

# Capítulo 7. Tolerancia al frío en el cultivo del arroz en el mundo

*Gabriel Donoso Ñ., Viviana Becerra V., Mario Paredes C., Maribel Cruz G.*

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una de las principales fuentes de alimentación para la población mundial y está sujeto a una demanda cada vez más difícil de cubrir (Khush, 1997; Cantrell y Reeves, 2002). Este cultivo es sensible a las bajas temperaturas y crece en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Biswas et al., 2019). Se considera que el cultivo del arroz crece en condiciones óptimas entre los 25 y 35 °C y temperaturas mínimas críticas de crecimiento que varían según el estado de desarrollo (Biswas et al., 2019). Las bajas temperaturas son un importante factor limitante respecto a la productividad del cultivo y restringe su ubicación geográfica (Xin y Browse, 2001). Éste es un problema que afecta, principalmente, a regiones montañosas de los trópicos y regiones templadas (Xie et al., 2012). En el ámbito mundial, 15 millones de hectáreas en África, Asia, Australia, Europa y América del Sur y del Norte son afectadas por las bajas temperaturas cada año, lo que resulta en una pérdida de rendimiento anual de 1,0 a 3,9 t ha<sup>-1</sup> (Jena y Hardy, 2012; Hyun et al., 2016). En Australia, la variación en los rendimientos promedio se debe en especial a eventos de temperatura inferiores a 15 °C durante la etapa reproductiva del cultivo, donde es común que las temperaturas sean tan bajas como a 11 o 12 °C (Reinke et al., 2012). En Bután, país ubicado al sur de la China y al norte de la India, el patrón de temperaturas es bajo-alto-bajo, como en Japón, el norte de China y Corea, donde la baja temperatura es un problema en la etapa temprana de crecimiento y también en la etapa reproductiva y de maduración. En Japón, 1,6 millones de hectáreas plantadas con arroz están expuestas a bajas temperaturas del verano. En Corea, donde se cultivan alrededor de un millón de hectáreas, los daños por frío pueden presentarse en la primavera y el otoño. En Nepal, 1,5 millones de hectáreas son amenazadas por bajas temperaturas. El clima frío recurrente con temperaturas de 8 a 10 °C (al inicio de la etapa vegetativa) hasta 13 a 15 °C (durante la floración y maduración) son las que afectan el arroz en Rusia. En California (U.S.A.), al igual que en Uruguay, el desafío relacionado con el clima es el vigor de las plántulas y la tolerancia al frío, tanto en estado vegetativo como en el reproductivo para ganar estabilidad en el rendimiento. En Chile, el país más austral del mundo donde se cultiva el arroz (Donoso et al., 2014), tiene temperaturas mínimas inferiores a 10 °C durante la etapa vegetativa e inferiores a 15 °C, durante la etapa reproductiva (Donoso et al., 2015). En los distritos del norte de Bangladesh, el arroz se afecta por el frío durante el establecimiento y la etapa reproductiva del cultivo y la mortalidad de las plántulas puede llegar hasta el 90 %. Dos millones de hectáreas de arroz en el norte y el noreste de Bangladesh se han visto afectadas por una fuerte ola de frío que causa pérdidas parciales o totales del cultivo (Rashid y Yasmeen, 2018).

Aumentar la producción de arroz en todo el mundo, incrementando la superficie sembrada es altamente improbable, pudiéndose generar un escenario de escasez alimentaria (Khush, 1997). Por ello, la sustentabilidad de la producción de arroz depende del desarrollo de nuevos cultivares de arroz, con rendimientos altos y estables, y tolerantes al frío, entre otros factores.

## Efectos de las bajas temperaturas en el cultivo del arroz

Las bajas temperaturas son una de las principales limitantes para el rendimiento de los cultivos en el mundo (Sanghera et al., 2011). Particularmente en el caso del arroz, éstas afectan el crecimiento, desarrollo y potencial de rendimiento de la planta. En general, el arroz es susceptible a temperaturas inferiores a 15 °C (Howarth y Ougham, 1993; Fujino et al., 2004). Los efectos de las bajas temperaturas en el cultivo dependen de la etapa de desarrollo, intensidad y tiempo de exposición (Díaz et al., 2006). La exposición a bajas temperaturas causa cambios fisiológicos en el cultivo (de los Reyes et al., 2003; Aghaee et al., 2011), como la disminución del contenido total de

clorofila (Aghaee et al., 2011), inhibición de la actividad fotosintética (Allen y Ort, 2001; Díaz et al., 2006; Suzuki et al., 2008), y estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004).

### **Efecto de las bajas temperaturas en la etapa de germinación**

En la etapa de germinación, la temperatura mínima crítica para su desarrollo es de 10 °C (Yoshida, 1981). La germinación ocurre idealmente entre 18 y 33 °C (Biswas et al., 2019). Las semillas tienen un papel esencial en el ciclo de vida de las plantas (He et al., 2011). En condiciones óptimas, las semillas pueden iniciar la actividad metabólica relacionada con la movilización de reservas, la biosíntesis de nuevas proteínas y la regeneración de la membrana celular (He y Yang, 2013). Este proceso comienza con la captación de agua (fase I), la reactivación del metabolismo (fase II) y la emergencia de la radícula (fase III). La fase II es la etapa más crítica, durante la cual se reactivan todas las vías metabólicas y procesos fisiológicos necesarios (He et al., 2011). La germinación es un proceso complejo que involucra muchos eventos relacionados con genes, proteínas y metabolitos. Sin embargo, muchos aspectos de este proceso aún son desconocidos. Durante el proceso de germinación, la mitocondria es una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS), que generan superóxido y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y también los glioxisomas que producen una alta cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la enzima glicolato oxidasa (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Otra fuente de radicales superóxidos son las NADPH oxidasas ubicadas en la membrana plasmática. Las moléculas de ROS como el radical hidroxilo (<sup>•</sup>HO), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los radicales superóxidos (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) pueden causar estrés oxidativo en la célula vegetal (Bailly, 2004; Rinalducci et al., 2008), lo que induce daño a componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ADN (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004). Este estrés puede causar la modificación de proteínas que producen una modificación postraduccional (Moller et al., 2007). Estas modificaciones son extremadamente importantes, porque pueden alterar las propiedades físicas y químicas, plegamiento, conformación, distribución, estabilidad, actividad y, en consecuencia, las funciones de las proteínas (Woodi et al., 2009). Algunos estudios han demostrado que las ROS tienen un papel importante al comienzo de la germinación (Yin et al., 2009). Sin embargo, es necesario un equilibrio complejo entre ROS y mecanismos antioxidantes para la supervivencia de las semillas y el logro de la germinación (Bailly, 2004). Las plantas han desarrollado numerosos mecanismos para mantener este equilibrio. Algunos de ellos están asociados con sistemas eliminadores de ROS, enzimáticos y no enzimáticos (Pradedova et al., 2011).

### **Metodologías para la evaluación de la tolerancia al frío en la etapa de germinación**

Respecto a la evaluación de la tolerancia al frío en la etapa de germinación, hay diversas metodologías que van desde 10 hasta 17 °C, siendo el más común 15 °C por 7 a 12 d (Cuadro 1). La evaluación normalmente consiste en la determinación del porcentaje de germinación, pero también existen casos en los que se determina el largo del coleóptilo. Este tipo de evaluaciones se realiza en condiciones de cámara en un laboratorio.

### **Mapeo de caracteres cuantitativos (QTLs) y tolerancia al frío en el arroz**

La tolerancia al frío en el cultivo del arroz es una característica cuantitativa controlada por múltiples genes. Por lo tanto, es complejo asociar directamente genes responsables de la tolerancia al frío. Para ello, estrategias para el desarrollo de marcadores moleculares y mapas de ligamiento han hecho posible la creación de una verdadera 'cartografía genética' y han obtenido un mapeo de los cromosomas, donde se ubican diversos *loci* de carácter cuantitativo (quantitative trait loci, QTLs), como es la tolerancia al frío. Esto ha permitido el desarrollo de estrategias como la selección asistida por marcadores, con lo que se eligen cultivares con la mayor cantidad de QTLs relacionados con tolerancia a bajas temperaturas. Para ello, se han desarrollado y mapeado los cromosomas de

poblaciones obtenidas de cruzamientos de genotipos con tolerancia a frío contrastante, lo que permite encontrar QTLs adecuados (Zhang et al., 2014a).

### Mapeo de caracteres cuantitativos (QTLs) relacionados con tolerancia al frío en la etapa de germinación

Los análisis muestran que múltiples genes controlan la germinación en condiciones de bajas temperaturas. La estrategia para encontrar los QTLs está resumida en el Cuadro 2. Los principales QTLs han sido encontrados en los cromosomas 2, 3, 4, 5, 7 y 8. Las principales metodologías utilizadas en germinación, para establecer los QTLs que tienen una variación explicada de al menos 15 %, fueron obtenidos con evaluaciones a 15 °C. En las evaluaciones se determinó el efecto de las bajas temperaturas en la velocidad de germinación o porcentaje de germinación.

### Evaluación de genes relacionados con tolerancia al frío en etapa de germinación

En el caso de la etapa de germinación, existen pocos antecedentes relacionados con la evaluación de genes que confieren tolerancia en esta etapa. Dentro de ellos se encuentra un gen relacionado con el incremento en la velocidad de germinación (*OsGST*; Takesawa et al., 2002) (Cuadro 3).

**Cuadro 1.** Metodologías para la evaluación de la tolerancia al frío en el cultivo del arroz en la etapa de germinación.

Metodología	Referencia
Germinación a 10, 15, 20 y 25 °C por 3 a 30 d.	Bertin et al., 1996
Germinación a 17 °C por 7 d.	Sthapit y Witcombe, 1998
Germinación a 13 °C y a 15 °C por 7 d.	Lee, 2001
Germinación a 15 °C por 4 d.	Miura et al., 2001
Largo del coleóptilo tras germinación a 15 °C por 10 d.	Hou et al., 2003
Germinación a 15 °C por 7 d.	Fujino et al., 2004
Germinación a 15 °C por 10 d.	Zhang et al., 2005
Germinación a 15 °C por 6 d.	Chen et al., 2006
Germinación a 15 °C por 7 a 15 d.	Jiang et al., 2006
Germinación a 14 °C por 7 a 17 d.	Han et al., 2006
Germinación a 15 °C por 10 d.	Ji et al., 2008
Largo del coleóptilo posterior a tratamiento de 13 °C por 4 d.	Donoso et al., 2013
Germinación a 15 °C por 4 a 5 d.	Li et al., 2013
Germinación a 15 °C por 12 d.	Ranawake et al., 2014
Germinación a 15 °C por 5 d.	Satoh et al., 2016
Germinación a 14 °C por 12 d.	Wang et al., 2016
Germinación a 15 °C por 7 y 8 d.	Jiang et al., 2017
Germinación a 15 °C por 7 d.	Yang et al., 2018

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

**Cuadro 2.** Estudio de QTLs relacionados con la tolerancia al frío en la etapa de germinación.

Cromosoma (N°)	Nombre del QTL	Varianza fenotípica (%)	Método de evaluación	Referencias
2	<i>qLTG2</i>	27,7	Porcentaje de germinación a 15 °C.	Hou et al., 2003
3	<i>qLTG 3 1</i>	35,1	Germinación a 15 °C.	Fujino et al., 2004
3	<i>qLTG 3 2</i>	17,4	Germinación a 15 °C .	Fujino et al., 2004
2, 7	<i>qLVG2, qLVG7-2, qCIVG7-2</i>	9,0-14,2	Vigor de germinación a 14 °C .	Han et al., 2006
5	<i>qLTG5-4</i>	24,3	Germinación a 15 °C.	Jiang et al., 2006
5	<i>qLTG5-2</i>	32,8	Germinación a 15 °C.	Jiang et al., 2006
3	<i>qLTG3</i>	21,6	Germinación a 15 °C.	Jiang et al., 2006
3	<i>qLTG3-1</i>	30	Germinación a 15 °C.	Fujino et al., 2008
2	<i>qLTG2-1</i>	33,3	Germinación a 15 °C.	Ji et al., 2008
5, 7	<i>qCTB-5-1/2/3, -7</i>	-	Germinación a 5 °C.	Lin et al., 2010
3	<i>qLTB3</i>	18,1-24,4	Vigor de germinación.	Shirasawa et al., 2012
3	<i>qLTG3,2</i>	23	Germinación a 13 y 15 °C.	Satoh et al., 2016
8	<i>qCGR8</i>	21,7	Germinación a 13 °C.	Jiang et al., 2017

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

**Cuadro 3.** Genes relacionados con la tolerancia al frío en el cultivo del arroz en la etapa de germinación.

Gen sobreexpresado/promotor	Función del gen	Tratamiento de frío	Características de las plantas transgénicas	Referencia
<i>OsGST</i> /Ubiquitina de maíz.	Detoxificación celular.	Germinación a 13 °C y crecimiento posterior a germinación a 15 °C, durante 13 d.	Disminución en 56 % de los d necesarios para la germinación en las plantas transgénicas, respecto a las plantas sin transformar. El crecimiento de la raíz y el tallo fue mayor en las plantas transgénicas respecto a las plantas no transformadas.	Takesawa et al., 2002

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

## Efecto de las bajas temperaturas en la etapa de plántula

Durante la etapa de plántula, la temperatura mínima crítica es de 12 a 13 °C (Yoshida, 1981). Tales temperaturas generan cambios fisiológicos en el cultivo (de los Reyes et al., 2003; Aghaee et al., 2011), como disminución del contenido total de clorofila (Aghaee et al., 2011), inhibición de la actividad fotosintética (Allen y Ort, 2001; Díaz et al. 2006; Suzuki et al., 2008) y estrés oxidativo. Esto afecta el vigor, generando poca uniformidad entre las plántulas (da Cruz et al., 2006) y una disminución en el macollamiento (Shimono et al., 2002). Además, puede generar daño irreversible como daño foliar, clorosis y necrosis (Suzuki et al., 2008; Ye et al., 2009; Andaya y Mackill, 2003a). Lo anterior puede provocar un bajo número de plántulas debido a una alta mortalidad (Mackill y Lei, 1997; Andaya y Mackill; 2003a; Baruah et al., 2009) y también una falta madurez del cultivo (Shimono et al., 2004; da Cruz et al., 2006). En climas templados, las bajas temperaturas afectan negativamente el establecimiento de las plántulas, reduciendo la tasa de crecimiento y provocando el amarillamiento de las hojas (Shimono et al., 2002; Ali et al., 2006; Baruah et al., 2009; Alvarado y Hernaíz, 2007). Todos estos efectos pueden inducir una disminución en los rendimientos del cultivo.

## Metodologías para la evaluación de la tolerancia al frío en la etapa de plántula

La tolerancia al frío en la etapa de plántula puede ser evaluada desde los 4 °C hasta los 12 °C, examinando, principalmente, el daño visible, supervivencia, peso fresco foliar y, en pocos casos, algunos metabolitos como prolina y malondialdehído (MDA) (Cuadro 4). La mayoría de las evaluaciones se realiza posterior al tratamiento por frío, con un periodo de recuperación que va de 5 a 7 d.

## Mapeo de caracteres cuantitativos (QTLs) relacionados con tolerancia al frío en la etapa de plántula

Los QTLs determinados para la tolerancia al frío en el estado de plántula se muestran resumidamente en el Cuadro 5. Existe una mayor heterogeneidad en las evaluaciones realizadas respecto a las bajas temperaturas utilizadas y a los días de exposición al frío. Las temperaturas varían entre 4 y 10 °C, con 6 a 13 d de exposición, respectivamente. En general, las evaluaciones consideran el crecimiento de la planta o la supervivencia posterior al tratamiento por bajas temperaturas. Se observa que la presencia de QTLs está en la mayoría de los cromosomas.

## Evaluación de genes relacionados con la tolerancia al frío en etapa de plántula

Dentro de los genes evaluados, más de la mitad corresponde a genes sobreexpresados de arroz y tres corresponden a genes provenientes de otras especies como *Zea mays*, *Aeluropus littoralis*, *Triticum aestivum*. La sobreexpresión de los genes mencionados en el Cuadro 6 implica un considerable incremento en la tolerancia al frío en la etapa de plántula, mejorando la supervivencia, incrementando en algunos casos la producción de osmolitos compatibles como prolina y, en otros casos, incrementando la tolerancia a otros estreses como el hídrico.

**Cuadro 4.** Metodologías para la evaluación de la tolerancia al frío en el cultivo del arroz en la etapa de plántula.

Metodología	Referencia
Tasa de supervivencia después de 10 d del tratamiento de frío (10 °C por 3, 6 y 9 d).	Bertin et al., 1996
Porcentaje de sobrevivencia (6 a 10 °C por 7 d).	Qian et al., 2000
Crecimiento y decoloración. Aire frío a 12 °C día / 10 °C noche, por 10 d, en estado de tres hojas.	Lee, 2001
Escala visual del 1 al 9, posterior a tratamiento de 9 °C por 8, 14, 16 y 18 d.	Andaya y Mackill, 2003b; Andaya y Tai, 2006
Tratamiento de 10 °C día / 6 °C noche, por 7 d y 10 d a 25 °C.	Lou et al., 2007
Tratamiento de 12 °C constantes por 10 d.	Han et al., 2007
Tasa de sobrevivencia después de 14 d del tratamiento (4 °C por 6 d en oscuridad).	Koseki et al., 2010
Actividad enzimática (POD, SOD, CAT y APX) (4 °C de 0 a 4 d más recuperación a 25 °C por 7 d).	Bonnecarrère et al., 2011; Huang et al., 2009; Sato et al., 2001
Evaluación del crecimiento de la plántula. 1 = plántula verde oscuro, 3 = plántula verde claro, 5 = plántula amarilla, 7 = plántula café, 9 = plántula muerta. Tratamiento de 9 °C por 14 d.	Kim y Tai, 2011; IRRI, 2002
Cambios en peso fresco de plantas después del tratamiento de frío como indicador de daño por frío (10 °C de 1 a 48 h).	Bonnecarrère et al., 2011
Tasa de supervivencia posterior a tratamiento de frío. Tratamiento a 4 °C por 6 d con recuperación a 26 °C por 6 d.	Zhang et al., 2011
Evaluación de metabolitos: fuga de electrolitos, prolina, MDA, AsA y GSH. Tratamiento de 9 °C por 1 a 14 d.	Tian et al., 2011; Zhang et al., 2011; Kim y Tai, 2011; Yang et al., 2012
Evaluación del daño visible en la hoja. Tratamiento a 10 °C constantes, por 7 d y 7 d de recuperación a 25 °C día/20 °C noche.	Suh et al., 2012
Desarrollo foliar posterior al tratamiento de 4 °C por 7 d, con recuperación a 25 °C por 10 d.	Xie et al., 2012
Tasa de supervivencia de plántula recién germinada con tallo de 5 mm de largo, posterior a tratamiento de frío a 2 °C, con 3 d de recuperación a 20 °C por 7 d.	Zhou et al., 2012
Tratamiento a 14 °C por 2 h seguidas, a 12 °C por 4 h, a 10 °C por 4 h, a 9 °C por 14 h, a 8 °C por 6 h y a 7 °C por 2 h.	Yang et al., 2013
Tratamiento de 4 a 5 °C por 10 d y 7 d de recuperación a 25 °C día/25 °C noche.	Liu et al., 2013
Tratamiento de 9 °C por 9 d, con 7 d de recuperación a 25 °C.	Zhang et al., 2014b
Tratamiento de 15 °C en condiciones de campo.	Verma et al., 2014
18 °C día / 8 °C noche, por 18 d, con 7 d de recuperación a 30 °C día/25 °C noche.	Kim et al., 2014
Evaluación de daño visual a través de escala arbitraria. Tratamiento de 4 °C por 7 d y 5 d de recuperación a 25 °C. Segundo periodo de estrés a 4 °C por 7 d con 5 d de recuperación 25 °C.	Ranawake et al., 2014
Tratamiento de 4 °C por 4 d con 7 d de recuperación a 25 °C día/20 °C noche.	Wang et al., 2016
Tratamiento de 10 °C por 10 d con 7 d de recuperación a 30 °C.	Biswas et al., 2017

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

**Cuadro 5.** Estudio de QTLs relacionados con la tolerancia al frío en la etapa de plántula.

Cromosoma (N°)	Nombre QTL	Varianza fenotípica (%)	Evaluación	Referencias
4	<i>qCTS4-1</i>	20,8	Daño foliar, posterior a tratamiento de 9°C por 8 a 18 d.	Andaya y Mackill, 2003a
6	<i>qCTS6-1</i>	15,3	Daño foliar, posterior a tratamiento de 9°C por 8 a 18 d.	Andaya y Mackill, 2003a
12	<i>qCTS12a</i>	40,6	Daño foliar, posterior a tratamiento de 9°C por 8 a 18 d.	Andaya y Mackill, 2003a
12	<i>qCTS12b</i>	41,7	Daño foliar, posterior a tratamiento de 9°C por 8 a 18 d.	Andaya y Mackill, 2003a
11	<i>qSCT-11</i>	29,8	Tasa de supervivencia, después de 13 d a 10 °C.	Zhang et al., 2005
3, 5, 8	<i>qSV-3-1/2, -5, -8-1/2</i>	3,1-15,8	Crecimiento de la planta.	Zhang et al., 2005
12	<i>qCTS12</i>	>40	Daño foliar, posterior a tratamiento de 9 °C constantes por 8 a 14 d.	Andaya y Tai, 2006
4	<i>qCTS4</i>	40	Daño foliar, posterior a tratamiento de frío nocturno de 9 °C.	Andaya y Tai, 2007
2	<i>qCTS-2</i>	27,4	Tasa de supervivencia, después de 7 d a 6-10 °C.	Lou et al., 2007
1	<i>qCST-1</i>	24,5	Tasa de supervivencia, después de 7 d a 6 °C.	Jiang et al., 2008
11	<i>qCtss11</i>	40	Tasa de supervivencia, después de 6 d a 4 °C.	Koseki et al., 2010
11	<i>qCtss11</i>	40	Crecimiento y daño foliar, posterior a tratamiento de frío a 4 °C por 6 d.	Koseki et al., 2010
2	<i>qCST2</i>	20	Sobrevivencia, posterior a tratamiento de 4-5 °C.	Liu et al., 2013
7	<i>qCTS11(1)-2</i>	35,6	Daño foliar, posterior a tratamiento a 4 °C.	Ranawake et al., 2014
7	<i>qCTS7(2)</i>	35,3	Daño foliar, posterior a tratamiento a 4 °C.	Ranawake et al., 2014
8	<i>qCTS8(2)</i>	27,2	Daño foliar, posterior a tratamiento a 4 °C.	Ranawake et al., 2014
11	<i>qCTS11</i>	23,1	Daño foliar, posterior a tratamiento con agua fría a 9,1 °C constante.	Zhang et al., 2014b
1	<i>qSCT1a</i>	10,6	Tolerancia a la marchitez, posterior a tratamiento de 18 °C día/ 8 °C noche, por 18 d.	Kim et al., 2014
11	<i>qSCT11</i>	16,5	Tolerancia a la marchitez, posterior a tratamiento de 18 °C día/ 8 °C noche, por 18 d .	Kim et al., 2014
11	<i>qCTS11(1)-1</i>	22,2	Daño foliar, posterior a tratamiento a 4 °C.	Ranawake et al., 2014

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

**Cuadro 6.** Genes relacionados con la tolerancia al frío en el cultivo del arroz en la etapa de plántula.

Gen(es) sobreexpresado(s) / promotor	Función del gen	Tratamiento de frío/fenología	Características de las plantas transgénicas	Efecto negativo presente en las plantas transgénicas	Referencia
<i>OsCDPK7/CaMV 35S</i> .	Proteína quinasa dependiente de $Ca^{2+}$ .	4 °C durante 1 d/ plántula de 10 d.	Mejora en la tolerancia al frío, estrés salino e hídrico./ El grado de tolerancia al frío se correlaciona con los niveles de expresión de <i>OsCDPK7</i> . Fluorescencia de las clorofilas recuperadas a niveles cercanos a la normalidad en las plantas transgénicas 48 horas posterior al tratamiento. Además, en las plantas transgénicas se mejoró la inducción de genes de respuesta al estrés en los tratamientos de estrés salino e hídrico.	–	Saijo et al., 2000
<i>OsMAPK5/CaMV 35S</i> .	MAP quinasa.	4 °C durante 3 d/ plántula de 14 d.	Incremento en la tolerancia al estrés por frío, sequía e hídrico.	–	Xiong y Yang, 2003
<i>OsDREB1</i> y <i>AtDREB1</i> / <i>CaMV 35S</i> y ubiquitina de maíz.	Factores de transcripción.	2 °C durante 4 d/ plántula de 17 d.	Mayor supervivencia (> 90 %) que planta sin transformar posterior a bajas temperaturas, estrés hídrico y salino. Elevado contenido de osmoprotectores como prolina y azúcares solubles.	Crecimiento lento en condiciones normales. Fenotipo enano en estado reproductivo, en algunas líneas transgénicas.	Ito et al., 2006
<i>OsCOIN</i> /Ubiquitina de maíz.	Factor de transcripción.	4 °C durante 3,5 d/ plántula de 14 d.	Incremento de la tolerancia al frío en las plantas transformadas (supervivencia > 79 % en planta transgénica y 52 % en planta sin transformar). Además, se observó un incremento en la tolerancia a estrés salino e hídrico. El contenido de prolina tres veces mayor en plantas transformadas en comparación con las plantas sin transformar.	–	Liu et al., 2007



<i>OsDREB1F/CaMV 35S.</i>	Factor de transcripción.	10°C durante 7 d/ plántula de 16 d.	Mejora la tolerancia a las bajas temperaturas, estrés hídrico y salino.	-	Wang et al., 2008
<i>SNAC2 (Oryza sativa)/ Ubiquitina de maíz.</i>	Factor de transcripción.	4 °C durante 5 d/ plántula de cuatro hojas.	Incremento en la tolerancia al frío tras 7 d de recuperación con más de 50 % en comparación con plantas muertas no transformadas. Además, mejora tolerancia al estrés salino e hídrico. Plantas transgénicas presentaron una menor permeabilidad.	-	Hu et al., 2008
<i>Triticum aestivum TaWFT1 y TaWFT2/CaMV 35S.</i>	Metabolismo de carbohidratos.	5 °C durante 11 d/ plántula de 10 d.	Mejora en la tolerancia al frío con sobre 90 % de supervivencia en comparación con 10 % en las plantas no transformadas. Alta acumulación de fructanos en las plantas transgénicas respecto a las no transformadas.	-	Kawakami et al., 2008
<i>OsZFP245/CaMV 35S.</i>	Factor de transcripción.	4 °C por 4 d/ plántula de tres a cuatro hojas.	Alta tolerancia al frío y estrés hídrico (~80 % supervivencia, 20 % en plantas no transformadas). Incremento de prolina y altos niveles de Pirrolina 5 carboxilato sintetasa y genes de transportador de prolina. Incremento en la actividad de enzimas que permiten eliminar especies reactivas derivadas del oxígeno.	Plantas transgénicas sensibilidad a ácido abscísico exógeno.	Huang et al., 2009
<i>OsMYB3R-2/Ubiquitina de maíz.</i>	Factor de transcripción.	2 °C con un máximo de 3,5 d/ plántula de tres hojas.	Mejora la tolerancia estrés frío con 50 % a 20 % de supervivencia en plantas transgénicas a diferencia de las plantas sin transformar que mueren posterior al tratamiento. Se incrementa prolina libre en 1,5 veces respecto a la planta sin transformar. Existe un mayor índice mitótico en las líneas transgénicas respecto a la planta no transformadas.	Crecimiento retardado en condiciones normales en el estado de excursión de panícula. Raíces cortas.	Ma et al., 2009

<i>OsAsr1</i> /Ubiquitina de maíz.	Desconocido	4 °C durante 4 d/ plántula de 10 d.	Mejora en la tolerancia al frío con 32 % de plantas sin marchitez en comparación de las plantas no transformadas con 96 % de plantas marchitas. Eficiencia de la fotosíntesis dos veces mayor que las plantas no transformadas, 1 d después del tratamiento.	-	Kim et al., 2009
<i>OsMYB53</i> /Ubiquitina de maíz.	Factor de transcripción.	4 °C durante 7 d/ plántula de 10 d.	Incremento en la tolerancia al frío con 86 % de supervivencia de las plantas transgénicas, en comparación con la planta no transformada. Represión de la vía de señalización en condiciones de frío, dependiente del factor de transcripción DREB1/CBF.	En invernadero, las plantas transgénicas presentaron una altura 20 % menor, 30 % menor macollamiento y 1 semana de retraso en la excursión de panícula al compararla con la planta no transformada.	Su et al., 2010
<i>OsPRP3</i> /Ubiquitina de maíz.	Proteína de pared celular.	4 °C durante 4 semanas y evaluación a los 42 d.	Mayor tolerancia al frío en plantas transgénicas en comparación con plantas no transformadas. Incremento en el contenido de prolina (4 veces) con respecto a plantas no transformadas. Células del mesófilo de las plantas transgénicas mantuvieron su estructura y conservaron la integridad de pared celular.	-	Gothandam et al., 2010
<i>OsRAN2</i> /Ubiquitina de maíz.	División celular.	4 °C durante 3 d/ plántula de 14 d.	Incremento en la tolerancia al frío con sobre 80 % de plantas transgénicas vivas en comparación con 14 % en las plantas no transformadas. Las plantas transgénicas mantuvieron la división celular, disminuyeron la proporción de células con tubulina intranuclear y formación normal de envoltura nuclear en el tratamiento de frío.	-	Chen et al., 2011

<i>OsTPS1/CaMV 35S.</i>	Metabolismo de carbohidratos.	4 °C durante 5 d/ plántula de 14 d.	Incremento en la tolerancia al frío con 90 % de supervivencia en plantas transgénicas, respecto a 4 % de supervivencia en plantas no transformadas. Incremento de tolerancia a estrés hídrico y salino. Incremento en los niveles de prolina y trealosa.	Leve enanismo y con hojas cortas en plantas crecidas en condiciones normales.	Li et al., 2011
<i>OsOVP1/Ubiquitina de maíz.</i>	Proteína transportadora de H <sup>+</sup> .	4 °C durante por 10 d/plántula de 15 d.	Incremento de la tolerancia al frío con 55 % de supervivencia, comparado con 20 % en plantas sin transformar. Incremento en la integridad de la membrana celular. Disminución en el contenido de MDA. Alta acumulación de prolina.	–	Zhang et al., 2011
<i>ZmCBF3/Ubiquitina de maíz.</i>	Factor de transcripción.	4 °C durante 1 d/ plántula de 21 d.	Las líneas transgénicas mostraron un incremento en la tasa de supervivencia (67 % a 93 %) comparada con la planta sin transformar (32 %), posterior al tratamiento de frío. Incremento de tolerancia a estrés hídrico y salino en plantas transgénicas. Menos contenido de MDA y conductividad relativa posterior al estrés.	Crecimiento retardado en etapa de plántula en condiciones normales. El rendimiento no se ve afectado en condiciones de campo.	Xu et al., 2011
<i>OsNAC5/Ubiquitina de maíz.</i>	Factor de transcripción.	4 °C durante 6 d/ plántula de 14 d.	Incremento de la tolerancia al frío con 70 % de supervivencia en comparación con 50 % de la planta no tratada. También presentaron tolerancia al estrés salino e hídrico. Incremento en la acumulación de prolina y azúcares solubles. Reducción en la acumulación de MDA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Plantas transgénicas mostraron un incremento en liberación de electrolitos solubles en comparación con la planta sin transformar.	–	Song et al., 2011

<i>LeTERF2 (Lycopersicon esculentum)/CaMV35S.</i>	Factor de transcripción.	6 °C durante 3 d/ plántula de 8 d.	Incremento en la tolerancia al frío. Incremento en la acumulación de osmolitos compatibles (prolina y azúcares solubles) y clorofila. Reducción en la presencia de especies reactivas derivadas del oxígeno y MDA posterior al tratamiento de frío. Disminución del índice de fuga de electrolitos posterior al tratamiento.	–	Tian et al., 2011
<i>OsZFP182/CaMV 35S.</i>	Factor de transcripción.	4 °C durante 4 d/ plántula de tres a cuatro hojas.	Alta tasa de supervivencia en líneas transgénicas (~ 80 %) en comparación con las plantas no transformadas (~ 17 %) posterior al tratamiento de frío, estrés salino e hídrico. Acumulación de osmolito compatibles como prolina libre y azúcares solubles.	–	Huang et al., 2012
<i>AISAP/CaMV 35S.</i>	Factor de transcripción.	4 °C durante 1 d y posteriormente a 12 °C por 3 d/ plántula de seis hojas.	Incremento de la tolerancia al frío con un 100 % de supervivencia posterior a tratamiento de frío. Estrés hídrico y salino. Tasa fotosintética restablecida después de 7 d de recuperación, posterior al tratamiento de frío.	–	Saad et al., 2012
<i>OsMYB2/Ubiquitina de maíz.</i>	Factor de transcripción.	2 °C durante 3 d/ plántula de 14 d.	Mejoramiento de la tolerancia al frío con una supervivencia de 80 % en plantas transgénicas, en comparación con 20 % en el caso de las plantas no transformadas. Además, incrementa tolerancia a la sequía y estrés salino.	–	Yang et al., 2012
<i>COLD1 (Oryza sativa).</i>	–	2 a 4 °C por 96 h, con recuperación de 4 d en condiciones controladas/ plántula de tres hojas.	Incremento en la tasa de supervivencia (> 80 %) respecto a las plantas sin transformar (< 20 %).	–	Ma et al., 2015

Os09g0410300	Posible función en vía de señales asociadas a los brasinosteroides.	8 °C en cámara fría hasta 48 h. Evaluación realizada después de 7 d de recuperación, posterior al tratamiento/ Plántula de tres a cuatro hojas.	Incremento en la supervivencia de las plantas transgénicas (80 %), respecto a las no transformadas, las cuales no sobrevivieron.	-	Zhao et al., 2017
--------------	---	---	--	---	-------------------

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

## Efectos de las bajas temperaturas en el cultivo del arroz en la etapa reproductiva

Durante la etapa reproductiva, las bajas temperaturas afectan negativamente la fertilidad del cultivo, causando una disminución en el rendimiento en grano (da Cruz et al., 2006). Las temperaturas mínimas críticas durante esta etapa del desarrollo son 15 °C (inicio de primordio), 15 a 20 °C (inicio de panícula) y 22 °C (antesis) (Yoshida, 1981). La microsporogénesis es la etapa más sensible al frío en el arroz (Nishiyama, 1995). Temperaturas por debajo de 15 °C, por 2 a 4 noches sucesivas durante la microsporogénesis, pueden causar un alto nivel de esterilidad del polen (Satake 1976; Nishiyama, 1984). Durante esta etapa, la sacarosa se almacena en la antera como almidón y se degrada durante la meiosis. Sin embargo, después del evento de frío se observa una acumulación inusual de almidón en la pared de la antera y se puede estimular la biosíntesis del almidón (Mamun et al., 2010). Durante la etapa microspora, la invertasa de la pared celular específica del arroz es regulada en forma negativa por el frío (Oliver et al., 2005). Algunos estudios han demostrado que, en condiciones de frío, el ácido abscísico (ABA) tendría un papel de regulación negativa de las invertasas de la pared celular del tapete, lo que produce inanición de azúcar en las microsporas en desarrollo, y acumulación anormal de almidón en la antera (Sharma, 2014; Oliver et al., 2005). Éstas y otras anomalías, relacionadas con la alteración bioquímica del metabolismo del azúcar, pueden causar hipertrofia del tapete, degradación de la callosa prematura, baja acumulación de almidón en el grano de polen, vacuolación anormal y formación inusual de la pared del polen y, finalmente, esterilidad del polen (Mamun et al., 2010). El estrés oxidativo también causa el aborto del polen. En el arroz se ha encontrado que la disminución de una proteína responsable de la desintoxicación de ROS (MT-1-4B) en el tapete, induce la esterilidad del grano de polen (De Storme y Geelen, 2014). Las bajas temperaturas también generan la esterilidad del óvulo, lo cual puede ser observado durante la floración como florecillas amorfas de color blanquecino (Arshad et al., 2017). Para la etapa reproductiva, la fertilidad de la espiguilla es el rasgo más común evaluado para determinar la tolerancia al frío, y consiste en calcular la tasa de granos llenos por panícula (Sato et al., 2011). También se ha desarrollado un índice de tolerancia al frío, calculado con base en el peso de los granos llenos por panícula (Cruz, 2010).

## Metodologías para la evaluación de la tolerancia al frío en la etapa de reproductiva

Diversas metodologías se han desarrollado para estudiar la etapa reproductiva (Cuadro 7). Las bajas temperaturas utilizadas en las evaluaciones van desde los 5 °C al utilizar aire frío y desde los 19 °C al utilizar tratamiento de agua fría. En el caso del aire frío, los tratamientos no se realizan por más de 5 d, principalmente en la etapa de microspora temprana, los cuales son realizados en cámaras bioclimáticas. En el caso del uso de agua fría, los tratamientos se pueden realizar en condiciones de campo o invernadero, por periodos más largos que van desde inicio de primordio hasta la excursión de la panícula. Estos tratamientos han sido utilizados, principalmente, en la selección de material genético y la búsqueda de QTLs relacionados con la tolerancia al frío en esta etapa del desarrollo del cultivo.

## Mapeo de caracteres cuantitativos (QTLs) relacionados con tolerancia al frío en la etapa reproductiva

En el caso de la etapa reproductiva, los QTLs descritos hasta ahora tienen relación, principalmente, con la cantidad de granos llenos por panícula, largo de la antera y fecha de espigado (Cuadro 8). Las temperaturas utilizadas para las evaluaciones asociadas a estos QTLs fueron 12 °C cuando se utilizó aire frío y 19 °C con agua fría. La duración de la exposición al estrés fue variable, entre 4 d en el caso de aire frío hasta 2 meses en el caso de agua fría.

## Evaluación de genes relacionados con la tolerancia al frío en etapa reproductiva

Pocos genes han demostrado efectividad en la tolerancia al frío en la etapa reproductiva (Cuadro 9). Dentro de ellos se han evaluado genes relacionados con el catabolismo de ABA de *Triticum aestivum* y otros dos genes de arroz relacionados con respuestas antioxidantes (*OsAPXa*) e incrementando la actividad de la ATP sintetasa (*CTB4a*).

**Cuadro 7.** Metodologías para la evaluación de la tolerancia al frío en el cultivo del arroz en la etapa reproductiva.

Metodología	Referencia
Tratamiento de 12 °C en el estado de microspora temprana por 3 a 5 d. Medición del porcentaje de fertilidad.	Koike et al., 1990
Tratamiento de 19 °C con agua fría en condiciones de campo, desde inicio de formación de panícula hasta excursión de panícula en condiciones de luz natural.	Saito et al., 1995
Tratamiento de 19 a 20 °C con agua fría en condiciones de campo, desde inicio de formación de panícula hasta excursión de panícula en condiciones de luz natural.	Li et al., 1997
Tratamiento de 19 °C con agua fría en condiciones de campo e invernadero, desde inicio de formación de panícula hasta excursión de panícula en condiciones de luz natural.	Saito et al., 2001
Tratamiento de 12 °C por 5 d en cámara de crecimiento.	Andaya y Mackill, 2003b
Riego con agua fría a 18 °C con lámina de 25 a 30 cm hasta madurez.	Liu et al., 2003
Tratamiento de 17 °C por 7 d en el estado de antesis. Medición del porcentaje de fertilidad.	da Cruz et al., 2006
Agua fría (20 cm de lámina de agua) a 19 °C desde el estado de primordio hasta excursión de la panícula. Porcentaje de fertilidad.	Kuroki et al., 2007
18 a 21 °C de agua fría en condiciones de campo, desde inicio de formación de panícula hasta excursión de panícula en condiciones de luz natural.	Xu et al., 2008
Tratamiento de 19,4 °C con agua fría en condiciones de campo al estado de inicio de panícula hasta excursión de panícula en condiciones de luz natural.	Kuroki et al., 2009
Tratamiento de 21 a 15 °C en condiciones de luz natural por 15 d a estado de bota.	Ye et al., 2010
Fertilidad de la panícula posterior a tratamiento a 12 °C por 6 d durante el estado de bota.	Sato et al., 2011

Tratamiento de 17 a 20 °C desde macollamiento hasta maduración.	Jiang et al., 2011
Tratamiento a 17 °C en el estado de bota por 10 d. Evaluación del porcentaje de fertilidad.	Suh et al., 2010; Jena et al., 2012
Esterilidad floral posterior a tratamiento con agua fría entre 18 y 19 °C con 20 a 25 cm de lámina de agua desde inicio de formación de panícula, hasta excursión de panícula (~ 60 d).	Shirasawa et al., 2012
Tratamiento de 17,5 °C día/noche con 50 % de sombra en condiciones de luz natural.	Shinada et al., 2013

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

### Cuadro 8. Estudio de QTLs relacionados con la tolerancia al frío en la etapa reproductiva.

Cromosoma (N°)	Nombre del QTL	Varianza fenotípica (%)	Método de evaluación	Referencias
1	<i>Ste1</i>	32,1	Fertilidad de la antera.	Li et al., 1997
1	<i>Ste2</i>	19,4	Fertilidad de la antera.	Li et al., 1997
12	<i>Ste3</i>	16,9	Fertilidad de la antera.	Li et al., 1997
7	<i>qCT-7</i>	22,1	Fertilidad de la antera.	Takeuchi et al., 2001
1	<i>qCL-1</i>	31,1	Largo de la antera.	Takeuchi et al., 2001
3	<i>qHD-3-2</i>	15,5	Días a espigado.	Takeuchi et al., 2001
4	<i>Ctb1, Ctb2</i>	-	Fertilidad de la panícula.	Saito et al., 2001
6	<i>qHD-6</i>	50,5	Días a espigado.	Takeuchi et al., 2001
2	<i>qCTB2a</i>	16,8	Fertilidad de la panícula.	Andaya y Mackill, 2003a
3	<i>qCTB3</i>	16,5	Fertilidad de la panícula.	Andaya y Mackill, 2003a
2, 3	<i>qCTB2a, qCTB3</i>	-	Fertilidad de la panícula.	Andaya y Mackill, 2003b
7	<i>qRCT7</i>	20,6	Fertilidad de la panícula.	Dai et al., 2004
1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11	<i>Dth (3, 6 y 7), cl (1 y 9), fer (11), pe (1 y 11) y dc (5 y 11)</i>	11,5 - 39,3	Días para que ocurra el espigado, largo del tallo, fertilidad de la panícula, excursión de la panícula, decoloración.	Oh et al., 2004
8	<i>qCTB8</i>	26,6	Fertilidad de la semilla.	Kuroki et al., 2007
10	<i>qCTB-10-2</i>	15,0	Fertilidad de la panícula.	Xu et al., 2008
1, 4, 5, 10, 11	<i>qCTB-1-1, qCTB-4-1, qCTB-5-1, qCTB-5-2 y qCTB-10-1</i>	0,9 - 14,9	Fertilidad de la panícula.	Xu et al., 2008
1	<i>qCTF1</i>	29,5	Fertilidad de la panícula.	Kuroki et al., 2009

10	<i>qCTF10-2</i>	20,4	Fertilidad de la panícula.	Kuroki et al., 2009
10	<i>qCTF10-1</i>	35,4	Fertilidad de la panícula.	Kuroki et al., 2009
3, 7, 8, 9, 11	<i>qPSST-3, qPSST-7, qPSST-9</i>	27,4	Fertilidad de la panícula.	Suh et al., 2010
4	<i>Ctb1</i>	-	Fertilidad de la panícula.	Saito et al., 2010
10	<i>qLTSPKST10.1</i>	20,5	Fertilidad de la panícula.	Ye et al., 2010
7	<i>qCTB7</i>	21,0	13 atributos relacionados con tolerancia al frío en etapa reproductiva.	Zhou et al., 2010
2	<i>QTL 2.1</i>	16,7	Fertilidad de la panícula.	Jiang et al., 2011
8	<i>QTL 8.1</i>	24,8	Fertilidad de la panícula.	Jiang et al., 2011
10	<i>QTL 10.1</i>	22,9	Fertilidad de la panícula.	Jiang et al., 2011
3	<i>qLTB3</i>	24,4	Fertilidad de la panícula.	Shirasawa et al., 2012
7	<i>qCC1-7-1</i>	39,8	Evaluación de clorofila de hoja bandera.	Yang et al., 2018

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

**Cuadro 9.** Genes relacionados con la tolerancia al frío en el cultivo del arroz en la etapa reproductiva.

Gen sobrexpresado/promotor	Función del gen	Tratamiento de frío/fenología	Características de las plantas transgénicas	Efecto negativo presente en las plantas transgénicas	Referencia
<i>TaABA8'OH1/OsG6B.</i>	Catabolismo de ABA.	12 °C durante 5 d/etapa reproductiva.	Porcentaje de esterilidad se redujo en las plantas transgénicas (30 % - 63 %) en comparación con las plantas no tratadas. Acumulación de ABA en la florecilla se redujo en las plantas transgénicas estresadas por las bajas temperaturas.	-	Ji et al., 2011



<i>OsAPXa/E0082b.</i>	Enzima antioxidante.	12 °C durante 6 d/etapa de bota.	Fertilidad de la espiguilla fue significativamente mayor en las plantas transgénicas, respecto a las plantas no transformadas. Niveles de peróxido de hidrógeno y contenido de MDA más bajos que las plantas no transformadas. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa tuvo una correlación negativa respecto a los niveles de MDA y peróxido de hidrógeno.	-	Sato et al., 2011
<i>CTB4a/CAMV35S.</i>	Receptor tipo kinasa con motivo repetido rico en leucina.	Tratamiento de frío con agua fría de 16 °C a 18 °C/etapa de bota.	Tolerancia a frío en etapa de bota.	-	Zhang et al., 2017

Adaptado de Da Cruz et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Biswas et al., 2019.

## Mecanismos de señalización y regulación molecular de las bajas temperaturas en la planta de arroz

Para sobrevivir a bajas temperaturas, las plantas de arroz perciben el fenómeno y lo transmiten mediante señales que activan mecanismos de tolerancia al estrés por frío. Dentro de los mecanismos de defensa frente a este estrés está la reprogramación de la transcripción, generándose cambios en el crecimiento y desarrollo que afectan el ciclo de vida normal de la planta. Según lo que se conoce hasta ahora, las bajas temperaturas inducen un cambio físico, disminuyendo la fluidez de la membrana plasmática (Monroy y Dhindsa, 1995; Zhu, 2016) (Figura 1A) y generando cambios en la organización del citoesqueleto. Estos fenómenos gatillan la activación de proteínas de membrana que a su vez activan canales de  $Ca^{2+}$ . Por ejemplo, se cree que el complejo proteico, que se conoce como COLD1/RCA1 y que corresponde a una proteína de membrana que interactúa con una proteína G, se activaría a través de los cambios físicos de la membrana plasmática, induciendo la activación de la proteína RCA1 que a su vez activaría canales de calcio. Estos canales se denominan CNGCs (canales regulados por nucleótidos cíclicos) y están ubicados en la membrana plasmática (Zelman et al., 2012). En arroz estos canales (OsCNGCs) están clasificados en 4 grupos (I-IV) con dos subgrupos (IVA y IVB) (Nawaz et al., 2014). En condiciones de bajas temperaturas se incrementa la expresión de los grupos I al III, mientras que en el caso del grupo IV, se reprime (Guo et al., 2018).

El calcio presente en alta concentración en el apoplasto entra en la célula, activando proteínas sensibles a calcio como la enzima calmodulina (OsCAM) o similares a la calmodulina (CML), proteína similar a la calcineurina B (OsCBL) y proteína kinasa dependiente de calcio (OsCDPK). En

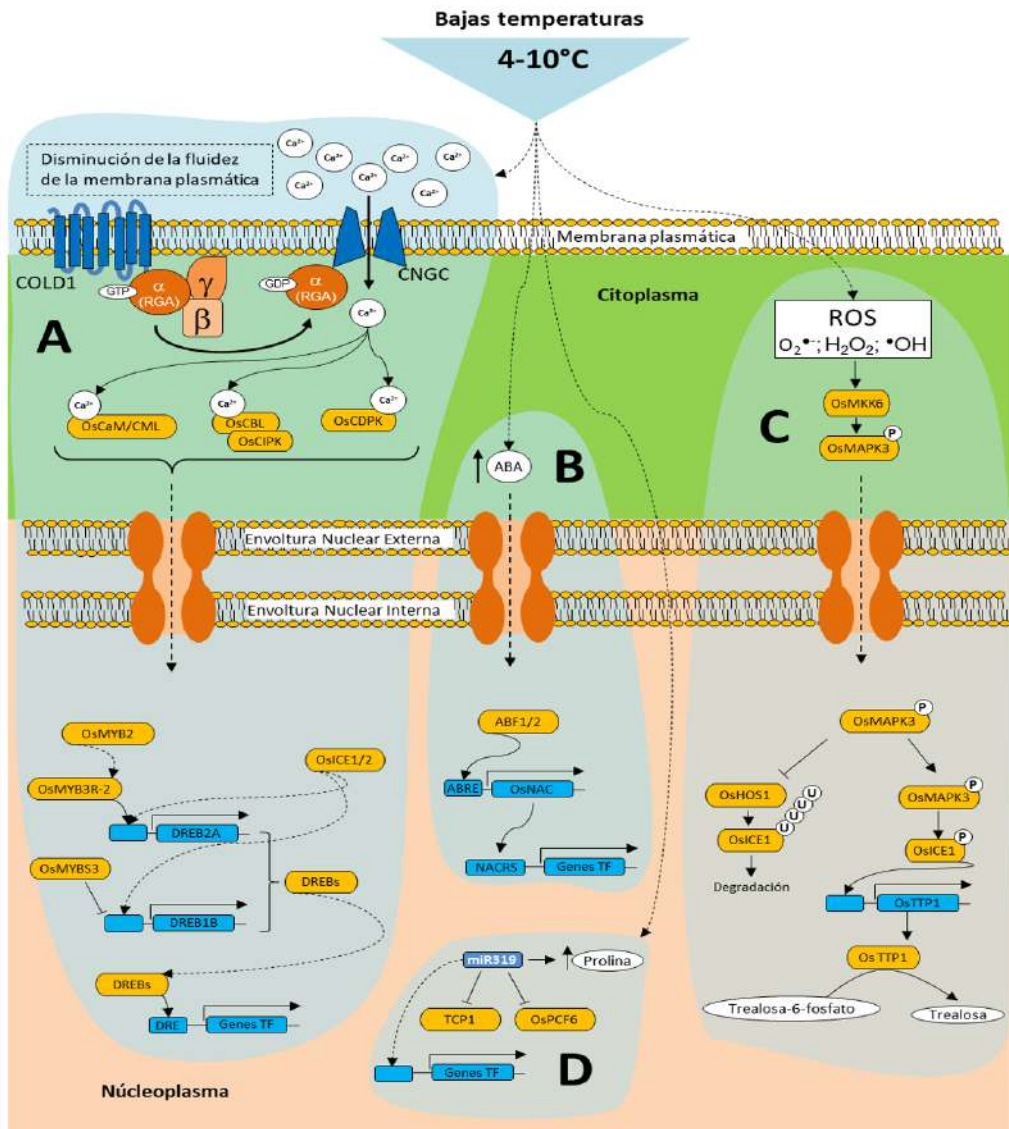
el caso de las proteínas CBL, pueden interactuar con proteínas quinasa CIPKs. Estas proteínas inducen factores de transcripción relacionados con la tolerancia al frío (OsMYB2, OsMYB3R, OslCE1/2, OsMYBS3), iniciándose una respuesta relacionada con la expresión de genes a través de los factores de transcripción DREB2A y DREB1B, que confieren tolerancia a las bajas temperaturas.

Las bajas temperaturas inducen, además, el incremento de la concentración citoplasmática de la hormona ABA (Figura 1B). Esta hormona actúa a nivel nuclear, gatillando indirectamente la expresión de genes como *OsNAC*, que es un factor de transcripción que activa la expresión de genes relacionados con la tolerancia al frío en arroz.

Las bajas temperaturas pueden causar el aumento de las ROS en los tejidos de las plantas. En estas condiciones las ROS pueden dañar el ADN, las membranas lipídicas y las proteínas (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004). Además, el estrés oxidativo induce alteraciones en el estado redox de las proteínas que regulan las funciones de las proteínas y la degradación (Moller et al., 2007). Las plantas han desarrollado numerosos mecanismos para reducir los efectos del daño oxidativo. Algunos de ellos están asociados con sistemas enzimáticos captadores de las ROS, por ejemplo, superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa (Ahmad et al., 2010). El estrés oxidativo causado por ROS se produce debido a un desequilibrio entre la formación de especies oxidativas y las defensas antioxidantes de la célula. En consecuencia, los niveles de ROS en la célula aumentan rápidamente (Tsugane et al., 1999). Las ROS se producen en las cadenas de transporte de electrones de cloroplastos y mitocondrias, algunas peroxidasas y oxidasas y moléculas de clorofila excitadas (Cheeseman, 2007). En la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la NAD deshidrogenasa y citocromo reductasa generan aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que se reducen a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  puede reaccionar con  $Fe^{2+}$  y  $Cu^+$  reducidos para producir los radicales hidroxilo ( $\cdot HO$ ) (Sweetlove y Foyer, 2004). En los cloroplastos, las ROS se generan por una reducción de oxígeno univalente en la reacción de Mehler en la cadena de transporte de electrones (Asada, 1996; Edreva, 2005). El  $O_2^{\cdot-}$  generado también puede ser transformado a radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), iniciando la peroxidación lipídica. La transformación de  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$  en la superficie de la membrana del estroma externo puede ocurrir espontáneamente o mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Grant y Loake, 2000). A través de la reacción de Fenton, el  $H_2O_2$  se transforma en  $\cdot HO$ , la especie más reactiva. Para evitar la producción de  $\cdot HO$ , el  $H_2O_2$  es eliminado por la maquinaria antioxidante (Dat et al., 2000). Otras fuentes de las ROS están relacionadas con la clorofila excitada, que induce la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Asada, 1996).

En condiciones de bajas temperaturas, las ROS inducen una respuesta basada en la fosforilación en cadena de proteínas quinasa, a partir de la enzima OsMKK6 (Figura 1C), la que fosforila a la enzima OsMAPK3. Esta última entra en el núcleo celular, fosforilando factores de transcripción como OslCE1, que a su vez induce la expresión de genes de respuesta al frío como OsTTP1, el cual está encargado de la producción de trealosa.

Finalmente, algunos estudios han demostrado que micro ARNs también tendrían efecto en la tolerancia al frío, como ocurre con el miR319 en el arroz (Figura 1D). Este micro ARN induce un incremento de los niveles de prolina, expresión de genes relacionados con la tolerancia al frío e inhibición de la expresión de proteínas como TCP1 y OsPCF6.



**Figura 1.** Esquema propuesto de la percepción y mecanismos de respuesta frente a las bajas temperaturas. El esquema representa una propuesta para los mecanismos moleculares relacionados con los principales procesos de percepción y respuesta a las bajas temperaturas en el arroz, encontrados hasta la fecha. A) Mecanismo de respuesta a las bajas temperaturas dependiente de calcio; B) mecanismo de respuesta a las bajas temperaturas dependiente de ácido abscísico (ABA); C) mecanismo de respuesta a las bajas temperaturas dependiente de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS); D) mecanismo de respuesta a las bajas temperaturas dependiente de micro ARN (miR319). CNGC: canal de calcio activado por nucleótidos cíclicos, ubicado en la membrana plasmática; P: fosfato; COLD 1: regulador de proteína G ubicado en membrana plasmática; RGA1: subunidad 1 de proteína G de arroz. En color naranja (■) se representan las proteínas relacionadas con la respuesta a las bajas temperaturas. En color azul (■) se presentan los segmentos de ADN nuclear que tienen relación con la respuesta a las bajas temperaturas. Genes TF: genes relacionados con la tolerancia al frío. El diagrama corresponde al resumen de diagramas revisados en la literatura (Zhang et al., 2013; 2014a; Ma et al., 2015; Guo et al., 2018).

## Referencias

- Aghaee, A., Moradi, F., Zare-Maivan, H., et al. 2011. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *Afr. J. Biotechnol.* 10:7617-7621.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., et al. 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30:161–175.
- Ali, M.G., Naylor, R.E.L., Matthews, S. 2006. Distinguishing the effects of genotype and seed physiological age on low temperature tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) *Exp. Agric.* 42:337-349.
- Allen, D.J., Ort, D.R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci.* 6:36-42.
- Alvarado, R., Hernaíz, S. 2007. Antecedentes generales sobre el arroz en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), INIA Quilamapu, Chillán, Chile.
- Andaya, V.C., Mackill, D.J. 2003a. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *J. Exp. Bot.* 54:2579-2585
- Andaya, V.C., Mackill, D.J. 2003b. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica* x *indica* cross. *Theor. Appl. Genet.* 106:1084-1090.
- Andaya, V.C., Tai, T.H. 2006. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 113:467-475.
- Andaya, V., Tai, T. 2007. Fine mapping of the *qCTS4* locus associated with seedling cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) *Mol. Breed.* 20:349-358.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Arshad, M.S., Farooq, M., Asch, F., et al. 2017. Thermal stress impacts reproductive development and grain yield in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 115:57-72.
- Asada, K. 1996. Radical production and scavenging in the chloroplasts. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14:93-107.
- Baruah, A.R., Ishigo-Oka, N., Adachi, M., et al. 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica* 165:459-470.
- Bertin, P., Kinet, J.M., 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.
- Biswas, P.S., Khatun H., Das, N., et al. 2017. Mapping and validation of QTLs for cold tolerance at seedling stage in rice from an *indica* cultivar Habiganj Boro VI (Hbj.BVI). *3 Biotech.* 7:359.
- Biswas, P.S., Rashid, M.M., Khatun, H., et al. 2019. Scope and progress of rice research harnessing cold tolerance. p. 225-264. In Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Nahar, K., et al. (eds.) *Advances in rice research for abiotic stress tolerance*. Elsevier Science Publishing, New York, USA.
- Bonnecarrère, V., Borsani, O., Díaz, P., et al. 2011. Response to photooxidative stress induced by cold in japonica rice is genotype dependent. *Plant Sci.* 180:726-732.
- Cantrell, R.P., Reeves, T.G. 2002. The rice genome: The cereal of the world's poor takes center stage. *Science* 296(5565):53.
- Cheeseman, J. 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* 1:4-15.

- Chen, L., Lou, Q., Sun, Z., et al. 2006. QTL mapping of low temperature on germination rate of rice. *Rice Sci.* 13:93-98.
- Chen, N.A., Xu, Y., Wang, X., et al. 2011. OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant Cell Environ.* 34:52-64.
- Cruz, M. 2010. Tolerancia del arroz a la temperatura baja. p.180-190. En Degiovanni, V., Martínez, C., Motta, F. (eds.) *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina*. Publicación CIAT N° 365. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- da Cruz, R., Milach, S.C., Federizzi, L.C. 2006. Rice cold tolerance at the reproductive stage in a controlled environment. *Sci. Agric.* 63:255-261.
- da Cruz, R.P., Sperotto, R.A., Cargnelutti, D., et al. 2013. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. *Food Energy Secur.* 2:96-119.
- Dai, L., Lin, X., Ye, C., et al. 2004. Identification of quantitative trait loci controlling cold tolerance at the reproductive stage in Yunnan landrace of rice, Kunmingxiaobaigu. *Breed. Sci.* 54:253-258.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., et al. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:779-795.
- de los Reyes, B.G., Morsy, M., Gibbons, J., et al. 2003. A snapshot of the low temperature stress transcriptome of developing rice seedling (*Oryza sativa* L.) via ESTs from subtracted cDNA library. *Theor. Appl. Genet.* 107:1071-1082.
- De Storme, N., Geelen, D. 2014. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ.* 37:1-18.
- Díaz, S., Morejón, R., Castro, R., et al. 2006. Comportamiento de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) seleccionados para tolerancia a bajas temperaturas en siembra temprana de frío. *Cult. Trop.* 27:71-75.
- Donoso, G., Cabas, P., Paredes, M., et al. 2015. Cold tolerance evaluation of temperate rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) genotypes at the seedling stage. *Gayana Botánica.* 72: 1-13.
- Donoso, G., Leyton, M., Paredes, M., et al. 2014. Relative expression of genes related with cold tolerance in temperate rice at the seedling stage. *African J. Biotech.* 13: 2506-2512.
- Donoso, G., Paredes, M., Arbiza O., et al. 2013. Cold tolerance evaluation in Chilean rice genotypes at the germination stage. *Chil. J. Agric. Res.* 73:3-8.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106:119-133.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* 3:175-182.
- Fujino, K., Sekiguchi, H., Matsuda, Y., et al. 2008. Molecular identification of a major quantitative trait locus, qLTG3-1, controlling low-temperature germinability in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:12623-12628.
- Fujino, K., Sekiguchi, H., Sato, T., et al. 2004. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 108:794-799.
- Gothandam, K.M., Nalini, E., Karthikeyan, S., et al. 2010. OsPRP3, a flower specific proline-rich protein of rice, determines extracellular matrix structure of floral organs and its overexpression confers cold-tolerance. *Plant Mol. Biol.* 72:125-135.

- Grant, J.J., Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124:21-30.
- Guo, X., Liu, D., Chong, K. 2018. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *J. Integr. Plant Biol.* 60:745-756.
- Han, L.Z., Qiao, Y.L., Zhang, S.Y., et al. 2007. Identification of quantitative trait loci for cold response of seedling vigor traits in rice. *J. Genet. Genom.* 34:239-246.
- Han, L.Z., Zhang, Y.Y., Qiao, Y.L., et al. 2006. Genetic and QTL analysis for low-temperature vigor of germination in rice. *Acta Genet. Sin.* 33:998-1006.
- He, D., Han, C., Yao, J., et al. 2011. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics* 1113:2693-2713.
- He, D., Yang, P. 2013. Proteomics of rice seed germination. *Front. Plant Sci.* 4:246.
- Hou, M.Y., Jiang, L., Wang, C.M., et al. 2003. Detection and analysis of QTLs for low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.) *Rice Genet. Newslett.* 20:52-55.
- Howarth, C.J., Ougham, H.J. 1993. Gene expression under temperature stress. *New Phytol.* 125:1-26.
- Hu, H., You, J., Fang, Y., et al. 2008. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 67:169-181.
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., et al. 2009. Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389:556-561.
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., et al. 2012. A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Mol. Biol.* 80:337-350.
- Hyun, U.J., Yeo, S.M., Lee, S.B., et al. 2016. Optimization of temperature regime to screen cold tolerant rice seedlings. *Plant Breed. Biotech.* 4:176-187.
- IRRI. 2002. Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Philippine.
- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., et al. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47:141-153.
- Jena, K.K., Hardy, B. 2012. "Foreword" (p.v). In Jena, K.K., Hardy, B. (eds.) *Advances in temperate rice research*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- Jena, K., Kim, S.M., Suh, J.P., et al. 2012. Identification of cold-tolerant breeding lines by quantitative trait loci associated with cold tolerance in rice. *Crop Sci.* 52:517-523.
- Ji, X., B., Dong, B., Shiran, M.J., et al. 2011. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiol.* 156:647-662.
- Ji, S.L., Jiang, L., Wang, Y.H., et al. 2008. QTL and epistasis for low temperature germinability in rice. *Acta Agron. Sin.* 34:551-556.
- Jiang, W., Jin, Y.M., Lee, J., et al. 2011. Quantitative trait loci for cold tolerance of rice recombinant inbred lines in low temperature environments. *Mol. Cells* 32:579-587.
- Jiang, L., Liu, S., Hou, M., et al. 2006. Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.) *Field Crop Res.* 98:68-75.

- Jiang, N., Shi, S., Shi, H., et al. 2017. Mapping QTL for seed germinability under low temperature using a new high-density genetic map of rice. *Front. Plant Sci.* 8:1223.
- Jiang, L., Xun, M., Wang, J., et al. 2008. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. *J. Cereal Sci.* 48:173-179.
- Kawakami, A., Sato, Y., Yoshida, M. 2008. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *J. Exp. Bot.* 59:793-802.
- Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol. Biol.* 35:25-34.
- Kim, S.J., Lee, S.C., Hong, S.K., et al. 2009. Ectopic expression of a cold-responsive *OsAsr1* cDNA gives enhanced cold tolerance in transgenic rice plants. *Mol. Cells.* 27:449-458.
- Kim, S.M., Suh, J.P., Lee, C.K., et al. 2014. QTL mapping and development of candidate gene-derived DNA markers associated with seedling cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) *Mol. Genet. Genom.* 289:333-343.
- Kim, S.I., Tai, T.H. 2011 Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. *Euphytica.* 178:437-447.
- Koike, S., Takeda, K., Satake, T. 1990. Comparison of cold tolerance between isogenic pairs differing in grain size. *Rice Genet. Newslett.* 7:133-134.
- Koseki, M., Kitazawa, N., Yonebayashi, S., et al. 2010. Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage. *Mol. Genet. Genom.* 284:45-54.
- Kuroki, M., Saito, K., Matsuba, S., et al. 2007. A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 115:593-600.
- Kuroki, M., Saito, K., Matsuba, S., et al. 2009. Quantitative trait locus analysis for cold tolerance at the booting stage in a rice cultivar, Hatsushizuku. *Jpn. Agric. Res. Quart.* 43:115-121.
- Lee, M.H. 2001. Low temperature tolerance in rice: the Korean experience. p. 109-117. In Fukai, S., Basnayake, J. (eds.) *Increased lowland rice production in the Mekong Region. Proceedings of an International Workshop, Vientiane, Laos. 30 October-2 November 2000.* Australian Center for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Li, L., Liu, X., Xie, K., et al. 2013. qLTG-9, a stable quantitative trait locus for low temperature germination in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 126:2313-2322.
- Li, H.B., Wang, J., Liu, A.M., et al. 1997. Genetic basis of low-temperature-sensitive sterility in *indica-japonica* hybrids of rice as determined by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 95:1092-1097.
- Li, H.W., Zang, B.S., Deng, X.W., et al. 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234:1007-1018.
- Lin, J., Zhu, W., Zhang, Y., et al. 2010. Detection of quantitative trait loci for cold tolerance at the bud bursting stage by using chromosome segment substitution lines in rice (*Oryza sativa*). *Chin. J. Rice Sci.* 24:233-236.
- Liu, F., Sun, C., Tan, L., et al. 2003. Identification and mapping of quantitative trait loci controlling cold tolerance of Chinese common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) at booting to flowering stages. *Chin. Sci. Bull.* 48:2068-2071.
- Liu, K., Wang, L., Xu, Y., et al. 2007. Overexpression of *OsCOIN*, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta* 226:1007-1016.
- Liu, F., Xu, W., Song, Q., et al. 2013. Microarray-assisted fine-mapping of quantitative trait loci for cold tolerance in rice. *Mol. Plant.* 6:757-767.

- Lou, Q., Chen, L., Sun, Z., et al. 2007. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) *Euphytica* 158:87-94.
- Ma, Q., Dai, X., Xu, Y., et al. 2009. Enhanced tolerance to chilling stress in *OsMYB3R-2* transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. *Plant Physiol.* 150:244-256.
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., et al. 2015. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell* 160:1209-1221.
- Mackill, D.J., Lei, X. 1997. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. *Crop Sci.* 37:1340-1346.
- Mamun, E., Cantrill, L.C., Overall, R.L., et al. 2010. Mechanism of low-temperature-induced pollen failure in rice. *Cell Biol. Int.* 34:469-476.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Miura, K., Lin, S.Y., Yano, M., et al. 2001. Mapping quantitative trait loci controlling low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.) *Breed. Sci.* 51:293-299.
- Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:459-481.
- Monroy, A.F., Dhindsa, R.S. 1995. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* 7:321-331.
- Nawaz, Z., Kakar, K.U., Saand, M.A., et al. 2014. Cyclic nucleotide-gated ion channel gene family in rice, identification, characterization and experimental analysis of expression response to plant hormones, biotic and abiotic stresses. *BMC Genomics* 15:18.
- Nishiyama, I. 1984. Climatic influence on pollen formation and fertilization. p. 153-171. Shigesaburo, T., Takahashi, N. (eds.) *Developments in crop science: Biology of rice*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- Nishiyama, I. 1995. Physiological basis of the damage caused by unfavorable climatic conditions, diseases, and insect pests. p. 769-793. In Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., et al. (eds.) *Science of the rice plant*. Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo, Japan.
- Oh, C.S., Choi, Y.H., Lee, S.J., et al. 2004. Mapping of quantitative trait loci for cold tolerance in weedy rice. *Breed. Sci.* 54:373-380.
- Oliver, S.N., van Dongen, J.T., Alfred, S.C., et al. 2005. Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene *osinv4* is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant Cell Environ.* 28:1534-1551.
- Pradedova, E.V., Isheeva, O.D., Salyaev, R.K. 2011. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 58:210-217.
- Qian, Q., Zeng, D., He, P., et al. 2000. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between *indica* and *japonica* rice. *Chin. Sci. Bull.* 45:448-453.
- Ranawake, A.L., Manangkil, O.E., Yoshida, S., et al. 2014. Mapping QTLs for cold tolerance at germination and the early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28:989-998.
- Rashid, M., Yasmeen, R. 2018. Cold injury and flash flood damage in boro rice cultivation in Bangladesh: A review. *Bangladesh Rice J.* 21:13-25.



- Reinke, R., Beecher, G., Dunn, B., et al. 2012. Temperate rice in Australia. p. 1–14. In Jena, K.K., Hardy, B. (eds.) *Advances in temperate rice research*. International Rice Research Institute: Los Baños, Philippines.
- Rinalducci, S., Murgiano, L., Zolla, L. 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J. Exp. Bot.* 59:3781-3801.
- Saad, B.R., Fabre, D., Mieulet, D., et al. 2012. Expression of the *Aeluropus littoralis* AISAP gene in rice confers broad tolerance to abiotic stresses through maintenance of photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 35:626-643.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., et al. 2000. Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23:319-327.
- Saito, K., Miura, K., Nagano, K., et al. 1995. Chromosomal location of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in rice variety "Norin-PL8". *Jpn. J. Breed.* 45:337-340.
- Saito, K., Miura, K., Nagano, K., et al. 2001. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theor. Appl. Genet.* 103:862-868.
- Saito, K., Saito, Y.H., Funatsuki, W.M., et al. 2004. Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus *Ctb1* for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor. Appl. Genet.* 109:515-522.
- Saito, K., Saito, Y.H., Kuroki, M., et al. 2010. Map-based cloning of the rice cold tolerance gene *Ctb1*. *Plant Sci.* 179:97-102.
- Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W., et al. 2011. Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Curr. Genom.* 12:30-43.
- Satake, T. 1976. Determination of the most sensitive stage to sterilettype cool injury in rice plants. *Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn.* 113:1-43.
- Sato, Y., Masuta, Y., Saito, K., et al. 2011. Enhanced chilling tolerance at the booting stage in rice by transgenic overexpression of the ascorbate peroxidase gene, *OsAPXa*. *Plant Cell Rep.* 30:399-406.
- Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., et al. 2001. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.* 52:145-151.
- Satoh, T., Tezuka, K., Kawamoto, T., et al. 2016. Identification of QTLs controlling low-temperature germination of the East European rice (*Oryza sativa* L.) variety Maratteli. *Euphytica* 207 245-254.
- Sharma, K.D. 2014. Pollen development under cold stress: A molecular perspective. *Austin J. Genet. Genom. Res.* 1:4.
- Shimono, H., Hasegawa, T., Fujimura, S., et al. 2004. Responses of leaf photosynthesis and plant water status in rice to low water temperature at different growth stages. *Field Crops Res.* 89:71-83.
- Shimono, H., Hasegawa, T., Iwama, K. 2002. Response of growth and grain yield in paddy rice to cool water at different growth stages. *Field Crops Res.* 73:67-79.
- Shinada, H., Iwata, N., Sato, T., et al. 2013. Genetical and morphological characterization of cold tolerance at fertilization stage in rice. *Breed. Sci* 63:197-204.
- Shirasawa, S., Endo, T., Nakagomi, K., et al. 2012. Delimitation of a QTL region controlling cold tolerance at booting stage of a cultivar, 'Lijiangxintuanheigu', in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 124(5):937-946.

- Song, S.Y., Chen, Y., Chen, J., et al. 2011. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta* 234:331-345.
- Sthapit, B.R., Witcombe, J.R. 1998. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. *Crop Sci.* 38:660-665.
- Su, C.F., Wang, Y.C., Hsieh, T.H., et al. 2010. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.* 153:145-158.
- Suh, J.P., Jeung, J.U., Lee, J.I., et al. 2010. Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 120:985-995.
- Suh, J.P., Lee, C.K., Lee, J.H., et al. 2012. Identification of quantitative trait loci for seedling cold tolerance using RILs derived from a cross between *japonica* and tropical *japonica* rice cultivars. *Euphytica* 184:101-108.
- Suzuki, K., Nagasuga K., Okada, M. 2008. The chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 49:433-442.
- Sweetlove, L., Foyer, C. 2004. Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. p. 307-317. In Day, D., Millar, A., Whelan, J. (eds.) *Plant mitochondria: From genome to function. Advances in photosynthesis and respiration.* Vol. 14. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Takesawa, T., Ito, M., Kanzaki, H., et al. 2002. Over-expression of  $\zeta$  glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. *Mol. Breed.* 9:93-101.
- Takeuchi, Y., Hayasaka, H., Chiba, B., et al. 2001. Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate *japonica* rice. *Breed. Sci.* 51:191-197.
- Tian, Y., Zhang, H., Pan, X., et al. 2011. Overexpression of ethylene response factor TERF2 confers cold tolerance in rice seedlings. *Transgenic Res.* 20:857-866.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., et al. 1999. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11:1195-1206.
- Verma, S.K., Xalxo, M.S., Saxena, R.R., et al. 2014. Identification of QTLs for cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) *Indian J. Genet. Plant Breed.* 74:86-89.
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., et al. 2008. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol. Biol.* 67:589-602.
- Wang, D., Liu, J., Li, C., et al. 2016. Genome-wide association mapping of cold tolerance genes at the seedling stage in rice. *Rice* 9:61.
- Woodi, M., Mondal, A.K., Padmanabhan, B., et al. 2009. Analysis of protein posttranslational modifications by mass spectrometry: With special reference to haemoglobin. *Indian J. Clin. Biochem.* 24:23-29.
- Xie, G., Kato, H., Imai, R. 2012. Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signaling pathway for chilling stress tolerance in rice. *Biochem. J.* 443:95-102.
- Xin, Z., Browse, J. 2001. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.* 23:893-902.
- Xiong, L., Yang, Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15:745-759.

- Xu, M., Li, L., Fan, Y., et al. 2011. *ZmCBF3* overexpression improves tolerance to abiotic stress in transgenic rice (*Oryza sativa*) without yield penalty. *Plant Cell Rep.* 30:1949-1957.
- Xu, L.M., Zhou, L., Zeng, Y.W., et al. 2008. Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a *japonica* rice near isogenic line. *Plant Sci.* 174:340-347.
- Yang, A., Dai, X., Zhang, W.H. 2012. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *J. Exp. Bot.* 63:2541-2556.
- Yang, Z., Huang, D., Tang, W., et al. 2013. Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. *PLoS One* 8:e68433.
- Yang, L., Wang, J., Lei, L., et al. 2018. QTL mapping for heading date, leaf area and chlorophyll content under cold and drought stress in two related recombinant inbred line populations (*Japonica* rice) and meta-analysis. *Plant Breed.* 137:527-545.
- Ye, H., Du, H., Tang, N., et al. 2009. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice. *Plant Mol. Biol.* 71:291-305.
- Ye, C., Fukai, S., Godwin, I.D., et al. 2010. A QTL controlling low temperature induced spikelet sterility at booting stage in rice. *Euphytica* 176:291-301.
- Yin, G., Sun, H., Xin, X., et al. 2009. Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. *Plant Cell Physiol.* 50:1305-1318.
- Yoshida, S. 1981. Climatic environment and its influence. p. 72. In Yoshida, S. (ed.) *Fundamentals of rice crop science*. The International Rice Research Institute. Manila, Philippines.
- Zelman, A.K., Dawe, A., Gehring, C., et al. 2012. Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Front. Plant Sci.* 3: 95.
- Zhang, Q., Chen, Q., Wang, S., et al. 2014a. Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. *Rice* 7:24.
- Zhang, Q., Jiang, N., Wang, G.L., et al. 2013. Advances in understanding cold sensing and the cold-responsive network in rice. *Adv. Crop Sci. Technol.* 1:104.
- Zhang, Z., Li, J., Pan, Y., et al. 2017. Natural variation in *CTB4a* enhances rice adaptation to cold habitats. *Nature Commun.* 8:14788.
- Zhang, J., Li, J., Wang, X., et al. 2011. *OVP1*, a vacuolar H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 49:33-38.
- Zhang, Z., Su, L., Li, W., et al. 2005. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Sci.* 168:527-534.
- Zhang, S., Zheng, J., Liu, B., et al. 2014b. Identification of QTLs for cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using two distinct methods of cold treatment. *Euphytica* 195:95-104.
- Zhao, J., Zhang, S., Dong, J., et al. 2017. A novel functional gene associated with cold tolerance at the seedling stage in rice. *Plant Biotechnol. J.* 15:1141-1148.
- Zhou, L., Zeng, Y., Hu, G., et al. 2012. Characterization and identification of cold tolerant near-isogenic lines in rice. *Breed. Sci.* 62:196.
- Zhou, Y., Zeng, Y., Zheng, W., et al. 2010. Fine mapping a QTL *qCTB7* for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 7 using a near-isogenic line. *Theor. Appl. Genet.* 121:895-905.
- Zhu, J.K. 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell.* 167:313-324.