiv. y sustentabilidad en Entre Ríos*.
- Benzie IF, Strain JJ** (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* **239**: 70–6
- Berberich T, Sagor G, Kusano T** (2015) Polyamines in plant stress response. *In* T Kusano, H Suzuki, eds, *Polyamines*. Springer, Japan, pp 155–168
- Bertin P, Bullens P, Bouharmont J, Kinet J** (1998) Somaclonal variation and chilling tolerance improvement in rice : changes in fatty acid composition. 31–41
- Bertin P, Kinet J, Bouharmont J** (1996) Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica* **89**: 201–210
- Bilsborough GD, Runions A, Barkoulas M, Jenkins HW, Hasson A, Galinha C** (2011) Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *PNAS* **108**: 3424–3429
- Bizet F, Hummel I, Bogeat-Triboulot M-B** (2014) Length and activity of the root apical meristem revealed in vivo by infrared imaging. *J Exp Bot* 1–9

- Bligh EG, Dyer WJW, Blygh E, Dyer WJW** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917
- Bloom AJ, Zwieniecki MA, Passioura JB, Randall LB, Holbrook NM, St. Clair DA** (2004) Water relations under root chilling in a sensitive and tolerant tomato species. *Plant, Cell Environ* **27**: 971–979
- Bodapati N, Gunawardena T, Fukai S** (2005) Increasing cold tolerance in rice by selecting for high polyamine and gibberellic acid content. RIRDC, Australian Government
- Bolhàr-Nordenkamp HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG** (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. *Funct Ecol* **3**: 497–514
- Bonhomme R** (2000) Bases and limits to using “degree day” units. *Eur J Agron* **13**: 1–10
- Bonifacio A, Martins MO, Ribeiro CW, Fontenele A V., Carvalho FEL, Margis-Pinheiro M, Silveira JAG** (2011) Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell Environ* **34**: 1705–1722
- Bonnecarrère V, Borsani O, Díaz P, Capdevielle F, Blanco P, Monza J** (2011) Response to photooxidative stress induced by cold in japonica rice is genotype dependent. *Plant Sci Shannon Irel* **180**: 726–732
- Bos HJ, Tijani-Eniola H, Struik PC** (2000) Morphological analysis of leaf growth of maize: responses to temperature and light intensity. *NJAS - Wageningen J Life Sci* **48**: 181–198
- Brizuela A** (2006) Síntesis climática de Entre Ríos, descripción y efectos. *El Arroz su Cultiv. y sustentabilidad en Entre Ríos*.
- Brouns SJJ, Smits N, Wu H, Ambrosius PL, Wright PC, Vos WM De, Van J, Snijders APL, Oost J Van Der** (2006) Identification of a Novel  $\alpha$  -Galactosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Identification of a Novel alpha -Galactosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* †. *J Bacteriol* **188**: 2392–2399
- Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, et al** (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**: 103–6
- Bultynck L, Fiorani F, Van Volkenburgh E, Lambers H** (2003) Epidermal cell division and cell elongation in two *Aegilops* species with contrasting leaf

elongation rates. *Funct Plant Biol* **30**: 425–432

- Calzadilla PI, Gazquez A, Maiale SJ, Ruiz OA, Bernardina MA** (2014) Polyamines as Indicators and Modulators in the Abiotic Stress in Plants. *Plant Adapt. to Environ. Chang. significance Amin. acids their Deriv.* pp 109–128
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL** (2009) BLAST plus: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 1
- Carvalho FEL, Ribeiro CW, Martins MO, Bonifacio A, Staats CC, Andrade CMB, Cerqueira J V., Margis-Pinheiro M, Silveira JAG** (2014) Cytosolic APX knockdown rice plants sustain photosynthesis by regulation of protein expression related to photochemistry, Calvin cycle and photorespiration. *Physiol Plant* **150**: 632–645
- Chaikam V, Karlson D** (2008) Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant, Cell Environ* **31**: 995–1006
- Chang A, Scheer M, Grote A, Schomburg I, Schomburg D** (2009) BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: New content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res* **37**: 588–592
- Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C** (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Anal* **10**: 178–182
- Cheah TW, Ismail I, Sidek NM, Wagiran A, Abdullah R** (2013) Biosynthesis of very long polyunsaturated Omega-3 and Omega-6 fatty acids in transgenic Japonica rice (*Oryza sativa* L.). *7*: 1227–1234
- Chen J, Tian L, Xu H, Tian D, Luo Y, Ren C, Yang L, Shi J** (2012) Cold-induced changes of protein and phosphoprotein expression patterns from rice roots as revealed by multiplex proteomic analysis. *Plant Omics* **5**: 194–199
- Chen S, Strasser RJ, Qiang S** (2014) In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiol Biochem* **84**: 10–21
- Chen W, Xu Z, Zhang L, Yang S** (1990) Comparative Studies on Stomatal Density and Its Relations to Gas Diffusion Resistance and Net Photosynthetic Rate in Rice Leaf. *Chinese J Rice Sci* **4**: 163–168
- Cheng C** (2006) Semi-global Analysis of the Early Cold Stress Response Transcriptome of Developing Seedlings of Rice (*Oryza sativa* L., japonica). The University of Maine, Orono, ME, USA
- Chou WC, Huang YW, Tsay WS, Chiang TY, Huang DD, Huang HJ** (2004) Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is

involved in developmental and environmental responses. *Physiol Plant* **121**: 50–57

**Counce PA, Siebenmorgen TJ, Ambardekar AA** (2015) Rice reproductive development stage thermal time and calendar day intervals for six US rice cultivars in the Grand Prairie, Arkansas, over 4 years. *Ann Appl Biol* **167**: 262–276

**Cox J, Mann M** (2012) 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics* **13**: S12

**Crowell S, Korniliev P, Falcão A, Ismail A, Gregorio G, Mezey J, McCouch S** (2016) Genome-wide association and high-resolution phenotyping link *Oryza sativa* panicle traits to numerous trait-specific QTL clusters. *Nat Commun* **7**: 10527

**Cuevas JC, López-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A** (2008) Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol* **148**: 1094–1105

**Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J** (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* **5**: 3162–3172

**Czesnick H, Lenhard M** (2015) Size Control in Plants — Lessons from Leaves and Flowers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1–17

**Das G, Rao GJN** (2015) Molecular marker assisted gene stacking for biotic and abiotic stress resistance genes in an elite rice cultivar. *Front Plant Sci* **6**: 698

**Daum B, Nicastro D, Austin J, McIntosh JR, Kühlbrandt W** (2010) Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell* **22**: 1299–1312

**Dhindsa R, Plumbdhindsa P, Thorpe T** (1981) Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* **32**: 93–101

**Dietz K-J** (2016) Thiol-Based Peroxidases and Ascorbate Peroxidases: Why Plants Rely on Multiple Peroxidase Systems in the Photosynthesizing Chloroplast? *Mol Cells* **39**: 20–5

**Dietz KJ, Horling F, König J, Baier M** (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot* **53**: 1321–1329

**Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, De Miranda SMN, Baier M,**

- Finkemeier I** (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* **57**: 1697–1709
- Dong MA, Farre EM, Thomashow MF** (2011) CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 7241–7246
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol* **215**: 407–19
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rébeillé F** (2001) The glycine decarboxylase system: A fascinating complex. *Trends Plant Sci* **6**: 167–176
- Du H, Liu H, Xiong L** (2013) Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front Plant Sci* **4**: 397
- Du Z, Bramlage W** (1992) Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric Food Chem* **40**: 1566–1570
- Dutt S, Parkash J, Mehra R, Sharma N, Singh B, Raigond P, Joshi A, Chopra S, Singh BP** (2015) Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. *Biol Plant* **59**: 401–412
- Eckardt N a** (2000) Sequencing the Rice Genome. *Plant Cell* **12**: 2011–2017
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**: 953–971
- Ensminger I, Busch F, Huner NPA** (2006) Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis. *Physiol Plant* **126**: 28–44
- Eremina M, Rozhon W, Poppenberger B** (2016) Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cell Mol Life Sci* **73**: 797–810
- Facette MR, Shen Z, Björnsdóttir FR, Briggs SP, Smith LG** (2013) Parallel proteomic and phosphoproteomic analyses of successive stages of maize leaf development. *Plant Cell* **25**: 2798–812
- FAO** (2016) Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Di Ferdinando M, Brunetti C, Fini A, Tattini M** (2012) Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. *In* P Ahmad, M Prasad, eds, *Abiotic Stress Responses Plants Metab. Product. Sustain.* Springer New York, New York, USA, pp 159–179

- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H** (2007) Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiol* **144**: 988–99
- Ferreira PCG, Hemerly IAS, Engler DA, Montagu M Van, Engler G** (1994) Developmental Expression of the *Arabidopsis* Cyclin Gene *cyclAt*. *Plant Cell* **6**: 1763–1774
- Fiorani F, Beemster GT, Bultynck L, Lambers H** (2000) Can Meristematic Activity Determine Variation in Leaf Size and Elongation Rate among Four *Poa* Species? A Kinematic Study. *Plant Physiol* **124**: 854–855
- Fiorani F, Beemster GTS** (2006) Quantitative analyses of cell division in plants. *Plant Mol Biol* **60**: 963–79
- Flachsbarth I, Willaarts B, Xie H, Pitois G, Mueller ND, Ringler C, Garrido A** (2015) The role of Latin America’s land and water resources for global food security: Environmental trade-offs of future food production pathways. *PLoS One* **10**: 1–24
- Fracheboud Y, Haldimann P, Leipner J, Stamp P** (1999) Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* **50**: 1533–1540
- French AP, Wilson MH, Kenobi K, Dietrich D, Voß U, Ubeda-tomás S, Pridmore TP, Wells DM** (2012) Identifying biological landmarks using a novel cell measuring image analysis tool : Cell-o-Tape. *Plant Methods* **8**:
- Fujii S, Saka H** (2001) The promotive effect of brassinolide on lamina joint-cell elongation, germination and seedling growth under low-temperature stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod Sci* **4**: 210–214
- Gammulla CG, Pascovici D, Atwell BJ, Haynes PA** (2011) Differential proteomic response of rice (*Oryza sativa*) leaves exposed to high- and low-temperature stress. *Proteomics* **11**: 2839–2850
- Gao D, Jln Z, Huang Y, Zhang D** (1992) Rice clock model - a computer model to simulate rice development. *Agric For Meteorol* **60**: 1–16
- Gesch RW, Heilman JL** (1999) Responses of photosynthesis and phosphorylation of the light-harvesting complex of photosystem II to chilling temperature in ecologically divergent cultivars of rice. *Environ Exp Bot* **41**: 257–266
- Ghosh N, Singh MRK** (1983) IR24 selections for cold tolerance. *Int Rice Res News* **4**: 8
- Giarrocco LE, Marassi MA, Salerno GL** (2007) Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. *Crop Sci* **47**: 853–860



- Giełwanowska I, Pastorczyk M, Kellmann-Sopyła W, Górniak D, Górecki RJ** (2015) Morphological and Ultrastructural Changes of Organelles in Leaf Mesophyll Cells of the Arctic and Antarctic Plants of Poaceae Family Under Cold Influence. *Arctic, Antarct Alp Res* **47**: 17–25
- Gielwanowska I, Pastorczyk M, Lisowska M, Wegrzyn M, Górecki RJ** (2014) Cold stress effects on organelle ultrastructure in polar Caryophyllaceae species. *Polish Polar Res* **35**: 627–646
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909–930
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF** (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* **16**: 433–442
- Gonzalez N, De Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Weigel D, Kamiya Y, et al** (2010) Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol* **153**: 1261–1279
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D** (2012) Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci* **17**: 332–340
- González Moreno S, Perales Vela H, Salcedo Alvarez MO** (2008) La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev Educ Bioquímica* **27**: 119–129
- Goodspeed D, Chehab EW, Min-Venditti A, Braam J, Covington MF** (2012) Arabidopsis synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 4674–7
- Goodwin RH, Stepka W** (1945) Growth and differentiation in the root tip of *Phleum pratense*. *Am J Bot* **32**: 36–46
- Granier C, Massonnet C, Turc O, Muller B, Chenu K, Tardieu F** (2002) Individual leaf development in *Arabidopsis thaliana*: A stable thermal-time-based programme. *Ann Bot* **89**: 595–604
- Granier C, Tardieu F** (1998a) Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development? *Plant, Cell Environ* **21**: 695–703
- Granier C, Tardieu F** (1998b) Spatial and Temporal Analyses of Expansion and Cell Cycle in Sunflower Leaves. *Plant Physiol* **116**: 991–1001
- Greaves J a** (1996) Improving suboptimal temperature tolerance in maize - The

- search for variation. *J Exp Bot* **47**: 307–323
- Green P** (1976) Growth and cell pattern formation on an axis: critique of concepts, terminology and modes of study. *Bot Gaz* **137**: 187–202
- Gregorio GB, Senadhira D, Mendoza RD** (1997) Screening Rice for Salinity Tolerance. *IRRI* **22**: 30
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013
- GRiSP** (2013) Rice Almanac, 4th ed. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines
- Grundy J, Stoker C, Carré IA** (2015) Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00648
- Guo-li W, Zhen-fei G** (2005) Effects of Chilling Stress on Photosynthetic Rate and Chlorophyll Fluorescence Parameter in Seedlings of Two Rice Cultivars Differing in Cold Tolerance. *Rice Sci* **12**: 187–191
- Guo M, Rupe MA, Wei J, Winkler C, Goncalves-Butruille M, Weers BP, Cerwick SF, Dieter JA, Duncan KE, Howard RJ, et al** (2014) Maize ARGOS1 (ZAR1) transgenic alleles increase hybrid maize yield. *J Exp Bot* **65**: 249–260
- Das Gupta M, Nath U** (2015) Divergence in Patterns of Leaf Growth Polarity Is Associated with the Expression Divergence of miR396. *Plant Cell* **27**: 2785–2799
- Gururani MA, Venkatesh J, Ganesan M, Strasser RJ, Han Y, Kim J-I, Lee H-Y, Song P-S** (2015) In Vivo Assessment of Cold Tolerance through Chlorophyll-a Fluorescence in Transgenic Zoysiagrass Expressing Mutant Phytochrome A. *PLoS One* **10**: e0127200
- Hakeem KR, Chandna R, Ahmad P, Iqbal M, Ozturk M** (2012) Relevance of Proteomic Investigations in Plant Abiotic Stress Physiology. *Omi A J Integr Biol* **16**: 621–635
- Hasan MM, Rafii MY, Ismail MR, Mahmood M, Rahim HA, Alam MA, Ashkani S, Malek MA, Latif MA** (2015) Marker-assisted backcrossing: A useful method for rice improvement. *Biotechnol Biotechnol Equip* **29**: 237–254
- Hashimoto M, Komatsu S** (2007) Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics* **7**: 1293–1302
- Hassibi P, Nabipour M, Moradi F** (2011) The glucose-intermediate role in ABA signalling and its influence on several physiological characteristics of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings during low temperature stress. *Int J Agric* **1**: 381–

- van Heerden PDR, Tsimilli-Michael M, Kruger GHJ, Strasser RJ** (2003) Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiol Plant* **117**: 476–491
- Heidarvand L, Maali Amiri R** (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol Plant* **32**: 419–431
- Hisanaga T, Ferjani A, Horiguchi G, Ishikawa N, Fujikura U, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Ishida T, Sugimoto K, et al** (2013) The ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in the *fas1* mutation during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol* **162**: 831–41
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK** (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604–611
- Hofmann NR** (2012) Alternative Splicing Links the Circadian Clock to Cold Tolerance. *Plant Cell* **24**: 2238
- Holá D, Kutík J, Kočová M, Rothová O** (2008) Low-temperature induced changes in the ultrastructure of maize mesophyll chloroplasts strongly depend on the chilling pattern/intensity and considerably differ among inbred and hybrid genotypes. *Photosynthetica* **46**: 329–338
- Horiguchi G, Tsukaya H** (2011) Organ Size Regulation in Plants: Insights from Compensation. *Front Plant Sci* **2**: 1–6
- Huang S, Raman AS, Ream JE, Fujiwara H, Cerny RE, Brown SM** (1998) Overexpression of 20-Oxidase Confers a Gibberellin- Overproduction Phenotype in Arabidopsis. *Plant Physiol* **118**: 773–781
- Huang S, Shingaki-Wells RN, Taylor NL, Millar AH** (2013) The rice mitochondria proteome and its response during development and to the environment. *Front Plant Sci* **4**: 16
- Huner NPA, Öquist G, Sarhan F** (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci* **3**: 224–230
- Ichihara K, Fukubayashi Y** (2010) Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* **51**: 635–40
- Imin N, Kerim T, Rolfe BG, Weinman JJ** (2004) Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. *Proteomics* **4**: 1873–1882
- International Rice Genome Sequencing Project** (2005) The map-based

sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793–800

**Ioio R Dello, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S** (2008) A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* (80-) **322**: 1380–1384

**IRRI** (1988) Standard Evaluation System for Rice. Los Baños, Philippines

**Ishida S, Morita KI, Kishine M, Takabayashi A, Murakami R, Takeda S, Shimamoto K, Sato F, Endo T** (2011) Allocation of absorbed light energy in PSII to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of rice. *Plant Cell Physiol* **52**: 1822–1831

**Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ** (1998) Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205**: 12–22

**Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S ichi, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H, Chino M** (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**: 456–463

**Jackson SA** (2016) Rice: The First Crop Genome. *Rice* **9**: 1–3

**Jain M, Kaur N, Garg R, Thakur JK, Tyagi AK, Khurana JP** (2006) Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integr Genomics* **6**: 47–59

**Jain M, Khurana JP** (2009) Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J* **276**: 3148–3162

**Janowiak F, Markowski A** (1994) Changes in leaf water relations and injuries in maize seedlings induced by different chilling conditions. *J Agron Crop Sci* **172**: 19–28

**Jena K, Hardy B** (2012) Advances in temperate rice research. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines

**Jena KK, Mackill DJ** (2008) Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. *Crop Sci* **48**: 1266–1276

**Jeong SW, Choi SM, Lee DS, Ahn SN, Hur Y, Chow WS, 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**: 419–28

**Jing W, Cheng-jun Z, Guo-xiang C, Ping W, Da-wei L** (2006) Responses of Photosynthetic Functions to Low Temperature in Flag Leaves of Rice

Genotypes at the Milky Stage. *Rice Sci* **13**: 113–119

**Kabaki N** (1983) Physiological Analysis of Growth Retardation of Rice Seedlings Caused by Low Temperature. *Japan Agric Res Q* **17**: 161–165

**Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P** (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* **225**: 353–364

**Kalve S, Fotschki J, Beeckman T, Vissenberg K, Beemster GTS** (2014a) Three-dimensional patterns of cell division and expansion throughout the development of *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Exp Bot* **65**: 6385–6397

**Kalve S, De Vos D, Beemster GTS** (2014b) Leaf development: a cellular perspective. *Front Plant Sci* **5**: 362

**Karlson D, Nakaminami K, Toyomasu T, Imai R** (2002) A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *J Biol Chem* **277**: 35248–35256

**Kasprzewska A, Carter R, Swarup R, Bennett M, Monk N, Hobbs JK, Fleming A** (2015) Auxin influx importers modulate serration along the leaf margin. *Plant J* **83**: 705–718

**Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S** (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and upregulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **4**: 712–722

**Kaushik D, Roychoudhury A** (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* **2**: 53 (1-13)

**Kavanová M, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Schnyder H** (2006) Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiol* **141**: 766–75

**Kazama T, Ichihashi Y, Murata S, Tsukaya H** (2010) The mechanism of cell cycle arrest front progression explained by a KLUH/CYP78A5-dependent mobile growth factor in developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **51**: 1046–1054

**Keech O, Gardeström P, Kleczkowski LA, Rouhier N** (2016) The redox control of photorespiration: From biochemical and physiological aspects to biotechnological considerations. *Plant, Cell Environ* 1–17

**Kim J-M, Sasaki T, Ueda M, Sako K, Seki M** (2015) Chromatin changes in

- response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Front Plant Sci* **6**: 1–12
- Kim KY, Park SW, Chung YS, Chung CH, Kim JI, Lee JH** (2004) Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. *J Exp Bot* **55**: 1153–1155
- Kim S-I, Kim D, Tai TH** (2012) Evaluation of Rice Seedling Tolerance to Constant and Intermittent Low Temperature Stress. *Rice Sci* **19**: 295–308
- Kim S-I, Tai TH** (2011) Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. *Euphytica* **178**: 437–447
- Kimball SL, Salisbury FB** (1973) Ultrastructural changes of plants exposed to low temperatures. *Bot Soc Am* **60**: 1028–1033
- Komatsu S, Yamada E, Furukawa K** (2009) Cold stress changes the concanavalin A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths. *Amino Acids* **36**: 115–123
- Körner C, Menendez-Riedl SP, John PCL** (1989) Why are Bonsai Plants Small ? A Consideration of Cell Size. *Aust J Plant Physiol* **16**: 443–448
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT, Renaut J** (2011) Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J Proteomics* **74**: 1301–1322
- Kratsch HA, Wise RR** (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell Environ* **23**: 337–350
- Kumar K, Khan P** (1982) Peroxidase and polyphenol oxidase in excised Ragi (Eleusine-Coracana Cv Pr 202) leaves during senescence. *Indian J Exp Biol* **20**: 412–416
- Kumar K, Sinha AK** (2014) Genome-wide transcriptome modulation in rice transgenic lines expressing engineered mitogen activated protein kinase kinase 6. *Plant Signal Behav* **9**: e28502
- Kunz H, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I, Flügge U-I, Fulda M, Gierth M, Flugge UI, Fulda M, Gierth M** (2009) The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of Arabidopsis during extended darkness. *Plant Cell* **21**: 2733–2749
- Kurata N, Yamazaki Y** (2006) Oryzabase. An integrated biological and genome information database for rice. *Plant Physiol* **140**: 12–17
- Kwanuk L, Hunseung K** (2016) Emerging Roles of RNA-Binding Proteins in Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Mol Cells* **39**: 179–185

- Laurance WF, Sayer J, Cassman KG** (2014) Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. *Trends Ecol Evol* **29**: 107–116
- Lazar C, Gatto L, Ferro M, Bruley C, Burger T** (2016) Accounting for the Multiple Natures of Missing Values in Label-Free Quantitative Proteomics Data Sets to Compare Imputation Strategies. *J Proteome Res* **15**: 1116–1125
- Lee C-M, Thomashow MF** (2012) Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 15054–9
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Lee JJ, Bahk JD, Kang KY, Lee BH** (2009) Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *J Plant Physiol* **166**: 1–11
- Lee J** (1979) Screening methods for cold tolerance at Crop Experiment Station Phytotron and at Chuncheon. Rep. a Rice Cold Toler. Work. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp 77–90
- Lee T-M, Lur H-S, Chu C** (1997) Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. II. Modulation of free polyamine levels. *Plant Sci* **126**: 1–10
- Li QF, Sun SSM, Yuan DY, Yu HX, Gu MH, Liu QQ** (2010a) Validation of candidate reference genes for the accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data in rice during seed development. *Plant Mol Biol Report* **28**: 49–57
- Li X, Cao K, Wang C, Sun Z, Yan L** (2010b) Variation of photosynthetic tolerance of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) to chilling temperature in the light. *J Biotechnol* **9**: 1325–1337
- Ling Q, Trösch R, Jarvis P** (2013) The Ins and Outs of Chloroplast Protein Transport. In B Biswal, K Krupinska, U Biswal, eds, *Plast. Dev. Leaves Dur. Growth Senescence, Adv. Photosynth. Respir.* Springer Science + Business Media, pp 239–280
- Liscum E, Reed JW** (2002) Genetics of Aux / IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **38**: 387–400
- Liu H, Frankel LK, Bricker TM** (2009) Characterization and complementation of a psbR mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* **489**: 34–40
- Liu J-H, Wang W, Wu H, Gong X, Moriguchi T** (2015) Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci* **6**: 827
- Liu Z, Duguay J, Ma F, Wang TW, Tshin R, Hopkins MT, McNamara L, Thompson JE** (2008) Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **59**: 939–950
- Livanos P, Apostolakos P, Galatis B** (2012) Plant cell division: ROS homeostasis

is required. *Plant Signal Behav* **7**: 771–778

**Livore A** (2006a) La genética del arroz. *El Arroz su Cultiv. y sustentabilidad en Entre Ríos*.

**Livore A** (2006b) Los cultivares de arroz. *El Arroz su Cultiv. y sustentabilidad en Entre Ríos*.

**Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, Tohge T, Fernie AR, Stitt M, Usadel B** (2014) Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ* **37**: 1250–8

**Long S, Humphries S** (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 633–662

**Lowry O, Resebgough N, Farr A, Randall R** (1951) Protein measurements with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275

**Lundberg M, Johansson C, Chandra J, Enoksson M, Jacobsson G, Ljung J, Johansson M, Holmgren A** (2001) Cloning and Expression of a Novel Human Glutaredoxin (Grx2) with Mitochondrial and Nuclear Isoforms. *J Biol Chem* **276**: 26269–26275

**Luo L, Zhou WQ, Liu P, Li CX, Hou SW** (2012) The development of stomata and other epidermal cells on the rice leaves. *Biol Plant* **56**: 521–527

**Lütz C** (2010) Cell physiology of plants growing in cold environments. *Protoplasma* **244**: 53–73

**Lyzenga W, Stone S** (2011) Protein Ubiquitination: An Emerging Theme in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Am J Plant Sci Biotechnol* **52**: 1–11

**Ma F, Liu Z, Wang TW, Hopkins MT, Peterson CA, Thompson JE** (2010) Arabidopsis eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress. *Plant, Cell Environ* **33**: 1682–1696

**Ma SF, Lin CY, Chen YM** (1990) Comparative studies of chilling stress on alterations of chloroplast ultrastructure and protein synthesis in the leaves of chilling - sensitive (mungbean) and - insensitive (pea) seedlings. *Bot Bull Acad Sin* **31**: 263–272

**Mackill DJ, Xiaomao L** (1997) Genetic Variation for Traits Related to Temperate Adaptation of Rice Cultivars. *Crop Sci* **37**: 1340–1346

**Maeda S, Horibata A, Yamagata H** (1999) Cold tolerance at seedling stage in Japonica rice varieties. *Relatsh. cold Toler. with Temp. React. fatty-acid Compos. Breeding Research*, p 86



- Maes E, Hadiwikarta WW, Mertens I, Baggerman G, Hooyberghs J, Valkenborg D** (2016) CONSTANd : a normalization method for isobaric labeled spectra by constrained optimization. *Mol Cell Proteomics* 2779–2790
- Magnan F, Ranty B, Charpentreau M, Sotta B, Galaud JP, Aldon D** (2008) Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J* 56: 575–589
- Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel E, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q, et al** (2010) Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. *Plant Cell* 22: 3509–42
- Majumder MK, Seshu D V, Shenoy V V** (1989) Implication of fatty acids and seed dormancy in a new screening procedure for cold tolerance in rice. *Crop Sci* 29: 1298–1304
- Mamedov F, Stefansson H, Albertsson PA, Styring S** (2000) Photosystem II in different parts of the thylakoid membrane: A functional comparison between different domains. *Biochemistry* 39: 10478–10486
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, et al** (2011) CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39: 225–229
- Marcon C, Malik WA, Walley JW, Shen Z, Paschold A, Smith LG, Piepho H-P, Briggs SP, Hochholdinger F** (2015) A high-resolution tissue-specific proteome and phosphoproteome atlas of maize primary roots reveals functional gradients along the root axes. *Plant Physiol* 168: 233–46
- Maruyama S, Tajima K** (1990) Leaf conductance in japonica and indica rice varieties. I. Size, frequency, and aperture of stomata. *Japan J Crop Sci* 59: 801–808
- McCouch SR, Wright MH, Tung C-W, Maron LG, McNally KL, Fitzgerald M, Singh N, DeClerck G, Agosto-Perez F, Korniliev P, et al** (2016) Open access resources for genome-wide association mapping in rice. *Nat Commun* 7: 10532
- Méchin V, Damerval C, Zivy M** (2007) Total Protein Extraction with TCA-Acetone. *Plant Proteomics*. pp 1–8
- Menéndez A, Rodríguez A, Maiale S, Rodríguez Kessler M, Jimenez Bremont J, Ruiz O** (2013) Polyamines contribution to the improvement of crop plants tolerance to abiotic stress. *In* N Tuteja, S Gill, eds, *Crop Improv. Under Advers. Cond.* Springer, New York, USA, pp 113–136

- Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin J-M, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, et al** (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16478–16483
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15–19
- Miura K, Furumoto T** (2013) Cold signaling and cold response in plants. *Int J Mol Sci* **14**: 5312–5337
- Miyake C** (2010) Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: Molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiol* **51**: 1951–1963
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M** (2007) KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* **35**: 182–185
- Morsy MR, Almutairi AM, Gibbons J, Yun SJ, De Los Reyes BG** (2005) The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene* **344**: 171–180
- Morsy MR, Jouve L, Hausman JF, Hoffmann L, Stewart JM** (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**: 157–167
- Mostowska A** (1999) Response of chloroplast structure to photodynamic herbicides and high oxygen. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci* **54**: 621–628
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S** (2010) The rate of cell differentiation controls the arabidopsis root meristem growth phase. *Curr Biol* **20**: 1138–1143
- Murakami M, Ashikari M, Miura K, Yamashino T, Mizuno T** (2003) The Evolutionarily Conserved OsPRR Quintet: Rice Pseudo-Response Regulators Implicated in Circadian Rhythm. *Plant Cell Physiol* **44**: 1229–1236
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H** (2008) Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal Biochem* **383**: 320–322
- Nadeau P, Delaney S, Chouinard L** (1987) Effects of Cold Hardening on the Regulation of Polyamine Levels in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **84**: 73–77

- Negrão S, Oliveira MM, Jena KK, Mackill D** (2008) Integration of genomic tools to assist breeding in the japonica subspecies of rice. *Mol Breed* **22**: 159–168
- Neilson K a., Mariani M, Haynes P a.** (2011) Quantitative proteomic analysis of cold-responsive proteins in rice. *Proteomics* **11**: 1696–1706
- Neilson KA, Scafaro AP, Chick JM, George IS, Van Sluyter SC, Gygi SP, Atwell BJ, Haynes PA** (2013) The influence of signals from chilled roots on the proteome of shoot tissues in rice seedlings. *Proteomics* **13**: 1922–1933
- Nelissen H, Gonzalez N, Inzé D** (2016) Leaf growth in dicots and monocots: So different yet so alike. *Curr Opin Plant Biol* **33**: 72–76
- Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuynck K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GTS** (2012) A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* **22**: 1183–1187
- Neuner G, Larcher W** (1990) Determination of Differences in Chilling Susceptibility of 2 Soybean Varieties By Means of In vivo Chlorophyll Fluorescence Measurements. *J Agron Crop Sci* **164**: 73–80
- Nishizawa a., Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* **147**: 1251–1263
- Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tsui T, Balbi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A** (2013) Jasmonate Controls Leaf Growth by Repressing Cell Proliferation and the Onset of Endoreduplication while Maintaining a Potential Stand-By Mode. *Plant Physiol* **161**: 1930–1951
- Nuruzzaman M, Gupta M, Zhang C, Wang L, Xie W, Xiong L, Zhang Q, Lian X** (2008) Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. *Mol Genet Genomics* **280**: 139–151
- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S** (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol* **4**: 1–16
- Ohsumi A, Kanemura T, Homma K, Horie T, Shiraiwa T** (2007) Genotypic variation of stomatal conductance in relation to stomatal density and length in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod Sci* **10**: 322–328
- Pagter M, Liu F, Jensen CR, Petersen KK** (2008) Effects of chilling temperatures and short photoperiod on PSII function, sugar concentrations and xylem sap ABA concentrations in two *Hydrangea* species. *Plant Sci* **175**: 547–555
- De Palma M, Grillo S, Massarelli I, Costa A, Balogh G, Vigh L, Leone A** (2007) Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid

- composition and freezing tolerance in potato plants. *Mol Breed* **21**: 15–26
- Pardossi a, Vernieri P, Tognoni F** (1992) Involvement of Abscisic Acid in Regulating Water Status in *Phaseolus vulgaris* L. during Chilling. *Plant Physiol* **100**: 1243–1250
- Park S-H, Chung PJ, Juntawong P, Bailey-Serres J, Kim YS, Jung H, Bang SW, Kim Y-K, Do Choi Y, Kim J-K** (2012) Posttranscriptional Control of Photosynthetic mRNA Decay under Stress Conditions Requires 3' and 5' Untranslated Regions and Correlates with Differential Polysome Association in Rice. *Plant Physiol* **159**: 1111–1124
- Parkash J, Vaidya T, Kirti S, Dutt S** (2014) Translation initiation factor 5A in *Picrorhiza* is up-regulated during leaf senescence and in response to abscisic acid. *Gene* **542**: 1–7
- Peng S, Ismail A** (2004) Physiological basis of yield and environmental adaptation in rice. In H Nguyen, A Blum, eds, *Physiol. Biochem. Integr. plant Breed*. Marcel Dekker, New York, USA, pp 83–140
- Peng X, Teng L, Yan X, Zhao M, Shen S** (2015) The cold responsive mechanism of the paper mulberry: decreased photosynthesis capacity and increased starch accumulation. *BMC Genomics* **16**: 898
- Pennycooke JC** (2003) Down-Regulating  $\beta$ -Galactosidase Enhances Freezing Tolerance in Transgenic *Petunia*. *Plant Physiol* **133**: 901–909
- Peoples TR, Koch DW, Smith SC** (1978) Relationship between Chloroplast Membrane Fatty Acid Composition and Photosynthetic Response to a Chilling Temperature in Four Alfalfa Cultivars. *Plant Physiol* **61**: 472–3
- Pereira da Cruz R, Golombieski JI, Bazana MT, Cabreira C, Silveira TF, Picolli da Silva L** (2010) Alterations in fatty acid composition due to cold exposure at the vegetative stage in rice. *Brazilian Soc Plant Physiol* **22**: 199–207
- Pérez-Bueno ML, Horton P** (2008) The role of lutein in the acclimation of higher plant chloroplast membranes to suboptimal conditions. *Physiol Plant* **134**: 227–236
- Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Pe JM, Cejudo FJ** (2006) Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection against Oxidative Damage. *Plant Cell* **18**: 2356–2368
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S** (2012) Growth and development of the root apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 17–23
- Peterhansel C, Horst I, Niessen M, Blume C, Kebeish R, Kürkcüoğlu S, Kreuzaler F** (2010) Photorespiration. *Arab B* 1–24

- Pettkó-Szandtner A, Cserhádi M, Barrôco RM, Hariharan S, Dudits D, Beemster GTS** (2015) Core cell cycle regulatory genes in rice and their expression profiles across the growth zone of the leaf. *J Plant Res* **128**: 953–974
- Ping W, Cheng-Jun Z, Guo-Xiang C, Jing W, Da-Wei S, Chuan-Gen L** (2006) Effects of Low Temperature on Lipid Peroxidation and Fatty Acid Composition of Flag Leaf in Rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* **32**: 568–572
- Pokhilko A, Mas P, Millar AJ** (2013) Modelling the widespread effects of TOC1 signalling on the plant circadian clock and its outputs. *BMC Syst Biol* **7**: 1–12
- Ponnala L, Wang Y, Sun Q, Van Wijk KJ** (2014) Correlation of mRNA and protein abundance in the developing maize leaf. *Plant J* **78**: 424–440
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N** (2002) Ascorbate and glutathione: Guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* **40**: 537–548
- Potters G, Horemans N, Bellone S, Caubergs RJ, Trost P, Guisez Y, Asard H** (2004) Dehydroascorbate Influences the Plant Cell Cycle through a Glutathione-Independent Reduction Mechanism. *Plant Physiol* **134**: 1479–1487
- Powell AE, Lenhard M** (2012) Control of organ size in plants. *Curr Biol* **22**: R360–R367
- Quintero C** (2009) Factores limitantes para el crecimiento y productividadd del arroz en Entre Ríos, Argentina. Universidade da Coruña
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Shinozaki KY** (2003) Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and AbscisicAcid Application Using cDNA Microarray and RNAGel-Blot Analyses. *Plant Physiol* **133**: 1755–1767
- Rachoski M, Gazquez A, Calzadilla P, Bezus R, Rodriguez A, Ruiz O, Menendez A, Maiale S** (2015) Chlorophyll fluorescence and lipid peroxidation changes in rice somaclonal lines subjected to salt stress. *Acta Physiol Plant* **37**: 1–12
- Radkova M, Vítámvás P, Sasaki K, Imai R** (2014) Development- and cold-regulated accumulation of cold shock domain proteins in wheat. *Plant Physiol Biochem* **77**: 44–48
- Ramakrishna A, Ravishankar GA** (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* **6**: 1720–1731
- Renaut J, Hoffmann L, Hausman JF** (2005) Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in

- poplar plantlets. *Physiol Plant* **125**: 82–94
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K** (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **52**: 35–41
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C** (2016) *InfoStat*.
- Ripullone F, Lauteri M, Grassi G, Amato M, Borghetti M** (2004) Variation in nitrogen supply changes water-use efficiency of *Pseudotsuga menziesii* and *Populus x euroamericana*; a comparison of three approaches to determine water-use efficiency. *Tree Physiol* **24**: 671–679
- Robertson FC, Skeffington AW, Gardner MJ, Webb AAR** (2009) Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Mol Biol* **69**: 419–427
- Rodríguez AA, Maiale SJ, Menéndez AB, Ruiz OA** (2009) Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *J Exp Bot* **60**: 4249–4262
- Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JAG, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2010) Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry* **71**: 548–558
- Rymen B, Coppens F, Dhondt S, Fiorani F, Beemster GTS** (2010) Kinematic analysis of cell division and expansion. *In* L Hennig, C Köhler, eds, *Plant Dev. Biol. Methods Mol. Biol.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 203–227
- Rymen B, Fiorani F, Kartal F, Vandepoele K, Inzé D, Beemster GTS** (2007) Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol* **143**: 1429–38
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, et al** (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root. *Cell* **99**: 463–472
- Saito M, Yoshida M** (2011) Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress. *J Plant Physiol* **168**: 2268–2271
- Sakai H, Lee SS, Tanaka T, Numa H, Kim J, Kawahara Y, Wakimoto H, Yang CC, Iwamoto M, Abe T, et al** (2013) Rice annotation project database (RAP-DB): An integrative and interactive database for rice genomics. *Plant Cell Physiol* **54**: 1–11
- Sánchez B, Rasmussen A, Porter JR** (2014) Temperatures and the growth and

- development of maize and rice: A review. *Glob Chang Biol* **20**: 408–417
- Schmidt R, Kunkowska AB, Schippers JHM** (2016) Role of Reactive Oxygen Species during Cell Expansion in Leaves. *Plant Physiol* **172**: 2098–2106
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ** (2006) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**: 251–261
- Seidler A** (1996) The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1277**: 35–60
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL** (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front Plant Sci* **6**: 1–11
- Senthil-Kumar M, Wang K, Mysore K** (2013) AtCYP710A1 gene-mediated stigmaterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* 2013; **8**: *Plant Signal Behav* **8**: 2
- Seo PJ, Mas P** (2015) STRESSing the role of the plant circadian clock. *Trends Plant Sci* **20**: 230–237
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M** (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot* **2012**: 1–26
- Shaykholeslam Esfahani E, Shahpiri A** (2015) Thioredoxin h isoforms from rice are differentially reduced by NADPH/thioredoxin or GSH/glutaredoxin systems. *Int J Biol Macromol* **74**: 243–248
- Shi Y, Yang S** (2014) ABA regulation of the cold stress response in plants. *In* D-P Zhang, ed, *Abscisic Acid Metab. Transp. Signal*. Springer Netherlands, pp 337–363
- Shimamoto K, Kyojuka J** (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 399–419
- Shimono H, Okada M, Kanda E, Arakawa I** (2007) Low temperature-induced sterility in rice: Evidence for the effects of temperature before panicle initiation. *F Crop Res* **101**: 221–231
- Shimosaka E, Ozawa K** (2015) Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice. *Breed Sci* **65**: 363–371
- Shulaev V, Oliver DJ** (2006) Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. *New Tools for Reactive Oxygen Species Research*. *Plant Physiol* **141**:

- Shutilova NI** (2010) The oxygen-evolving complex of chloroplast membranes. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol* **4**: 125–133
- Sierla M, Rahikainen M, Salojärvi J, Kangasjärvi J, Kangasjärvi S** (2013) Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2220–39
- Silk WK, Erickson RO** (1979) Kinematics of plant growth. *J Theor Biol* **76**: 481–501
- Singh R, Jwa N** (2013) Understanding the Responses of Rice to Environmental Stress Using Proteomics. *J Proteome Res* **12**: 4652–4669
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell Environ* **30**: 1126–1149
- Smith AT, Veitch NC** (1998) Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol* **2**: 269–278
- Sonoike K** (2011) Photoinhibition of photosystem I. *Physiol Plant* **142**: 56–64
- Sthapit B, Witcombe J, Wilson J** (1993) Methods of Selection for Chilling Tolerance in Nepalese Rice by Chlorophyll Fluorescence Analysis. *Crop Sci* **35**: 90–94
- Stirbet A, Govindjee** (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B Biol* **104**: 236–257
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee** (1995) Polyphasic Chlorophyll a Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria. *Photochem Photobiol* **61**: 32–42
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M** (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *In* M Yunus, P Uday, M Prasanna, eds, *Probing Photosynth. Mech. Regul. Adapt.* Taylor and Francis, pp 445–483
- Strauss AJ, Krüger GHJ, Strasser RJ, Heerden PDR Van** (2006) Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environ Exp Bot* **56**: 147–157
- Strauss AJ, Krüger GHJ, Strasser RJ, Van Heerden PDR** (2007) The role of low soil temperature in the inhibition of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance. *Physiol Plant* **131**: 89–105



- Suorsa M, Sirpiö S, Allahverdiyeva Y, Paakkanen V, Mamedov F, Styring S, Aro EM** (2006) PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II. *J Biol Chem* **281**: 145–150
- Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HMO, Haseloff J, Beemster GTSS, Bhalerao R, Bennett MJ, Leyser O, et al** (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat Cell Biol* **7**: 1057–1065
- Świątek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inzé D, Van Onckelen H** (2002) Differential Effect of Jasmonic Acid and Abscisic Acid on Cell Cycle Progression in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol* **128**: 201–211
- Takanashi J, Maruyama S, Kabaki N, Tajima K** (1987) Temperature dependency of protein synthesis by cell-free system constructed with polysomes from rice radicle. *Japan J Crop Sci* **56**: 44–50
- Takeuchi Y, Hayasaka H, Chiba B, Tanaka I, Shimano T, Yamagishi M, Nagano K, Takuji S, Yano M** (2001) Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate japonica rice. *Breed Sci* **51**: 191–197
- Tanabe M, Kanehisa M** (2012) Using the KEGG database resource. *Curr Protoc Bioinforma*. doi: 10.1002/0471250953.bi0112s38
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvão VC, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**: 300–314
- The 3000 Rice Genomes Project** . (2014) The 3,000 rice genomes project. *Gigascience* **3**: 7
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller L a., Rhee SY, Stitt M** (2004) Mapman: a User-Driven Tool To Display Genomics Data Sets Onto Diagrams of Metabolic Pathways and Other Biological Processes. *Plant J* **37**: 914–939
- Thompson JE, Hopkins MT, Taylor C, Wang TW** (2004) Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: Implications for plant growth and development. *Trends Plant Sci* **9**: 174–179
- Tong H, Xiao Y, Liu D, Gao S, Liu L, Yin Y, Jin Y, Qian Q, Chu C** (2014) Brassinosteroid Regulates Cell Elongation by Modulating Gibberellin Metabolism in Rice. *Plant Cell* **26**: 4376–4393
- Trudgill DL, Honek a, Li D, Van Straalen NM, Straalen NM, Honěk A, Li D, Van Straalen NM** (2005) Thermal time – concepts and utility. *Ann Appl Biol* **146**:

- Tsiantis M, Brown MIN, Skibinski G, Langdale JA** (1999) Disruption of Auxin Transport Is Associated with Aberrant Leaf Development in Maize. *Plant Physiol* **121**: 1163–1168
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606–616
- Tsukaya H** (2002) Interpretation of Mutants in Leaf Morphology: Genetic evidence for a Compensatory System in Leaf Morphogenesis That Provides a New Link between Cell and Organismal Theories. *Int Rev Citol* **217**: 1–39
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J** (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* **13**: 731–40
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ** (2008) Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* **10**: 625–628
- Uehara Y** (2003) Improving field resistance to blast and eating quality in Japanese rice varieties. *In* GS Khush, DS Brar, B Hardy, eds, *Adv. Rice Genet.* IRRI, Manila, Phillipines, pp 41–44
- Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H** (2012) Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *J Exp Bot* **63**: 3001–3009
- Upchurch RG** (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* **30**: 967–977
- Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A, Stitt M** (2009) A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. *Plant Cell Environ* **32**: 1211–29
- Vanneste S, Friml J** (2012) Plant signaling: Deconstructing auxin sensing. *Nat Chem Biol* **8**: 415–416
- Venzhik Y V., Titov a. F, Talanova V V., Miroslavov E a., Koteeva NK** (2013) Structural and functional reorganization of the photosynthetic apparatus in adaptation to cold of wheat plants. *Cell tissue biol* **7**: 168–176
- Villanova G, Albornoz E** (2006) La economía del cultivo de arroz. *El Arroz su Cultiv. y sustentabilidad en Entre Ríos.*
- Voorend W, Lootens P, Nelissen H, Roldán-ruiz I, Inzé D, Muylle H** (2014)

- LEAF-E: a tool to analyze grass leaf growth using function fitting. *Plant Methods* **10**: 37
- De Vos D, Vissenberg K, Broeckhove J, Beemster GTS** (2014) Putting Theory to the Test: Which Regulatory Mechanisms Can Drive Realistic Growth of a Root? *PLoS Comput Biol.* doi: 10.1371/journal.pcbi.1003910
- Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS** (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biol* **15**: 713–722
- Wand M, Jones M** (1995) Kernel Smoothing. Chapman & Hall/CRC.
- Wang J, Lin X, Sun Q, Jena KK** (2013) Evaluation of cold tolerance for japonica rice varieties from different country. *Adv J Food Sci Technol* **5**: 54–56
- Wang L, Xu C, Wang C, Wang Y** (2012) Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. *BMC Plant Biol* **12**: 118
- Wang TW, Lu L, Wang D, Thompson JE** (2001) Isolation and Characterization of Senescence-induced cDNAs Encoding Deoxyhypusine Synthase and Eucaryotic Translation Initiation Factor 5A from Tomato. *J Biol Chem* **276**: 17541–17549
- Wang W, Chen Q, Hussain S, Mei J, Dong H, Peng S, Huang J, Cui K, Nie L** (2016) Pre-sowing Seed Treatments in Direct-seeded Early Rice: Consequences for Emergence, Seedling Growth and Associated Metabolic Events under Chilling Stress. *Sci Rep* **6**: 19637
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* **9**: 244–252
- van der Weele CM, Jiang HS, Palaniappan KK, Ivanov VB, Palaniappan K, Baskin TI** (2003) A New Algorithm for Computational Image Analysis of Deformable Motion at High Spatial and Temporal Resolution Applied to Root Growth . Roughly Uniform Elongation in the Meristem and Also , after an Abrupt Acceleration , in the Elongation Zone. *Plant Physiol* **132**: 1138–1148
- Wery J, Silim SN, Knights EJ, Malhotra RS, Cousin R** (1994) Screening Techniques and Sources of Tolerance To Extremes of Moisture and Air-Temperature in Cool-Season Food Legumes. *Euphytica* **73**: 73–83
- West G, Inze D, Inzé D, Beemster G, Inze D** (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol* **135**: 1050–1058
- Wijerathna YMAM** (2015) Marker Assisted Selection: Biotechnology Tool for Rice

Molecular Breeding. *Adv Crop Sci Technol*. doi: 10.4172/2329-8863.1000187

- Wingler A** (2015) Comparison of signaling interactions determining annual and perennial plant growth in response to low temperature. *Front Plant Sci* **5**: 1–9
- Wolosiuk A, Crawford A, Yee C, Buchanan B** (1979) Isolation of Three Thioredoxins from Spinach Leaves. *J Biol Chem* **254**: 1627–1632
- Xie G, Kato H, Imai R** (2012) Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signalling pathway for chilling stress tolerance in rice. *Biochem J* **443**: 95–102
- Xie G, Kato H, Sasaki K, Imai R** (2009) A cold-induced thioredoxin h of rice, OsTrx23, negatively regulates kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 in vitro. *FEBS Lett* **583**: 2734–2738
- Xu J, Zhang B, Jiang C, Ming F** (2011) RcelF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **75**: 167–178
- Yan S-P, Zhang Q-Y, Tang Z-C, Su W-A, Sun W-N** (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics* **5**: 484–96
- Yang JC, Li M, Xie XZ, Han GL, Sui N, Wang BS** (2013) Deficiency of phytochrome B alleviates chilling-induced photoinhibition in rice. *Am J Bot* **100**: 1860–1870
- Yoshida S** (1981) *Fundamentals of rice crop science*. IRRI, Los Baños, Laguna, Philippines
- You J, Chan Z** (2015) ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front Plant Sci* **6**: 1092
- Youssef C, Aubry C, Montrichard F, Beucher D, Juchaux M, Ben C, Prospero JM, Teulat B** (2016) Cell length instead of cell number becomes the predominant factor contributing to hypocotyl length genotypic differences under abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Physiol Plant* **156**: 108–124
- Yu Y, Huang Y, Zhang W** (2012) Changes in rice yields in China since 1980 associated with cultivar improvement, climate and crop management. *F Crop Res* **136**: 65–75
- Zhang C-J, Zhao B-C, Ge W-N, Zhang Y-F, Song Y, Sun D-Y, Guo Y** (2011) An Apoplastic H-Type Thioredoxin Is Involved in Stress Response Through Regulation of the Apoplastic Reactive Oxygen Species in Rice. *Plant Physiol* **157**: 1884–1899
- Zhang C, Xie Q, Anderson RG, Ng G, Seitz NC, Peterson T, McClung CR, McDowell JM, Kong D, Kwak JM, et al** (2013) Crosstalk between the

Circadian Clock and Innate Immunity in Arabidopsis. PLoS Pathog. doi: 10.1371/journal.ppat.1003370

**Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ** (2006) A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol* **18**: 445–450

**Zhang T, Zhao X, Wang W, Pan Y, Huang L, Liu X, Zong Y, Zhu L, Yang D, Fu B** (2012) Comparative transcriptome profiling of chilling stress responsiveness in two contrasting rice genotypes. *PLoS One* **7**: e43274

**Zhang W, Zhang H, Ning L, Li B, Bao M** (2016) Quantitative Proteomic Analysis Provides Novel Insights into Cold Stress Responses in Petunia Seedlings. *Front Plant Sci* **7**: 1–13

**Zhang Z, Sang J, Ma L, Wu G, Wu H, Huang D, Zou D, Liu S, Li A, Hao L, et al** (2014) RiceWiki: A wiki-based database for community curation of rice genes. *Nucleic Acids Res* **42**: 1222–1228

**Zhao W, Wang J, He X, Huang X, Jiao Y, Dai M, Wei S, Fu J, Chen Y, Ren X, et al** (2004) BGI-RIS: an integrated information resource and comparative analysis workbench for rice genomics. *Nucleic Acids Res* **32**: 377–382

**Zhou Q, Yu Q, Wang Z, Pan Y, Lv W, Zhu L, Chen R, He G** (2013) Knockdown of GDCH gene reveals reactive oxygen species-induced leaf senescence in rice. *Plant, Cell Environ* **36**: 1476–1489

**Zhu S, Yu C, Liu X, Ji B, Jiao D** (2007) Changes in Unsaturated Levels of Fatty Acids in Thylakoid PSII Membrane Lipids During Chilling-induced Resistance in Rice. *J Integr Plant Biol* **49**: 463–471

**Zorrilla G, Martínez C, Berrío L, Corredor E, Carmona L, Pulver E** (2013) Improving Rice Production Systems in Latin America and the Caribbean. *Eco-efficiency From Vis. to Real.* pp 161–170

## **Material suplementario**

### **Tablas suplementarias**

**Tabla suplementaria 1.** Parámetros de crecimiento de raíz extraídos de los datos publicados utilizados para meta-análisis. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla suplementaria 2.** Parámetros de crecimiento foliar de las *Graminae* extraídos de los datos publicados para meta-análisis. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla suplementaria 3.** Parámetros de crecimiento foliar de las Eudicotiledóneas extraídos de los datos publicados para meta-análisis. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla suplementaria 4.** Parámetros del análisis cinemático describiendo el efecto del estrés por ST en el crecimiento de la cuarta hoja de seis cultivares contrastantes. Los datos son promedios  $\pm$  DE (n=23 para LER; n=10 para FLL y TLE; n=5 para el resto de los parámetros). Se usó un t-test para analizar diferencias entre tratamientos. Cambios de porcentaje de ST sobre OT se muestran para cada cultivar y parámetro, \*\*\* valor- $p$  <0.0001, \*\* 0.001<valor- $p$ <0.0001, \* 0.05<valor- $p$ <0.001, no significativo (NS) si valor- $p$ <0.05. Parámetros: *FLL*, largo final de hoja; *LER*, velocidad de elongación de la hoja; *T<sub>LE</sub>*, tiempo de elongación de la hoja; *P*, producción celular; *I<sub>mat</sub>*, largo de célula madura; *N<sub>div</sub>*, número de células en el meristema; *L<sub>mer</sub>*, largo del meristema; *D*, velocidad promedio de división celular; *T<sub>C</sub>*, duración del ciclo celular; *T<sub>div</sub>*, tiempo de residencia de las células en el meristema; *l<sub>div</sub>*, largo de las células que abandonan el meristema; *RER*, velocidad relativa de elongación; *T<sub>el</sub>*, tiempo de residencia de las células en la zona de elongación; *L<sub>gz</sub>*, largo de toda la zona de crecimiento; *L<sub>el</sub>*, largo de la zona de elongación; *N<sub>gz</sub>*, número de células en toda la zona de crecimiento; *N<sub>el</sub>*, número de células en la zona de elongación.

Parámetro	Koshihikari		% cambio
	OT	ST	
<b>FLL (cm)</b>	30.01 ± 3.1547	20.16 ± 1.6985	<b>-33***</b>
<b>T<sub>LE</sub> (d)</b>	5.7 ± 0.8233	14.2 ± 0.6325	<b>149***</b>
<b>LER (mm.h<sup>-1</sup>)</b>	2.617 ± 0.2786	0.6978 ± 0.0913	<b>-73***</b>
<b>l<sub>mat</sub> (μm)</b>	70.0095 ± 5.5663	50.3642 ± 3.3979	<b>-28**</b>
<b>P (cells.h<sup>-1</sup>)</b>	35.351 ± 2.641	13.939 ± 0.9777	<b>-61***</b>
<b>D (cells.cells<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0687 ± 0.0085	0.0467 ± 0.0174	<b>-32*</b>
<b>T<sub>c</sub> (h)</b>	10.2382 ± 1.5048	16.2303 ± 4.8215	<b>58*</b>
<b>N<sub>div</sub> (cells)</b>	522.9047 ± 92.0759	327.0345 ± 95.9572	<b>-37*</b>
<b>T<sub>div</sub> (h)</b>	92.5425 ± 16.224	136.4169 ± 46.4452	NS
<b>T<sub>el</sub> (h)</b>	13.9115 ± 2.3671	48.3369 ± 10.562	<b>248*</b>
<b>RER (μm.μm<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0955 ± 0.0168	0.0332 ± 0.0042	<b>-65*</b>
<b>l<sub>div</sub> (μm)</b>	19.2295 ± 4.0517	10.7004 ± 3.0432	<b>-44*</b>
<b>L<sub>mer</sub> (mm)</b>	6.0552 ± 1.0025	3.2733 ± 0.73	<b>-46*</b>
<b>L<sub>el</sub> (mm)</b>	20.1448 ± 4.5306	15.5267 ± 2.4093	NS
<b>L<sub>gr</sub> (mm)</b>	26.2 ± 4.0249	18.8 ± 2.9496	<b>-28*</b>
<b>N<sub>el</sub> (cells)</b>	489.4516 ± 75.877	678.6639 ± 170.8433	NS
<b>N<sub>gr</sub> (cells)</b>	1012.3563 ± 59.4005	1005.6984 ± 256.7088	NS

Parámetro	CT-6742-10-10-1		% cambio
	OT	ST	
FLL (cm)	47.97 ± 1.6918	30.85 ± 2.4346	<b>-36***</b>
T <sub>LE</sub> (d)	7.1 ± 0.9944	14.3 ± 1.3375	<b>101***</b>
LER (mm.h <sup>-1</sup> )	3.9526 ± 0.3267	0.9639 ± 0.1426	<b>-76***</b>
l <sub>mat</sub> (μm)	82.6583 ± 7.1997	66.2669 ± 9.451	<b>-20*</b>
P (cells.h <sup>-1</sup> )	45.3358 ± 4.163	14.5111 ± 3.0134	<b>-68***</b>
D (cells.cells <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.0667 ± 0.0105	0.0316 ± 0.005	<b>-52**</b>
T <sub>c</sub> (h)	10.5808 ± 1.5463	22.4003 ± 3.5259	<b>112**</b>
N <sub>div</sub> (cells)	687.2374 ± 77.6726	459.6158 ± 69.1811	<b>-33*</b>
T <sub>div</sub> (h)	99.7956 ± 15.7554	197.7945 ± 31.0317	<b>98**</b>
T <sub>el</sub> (h)	17.0901 ± 2.286	64.9701 ± 12.9308	<b>280*</b>
RER (μm.μm <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.106 ± 0.0109	0.0271 ± 0.0048	<b>-74***</b>
l <sub>div</sub> (μm)	13.7821 ± 1.7535	11.8898 ± 1.481	NS
L <sub>mer</sub> (mm)	6.3834 ± 0.8674	4.7282 ± 0.5366	<b>-26*</b>
L <sub>el</sub> (mm)	28.0166 ± 3.6257	25.0718 ± 3.0945	NS
L <sub>gr</sub> (mm)	34.4 ± 3.5777	29.8 ± 2.6833	NS
N <sub>el</sub> (cells)	770.3258 ± 85.5864	913.7764 ± 70.3037	<b>-19*</b>
N <sub>gr</sub> (cells)	1457.5632 ± 105.5855	1373.3923 ± 104.2043	NS



Parámetro	General Rossi		% cambio
	OT	ST	
<b>FLL (cm)</b>	38.77 ± 1.5826	25.42 ± 1.0809	<b>-35***</b>
<b>T<sub>LE</sub> (d)</b>	7.2 ± 0.6325	14.7 ± 1.0593	<b>104***</b>
<b>LER (mm.h<sup>-1</sup>)</b>	3.3013 ± 0.2578	0.8717 ± 0.1464	<b>-74***</b>
<b>l<sub>mat</sub> (μm)</b>	74.263 ± 5.8384	59.6561 ± 3.5294	<b>-20*</b>
<b>P (cells.h<sup>-1</sup>)</b>	44.6998 ± 3.1151	14.9528 ± 1.9061	<b>-67***</b>
<b>D (cells.cells<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0929 ± 0.0152	0.0379 ± 0.0139	<b>-59**</b>
<b>T<sub>c</sub> (h)</b>	7.6208 ± 1.2052	20.3925 ± 7.2895	<b>168*</b>
<b>N<sub>div</sub> (cells)</b>	488.7138 ± 62.5774	425.8272 ± 110.8495	NS
<b>T<sub>div</sub> (h)</b>	68.1643 ± 11.9798	179.3997 ± 70.5899	<b>163**</b>
<b>T<sub>el</sub> (h)</b>	18.7555 ± 3.3755	52.7433 ± 8.1737	<b>118***</b>
<b>RER (μm.μm<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0939 ± 0.0135	0.0301 ± 0.0037	<b>-68**</b>
<b>l<sub>div</sub> (μm)</b>	13.2357 ± 1.1282	12.4733 ± 1.4643	NS
<b>L<sub>mer</sub> (mm)</b>	4.9035 ± 0.7556	4.8643 ± 0.9654	NS
<b>L<sub>el</sub> (mm)</b>	29.0965 ± 5.0875	20.5357 ± 1.7755	<b>-29*</b>
<b>L<sub>gr</sub> (mm)</b>	34 ± 5.0498	25.4 ± 1.8166	<b>-25*</b>
<b>N<sub>el</sub> (cells)</b>	840.0054 ± 176.9085	777.6307 ± 46.1389	NS
<b>N<sub>gr</sub> (cells)</b>	1328.7192 ± 148.3811	1203.458 ± 100.5426	NS

Parámetro	IR50		% cambio
	OT	ST	
<b>FLL (cm)</b>	29.83 ± 2.6767	14.42 ± 0.8702	<b>-52***</b>
<b>T<sub>LE</sub> (d)</b>	7.2 ± 0.9189	12.8 ± 1.2293	<b>78***</b>
<b>LER (mm.h<sup>-1</sup>)</b>	2.5978 ± 0.2437	0.5591 ± 0.078	<b>-79***</b>
<b>l<sub>mat</sub> (μm)</b>	71.1071 ± 6.6093	56.376 ± 4.0943	<b>-21*</b>
<b>P (cells.h<sup>-1</sup>)</b>	35.9218 ± 4.7807	10.091 ± 1.6581	<b>-72***</b>
<b>D (cells.cells<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0542 ± 0.0091	0.0246 ± 0.0052	<b>-55**</b>
<b>T<sub>c</sub> (h)</b>	13.0472 ± 2.0126	29.2503 ± 6.4417	<b>124*</b>
<b>N<sub>div</sub> (cells)</b>	665.6667 ± 35.6515	417.3304 ± 66.4547	<b>-37**</b>
<b>T<sub>div</sub> (h)</b>	122.4369 ± 19.6403	254.9268 ± 60.6683	<b>108*</b>
<b>T<sub>el</sub> (h)</b>	21.0352 ± 2.564	55.2615 ± 28.764	NS
<b>RER (μm.μm<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0893 ± 0.0095	0.0322 ± 0.0131	<b>-64***</b>
<b>l<sub>div</sub> (μm)</b>	11.0677 ± 0.9678	13.1162 ± 3.7451	NS
<b>L<sub>mer</sub> (mm)</b>	4.991 ± 0.8284	4.2443 ± 0.3143	NS
<b>L<sub>el</sub> (mm)</b>	21.209 ± 3.6458	14.9557 ± 5.9793	NS
<b>L<sub>gr</sub> (mm)</b>	26.2 ± 4.0866	19.2 ± 5.7619	NS
<b>N<sub>el</sub> (cells)</b>	761.276 ± 183.6129	528.8427 ± 227.7546	NS
<b>N<sub>gr</sub> (cells)</b>	1426.9427 ± 176.0434	946.1731 ± 278.5743	<b>-34*</b>

Parámetro	IR24		% cambio
	OT	ST	
FLL (cm)	28.51 ± 2.162	13.83 ± 0.8782	<b>-51***</b>
T <sub>LE</sub> (d)	6.3 ± 0.483	10.9 ± 0.9944	<b>73***</b>
LER (mm.h <sup>-1</sup> )	2.7026 ± 0.2627	0.5548 ± 0.0988	<b>-80***</b>
I <sub>mat</sub> (μm)	85.962 ± 4.6833	55.0762 ± 3.3776	<b>-36***</b>
P (cells.h <sup>-1</sup> )	32.4218 ± 2.9573	10.4786 ± 1.3581	<b>-68***</b>
D (cells.cells <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.0779 ± 0.0113	0.0386 ± 0.0157	<b>-50*</b>
T <sub>c</sub> (h)	9.043 ± 1.2236	19.8785 ± 6.1344	<b>120*</b>
N <sub>div</sub> (cells)	422.1449 ± 63.2508	306.8456 ± 118.2353	NS
T <sub>div</sub> (h)	78.9231 ± 12.2362	165.238 ± 60.4262	<b>109*</b>
T <sub>el</sub> (h)	17.2225 ± 4.1621	51.703 ± 9.5059	<b>200**</b>
RER (μm.μm <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.1087 ± 0.0238	0.0285 ± 0.0063	<b>-74*</b>
I <sub>div</sub> (μm)	14.397 ± 2.7991	13.2614 ± 1.527	NS
L <sub>mer</sub> (mm)	4.0306 ± 0.7193	3.7072 ± 0.5926	NS
L <sub>el</sub> (mm)	23.3694 ± 6.4192	14.0928 ± 2.6621	<b>-40*</b>
L <sub>gr</sub> (mm)	27.4 ± 6.8775	17.8 ± 3.0332	<b>-35*</b>
N <sub>el</sub> (cells)	555.4778 ± 122.9777	534.2144 ± 69.8178	NS
N <sub>gr</sub> (cells)	977.6227 ± 167.2911	841.06 ± 129.6149	NS

Parámetro	Honezhaosen		% cambio
	OT	ST	
<b>FLL (cm)</b>	26.14 ± 0.9686	13.45 ± 1.2039	<b>-49***</b>
<b>T<sub>LE</sub> (d)</b>	6.7 ± 0.6749	12.6 ± 1.7127	<b>88***</b>
<b>LER (mm.h<sup>-1</sup>)</b>	2.4583 ± 0.1954	0.54 ± 0.0745	<b>-78***</b>
<b>l<sub>mat</sub> (μm)</b>	69.048 ± 8.2535	50.5883 ± 4.6861	<b>-27*</b>
<b>P (cells.h<sup>-1</sup>)</b>	36.5468 ± 5.0818	12.5027 ± 2.0467	<b>-66***</b>
<b>D (cells.cells<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.1117 ± 0.0203	0.0324 ± 0.0077	<b>-71***</b>
<b>T<sub>c</sub> (h)</b>	6.3879 ± 1.2775	22.3652 ± 5.158	<b>250*</b>
<b>N<sub>div</sub> (cells)</b>	335.1183 ± 66.8189	395.8887 ± 78.6964	NS
<b>T<sub>div</sub> (h)</b>	53.6588 ± 12.3091	193.3376 ± 49.6597	<b>260*</b>
<b>T<sub>el</sub> (h)</b>	18.6512 ± 4.5697	50.9218 ± 10.7211	<b>173**</b>
<b>RER (μm.μm<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0.0759 ± 0.0136	0.0326 ± 0.0058	<b>-57**</b>
<b>l<sub>div</sub> (μm)</b>	18.7259 ± 10.075	10.1992 ± 2.2315	NS
<b>L<sub>mer</sub> (mm)</b>	4.2328 ± 1.0458	3.5913 ± 0.5656	NS
<b>L<sub>el</sub> (mm)</b>	23.3672 ± 3.8587	15.0087 ± 2.5196	<b>-36*</b>
<b>L<sub>gr</sub> (mm)</b>	27.6 ± 3.5777	18.6 ± 2.4083	<b>-33*</b>
<b>N<sub>el</sub> (cells)</b>	696.4601 ± 253.5035	627.5186 ± 123.1999	NS
<b>N<sub>gr</sub> (cells)</b>	1031.5784 ± 267.4337	1023.4073 ± 98.1969	NS

**Tabla Suplementaria 5.** Cebadores de genes seleccionados para PCR cuantitativa usada para validar el microarreglo.

RjGene-1_0-st array:					
IRGSP 1.0 Gene ID	BGI Gene ID	MSU 7 Gene ID	RjGene-1_0-st Transcript Cluster ID	Left primer 5' → 3'	Right primer 5' → 3'
Os01g0128200	BGIOGA002698	LOC_Os01g03730	16096632	AATTCGTGTCACCAAGCAAGG	AACATCAGGCTCTCCGTGAG
Os01g0922700	BGIOGA000229	LOC_Os01g69840	16132742	CCAGAGCAGCCCTTCTGTAA	CTCTGACGGCCAAAGATGTAAG
Os01g0702000	BGIOGA000953	LOC_Os01g50622	16126263	TACGTTTGGTGGGATTACA	GAACCTTACCCGGAAGCA
Os12g0586100	BGIOGA035923	LOC_Os12g39630	16174270	CAGAAAGCAAAATCCAGCA	GTCCGAGTCCATATCCTCCA
Os09g0489200	BGIOGA029547	LOC_Os09g31380	16359971	GGCTCAGCATCCCTTGTTT	GTGCAATGGTGTCACCTGTCC
Os12g0493900	BGIOGA037422	LOC_Os12g31000	16165506	GCAGCAATGTGGTTGAGAAA	AGCAAGGAGCTCCAGAATGA
Os11g0525700	BGIOGA035363	LOC_Os11g32270	16152261	GTGCAACCAGAACCTGGACT	CCAGAGAAGGTGCAGTAGGG
Os03g0133400	BGIOGA011785	LOC_Os03g04110	16209190	GCGCTACAGTGGTTACTCC	TGCAAGGCTGGTTGTATGA
Os12g0638300	BGIOGA035754	LOC_Os12g44110	16175694	GCCAACTGCTGCTACTTCT	TGGTGGTGTCTTGAACTG
Os06g0306300	BGIOGA022766	LOC_Os06g20150	16293838	AGCTCCGCGTCGACTACTAC	GCCGATGATCTTCTCCATCT
Os04g0684800	BGIOGA017384	LOC_Os04g58800	16255114	TCTGCGACAAGGACTACCC	CATGTTGATCCTGGAGTGGA
Os04g0688100	BGIOGA014042	LOC_Os04g59150	16267762	CTTCTCCACGACTGCTTCC	TATCTCACCAGCTCGCTTT
Os07g0663800	BGIOGA026332	LOC_Os07g46852	16319789	TACGTCAACGGGCATAACCT	ATGGATTGTCGTCTCCTTT
Os08g0103000	BGIOGA027812	LOC_Os08g01270	16339955	AGGGATTCGCTTGGAGATT	CAGGATCTCGTCCCAACAC
Os12g0583300	BGIOGA037682	LOC_Os12g39360	16167170	AAGCTTTCGTTCTCGTCT	CAAGTAAATTAGGGCGGTGGT
Os11g0256900	BGIOGA015677	LOC_Os11g15040	16150447	GGA GCGACTACACCACCATC	TCTCCAATGTCATCTCTGG
Os03g0161900	BGIOGA011916	LOC_Os03g06630	16210166	TGAATGATGAGCCTGCAAAAG	TCGTGGTTAAACTCGGTTTC
Os12g0247700	BGIOGA037221	LOC_Os12g14440	16164162	ATACCACGGCTGGTCTGTTG	GACCTGCCTTGTGCTTCTCT

**RcNcGene-1\_0-st array:**

IRGSP 1.0 Gene		RcNcGene-1_0-st				Right primer 5' → 3'	
ID	BGI Gene ID	MSU 7 Gene ID	Transcript Cluster ID	Left primer 5' → 3'	Right primer 5' → 3'		
Os1g0128200	BGIOSGA002698	LOC_Os01g03730	16381715	AATTCTCGTCACCAGCAAGG	AACATCAGGCTCCTCCGTCAG		
Os09g0489200	BGIOSGA029547	LOC_Os09g31380	16558706	GGCTCAGCATCCCTTGTTT	GTGCAATGGTGCACTGTCC		
Os1.2g0493900	BGIOSGA037422	LOC_Os1.2g31000	16427933	GCAGCAATGGTTGAGAAA	AGCAAGGAGCTCCAGAAATGA		
Os01g0702000	BGIOSGA000953	LOC_Os01g50622	16401551	TACGTTTGGTGGGATTACA	GAACCTTACCCGGAAA GCA		
Os03g0133400	BGIOSGA011785	LOC_Os03g04110	16456567	GCGCTACAGTGGTTACTCC	TGCAAGGCTGTTTGTATGA		
Os1.2g0586100	BGIOSGA035923	LOC_Os1.2g39630	16434013	CAGAAACAACAATCCAGCA	GTCCAGTCCATATCCTCCA		
Os1.1g0525700	BGIOSGA035363	LOC_Os1.1g32270	16419297	GTGCAACCAGAACCTGGACT	CCAGAGAAAGGTGCAGTAGGG		
Os07g0283050	BGIOSGA024476	LOC_Os07g18230	16534260	CAGGTGGATTAGCACAAGA	AGGTCTGGAA CGAGGCTTT		
Os04g0688100	BGIOSGA014042	LOC_Os04g59150	16495207	CTTCTCCACGACTGCTTCC	TATCTCACCAGCTCGCTTT		
Os04g0684800	BGIOSGA017384	LOC_Os04g58800	16486700	TTCTGCGACAAGGACTACCC	CATGTTGATCCTGGAGTGA		
Os07g0663800	BGIOSGA026332	LOC_Os07g46852	16531335	TAGTCAACGGGCATAACCT	ATGGGATTGCTCTCCTTT		
Os08g0103000	BGIOSGA027812	LOC_Os08g01270	16544769	AGGGA TTTGCTTGGAGATT	CAGGATCTTCGTCCCAACAC		
Os1.1g0256900	BGIOSGA015677	LOC_Os1.1g15040	16487219	GGAGCGACTACACCACCATC	TCTCCATGCATCTCATCTGG		
Os06g0306300	BGIOSGA022766	LOC_Os06g20150	16513232	AGTCCCGCTCGACTACTAC	GCCGATGATCTTCTCCATCT		
Os03g0161900	BGIOSGA011916	LOC_Os03g06630	16457253	TGAATGATGAGCCTGCAAAAG	TCGTGGTTAACTCGGTTTC		
Os1.2g0583300	BGIOSGA037682	LOC_Os1.2g39360	16429063	AAGCTGTTGTTCTCGTGCT	CAAGTAAATTAGGGCGGTGGT		
Os1.2g0247700	BGIOSGA037221	LOC_Os1.2g14440	16427159	ATACCACGGCTGGTCTGTTG	GACCTGCCITGTGCTTCTCT		
<b>Housekeeping for both arrays:</b>							
IRGSP 1.0 Gene		RcNcGene-1_0-st				Right primer 5' → 3'	
ID	BGI Gene ID	MSU 7 Gene ID	Housekeeping name	Left primer 5' → 3'	Right primer 5' → 3'		
OS03G0718100	BGIOSGA013463	LOC_Os03g50885	Actin-1	AGGAATGGAAGCTGCGGGTAT	GCAGGAGGACGGCGGATAACA		

**Tabla Suplementaria 6.** Resultados del microarreglo de plántulas de IR50 y Koshihikari. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla Suplementaria 7.** Resultados del análisis proteómico de Koshihikari. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla Suplementaria 8.** Resultados del análisis proteómico de IR50. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla Suplementaria 9.** Descripción de proteínas que cambiaron su abundancia de manera significativa en respuesta a ST (FDR<0.10). ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla Suplementaria 10.** Descripción funcional de proteínas identificadas en el meristema y la zona de elongación de Koshihikari que cambiaron su abundancia en respuesta a ST. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

**Tabla Suplementaria 11.** Descripción funcional de proteínas identificadas en el meristema y la zona de elongación de IR50 que cambiaron su abundancia en respuesta a ST. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***

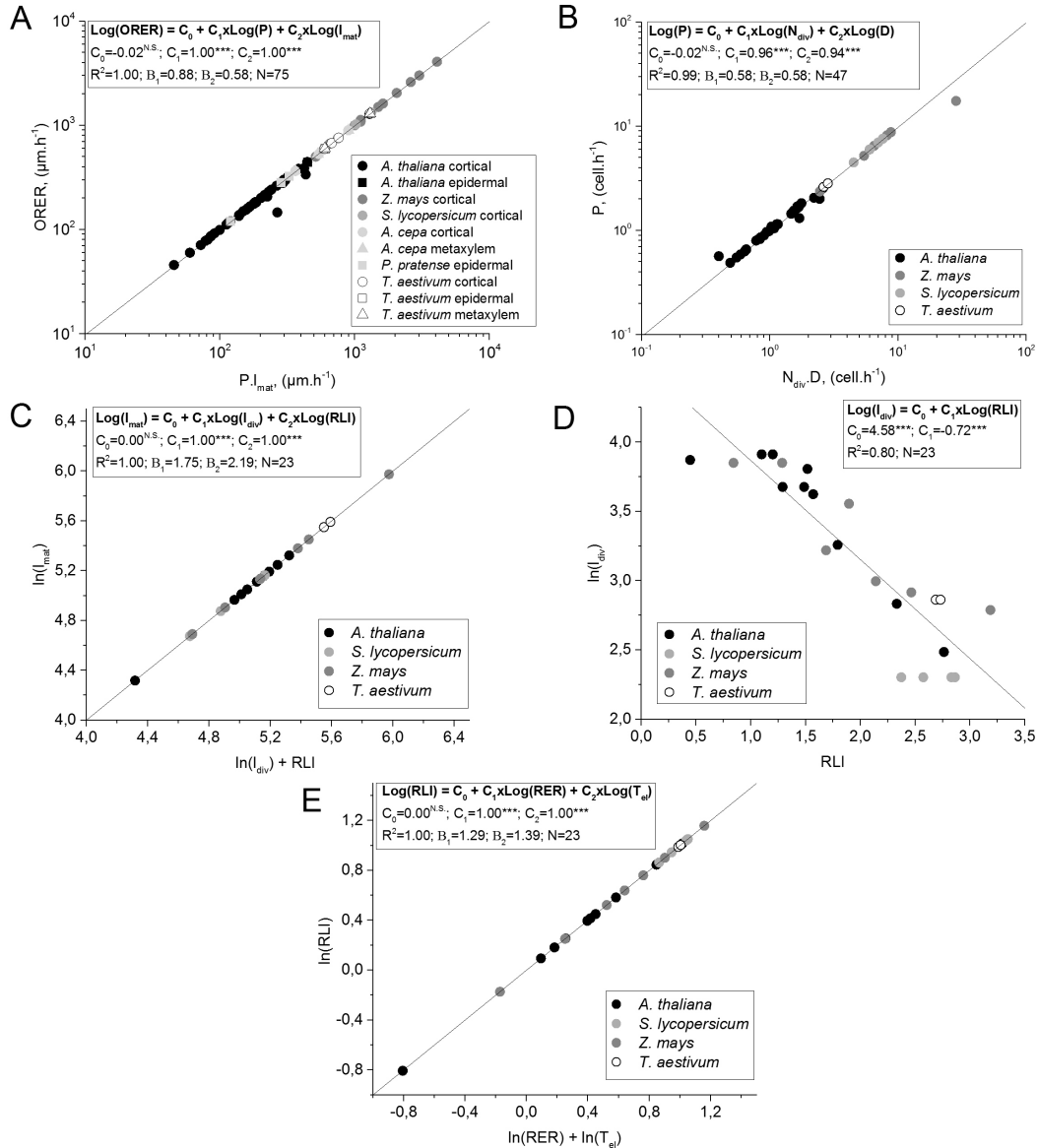
**Tabla Suplementaria 12.** Ácidos grasos analizados y sus tiempos de retención.

FAME		$t_R$ (min)
Caproic acid	C6	2.02
Caprylic acid	C8	2.76
Capric acid	C10	4.31
Undecylic acid	C11	5.46
Lauric acid	C12	6.79
Tridecylic acid	C13	8.25
Myristic acid	C14	9.78
Myristoleic acid	C14(n:9)	10.39
Pentadecylic acid	C15	11.32
cis-10-Pentadecanoic acid	C15(n:10)	11.95
Palmitic acid	C16	12.88
Palmitoleic acid	C16(n:9)	13.31
Margaric acid	C17	14.36
cis-10-Heptadecanoic acid	C17(n:10)	14.81
Stearic acid	C18	15.83
Elaidic acid	trans C18(n:9)	16.03
Oleic acid	cis C18(n:9)	16.18
Linolelaidic acid	trans C18(n:9.12)	16.53
Linoleic acid	cis C18(n:9.12)	16.85
g-Linolenic acid	gC18(n:6.9.12)	17.24
Linolenic acid	C18(n:9.12.15)	17.72
Arachidic acid	C20	18.58
cis-11-Eicosenoic acid	C20(n:11)	18.92
cis-11,14-Eicosodienoic acid	C20(n:11,14)	19.6
methyl-cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	C21(n:8,11,14)	19.89
Heneicosylic acid	C21	19.98
Arachidonic acid	C20(n:5,8,11,14)	20.21
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	C20(n:11,14,17)	20.42
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	C20(n:5,8,11,14,17)	21.03
Behenic acid	C22	21.15
Erucic acid	C22(n:13)	21.48
cis-13,16-Docosadienoic acid	C22(n:13,16)	22.14
Tricosylic acid	C23	22.34
Lignoceric acid	C24	23.53
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexanoic acid	C22(n:4,7,10,13,16,19)	23.81

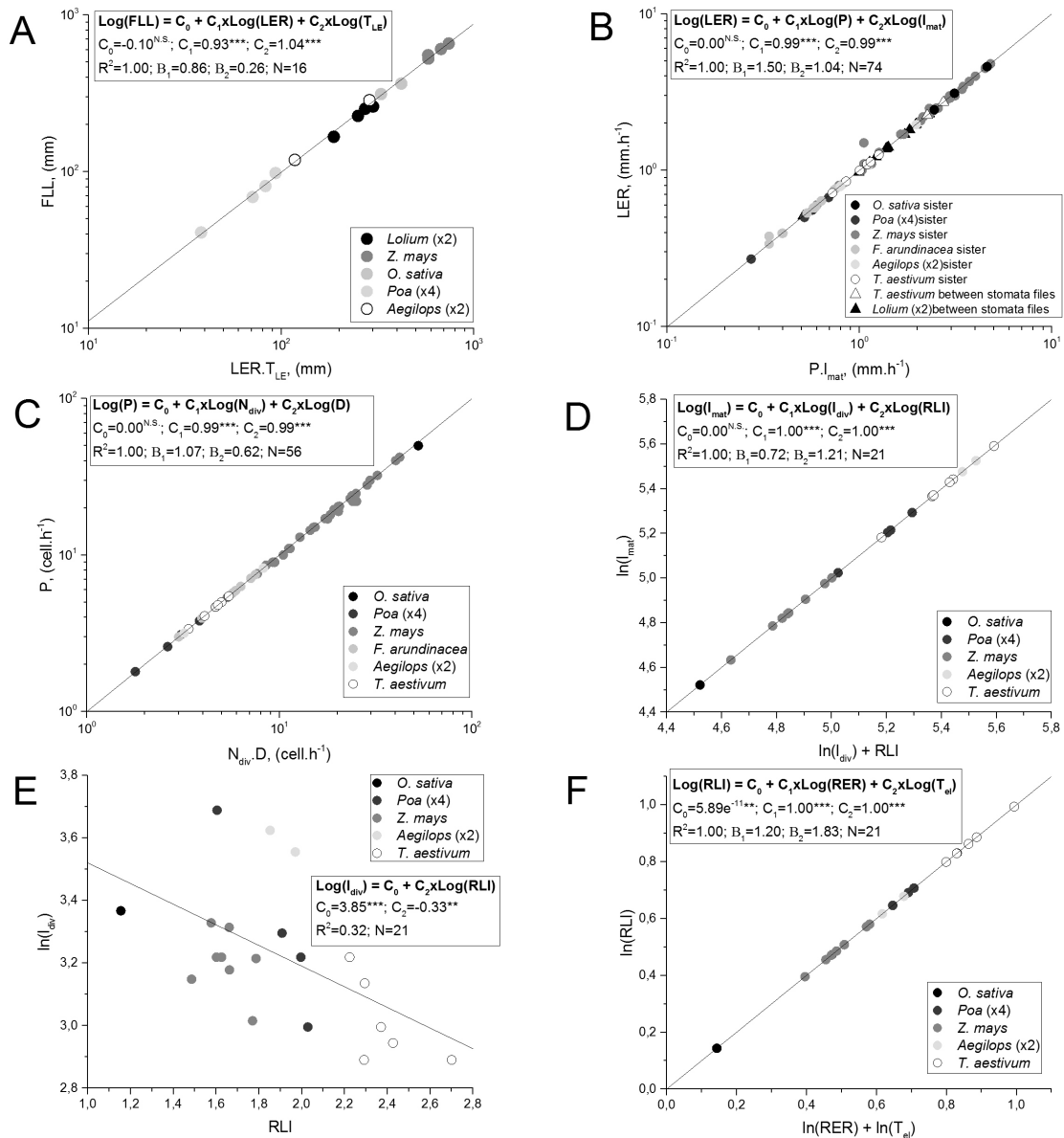
**Tabla Suplementaria 13.** Resultados del ANOVA de tres vías realizado para el análisis del sistema redox de los datos discutidos en la sección 5.4.4. ***Esta tabla se encuentra disponible al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar.***



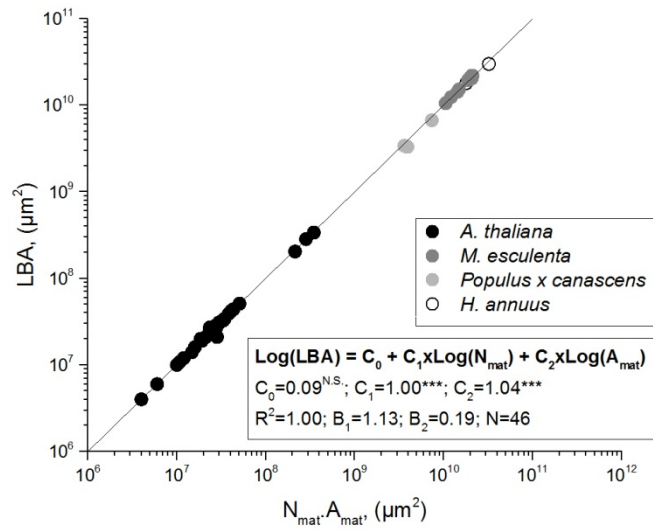
## Figuras Suplementarias



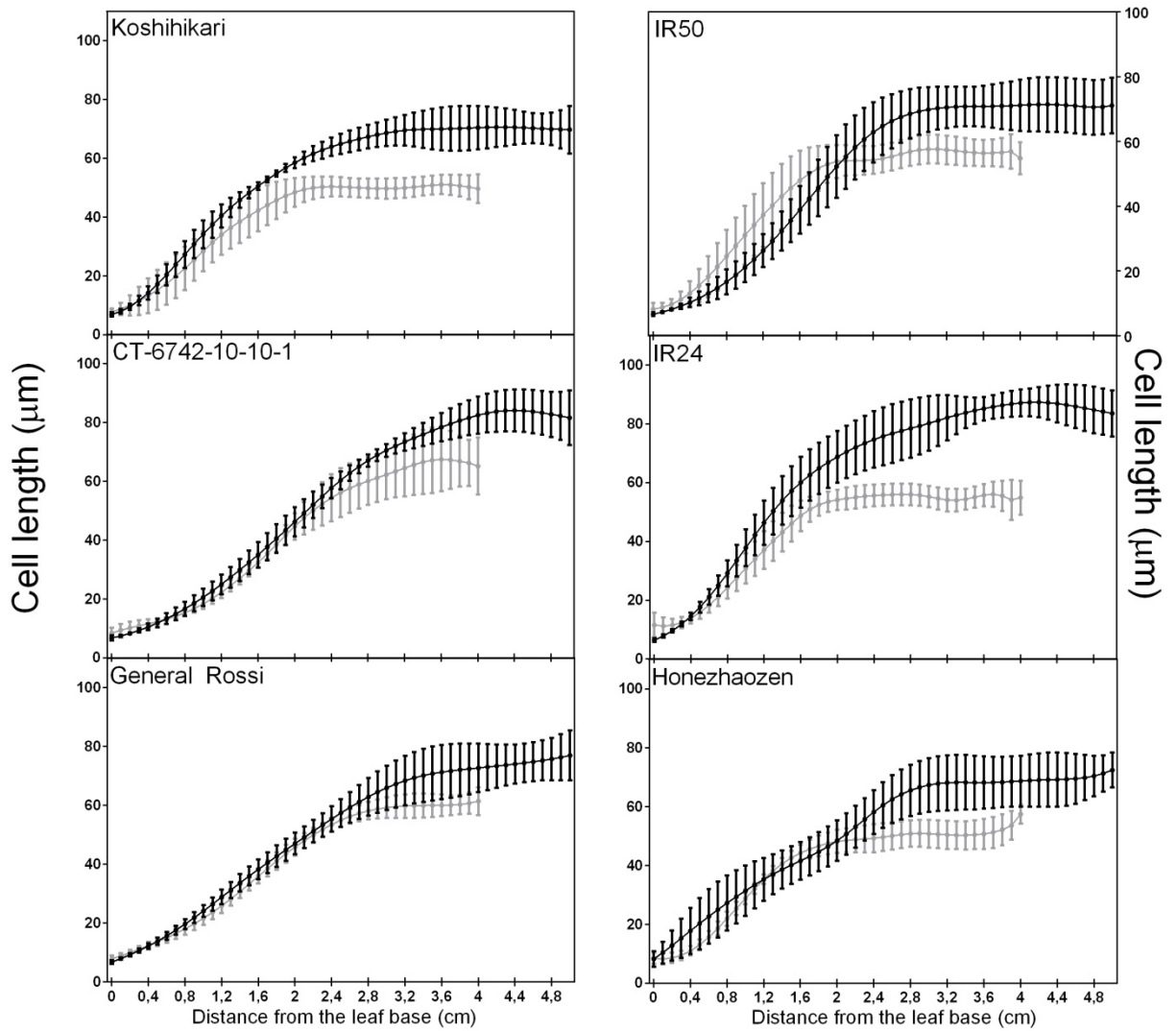
**Figura Suplementaria 1.** Regresiones con modelos completos de las bases celulares de las diferencias en la velocidad de crecimiento de raíces en un rango de especies. **A)** la relación entre la velocidad de elongación de la raíz (ORER), producción celular (P) y el largo de la célula madura ( $I_{\text{mat}}$ ). **B)** la relación entre P, número de células en el meristema ( $N_{\text{div}}$ ) y promedio de velocidad de división celular (D). **C)** la relación entre el largo de células corticales maduras ( $I_{\text{mat}}$ ), el largo de células al final del meristema ( $I_{\text{div}}$ ) y el incremento relativo del largo (RLI). **D)** la relación entre  $I_{\text{div}}$  y RLI. **E)** la relación entre RLI, velocidad relativa de elongación (RER) y tiempo en la zona de elongación ( $T_{\text{el}}$ ). Detalles de los parámetros de regresión se muestran en la figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$ , coeficiente de correlación;  $B_1$  y  $B_2$ , coeficientes estandarizados Beta; N, número de muestras.



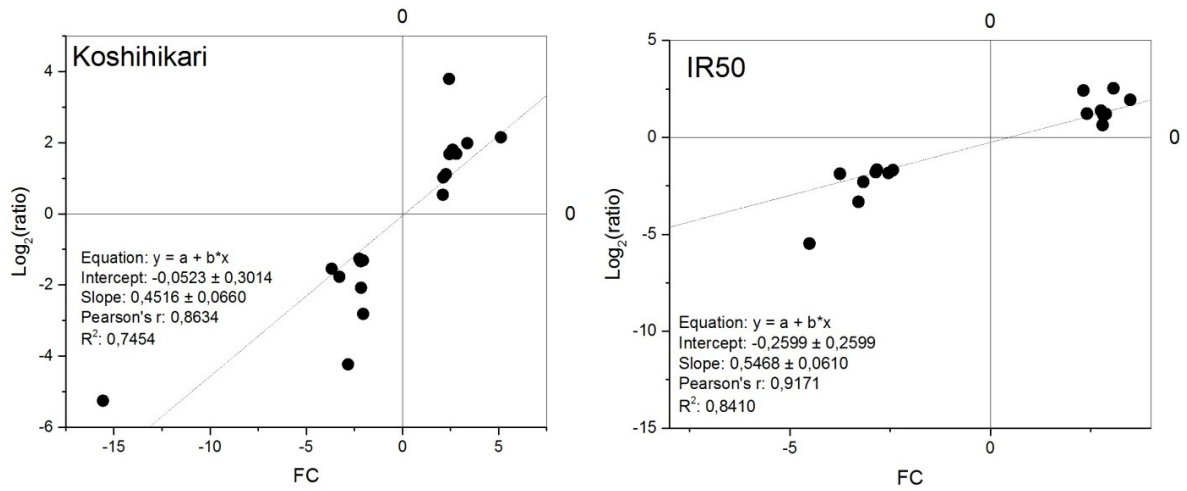
**Figura Suplementaria 2.** Análisis cuantitativo del patrón de crecimiento de órgano completo y sus bases celulares la velocidad de elongación foliar que determinan el tamaño de hoja en un rango de *Graminae*. **A)** la relación entre el largo final de hoja (FLL), velocidad de elongación foliar (LER), y duración de la expansión foliar ( $T_{LE}$ ). **B)** la relación entre LER, producción celular (P), y largo de célula madura ( $I_{mat}$ ). **C)** la relación entre P de células hermanas, el número de células en el meristema ( $N_{div}$ ) y la velocidad promedio de división celular (D). **D)** la relación entre  $I_{mat}$  de células hermanas, largo de las células al final del meristema ( $I_{div}$ ) y el incremento de largo relativo (RLI). **E)** la relación entre  $I_{div}$  y RLI de células hermanas. **F)** la relación entre RLI, velocidad relativa de expansión (RER) tiempo en la zona de elongación ( $T_{el}$ ) de células hermanas. Detalles de los parámetros de regresión se muestran en la figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$ , coeficiente de correlación;  $B_1$  y  $B_2$ , coeficientes estandarizados Beta; N, número de muestras.



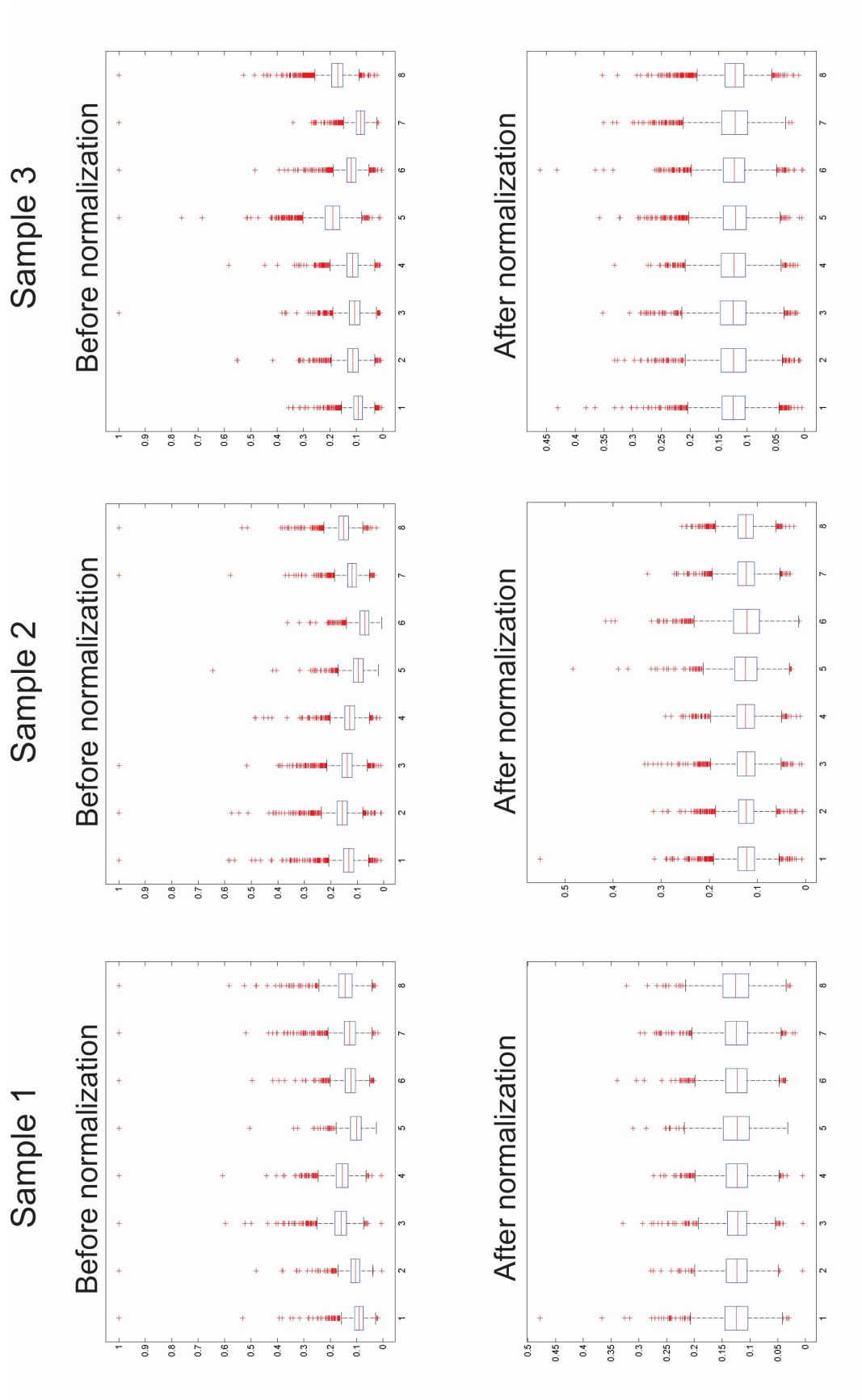
**Figura Suplementaria 3.** Modelo completo de las bases celulares de las diferencias en tamaño de hoja a lo largo de especies de Eudicotiledóneas. La correlación entre el área de la hoja (LBA), área de célula madura ( $A_{\text{mat}}$ ) y número de células ( $N_{\text{mat}}$ ) para células epidérmicas de hojas de dicotiledóneas. Detalles de los parámetros de regresión se muestran en la figura:  $C_0$ ,  $C_1$ , y  $C_2$  son los coeficientes parciales;  $R^2$ , coeficiente de correlación;  $B_1$  y  $B_2$ , coeficientes estandarizados Beta; N, número de muestras.



**Figura Suplementaria 4.** Efecto del ST en el perfil del largo celular. Largo celular desde la base de la hoja medido en seis cultivares en condiciones OT (línea negra) y ST (línea gris) cada un mm. Los datos son medias  $\pm$  DE. n=5.



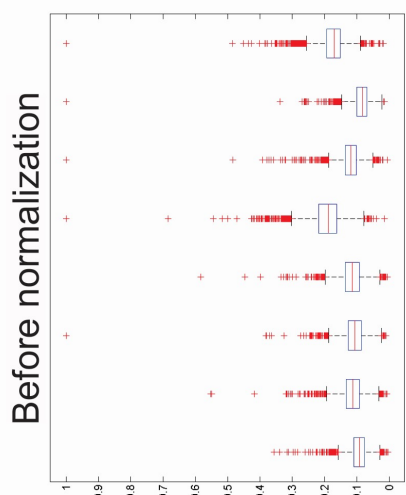
**Figura Suplementaria 5.** Análisis de regresión y correlación de Pearson para la validación de los resultados del microarreglo. Los gráficos muestran la expresión relativa de los genes obtenidos del microarreglo (eje X) y de la qPCR (eje Y). Se muestra en los gráficos información sobre la regresión lineal.



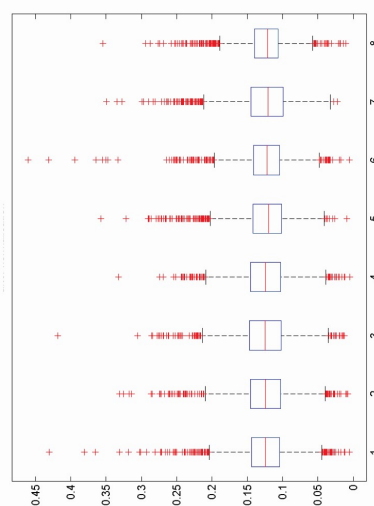
**Figura Suplementaria 6.** Dibujos de cajas de datos crudos de los tres análisis de muestras marcadas con iTRAQ usando Uniprot *O. sativa* japonica ssp (39947) para búsqueda de datos

antes (arriba) y después (abajo) de la normalización con CONSTANd. Los dibujos de cajas muestran valores de la mediana, cuartiles superior e inferior, mayores/menores datos no-aberrantes, y datos aberrantes.

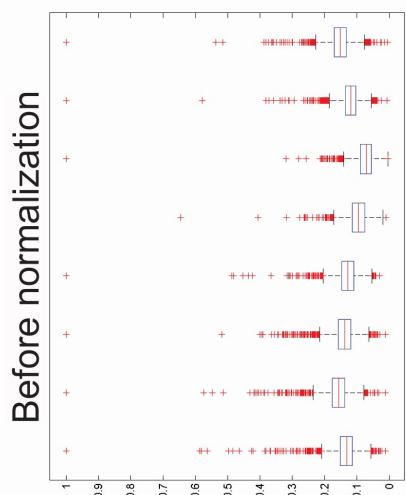
### Sample 3



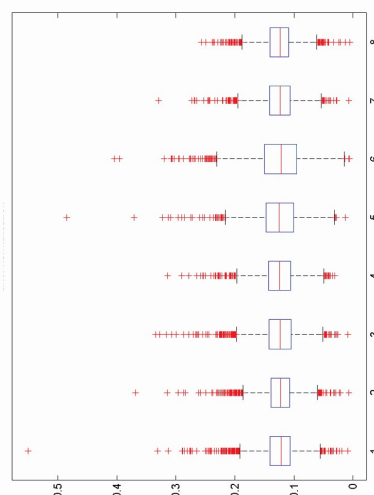
### After normalization



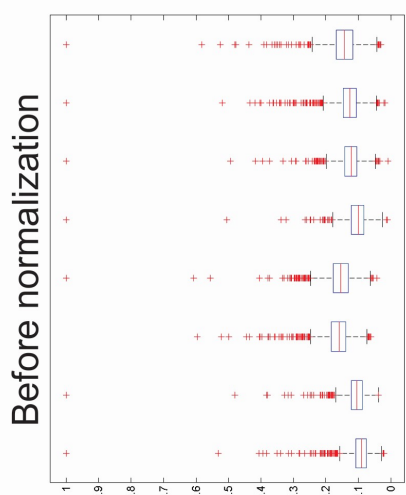
### Sample 2



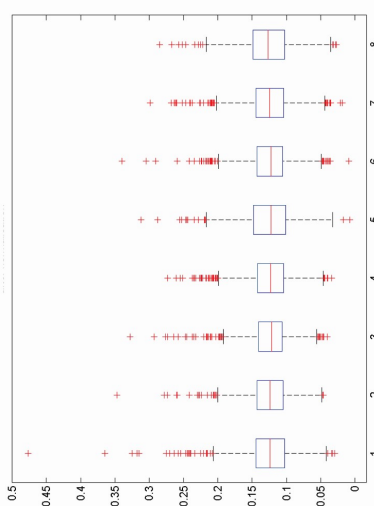
### After normalization



### Sample 1



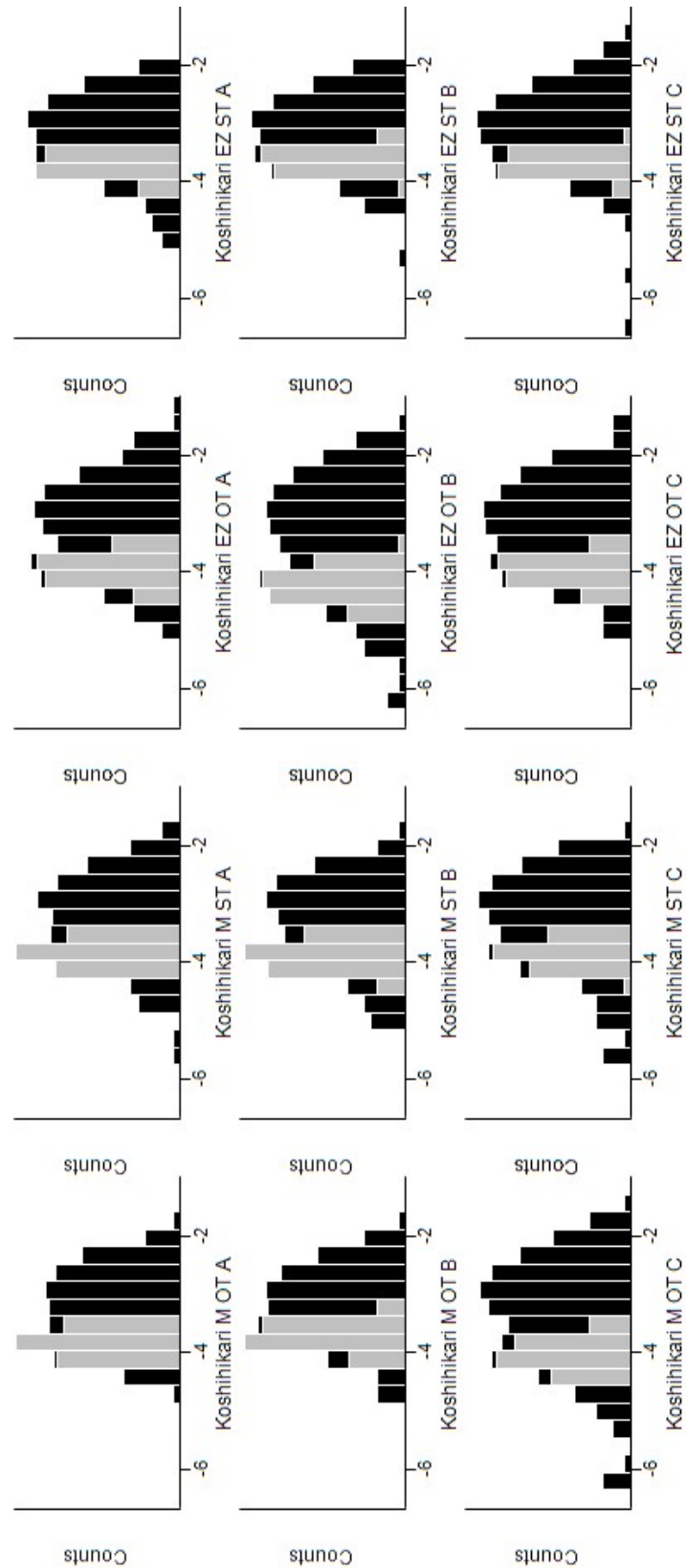
### After normalization



**Figura Suplementaria 7.** Dibujos de cajas de datos crudos de los tres análisis de muestras marcadas con iTRAQ usando Uniprot *O. sativa indica ssp* (39946) para búsqueda de datos

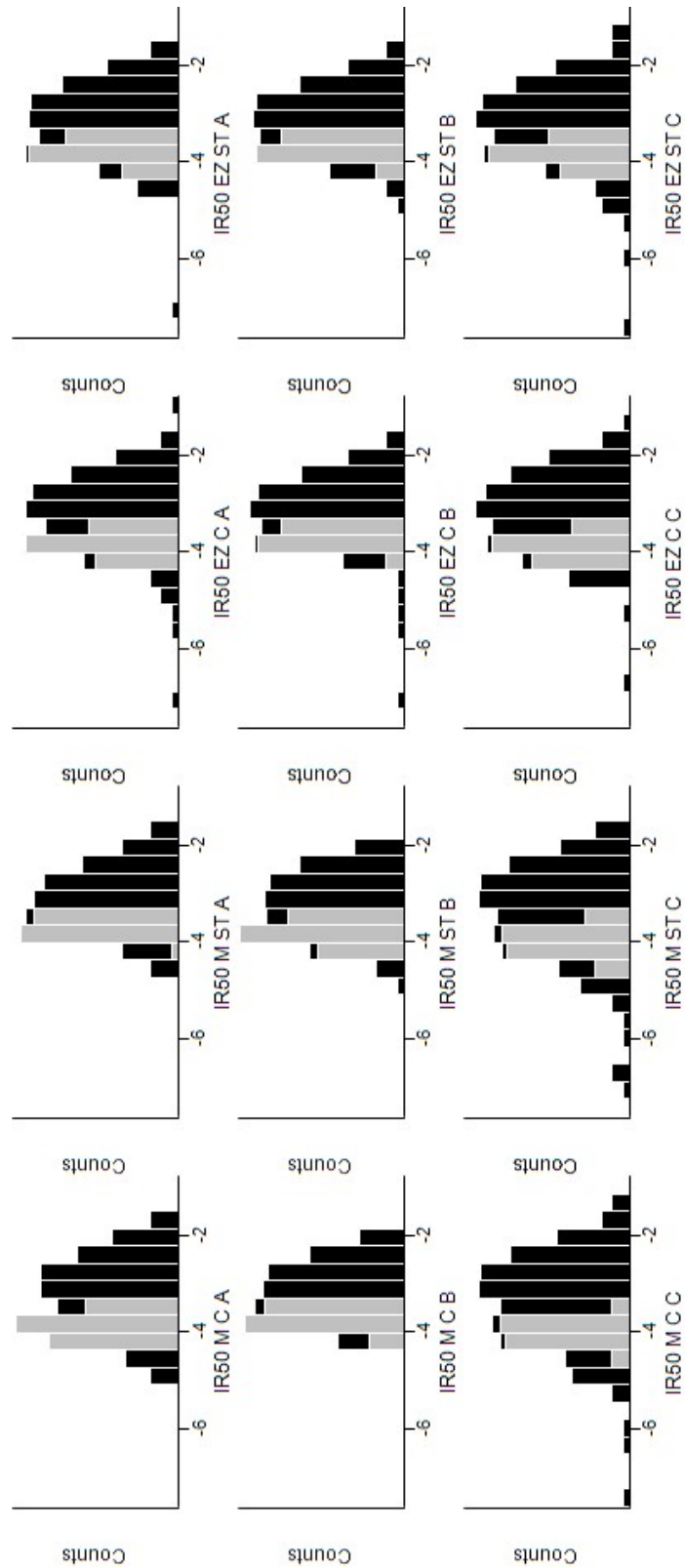


antes (arriba) y después (abajo) de la normalización con CONSTANd. Los dibujos de cajas muestran valores de la mediana, cuartiles superior e inferior, mayores/menores datos no-aberrantes, y datos aberrantes.



**Figura Suplementaria 8.** Distribución de la abundancia de péptidos mostrados como histogramas para cada muestra de Koshihikari analizada en base a la subespecie japónica. Los datos fueron escalados; en negro todos los datos, en gris los valores faltantes imputados. La etiqueta de cada muestra está marcada como sigue: nombre del cultivar (Koshihikari), zonas

(M: meristema; EZ: zona de elongación), tratamiento (OT: temperaturas óptimas; ST: temperaturas subóptimas), y pool de muestra (A, B, o C).



**Figura Suplementaria 9.** Distribución de la abundancia de péptidos mostrados como histogramas para cada muestra de IR50 analizada en base a la subespecie japónica. Los datos fueron escalados; en negro todos los datos, en gris los valores faltantes imputados. La etiqueta de cada muestra está marcada como sigue: nombre del cultivar (IR50), zonas (M: meristema;

EZ: zona de elongación), tratamiento (OT: temperaturas óptimas; ST: temperaturas subóptimas), y pool de muestra (A, B, o C).

## ***Datos suplementarios***

Los datos suplementarios se darán como archivos extra al preguntar a ayelen@gazquez.com.ar dado que no entran en esta Tesis. Los datos suplementarios corresponden a:

**Datos Suplementarios 1.** Datos crudos del análisis transcripcional en archivos .CEL.

**Datos Suplementarios 2.** Datos de los péptidos detectados en el análisis proteómico antes del análisis estadístico.

**Datos Suplementarios 3.** Abundancia de los péptidos en cada muestra luego de la normalización por CONSTANd. Casilleros vacíos significan que el ion reportero estaba por debajo del límite de detección o faltaba. Cero significa que el péptido no pudo corresponderse en las distintas corridas.

