Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Variación genética natural en las respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis thaliana

Kasulin, Luciana

2014-03-31

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Kasulin, Luciana. (2014-03-31). Variación genética natural en las respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis thaliana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Kasulin, Luciana. "Variación genética natural en las respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis thaliana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-31.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Variación genética natural en las respuestas de escape al sombreado en *Arabidopsis thaliana*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
CIENCIAS BIOLOGICAS

Lic. Luciana Kasulin

Director de tesis: Dr. Javier F. Botto

Consejero de Estudios: Dr. Jorge P. Muschietti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura-CONICET-Facultad de Agronomía-Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Marzo 2014

Indice

Resumen....3
Abstract....4
Agradecimientos....5
Dedicatoria....6
Introducción....7
Objetivos....21
Capítulo I: Mapeo de QTL en las respuestas de escape al sombreado....22
Introducción....22
Resultados....23
Discusión....35
Capítulo II-Mapeos de asociación para caracteres vegetativos, florales y reproductivos de plantas de *A.thaliana* cultivadas en el invernáculo....39
Introducción....39
Resultados....40
Discusión....51
Capítulo III- Un nuevo genotipo de *A.thaliana* en Patagonia, Argentina....55
Introducción....55
Resultados....56
Discusión....72
Discusión general....76
Materiales y Métodos....79
Bibliografía....87
Anexo I....100
Anexo II....102

Resumen

Las señales lumínicas percibidas por los fotorreceptores son importantes para una aclimatación adecuada de las plantas a su ambiente natural. Las plantas detectan la baja relación rojo:rojo-lejano (R/RL) reflejada por la proximidad de las plantas vecinas respondiendo morfológicamente antes de ser sombreadas. La disminución de luz R/RL promueve en las plantas el síndrome de escape al sombreado, SAS (*del inglés*, Shade Avoidance Syndrome) un conjunto de respuestas morfológicas que promueve el crecimiento de las estructuras vegetativas y mejora la competencia por luz evitando el sombreo por plantas vecinas. Es común encontrar una importante variación natural entre poblaciones de una misma especie en respuesta a la luz. El objetivo de esta tesis fue estudiar la variación natural en las respuestas asociadas al SAS en *Arabidopsis thaliana*, un modelo funcional muy atrayente para comprender cómo el genotipo determina la expresión de la plasticidad adaptativa de las plantas en ambientes lumínicos cambiantes. Mediante el mapeo de QTL en tres líneas recombinantes y endrocriadas, RILs (*del inglés, Recombinant* Inbred Lines) que comparten una misma línea parental, Landsberg *erecta*, se identificaron los QTL comunes y divergentes en la respuesta de crecimiento del hipocotilo entre las poblaciones. Además se determinó y caracterizó la contribución de *ERECTA* en distintas respuestas asociadas al SAS en las cuales los efectos pleiotrópicos de este gen fueron dependientes del fondo genético. Por otro parte, se realizaron mapeos de asociación de GWAS (*del inglés*, Genome Wide Association Study) para caracteres vegetativos, florales y reproductivos en plantas cultivadas en condiciones de radiación natural y sombreado en el invernáculo. Si bien la resolución de los mapeos GWAS fue baja, se identificaron dos QTNs (*del inglés*, Quantitative Trait Nucleotide) asociados al largo de la lámina y del vástago floral. Además, se estudió la fisiología y la diversidad genética de plantas de *A.thaliana* recolectadas en la Patagonia Argentina. El árbol de similitud genética sugiere que las poblaciones patagónicas son idénticas entre sí y similares a las accesiones originarias de Italia, siendo la más cercana Tívoli. Por otra parte, se determinó que la accesión Patagonia es hiposensible a la luz roja y a la SAS, y tiene requerimientos de vernalización que correlacionan con los patrones de expresión de *FLC*. Finalmente, esta tesis ha contribuido a la incorporación de un nuevo genotipo de *A.thaliana* al germoplasma de esta especie que puede ser de interés para estudios futuros.

Abstract

Light signals perceived by photoreceptors are important for acclimation of plants to their natural environment. Plants detect low Red/Far-Red (R/FR) ratio reflected by the proximity of neighboring plants responding morphologically before being shaded. The decrease of R/FR ratio promotes the shade avoidance syndrome, SAS, a set of morphological responses that promotes the growth of vegetative structures to improve competition for photosynthesis light. It is common to find a large natural variation among populations of the same species in response to light. The aim of this thesis was to study the SAS natural variation in *Arabidopsis thaliana*, a small crucifera and an attractive model to understand how genotype determines the expression of plant adaptive plasticity in changing light environments. By mapping strategies, we explored the genetic bases of allelic variations associated to the phenotype. We found common and divergent QTL (Quantitative Trait Loci) for hypocotyl growth induced by simulated shade among three RIL (Recombinant Inbred Lines) populations sharing the same parental line, Landsberg *erecta*. Furthermore we characterized the contribution of *ERECTA* in the shade. We found *ERECTA* pleiotropic effects in the SAS being its effects dependent on the genetic background. Also we carried out genome wide mapping association study (GWAS) for vegetative, floral and reproductive traits for plants grown under natural radiation and shade light in a greenhouse. However GWAS resolution was low in our conditions, we mapped two QTNs (Quantitative Trait Nucleotide) associated with the length of leaf and flowering stem. Moreover, we studied the physiology and genetic diversity of *A.thaliana* plants collected in Patagonia, Argentina. The genetic similarity analysis suggests that Patagonia populations are identical between them, and similar to genotypes from Italy, being the closest Tivoli accession. In addition, we demonstrated that Patagonia accession is hyposensitive to red light and SAS, and it has vernalization requirements that correlate with the expression patterns of *FLC*. This thesis also contributes adding a new genotype in the *A.thaliana* germplasm that may be of interest for future studies.

Agradecimientos

A mi director Javier Botto por las oportunidades brindadas para llevar a acabo este trabajo y para seguir trabajando en un futuro proyecto.

A Rolando León por transmitir su avasallante conocimiento y por responder a todas mis preguntas.

A Marcelo Yanovsky por sus respuestas a todas mis consultas y por confiar en mí dándome la oportunidad de continuar trabajando y ser parte de su equipo.

A la AGENCIA y a CONICET por las becas otorgadas que me permitieron llevar este trabajo.

Al IFEVA por avalar mi doctorado y postdoctorado en esta institución.

A mis compañeros del laboratorio grande y a todos los integrantes del IFEVA:

A Pato, Mica, Analía G. y a Marian y Seba por todo el apoyo que ha continuado más allá de las fronteras del laboratorio. Disfruto mucho las charlas con ustedes. Gracias por todo su apoyo!

A Sabri, a Mery y a Mati por las largas horas compartidas después de labo, por los múltiples consejos siempre tan acertados. Gracias chicos!

A Yami y a Gonza por compartir infinitas horas trabajando a la par. Gracias!

A los chicos UV, Meli, Nacho, Mer, Miriam C. y Flor por los consejos y por hacerme un lugarcito en los almuerzos y compartir muchas lindas charlas. A Carlos M. y Miriam I. por incentivarme.

A Vero R. y a Santi porque la oficina fue un ambiente de gran contención en los últimos tiempos.

En particular quiero agradecer a Romina S, Elizabeth y Carlos C por la gran ayuda desde mis primeros días en el labo con las primeras mediciones de hipocotilos y la PCRs!

A Leo, Paulita, Steve, Elsa, Gaby y a JP, Pipa, Martín por todos los momentos compartidos dentro y sobretodo fuera del labo. A Orne, Manu, Vicky y Marcos por la buena onda de todos los días.

A los chicos “Botto”: Paula C, Ogui, Silvia, Rocío, Cristian y Tai por todas las vivencias que hemos compartido como grupo. Gracias Tai por todos tus abrazos diarios!

A los chicos del lab de semillas, Rena, Nati y los Cristians y a los chicos de ecología Georgy, Martita, Ade, Luis, Lore G, Romi C, Juan, Grisel, Lau M, Fer, Lucho, Marina, Lu D, Lu C, Male D, Vicky, Mile, Gastón, Lucho y los Pablos, a todos por la buena onda. Y en especial a Pame, Oggi, Gus y Perdro G. por las charlas y consejos.

A Robert, Marisol, Meli, Ale H, Andre T, Wally, Juanca, Pity, Mirtha R, Andre D y Laura V. por todo su apoyo. Gracias!

A mis amigas del alma y de la vida Paulati, Maru, Lili y Ani y sus flias. Gracias por estar siempre!

A mi gran familia por todo el apoyo recibido en estos años, y en especial a mis padres por enseñarme y transmitirme sus valores.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico muy especialmente a Alberto F. Llaria. Gracias por estar, por acompañarme en este camino, por todo el banque de estos años, por pelearla juntos. Gracias por tu amor!

Introducción

Las plantas y la percepción de la luz.

Las plantas son organismos sésiles que sensan distintas señales del ambiente respondiendo a las mismas para satisfacer sus necesidades fisiológicas, de defensa y reproductivas. La luz es una señal lumínica necesaria para la generación de su propia energía química, la fotosíntesis, pero también es una señal ambiental que brinda a la planta información del medio que la rodea para un mejor ajuste de su crecimiento y desarrollo. Entre otras, las plantas usan a la luz como una señal para promover la germinación, inducir los procesos de de-etiolacion que ocurren durante la transición del crecimiento de una plántula en total oscuridad a la luz, promueven las respuestas de escape al sombreado y ayudan a ajustar el momento en el que las plantas florecen. La luz visible, vista por el ojo humano como luz blanca, se puede descomponer en siete colores que van desde el color azul (400-500 nm) hasta el color rojo (650-680 nm) (Figura 1). En la naturaleza, las longitudes de onda de entre los 400-700 nm pueden ser absorbidas por las plantas casi en su totalidad por la clorofila (pirrol de anillo carbonado) para realizar los procesos fotosintéticos, es por esto que se la llama radiación fotosintéticamente activa (PAR, Photosynthetic Active Radiation) (Figura 1). Fuera del rango de la luz visible, las plantas también pueden percibir la luz ultravioleta (250-400nm)(Taiz & Zeiger, 2006) (Figura 1).

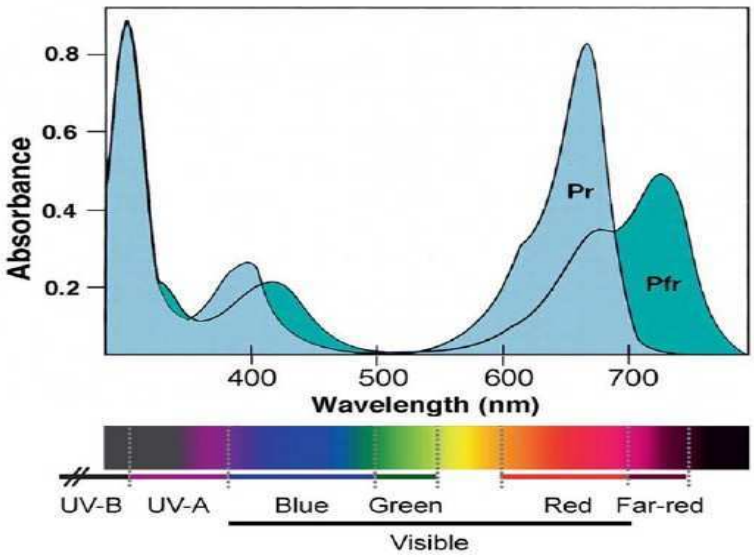


Figura 1. Espectro de la luz solar absorbido por la plantas. Pr y Prf indican las regiones de absorción de ambas conformaciones de los fitocromos.

Los fotorreceptores de las plantas.

En las plantas los fotorreceptores son capaces de percibir las señales lumínicas. Los criptocromos, las fototropinas y zeitlupe (ZTL) absorben la luz correspondiente a las longitudes de onda del azul (A) al UV-A (315-400 nm) (Cashmore et al., 1999; Deng & Quail, 1999; Koorneef et al., 1980; Kim et al., 2007), el *UVR8* (*UV RESISTANCE LOCUS 8*) que es el fotorreceptor UV-B recientemente caracterizado absorbe en el rango de 280 nm a 315 nm (Kami et al. 2010, Heijde & Ulm, 2012) y por último los fitocromos que absorben luz correspondiente a las longitudes de onda y del rojo (R, 600-700 nm) y del rojo lejano (RL, 700-800 nm) (Quail, 2002).

Los fotorreceptores que han sido más descriptos son los criptocromos y los fitocromos. Los criptocromos son flavoproteínas. Existen tres genes que codifican para tres criptocromos diferentes: *CRY1, CRY2* y *CRY3* que difieren en su modo de acción. La proteína CRY1 es estable a altos flujos de luz azul mientras que CRY2 es más estables en bajos flujos de luz azul, pero es rápidamente degradado en altos flujos de luz (Ahmad et al., 1998; Lin et al., 1998). Las proteínas de CRY1 y CRY2 difieren principalmente en el extremo C-terminal y tienen una gran similitud con las fotoliasas que son enzimas de reparación del ADN y comparten los mismos cofactores del cromoforo. CRY3 tendría actividad de fotoliasa (Selby & Sancar, 2006).

Los fitocromos son cromoproteínas homodiméricas conformadas por dos polipéptidos de aproximadamente 125 Kda. Cada monómero posee dos dominios estructurales: el carboxi-terminal que está involucrado en la dimerización y el amino terminal que está unido covalentemente a un cromóforo tetrapirrólico por donde se produce la absorción de la luz (Quail, 1991). En *Arabidopsis thaliana* se han secuenciado y caracterizado 5 genes que codifican para 5 fitocromos diferentes, phyA, B, C, D y E (Sharrock & Quail, 1989; Clack et al., 1994). Las proteínas codificadas por los genes *PHYB* y *PHYD* comparten un 80% de homología y se encuentran más relacionadas con la de *PHYE* que con las de *PHYA* o *PHYC*. Por este motivo se considera que los genes *PHYB*, *PHYD* y *PHYE* forman un subgrupo distinto dentro de los genes de la familia de fitocromos de *Arabidopsis thaliana* (Goosey et al., 1997). En contraste al resto de los fitocromos cuyos niveles se mantienen relativamente más estables a la luz, phyA es lábil y su forma Pfr es rápidamente ubiquitinizada y degradada vía el proteosoma 26S en presencia de luz (Clough & Vierstra, 1997, Hennig et al., 1999).

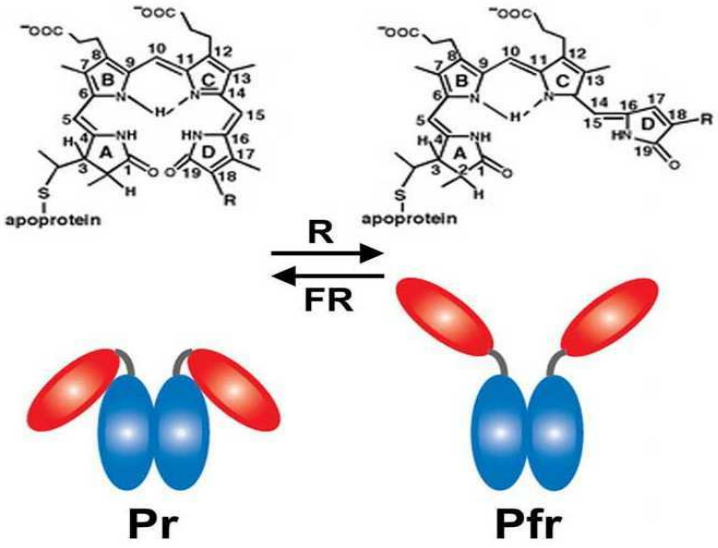


Figura 2. Cambios en el cromóforo (arriba) y esquema de las conformaciones que adopta el fitocromo según la calidad de luz que esté absorbiendo (abajo).

Los fitocromos existen en dos formas fotointerconvertibles: el Pr que absorbe luz roja con un máximo de absorción a los 660 nm y el Pfr que absorbe luz roja lejana con un máximo de absorción a 730 nm (Quail et al., 1995; Frankhauser & Chory, 1997). El cromóforo absorbe principalmente luz roja o roja lejana modificando la conformación de la apoproteína y su capacidad de acción biológica. La absorción de la luz R desencadena una isomerización de "Z"a "E" en el doble enlace C15-C16 entre el anillo C y D del tetrapirrol lineal, resultante en forma Pfr (Andel et al., 1996) (Figura 2). Sin embargo, recientemente un análisis de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) mostró que el anillo pirrol A gira alrededor de doble enlace C4-C5 durante la fotoconversión (Ulijasz et al., 2010). Los fitocromos son sintetizados en el citoplasma en la forma Pr que es biológicamente inactiva y al absorber rojo cambia a su conformación activa, Pfr, y migran al núcleo (Nagy et al., 2001).

La forma Pfr activa se puede destruir (Marme et al., 1971) o convertir de nuevo a la forma Pr inactiva, ya sea por una reacción no fotoinducida lenta (reversión en oscuridad) o después de la absorción de la luz RL en una fotoconversión mucho más rápida (Mancinelli, 1994; Quail, 1997; Figura 2). La proporción de Pfr respecto al fitocromo total (Pfr/P, porcentaje de Pfr) establecida por cada tratamiento lumínico dependerá de la composición espectral del mismo (Mancinelli, 1994). Luz monocromática de 660 nm (R) convierte un 87% del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática de 730 nm (RL) establece un 3% de Pfr. La luz policromática define la proporción de luz R y RL incidente estableciendo el porcentaje de Pfr (Mancinelli, 1994).

El estímulo lumínico sensado por los fitocromos en ambientes sombreados.

Un parámetro que describe la luz natural proveniente del ambiente es la proporción de irradiancia medida en fotones de luz R y luz RL. Esta proporción es cercana a 1.15 en días soleados y disminuye a proporciones menores de 0.5 bajo canopeos (Holmes & Smith, 1977).

$$\text{Relación R/RL} = \frac{\text{fotones irradiados de luz R (entre 655-665 nm)}}{\text{fotones irradiados de luz RL (entre 725-735 nm)}}$$

En ambientes enriquecidos en rojo, por ejemplo un día soleado, la alta relación R/RL modifica el fotoequilibrio entre las dos conformaciones del fitocromo, desplazándose hacia la forma Pfr. La forma Pfr, forma activa, inhibe el crecimiento de hipocotilos y tallos, la hiponastía (movimiento de las hojas hacia arriba) y la floración. Cuando las plantas se encuentran creciendo cercana a otras plantas, la calidad de la luz disminuye debido a un aumento en la proporción de rojo lejano que está siendo reflejado o transmitido por plantas vecinas. Las ondas electromagnéticas de los 500 nm (verde) son reflejadas y transmitidas y de ahí su color verde. Las plantas también reflejan y transmiten longitudes de onda mayor a la de la luz roja, esta longitud se llama luz rojo lejano (RL) y su banda de absorción va entre los 710 nm y los 740 nm. Por esta razón, cuando las plantas crecen debajo de otras plantas o cubiertas por un canopeo, la cantidad de luz que reciben es menor que en un ambiente abierto y la luz que llega está enriquecida principalmente en luz rojo lejano, la calidad de luz se ve enriquecida en luz verde (500-800 nm) y hay una disminución de la luz azul (400-500 nm) (Taiz & Zeiger, 2006; Casal, 2012). Las plantas pueden sensar la presencia de plantas vecinas a través de la calidad de luz que están recibiendo del ambiente. Un ambiente enriquecido en luz RL provoca una disminución en la relación R/RL y, por lo tanto, el desplazamiento del fotoequilibrio hacia la forma inactiva Pr. Al disminuir los niveles de la forma Pfr, deja de haber inhibición en el crecimiento de tallos y pecíolos que permite el desarrollo de plantas más altas que tiene más chances de escapar de la sombra (Ballaré et al., 1999). El conjunto de respuestas que se promueven en ambientes sombreados se conocen como el síndrome de escape al sombreado (Shade Avoidance Sindrome, SAS) e incluye, la elongación de tallos y pecíolos, la ubicación de las hojas en posición erecta y la aceleración de la floración, entre otras.

La integración de la señal lumínica durante la de-etiolación.

En *Arabidopsis thaliana* existen muchos genes activados por la luz que han sido estudiados en la respuesta de elongación del hipocotilo. Los genes *FARRED IMPAIRED RESPONSE1* (*FAR1*) y *FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3* (*FHY3*), entre otros, están involucrados en el desarrollo del hipocotilo cuando la plántula crece bajo luz RL (Chory, 1992). Los genes que fueron descubiertos por las alteraciones en el desarrollo del hipocotilo en oscuridad son *DE-ETIOLATED, DET* (Chory et al., 1989), *CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC, COP* (Deng et al., 1991; Wei & Deng, 1992) y *FUSCA* (Castle & Meinke, 1994). Los productos de los genes *DET*, *COP* y *FUS* actúan río abajo de los fotorreceptores en la cadena de traducción de señales fotomorfogénicas (Chory, 1992). DET y COP actúan como reguladores negativos, integrando las señales luminosas recibidas por los fotorreceptores a los programas de fotomorfogénesis (Chory, 1992).

Por otro lado, el gen *LONG HYPOCOTYL 5* (*HY5*) es un factor de transcripción del tipo bZIP que actúa río abajo de los fotorreceptores regulando un gran número de genes durante la fotomorfogénesis (Ang et al., 1998; Ulm et al., 2004; Lee et al., 2007). En la oscuridad, la actividad de HY5 es reprimida por COP1, el principal regulador negativo de la transcripción. COP1 interacciona directamente con HY5 (Osterlund et al., 2000; Saijo et al., 2003), HY5 queda ubiquitinizado y de esta forma marcado para la degradación por la vía del proteasoma 26S (Holm et al., 2002). El sensado de la luz por los fotorreceptores inducen la relocalización de COP1 hacia el citosol (Osterlund & Deng, 1998), donde queda inactivo y excluido del núcleo, provocando la des-represión de HY5 y de las respuestas inducidas por luz (Quail, 2002). *HY5* también está involucrado en las respuestas a pulsos de luz o sombra durante la tarde (Sellaro et al., 2011).

La transducción de la señal de sombra.

Existen numerosas componentes en la vía de traducción de señales desencadenada río abajo de los fitocromos que han sido identificados asociados a la vía de las SAS. Entre ellos se encuentran un grupo de factores de transcripción llamados *PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR)* que conforman una familia de factores de transcripción de tipo hélice-vuelta-hélice básica (bHLH). PIF4, PIF5 y PIF7 son importantes reguladores de las SAS (Leivar et al., 2008, Li et al., 2011). Dentro de esta subfamilia están los genes *PIF* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR*) que llevan el dominio bHLH y un motivo activo de unión a *PHYB,* llamado APB (*ACTIVE PHYTOCHROME BINDING)*. Además, *PIF1* y *PIF3* tiene un dominio adicional denominado APA (ACTIVE PHYA BINDING), que es necesario para la unión a phyA. Los genes *PIF1, PIF3, PIF4, PIF5* y *PIF7* actúan reprimiendo la fotomorfogénesis y promoviendo la escotomorfogénesis en

plántulas etioladas (Leivar et al., 2008, Li et al., 2011). A esta subfamilia también pertenecen los genes, *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1* (*HFR1*) y *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE1* (*PIL1*) que tienen funciones fotomorfogénicas. Entre los otros cinco miembros restantes *ALCATRAZ* (*ALC*) y *bHLH23* no tienen actividad fotomorfogénica aparente debido a una mutación natural en APB que bloquea la unión a phyB, y algunos aún no se han caracterizado completamente (*bHLH56*, *bHLH119* y *bHLH127*) (revisado por Leivar & Quail, 2011). También *SPATULA* (*STP*) es una bHLH con alta homología con las PIFs, pero no interactúan directamente con *PHYB* (Duek & Frankhauser, 2005; Reymond et al., 2012).

Los PHYB interactúan con PIF modulando la respuesta de escape al sombreado. A alta relación de R/RL, la proteína PHYB se encuentra predominantemente en su conformación Pfr que interacciona con el dominio APB (Active Phytochrome Binding) de PIF4 y PIF5 e impide la activación de los genes de sombra. De esta manera, PIF4 y PIF5 pueden ser fosforilados y degradados por el sistema proteosómico 26S (Lorrain et al., 2008). Si la planta se expone a baja relación de R/RL, se produce la fotoconversión del PHYB a la forma inactiva (Pr) disminuyendo la probabilidad de interacción con PIF4 y PIF5 produciendo un aumento de la expresión de los genes inducidos por el sombreado (Lorrain et al., 2008). En ambientes de baja relación R/RL, los *PIFs* activan la expresión de genes asociados con las SAS como *ATHB-2*, *HFR1* y *PIL1* (Carabelli et al., 1996; Jiao et al. 2007; Lorrain et al., 2008; Leivar et al., 2008). Por otro lado, PIF7 es una proteína que se encuentra en muy baja abundancia, pero que interactúa selectivamente con la forma Pfr de PHYB y a diferencia de las PIF previamente descriptas es estable a la luz. PIF7 también actúa como un regulador negativo de la señalización por PHYB bajo luz R (Leivar et al., 2008).

La interacción de PHYB con PIF4 y PIF5 promueve una disminución de los niveles de expresión de los genes inducidos por el sombreado como son los genes PARs (*PHYTOCHROME RADIDLY REGULATED*), entre otros. Ambos factores actúan redundantemente como reguladores negativos, formando un heterodímero con *PIF4* e impidiendo la unión del mismo al ADN (Roig-Villanova et al., 2007; Hao et al., 2012). *PAR1* y *PAR2* son degradados por *COP1* actúando río abajo de los fotorreceptores en la cascada de señalización (Zhou et al., 2014). Recientemente nuestro laboratorio se ha demostrado que los genes B-Box intervienen regulando la respuesta de las SAS, en particular *BBX21* (*BBOX DOMAIN PROTEIN21*) interaccionan con *COP1* para modular la elongación de los tejidos en condiciones de sombreado (Crocco et al., 2010). También se ha observado que BBX24 y BBX25 actúan río abajo de COP1 en la señalización por luz de sombra (Gangappa et al., 2013). COP1 se acumula en el núcleo cuando las plantas son expuestas a luz de sombra simulada o natural indicando que COP1 es funcional en estas condiciones (Pacin et al., 2013). Se ha propuesto que

COP1 regula los patrones diarios de sensibilidad a la sombra en ambientes de luz fluctuantes (Pacin et al., 2013).

Las señales de sombra y las hormonas.

Las hormonas vegetales actúan en las vías de señalización por sombra. Entre otras, se ha documentado la función de las auxinas, brasinosteroides y giberelinas (Casal 2012, Bou-Torrent et al., 2014). La señal de las auxinas es sensada por el receptor *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*TIR1*) (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski & Leyser, 2005). Si las plantas sensan una baja relación R/RL, la síntesis de auxina se ve favorecida en las hojas mediante el gen *SHADE AVOIDANCE 3* (*SAV3*)/*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* (*TAA1)* (Tao et al., 2008) redistribuyéndose hacia la epidermis y las células corticales del hipocotilo mediante el transportador PINFORMED 3 (PIN3) (Friml et al., 2002) promoviendo de esta manera el alargamiento del hipocotilo (Morelli & Ruberti, 2000). La baja relación de luz R/RL también influye en la capacidad de respuesta a auxinas. La expresión de los factores de transcripción con homeodominio cierre de leucina: *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX PROTEÍN 2* (*ATHB2*), *HAT2* y *HAT4* es rápida y reversible y están promovidos por la baja relación R/RL, parcialmente dependiente de PFI4 y PIF5 (Carabelli et al., 1993; Roig-Villanova et al., 2006; Lorrain et al., 2008). Las vías de las auxinas y de los brasinoesteroides pueden ser integradas mediante la actividad brasinoesteroide de la quinasa GSK3 *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2* (*BIN2*) que fosforila a *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* (*ARF2*) (Vert et al., 2008). ARF2 fosforilada disminuye su actividad de represión por la unión al ADN, aumentando sinérgicamente la transcripción de los genes de respuesta a las auxinas (Vert et al., 2008). Además, la baja relación de R/RL promueve la expresión de *BRI1* (Devlin et al., 2003) y de los factores de transcripción como *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX PROTEÍN 4* (*ATHB4*) y *HAT3* (Roig-Villanova et al., 2006; Sorin et al., 2009).

Las proteínas DELLA conformadas por REPRESSOR OF GA (RGA), GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI), *RGA-Like1* (RGL1), RGL2 y RGL3 (Sun, 2008), son reguladores negativos del alargamiento que impiden el crecimiento del hipocotilo, al bloquear la unión de *PIF3* y *PIF4* al ADN (De Lucas et al., 2008;. Feng et al., 2008). Una baja relación de luz R/RL puede promover fuertemente la expresión del gen *GAI* (Devlin et al., 2003), e inducir la degradación DELLA incrementando la elongación de los hipocotilos (Djakovic-Petrovic et al., 2007).

La señal de vernalización en la respuesta a la floración.

En Arabidopsis, distintas vías de señalización convergen regulando el tiempo a floración a través de genes integradores tales como *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*) y *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) (Kim et al., 2009). En las plantas una señal ambiental como es la de la exposición a períodos prolongados de frío (vernalización) puede ser medida y memorizada (Burn et al., 1993). Las plantas con requerimiento de vernalización aceleran su floración luego de estar expuestas al frío por períodos prolongados (Sheldon et al., 1999; Michaels & Amasino, 1999). En Arabidopsis, el gen central de la represión y el silenciamiento es el locus *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), que codifica para una proteína de dominio MADS y que actúa como represor de los genes la floración, *FT* (Michaels & Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999; Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005). Luego de la exposición al frío prolongado, cuando las temperaturas son cálidas, el gen *FLC* pasa a ser silenciado epigenéticamente de manera rápida (Amasino, 2004; Shindo et al., 2005). Esta represión epigenética ocurre a través de la metilación de histonas, incluso en genes adyacentes a *FLC*, pero en estos no es memorizada (Sheldon et al., 2009). La función de *FLC* está reforzada por *FRIGIDA* (*FRI*) (Choi et al., 2011), una proteína con dominios espiral-bobina (coiled-coil) que interactúa directamente con el complejo de unión nuclear (Geraldo et al., 2009; Risk et al., 2010). *FRI* actúa como un andamio ayudando al reclutamiento de los modificadores conservados de la cromatina en el promotor de *FLC* (Choi et al., 2011).

La vernalización es proceso de naturaleza cuantitativa, la longitud del tratamiento de frío se ve reflejado en el grado de silenciamiento y es relativamente lenta, es decir se requieren semanas o meses de frío para saturar el requisito de la vernalización (Sheldon et al., 2000; Shindo et al., 2005). Cuando la expresión de *FLC* es alta, la floración se inhibe incluso en días largos cuando las condiciones fotoperíodicas son inductivas como es el caso *Arabidopsis thaliana* (Sheldon et al., 1999; Michaels & Amasino, 1999; Johanson et al., 2000). Cuando la expresión de *FLC* se reprime, se produce la disminución de su expresión transcripcional, haciendo que las plantas se vuelvan competentes para sensar las señales de la vía fotoperíodica favoreciendo la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva (Andrés & Coupland, 2012). Esta transición está separada temporalmente entre el establecimiento del silenciamiento (período de exposición al frío) y el mantenimiento de la marca epigenética en *FLC* (luego de la exposición al frío) incluso durante la replicación del DNA y en ambientes donde hay otras señales externas. Sin embargo, la marca epigenética se resetea en la siguiente generación garantizando que el requerimiento de vernalización exista en cada generación de plantas (Sheldon et al., 2008, Choi et al., 2009).

Arabidopsis thaliana como organismo modelo.

Arabidopsis thaliana (L.) Heyhn es una maleza anual de la familia Brassicaceae o Cruciferae (Al-Shehbaz & O´Kane, 2002). Esta pequeña crucífera es un organismo modelo debido a que tiene un genoma corto, es de fácil reproducción, tiene un corto ciclo de vida, y produce gran cantidad de semillas (Alonso-Blanco & Koorneef, 2000). *A.thaliana* una especie de autopolinización predominantemente, la tasa de cruzamiento es del 3% y la tasa de mutación es de $7x10^{-9}$ sustituciones por sitio por generación. *A.thaliana* fue el primer genoma en ser secuenciada. El genotipo Columbia (Col) es el genoma de referencia que tiene 120Mb (Weigel & Mott, 2009). Está adaptada a ambientes bióticos y abióticos diversos, ocupa hábitats abiertos o perturbados o en riberas de los ríos, bordes de caminos, taludes rocosas, desiertos y terrenos cultivados. En Europa, crece principalmente en arena o suelos arcillosos y parece ser rara o ausente en suelos de pH básico derivados de caliza (Alonso-Blanco & Koornneef, 2000; Hoffman 2002). En Asia, habita en suelos salinos de las estepas. Y en Asia Central, la especie también crece en zonas de piedra caliza. Por lo tanto, la información genética de cada planta de *A.thaliana* recolectada en distintas latitudes lleva una identidad genética única en respuesta a los principales estímulos ambientales a las que se encuentran expuestas (Nordborg et al., 2005, Clark et al., 2007; Anwer & Davis, 2013). La distribución actual de *A.thaliana* es extensa, se encuentra en mayor proporción distribuida por el centro, occidente y el norte de Europa y en los Estados del Atlántico de América del Norte. En menor proporción se ha recolectado en Turquía, Kazajstán, el Himalaya, Japón, Corea del Norte y África (Figura 3). También fue descripta en América del Sur en Argentina y Uruguay (Al-Shehbaz & O´Kane, 2002). Latitudinalmente se extiende desde los 68 ° N (norte de Escandinavia) a los 0 ° (montañas de Tanzania y Kenia) y altitudinalmente habita desde el nivel del mar en los Países Bajos a la alta región occidental del Himalaya donde se la llegó a encontrar a los 4250 m (Alonso-Blanco & Koornneef, 2000; Hoffman, 2002).

Historia demográfica de *A.thaliana.*

Los cambios climáticos y de vegetación durante el Pleistoceno han influenciado el rango de distribución geográfica y la variación genética de *A.thaliana* y muchas especies europeas durante los últimos 135.000 años (Sharbel et al., 2000; Beck et al., 2008). En Eurasia, la fragmentación de hábitats ibéricos favoreció la aparición de refugios glaciales múltiples aislados unos de otros. Muchos estudios filogeográficos de flora europeos y fauna han demostrado subdivisión genética fuerte en la Península Ibérica (Picó et al., 2008). La distribución espacial separada de los linajes genéticos es interpretada como puntos de referencia de los refugios remanentes del Pleistoceno

(Beck et al., 2008). Los análisis comparativos demuestran que patrones filogeográficos ibéricos de diferentes especies se superponen ampliamente entre sí, así como con las zonas de alta endemismo. Estos estudios indican la complejidad interna de Iberia como refugio glacial (Gómez & Lunt, 2006). Luego del Pleistoceno, la recolonización de *A.thaliana* en Europa siguió un recorrido de este a oeste según la estructura poblacional y posiblemente acompañado de la actividad agrícola del hombre en el Neolítico (Fracois et al., 2006; Lasky et al., 2012). La estructura poblacional se restringe a la combinación de la diversidad genética y revela patrones de flujo génico pasado, reflejando su historia evolutiva e influye en su trayectoria evolutiva. Recientemente se realizaron estudios a escala global incluyendo a más de 5000 poblaciones de *A.thaliana* provenientes de Eurasia y América del Norte, las cuales fueron genotipeadas con un chip de 139 SNPs (del inglés, Single Nuceotide Polymorphisms, Platt et al., 2010). Los estudios de variabilidad genética natural en Arabidopsis parten del análisis de genotipos que provienen del Hemisferio Norte, y en particular de Eurasia, su lugar de origen. En estos estudios se demostró que poblaciones europeas de *A.thaliana* tienen una estructura poblacional definida por efectos del aislamiento geográfico asociados a los eventos glaciares del Pleistoceno, mientras que otras poblaciones recolectadas en América del Norte, Asia y Europa muestran una baja estructura poblacional como consecuencia probable de flujos génicos recientes asociados a la actividad humana (Beck et al., 2008; Bomblies et al., 2010; Platt et al., 2010).

Figura 3. Región de distribución mundial de *Arabidopsis thaliana.* En rosa se indica el área de crecimiento, y los puntos verde hacen referencia a las accesiones secuenciadas actualmente.

Fenotipo y variación natural de caracteres cuantitativos.

La plasticidad fenotípica se refiere a la capacidad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a cambios en el ambiente (Schmalhausen, 1949; Falconer & Mackay, 1996). En los organismos sésiles, como es el caso de las plantas, una alta plasticidad fenotípica a lo largo de su vida les permite mantenerse, adaptarse y sobrevivir a condiciones desfavorables y fluctuantes del ambiente (Bradshaw, 1972). Un cambio en las condiciones lumínicas (perturbación) es una señal que las plantas sensan ajustando su sensibilidad a dichos cambios (Pigliucci & Kolodynska, 2002). La plasticidad fenotípica está beneficiada cuando ésta permite al organismo alterar su fenotipo hacia una adaptación al ambiente perturbado (Roff, 1992; Whitman & Ananthakrishnan, 2009). Manteniendo una capacidad plástica, la descendencia puede fijar cambios genéticos que le permitan adaptarse al nuevo ambiente, logrando una estrategia de largo plazo y de persistencia evolutiva (Meyers & Bull, 2002; Whitman & Ananthakrishnan, 2009).

A.thaliana habita en ambientes diversos por lo que tiene numerosas adaptaciones al ambiente y manifiesta una rica diversidad fenotípica en cuanto a su fisiología, morfología y resistencia al estrés biótico y abiótico. La mayor parte de esa variación fenotípica es de naturaleza cuantitativa, de tal manera que está influenciada por la acción simultánea de múltiples genes cuya expresión depende del ambiente genético y ambiental (Falconer & Mackay, 1996). Para comprender la variación natural de los caracteres cuantitativos es necesario estudiar la arquitectura genética. La arquitectura genética es el patrón de factores genéticos que determinan y controlan un fenotipo y su variación (Mackay, 2001). Un aspecto importante del estudio de la arquitectura genética es identificar las regiones polimórficas del genoma que afectan la variación del caracter (QTL, del inglés Quantitative Trait Loci; y QTN, Quantitative Trait Nucleotide). Para comprender la arquitectura genética de un caracter es necesario identificar de que manera la variación genética se relaciona con la variación fenotípica y cuantificar cual es la influencia del ambiente sobre la expresión fenotípica. La variación fenotípica de un caracter está determinada por la variación genética (variación genética aditiva y no aditiva), por la variación ambiental y por la relación entre ambos componentes (Falconer & Mackay, 1996). La variación genética aditiva implica la existencia de diferentes alelos de múltiples genes que contribuyen de manera independiente y lineal al valor fenotípico del caracter. La variación genética no aditiva modifica el fenotipo de un caracter generalmente en forma no lineal, e involucra interacciones intragénicas (dominancia/recesividad) e intergénicas (epistasis). A pesar de los grandes avances en la identificación de las bases genéticas de los caracteres cuantitativos, aún nos falta mucho aprender acerca de las bases genéticas y moleculares responsables de la variación en las poblaciones naturales que les permite ajustar los cambios fenotípicos al ambiente a través de los mecanismos adaptativos de selección natural.

Para estudiar la arquitectura genética de los caracteres complejos es necesario identificar los loci responsables de la variación genética. Distintas aproximaciones estadísticas se han desarrollado para mapear los loci responsables (Falconer & Mackay, 1996; Mitchell-Olds et al., 2006; Alonso-Blanco, 2009).

*Mapeos de QTLs

En los mapeos de QTL (Quantitative Trait Loci, QTLs) se utilizan poblaciones de mapeo como son las líneas recombinantes y endocriadas (Recombinant Inbreed Lines, RILs). Estas líneas se generan a través de cruzas de dos líneas parentales cuyas características fisiológicas son generalmente opuestas. La generación F6-F8 consiste en una población prácticamente homocigota, por lo que se la llama población inmortal o permanente y puede ser usada en múltiples mapeos comparando diferentes ambientes. El mapa genético de esta población se ha construido a partir de marcadores polimórficos entre los dos parentales elegidos, generalmente entre 50-100 marcadores a lo largo de todo el genoma. El estudio fenotípico de la descendencia permite a través de los mapeos de QTL identificar y comparar asociaciones entre los marcadores genotípicos y el caracter fisiológico (Falconer & MacKay, 1996; Alonso-Blanco, 2010; Trotin et al., 2011)

* Los mapeos de asociación del genoma completo (GWAS, Genome Wide Association Study)

La variabilidad fenotípica puede ser asociada a variantes alélicas contenidas en centenares de accesiones de *Arabidopsis thaliana* que están secuenciadas en una muy alta densidad con millones de SNP (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). De esta manera, las accesiones de *A.thaliana* pueden ser directamente utilizadas para identificar polimorfismos asociados con adaptaciones utilizando el desequilibrio de ligamiento mediante estudios de asociación (Genome Wide Association study, GWAs) (Trontin et al., 2011). Si bien las técnicas del mapeo asociativo están aun en desarrollo, el GWAS es un método de alta resolución que permite el mapeo de loci de caracteres cuantitativos basados en el desequilibrio de ligamiento (LD), que es la asociación no aleatoria de alelos en distintos loci. Diversos grupos de investigación han desarrollado métodos de mapeos diferentes, entre ellos está el EMMAX (Kang et al., 2010), GEMMA (Zhou & Stephens, 2012) y el FaST (Lippert et al., 2011). La disminución en los costos de secuenciación facilitó la utilización de los estudios de asociación para el análisis de la variación natural (Atwell et al., 2010). *Arabidopsis thaliana* tiene un genoma diploide de 5 cromosomas con 125-150 millones de bases nucleotídicas y alrededor de 30.000 genes que codifican para proteínas (Al-Shehbaz & O´Kane, 2002; Weigel, 2012). Los mapeos de asociación son un método de alta resolución que permite el mapeo de loci de caracteres cuantitativos basados en el LD. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, el LD decae rápidamente a una tasa de 10 kb, siendo el equivalente a la cantidad de bases que corresponden, en promedio, a la

secuencia de dos genes (Weigel, 2012). El Consorcio "Genoma1001" ha desarrollado el HapMap, conformando el primer mapa de haplotipos disponible en esta especie (http://1001genomes.org/). Hoy en día se dispone más de 1300 accesiones de *A.thaliana* secuenciadas con un arreglo de 250000 SNP (250000 marcadores moleculares) a razón de un SNP por 480 bp a lo largo del genoma de *A.thaliana.* De esta manera, se conformó el mapa genético que provee la información para ser asociada con las respuestas a evaluar en estas accesiones (Clark et al., 2007; Weigel & Mott, 2009; Atwell et al., 2010; Trontin et al., 2011).

Mapeos genéticos en las SAS.

El estudio de las SAS en más de 100 accesiones de Arabidopsis demostró que existe un rango importante de variación natural en las respuestas de escape al sombrado. Dos respuestas de escape al sombreado como son la elongación del hipocotilo y la inducción floral no se correlacionan entre sí cuando se analiza globalmente todas las poblaciones sugiriendo que actúan distintas fuerzas de selección para una misma señal ambiental que simula la sombra durante el ciclo de vida de la planta (Botto & Smith, 2002). A partir de este estudio se identificaron accesiones que tenían escasa capacidad de responder a las señales de luz rojo-lejano típicas de los canopeos vegetales, entre otras, Bla6 (Botto & Smith, 2002). Un estudio posterior demostró que la respuesta constitutiva a la sombra durante la floración es causada por la expresión de niveles altos de *FLC*, represor floral que inhibe la expresión del integrador floral *FT* (Adams et al., 2009). Por otra parte, la variación genética natural a nivel de los fotorreceptores ha sido caracterizada secuencial y funcionalmente (Maloof et al., 2001; Filiault et al., 2008). En un estudio comparativo en respuesta a la calidad de luz en 16 accesiones de Arabidopsis, se encontró que la accesión Le Mans 2, de baja sensibilidad a las señales de luz RL continuo, tiene un fenotipo mimetizado con el fenotipo del mutante phyA debido a la presencia de un alelo poco común de phyA que estabiliza a la proteína lábil a través de un simple cambio aminoacídico (Maloof et al., 2001). Por otra parte, el estudio de patrones de asociación entre secuencias ADN de *PHYB* provenientes de 33 accesiones de Arabidopsis identificó 14 polimorfismos no-sinónimos, entre los cuales, a uno de ellos se asoció con la variación de la respuesta a la luz R (Filiault et al., 2008). El mapeo de QTL y la posterior caracterización de uno de los locus asociado a la respuesta de elongación de hipocotilo y promoción de la floración en respuesta a bajas relaciones de luz R/RL permitieron identificar a *ELF3* como uno de los genes responsables de las respuestas de escape al sombreado en la población de líneas endocriadas y recombinantes provenientes de la cruza entre Shadara y Bayreuth (Jimenez-Gomez et al., 2010; Coluccio et al., 2011). Más recientemente, se realizó un mapeo de asociación GWAS para la respuesta de elongación de hipocotilo a baja y alta relación de luz R/RL analizándose la variación

fenotípica de 180 accesiones (Filiault & Maloof, 2012). Los resultados del GWAS demostraron que este caracter está controlado por varios loci de efectos pequeños. A pesar que estos mapeos mostraron escasas asociaciones significativas, la generación de listas de genes candidatos a priori como *PHYC* sugieren que los mapeos asociativos son una herramienta útil para identificar variantes genéticas asociadas a las SAS (Filiault & Maloof, 2012).

Para entender las bases genéticas de la adaptación, se necesita estudiar la variación natural no sólo en condiciones simuladas de laboratorio, sino extender estos análisis a condiciones naturales. Es necesario entonces, diseñar experimentos en los cuales el ambiente complejo este correctamente definido por los factores ambientales que determinan la heterogeneidad ambiental y espacial en las cuales las plantas crecen y se desarrollan (Koornneef, et al., 2004). Los efectos de la densidad y la variación estacional en la respuesta de la floración fueron estudiados en tres poblaciones de RILs: LerxCvi, BayxSha y LerxNo-0 que fueron expuestas a dos densidades distintas, baja y alta, y a dos ambientes estacionales, otoño-invierno y primavera (Botto & Coluccio, 2007). Los mapeos de QTL demostraron que la mayoría de QTL identificados son dependientes de la interacción entre la densidad y el ambiente estacional, mientras que solo una pequeña proporción de QTL son independientes del ambiente en el que las plantas fueron cultivadas sugiriendo que las interacciones GxE son relevantes en condiciones naturales.

Objetivos

Objetivo general.

El objetivo general de esta tesis es contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de las respuestas asociadas con el síndrome de escape al sombreado (SAS) utilizando como modelo experimental a *Arabidopsis thaliana.* Para lograr este objetivo general se definieron objetivos específicos y sus hipótesis asociadas.

Objetivo especifico 1 (Capítulo I- Mapeo de QTLs)

Identificar loci asociados a la respuesta de elongación del hipocotilo en plántulas de *A.thaliana* en respuesta a las señales de luz rojo lejano al final del día (EOD), un tratamiento de laboratorio que simula condiciones de sombreado naturales, mediante el mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) en poblaciones de RILs (Recombinant Inbred Lines).

Hipótesis asociada: La respuesta de elongación del hipocotilo en plántulas de *A.thaliana* en respuesta al tratamiento de EOD está bajo el control de un grupo común de loci en tres diferentes poblaciones de mapeo de RILs que comparten una misma línea parental.

Objetivo especifico 2 (Capítulo II- Mapeo de asociación del genoma completo)

Identificar loci asociados al SAS de caracteres vegetativos, florales y reproductivos en plantas de *A.thaliana* cultivadas en condiciones semi-naturales bajo sombra simulada y mediante mapeos de asociación del genoma completo (GWAS).

Hipótesis asociada: Los loci identificados mediante GWAS para caracteres vegetativos, florales y reproductivos asociadas al SAS tienen efectos pleiotrópicos en la expresión de otros caracteres.

Objetivo específico 3 (Capítulo III- Genotipo Patagonia)

Recolectar, analizar la diversidad genética y caracterizar algunas respuestas fisiológicas de genotipos de *A.thaliana* cuya presencia había sido previamente documentada en la Patagonia, Argentina.

Hipótesis asociada: Las poblaciones de *Arabidopis thaliana* que provienen de la Patagonia expresan diferencias fisiológicas y genéticas respecto de las poblaciones ancestrales originarias de Eurasia**.**

Capítulo I: Mapeo de QTL en las respuestas de escape al sombreado.

Introducción

Las plantas sensan cambios en el ambiente que las rodea (luz, temperatura, sequía, inundación, predadores) respondiendo a los mismos. En ambientes sombreados, una de las señales lumínicas que son detectadas por las plantas es la reducción en la R/RL que llega a las hojas y establece una baja proporción de fitocromos en su forma activa (Pfr). Los fitocromos que perciben las señales de sombra son, principalmente, el phyB, y secundariamente phyD y phyE (Franklin & Whiltelam, 2005). Esta reducción del fotoequilibrio en los tejidos promueve tempranamente un conjunto de respuestas fisiológicas conocidas como el síndrome de escape al sombreado (SAS). Las SAS incluyen distintas respuestas, entre otras, promueve la elongación del tallo y entrenudos, induce la hiponastía, acelera la floración, y en ciertas especies, reduce la producción de semillas (Franklin & & Quail, 2010, Casal, 2012). Las SAS son un modelo ideal para integrar aproximaciones genéticas, fisiológicas y poblacionales para el estudio de la plasticidad fenotípica. La observación de la impresionante variación fenotípica que existe en distintas accesiones de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a las señales de sombreado, sugiere que las SAS son un grupo de respuestas adaptativas con un potencial evolutivo para que actúen las fuerzas de selección natural (Schmitt, 1997). Uno de los trabajos pioneros que estudio la variación natural en más de 100 accesiones de *A.thaliana* demostró que las respuestas de escape al sombreado de elongación de hipocotilos y promoción de la floración por señales de luz RL son respuestas con una plasticidad alta (Botto & Smith, 2002). Además, se observó que los genotipos analizados mostraban una muy baja correlación de respuesta a la misma señal lumínica de sombreado sugiriendo que los procesos de elongación e inducción de la floración están bajo control de un grupo distinto de genes (Botto & Smith, 2002). Mapeando la población de RILs de BayxSha, se identificó y caracterizó al gen *ELF3* como uno de los genes responsables de las respuestas de escape al sombreado que promueve la elongación del hipocotilo y la respuesta a floración (Jimenez-Gomez et al., 2010, Coluccio et al., 2011).

A partir de estas evidencias previas, en este capítulo nos propusimos identificar loci asociados a la respuesta de elongación del hipocotilo en respuesta a señales de luz rojo lejano al final del día (EOD) un tratamiento de laboratorio que simula condiciones de sombreado en condiciones naturales. En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos a partir de mapeos de QTL en plántulas que provienen de tres poblaciones de líneas recombinantes y endocriadas (RILs) de *A.thaliana* originadas a partir de una línea parental en común que son cultivadas en condiciones de laboratorio en luz blanca y luz blanca suplementada con un pulso de luz RL al final del día.

Resultados

Mapeos de QTL para la elongación del hipocotilo en respuesta al sombreado en poblaciones de RILs de *A.thaliana.*

Con el fin de identificar loci comunes y específicos que estuvieran involucrados en la respuesta de escape al sombreado, se realizaron mapeos genéticos en tres poblaciones de RILs. Se evaluó la respuesta de elongación del hipocotilo en respuesta a la luz rojo lejana (RL) al final del día, un tratamiento de laboratorio que simula condiciones de sombreado. Los tratamientos lumínicos consistieron en exponer las plántulas bajo regímenes fotoperíodicos de 8hs de luz blanca fluorescente y 16 hs de oscuridad durante 4 días a 21°C (LB). La mitad de las plántulas recibieron un pulso de luz RL de 30 min al final del día (EOD). La variable largo de hipocotilo fue medida al final de cada tratamiento y se calculó la relación de la elongación del hipocotilo entre los tratamientos de EOD y LB (EODRATIO) con el fin de analizar la respuesta neta de elongación por efecto del sombreado simulado. Se mapearon QTL para LB, EOD y EODRATIO. Las tres poblaciones de RILs comparten uno de los genotipos parentales y fueron originadas a partir de la cruza de *Landsberg erecta* (L*er*)xCol (Columbia), L*erx*CVI (Cape Verdi Island) y L*erx*No-0 (Nossen-0).

La distribución de frecuencias de largo de hipocotilos de las 100 RILs de LerxCol, 163 RILs de LerxCVI y 137 RILs de LerxNo-0 mostraron una distribución normal con niveles altos de transgresión fenotípica (diferencias fenotípicas) respecto a las líneas parentales y una importante variabilidad fenotípica entre las RILs bajo una misma condición lumínica (Figura 1). Se observaron diferencias en el largo del hipocotilo de la línea parental Ler entre experimentos probablemente por diferencias de irradiancias entre experimentos (Figura 1). La irradiancia en LB fue 30, 70 y 110$\mu molm^{-2}s^{-1}$ para los experimentos de las poblaciones de RIL de LerxNo-0, LerxCvi y LerxCol, respectivamente.

La heredabilidad, que indica la proporción de la varianza fenotípica que es explicada por el componente genético, fue entre 0.54 y 0.84 en LB, entre 0.59 y 0.84 en EOD y entre 0.63 y 0.31 en EODRATIO. Los mayores valores de heredabilidad fueron observados en la población de RIL de LerxNo-0 y los menores índices de heredabilidad fueron identificados en la población de mapeo de RILs de LerxCVI (Tabla 2 Anexo I)

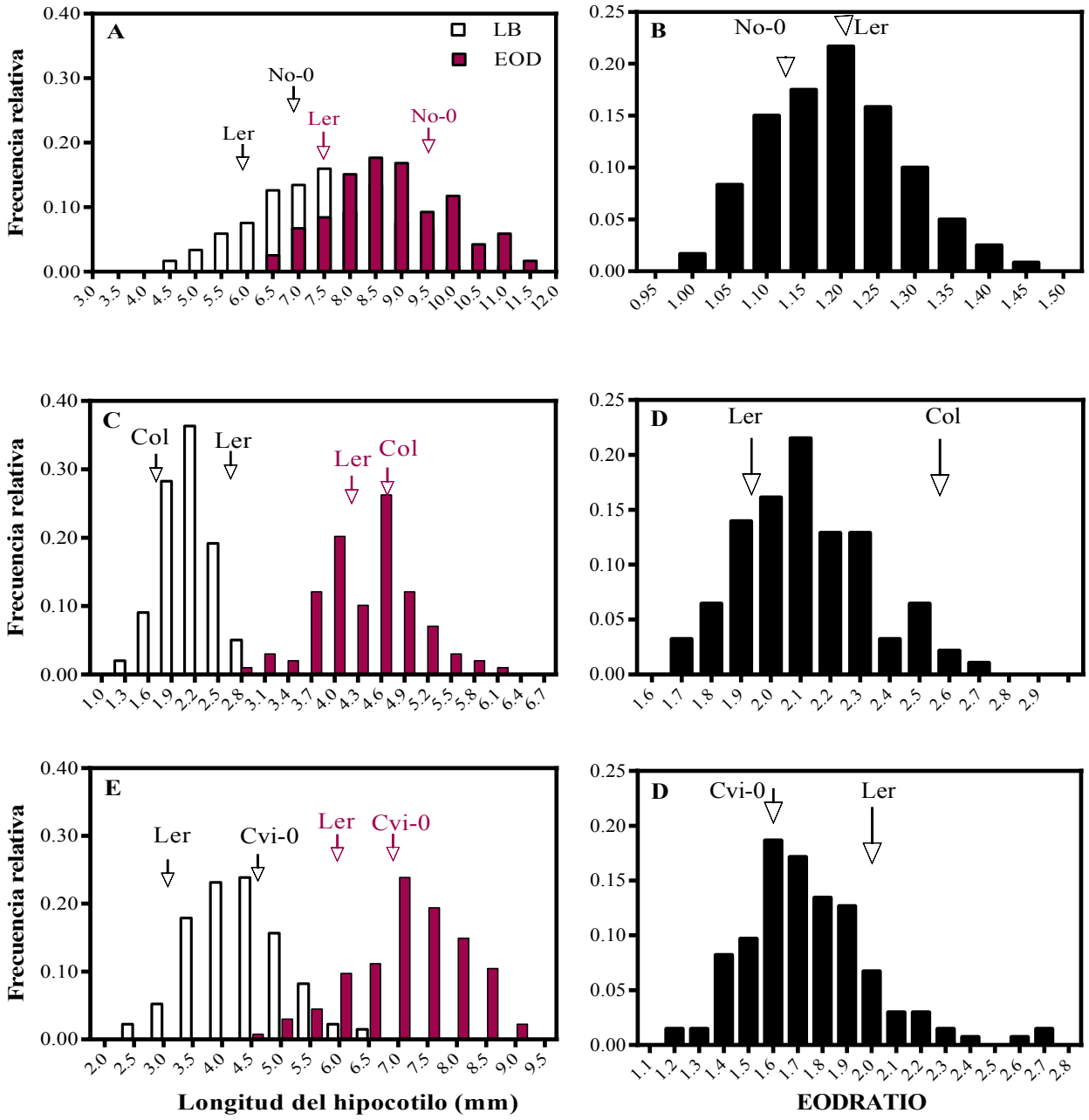


Figura 1. Distribución de frecuencias en LB, EOD y EODRATIO para las poblaciones de RILs LerxNo-0 (A y B), LerxCol (C y D) y LerxCVI-0 (E y F). El promedio de la respuesta de los genotipos parentales se indica con flechas en cada condición de luz.

Se mapearon QTL para tres caracteres: LB, EOD y EODRATIO siendo este último estimado como el cociente de la respuesta entre LB y EOD. Se identificaron siete QTLs para LB, seis QTLs para

EOD y cinco QTLs para EODRATIO (Figura 2). Los QTLs comunes a los tratamientos LB y EOD que colocalizaron fueron *LB1*, *LB3*, *LB5*, *LB7*, *EOD1* y *EOD6*. Ninguno de estos QTLs fue significativo para la respuesta del EOD (EODRATIO), lo que sugiere que estos loci están implicados en el alargamiento general, sin efectos en la respuesta al EOD (Figura 2, Tabla 2 Anexo I). *EOD2* y *EODRATIO1* colocalizaron con *LB0,* un QTL mapeado en el tratamiento LB (Tabla 2 AnexoI). *LB0 y EOD2* son los QTLs mayores que explican la mayor proporción de la varianza fenotípica (0.33 y 0.37, respectivamente) (Tabla 2 AnexoI). Algunos QTL fueron específicos para los tratamientos evaluados. Los QTL específicos en el tratamiento de LB fueron *LB2*, *LB4* y *LB6,* en el tratamiento de EOD fueron *EOD3, 4 y 5* y en el tratamiento de respuesta al EOD fueron *EODRATIO2, 3, 4 y 5* (Figura 2, Tabla 2 Anexo I).

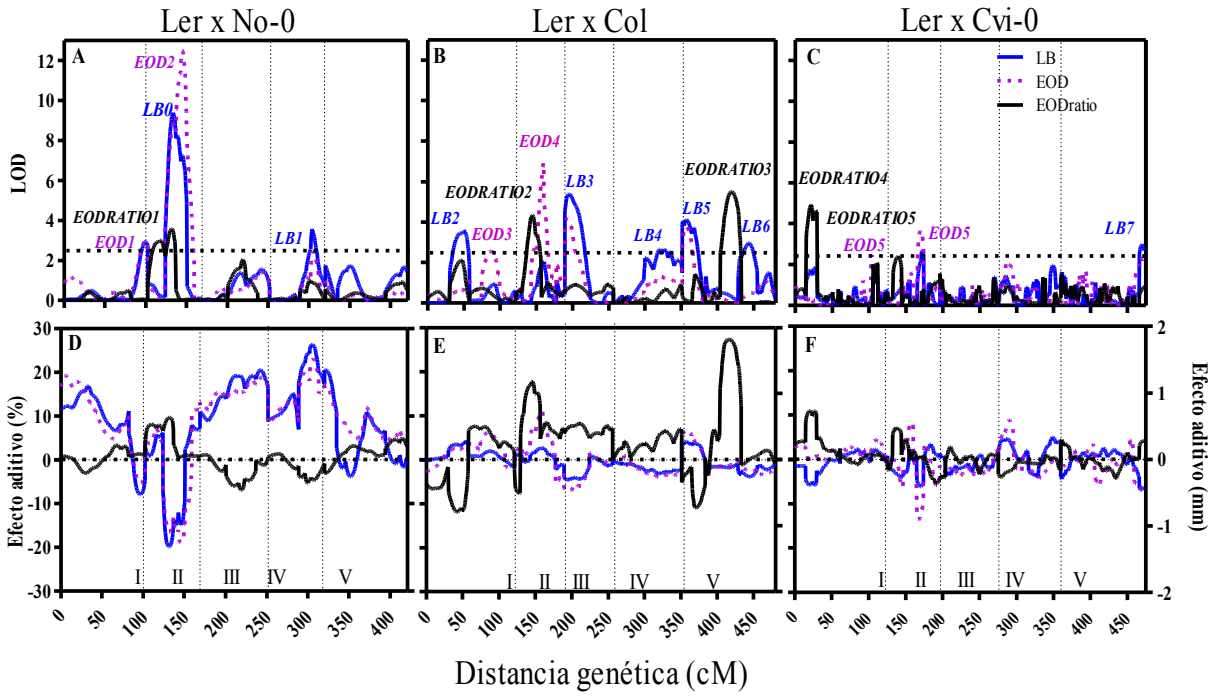


Figura 2. Mapeo de QTLs en tres poblaciones de mapeo que comparten el parental Ler. LOD y efectos aditivos fueron graficados para LB, EOD y EODRATIO a lo largo de la distancia acumulada (cM) de los cinco cromosomas de *Arabidopsis* (A y D para LerxNo-0, B y E para LerxCol y C y F de LerxCVI-0 RIL poblaciones). Los números de los QTL identificados son arbitrarios. Las líneas de puntos horizontales representan umbrales significativos para las puntuaciones LOD. En los gráficos de efectos aditivos, los valores positivos indican una contribución positiva de los alelos Ler y los valores negativos indican una contribución positiva del parental alternativo. Los números romanos indican el número de cromosomas.

Los cinco QTL para *EODRATIO* fueron mapeados en los cromosomas 1, 2 y 5 y explican entre 7 y 33% del total de la variación fenotípica (Figura 2, Tabla 2 Anexo I). Los alelos Ler en estos cinco QTL *EODRATIO* contribuyeron positivamente al respuesta del EOD, siendo los efectos menores en *EODRATIO5* y mayores en *EODRATIO3* (0.07 y 0.27, respectivamente, Tabla 2 Anexo I). Los QTLs *EODRATIO1*, *2* y *5* identificados en las tres poblaciones de RIL co-localizaron en el cromosoma 2, cuyos intervalos de confianza contienen entre otros genes a *PHYB,* pero no *ERECTA* (Tabla 2, Figura2). De los restantes QTLs, *EODRATIO3* mapeó en la mitad del cromosoma 5 en la población Ler×Col RIL y *EODRATIO4* mapeó en el brazo superior del cromosoma 1 en la población de RIL Ler×CVI-0 (Tabla 2 Anexo I, Figura 2B, 2C).

Confirmación del *EODRATIO1.*

En la población de RILs de LerxNo-0, *EODRATIO1* colocaliza con *LB0* (Tabla 1). Para la confirmación de *EODRATIO1*, se utilizó una familia de líneas heterogéneas y endocriada (HIF), a partir de una línea, la RIL152 que tenía una región segregante en el marcador PLS5 del cromosoma 2. Se seleccionaron las líneas homocigotas, HI152-Ler y HIF152-No-0 construyendo la HIF152. Los alelos No-0 en el marcador PSL5 de la HIF152 redujeron significativamente la respuesta del EOD como consecuencia de una mayor longitud de hipocotilo en LB y EOD en comparación con respecto de los alelos Ler (Figura 3). Posteriores análisis de la descendencia de la HIF152 segregante mediante genotipado con marcadores polimórficos en el intervalo entre CIW3 y NGA1126 de *EODRATIO1*, se seleccionó una HIF recombinante (rHIF). Cada rHIF contenía regiones segregantes más acotadas a lo largo de la región segregante (Figura 3E). Las rHIF13 y rHIF88 no mostraron diferencias alélicas en la respuesta al EOD, mientras que rHIF44 y rHIF16 mostraron respuesta al EOD confirmando *EODRATIO1* a un intervalo de 1.2 Mb, entre 8148 y 9354 Kb, una región que incluye el gen *PHYB* (Figura 3 C y E). Para evaluar si *PHYB* es el gen candidato para *EODRATIO1*, se seleccionó la rHIF36 con alelos del gen *PHYB,* pero con alelos homocigotos en el resto del intervalo confirmado de este QTL. Los alelos en rHIF36 no mostraron una respuesta significativa al EOD lo que sugiere que *PHYB* no es responsable de *EODRATIO1* (Figura 3 C y E).

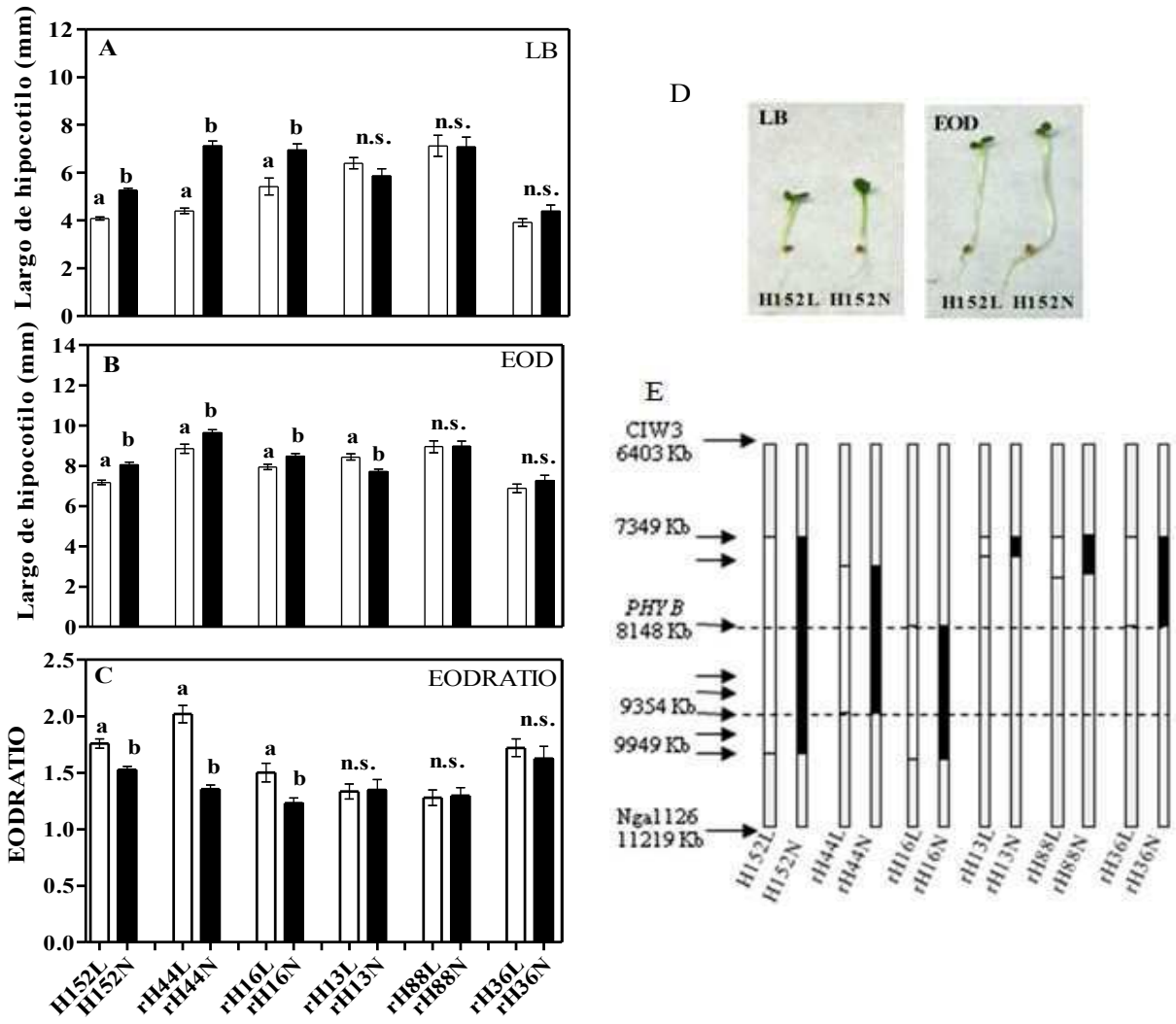


Figura 3. *EODRATIO1* en LB (A) y EOD (B) se confirmó por HIF y rHIF polimórficas entre los marcadores CIW3 y NGA1126 en el cromosoma 2. *EODRATIO1* se confirmó en un intervalo de 1.2 Mb en el cromosoma 2. La longitud del hipocotilo de HIF y rHIF se obtuvo a partir de RIL152 polimórfica en PSL5 marcador (C). Cada barra representa la media±SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de t y se indican con letras distintas ($p<0.05$). Las diferencias significativas entre las medias de la misma HIF o rHIF se realizaron mediante la prueba de t y se indican con letras ($p<0.05$). Las fotografías de HIF152 cultivadas bajo LB o EOD (D). Diagrama de la zona de segregación para HIF152 y rHIF152 líneas en el cromosoma 2 (E). El área de la segregación para cada línea se muestra como heterocigotos (Ler en blanco y No-0 en negro) o homocigotos (gris). Las posiciones de los marcadores se indican mediante flechas.

PHYB* es el gen candidato para *EODRATIO5* pero no para *EODRATIO1 y EODRATIO2.

Adicionalmente y para confirmar que PHYB no es el gen responsable de EODRATIO1 se realizó un ensayo de complementación cuantitativa. Se cruzaron los alelos mutantes de *phyB* con los alelos salvajes de PHYB de cada genotipo parental (Ler y No-0), obteniendo líneas F1 con PHYB_Ler y PHYB_No-0, denominadas PHYB+ utilizándose la metodología descripta en Mackay y colaboradores (2001). El análisis fenotípico de los individuos F1 de PHYB+ y phyB demostraron que los alelos No-0 y Ler fueron capaces de complementar la disfunción del alelo mutante *PHYB* (P genotipoxphyB = 0.11). Por lo tanto, concluimos que la variación alélica en el gen *PHYB* no es responsable de *EODRATIO1* (Figura 4A). *EODRATIO2* que se mapeó en la población de RIL de LerxCol no mostró complementación de PHYB (P genotipoxphyB = 0.43, Figura 4B).

PHYB también fue mapeado a los intervalos de confianza de los QTL *EODRATIO2* y *EODRATIO5*. Los resultados de dos ensayos independientes sugieren que *PHYB* es el gen candidato para *EODRATIO5* mapeado en la población LerxCVI-0. En primer lugar, el alelo *PHYB*+Ler falló en la complementación de la mutación phyB en individuos F1 (P genotipoxphyB=0.0006, Figura 4C). En segundo lugar, utilizando líneas transgénicas que llevan alelos *PHYB* de Ler o CVI-0 en el fondo genético de *phyB-9* mutante se demostró que el alelo PHYB-Ler tiene una mayor contribución a la respuesta del EOD que el alelo PHYB-CVI (Figura 4D).

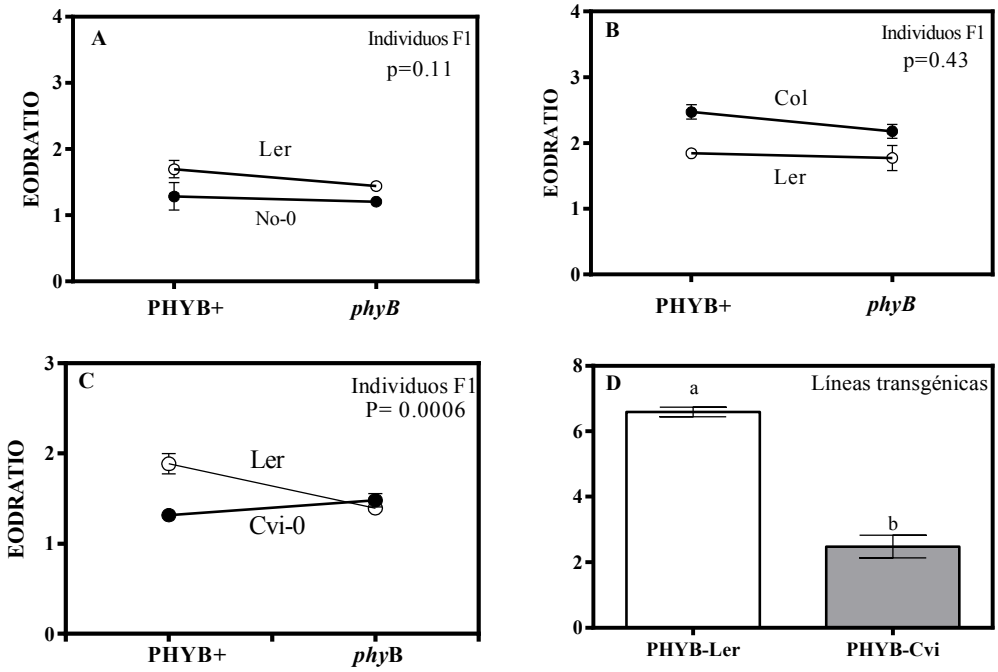


Figura 4. *PHYB* es el gen candidato para *EODRATIO5,* pero no es responsable de *EODRATIO1* y *EODRATIO2.* Prueba de complementación cuantitativa en el EODRATIO. Prueba de complementación cuantitativa con *phyB* mutante se hizo en los fondos genéticos Ler (C) y No-0 (A), Col (B), CVI (C). En el gráfico se indica el valor de p de la interacción entre el genotipo tester (factor genotipo) y la mutación *phyB* en el fondo gentético Ler (factor phyB). Cada punto representa la media±SEM. Respuesta al EOD en líneas transgénicas portadoras de alelos 35S::PHYB-CVI y 35S::PHYB-Ler (D). Cada barra representa la media±SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de t y se indican con un letras ($p<0.01$).

ERECTA es el gen candidato para *EOD6.*

En las tres poblaciones de mapeo, los genotipos parentales No-0, Col y CVI-0 llevan alelos *ERECTA* de tipo salvaje, mientras que el genotipo parental Ler contiene una mutación en *ERECTA* inducida en el gen de repeticiones ricas en leucina similar al receptor de Ser/Thr quinasa (Torii et al., 1996). En nuestros mapeos, tres QTL fueron mapeados en el marcador *ERECTA* en las tres poblaciones de mapeo: *EOD2* y *EOD4* para EOD en LerxNo-0 y LerxCol, respectivamente, y *EOD6* para LB y EOD en LerxCVI-0 (Tabla 2, Anexo I). Como se esperaba por los antecedentes en la bibliografía para la función *ERECTA* en el control del crecimiento (Magliano et al., 2005), los alelos Ler reducen la elongación del hipocotilo con respecto a los alelos No-0, CVI-0 y Col. Es decir, las plántulas que llevan la mutación *erecta* en *EOD2* y *EOD6* son más cortas que las plántulas

que llevan los alelos de No-0 y CVI-0 (Figura 5). Sin embargo, *ERECTA* no es responsable de *EOD4* porque no se encontraron efectos alélicos opuestos entre Ler y Col (Tabla 1 Anexo I). Usando NILs polimórficas en la región *ERECTA*, confirmamos la contribución positiva de los alelos CVI-*ERECTA* en *EOD6* para el alargamiento del hipocotilo en LB y EOD, pero no para EODRATIO (Figura 5).

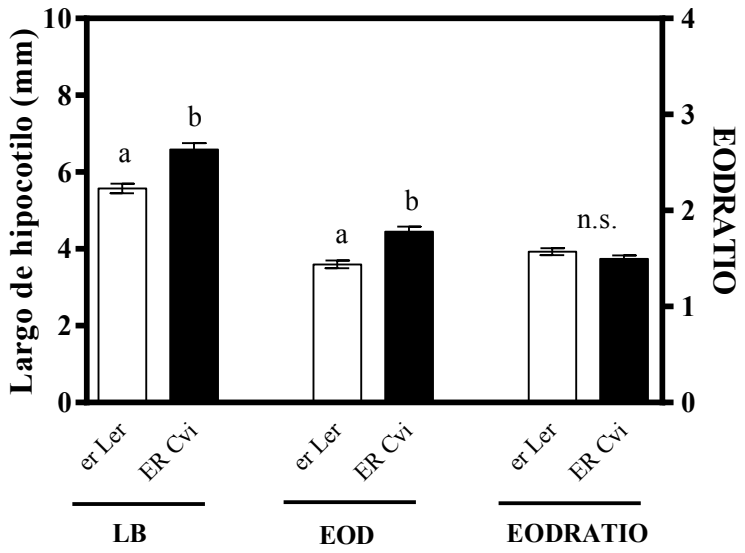


Figura 5. *ERECTA* es el gen candidato para *EOD6*. La longitud del hipocotilo en LB, EOD y EODRATIO de NIL llevar alelo ERECTA polimórfica originado de LerxCVI-0 población RIL. Cada barra representa la media±SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de t y están indicados con letras ($p<0.001$)

Los efectos de *ERECTA* dependen del fondo genético.

Para tener una mejor comprensión de la función de *ERECTA* en los ambientes sombreados, se analizó la respuesta al EOD en las líneas que son polimórficas en el gen *ERECTA* usando cinco fondos genéticos (distintas accesiones). En la mayoría de los casos, los alelos *ERECTA* contribuyeron con una mayor elongación del hipocotilo en LB y EOD con excepción de la accesión Van en el tratamiento de EOD (Figura 6 A y B). Estos efectos significativos del polimorfismo de ERECTA se pierden cuando se analiza el EODRATIO en Ler, WS y HIR. Sin embargo, el polimorfismo en *ERECTA* tuvo efectos significativos en EODRATIO para Col y Van. El alelo mutado *erecta* en Col-0 y Van-0 contribuyó con una mayor respuesta al EOD en comparación con respecto a las plántulas que llevan el alelo *ERECTA*. Genotipos mutantes del gen *ERECTA* en Col y

WS (mutantes puntuales), y líneas transgénicas de *ERECTA* en las accesiones Ler, Van-0, y HIR-1 (que llevan *ERECTA* mutado), demostramos que los efectos *ERECTA* en la sombra son dependientes del fondo genético (Figura 6 C).

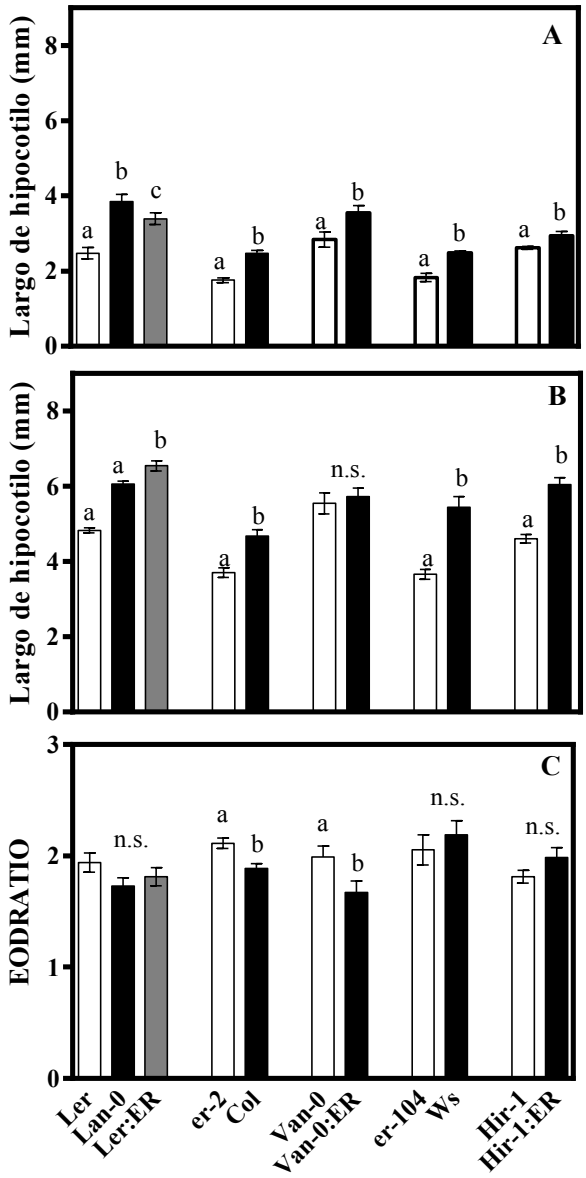


Figura 6. Los efectos *ERECTA* sobre las respuestas de escape al sombreado dependen de los antecedentes genéticos longitud de hipocotilo en LB (A), del EOD (B) y EODRATIO (C). Cada barra representa la media±SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de t y se indican con letras ($p<0.05$).

***ERECTA* es pleiotrópico a otras respuestas de escape al sombreado.**

Las respuestas de las plantas a las señales de sombra están presente a lo largo del ciclo de vida y pueden afectar parámetros vegetativos, florales y reproductivos en *Arabidopsis thaliana* (Smith & Whitelam, 1997). Por tal razón, nos pareció interesante determinar si los efectos de *ERECTA* que son dependientes del fondo genético en la respuesta al EOD durante el estadio de la plántula también eran importantes en otras respuestas a la sombra previamente documentadas durante el crecimiento vegetativo (ángulo foliar, largo de pecíolo, largo de lámina) y promoción de la floración (tiempo a floración indicado como número de hojas al momento de la aparición del eje floral). En algunos líneas naturales, el alelo *erecta* aumentó la respuesta del EOD (EODRATIO). El EODRATIO en Van-0 fue mayor comparado a Van-0 ER para largo de lámina y pecíolo, pero no para ángulo foliar ni tampoco para tiempo a floración (Figura 7 C y 8 C). En oposición, EODRATIO fue menor en Ler para largo de lámina y pecíolo con respecto a Lan-0. En WS, los efectos de *ERECTA* dependieron de la respuesta analizada. Mientras el alelo *erecta* de WS aumento el EODRATIO para el ángulo foliar y tiempo a floración, lo redujo para el largo de pecíolo. En las otras líneas analizadas, como Col y HIR, no se detectaron efectos significativos asociados al polimorfismo de *ERECTA* en el EODRATIO (Figura 7). Dependiendo del fondo genético, el alelo *ERECTA* incremento significativamente el pecíolo y largo de lámina, y el ángulo foliar en los tratamientos de LB y EOD, y en ciertos casos, el alelo *erecta* retrasó el tiempo a floración promoviendo el número de hojas a floración en LB como se observa para WS (Figura 7 y 8).

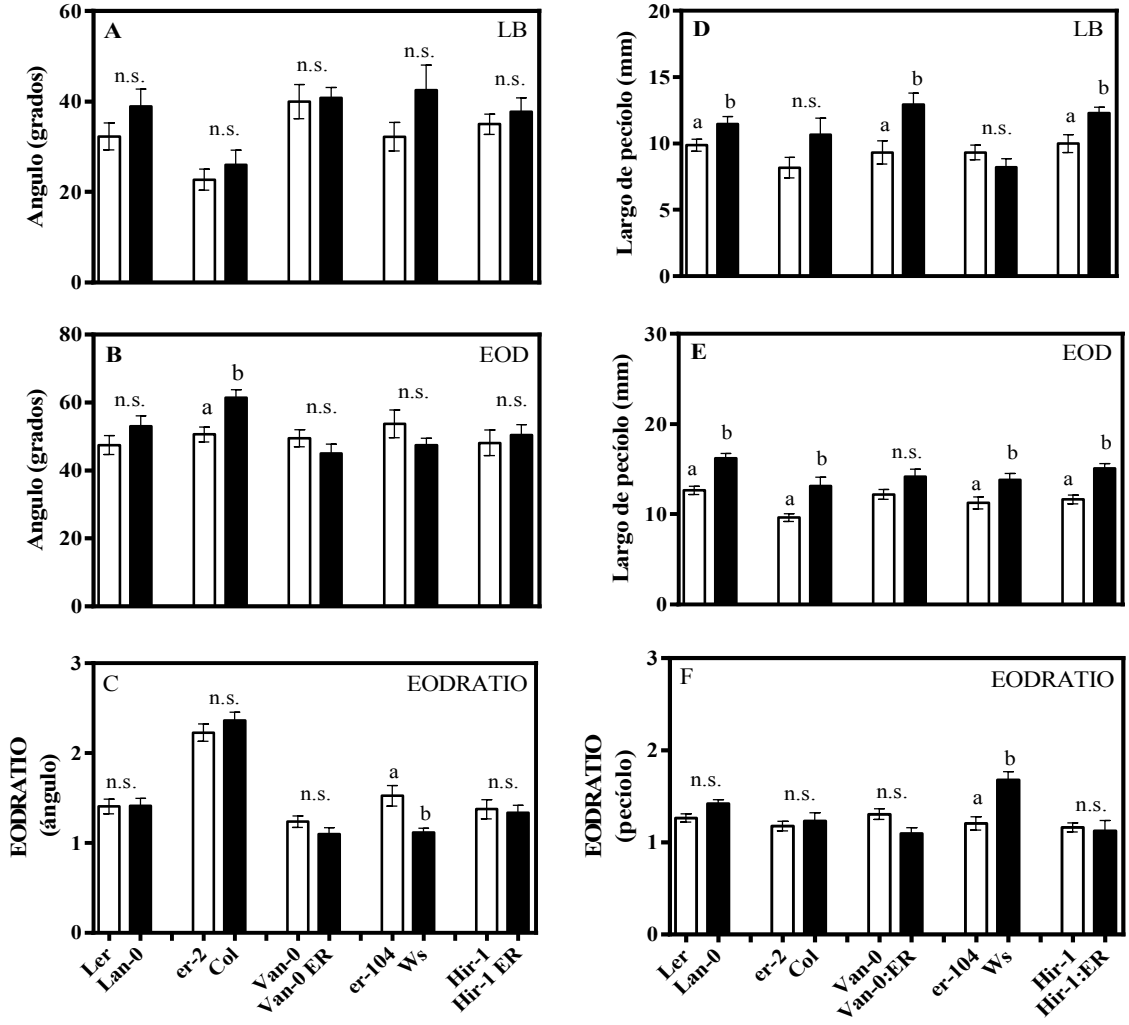


Figura 7. La función de *ERECTA* en las SAS es pleiotrópica. Ángulo y largo de pecíolo se midieron en las plantas cultivadas en LB (A y D), EOD (B y E) y EODRATIO (C y F). Cada barra representa la media±SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de t y se indican con letras ($p<0.05$).

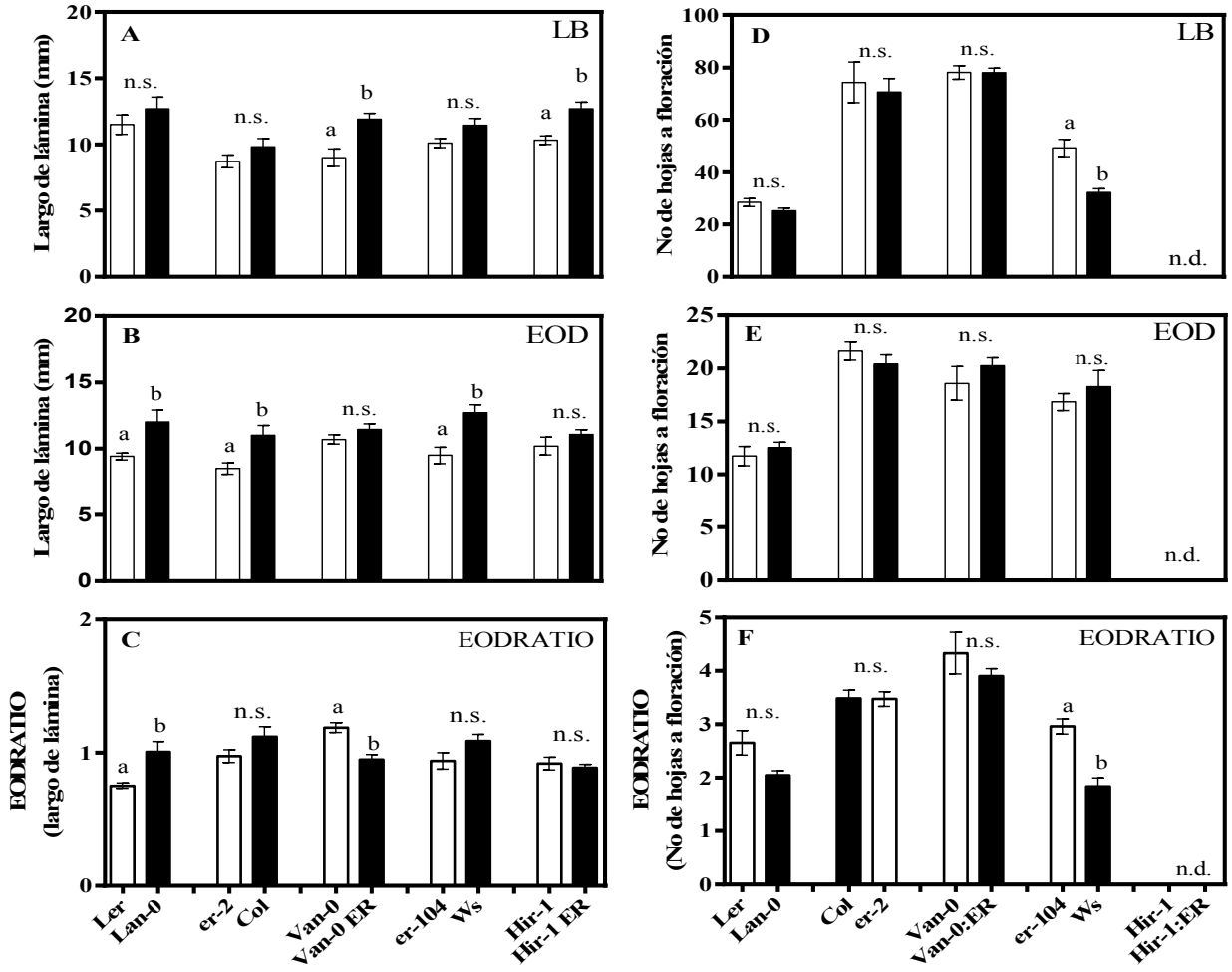


Figura 8. La función de *ERECTA* en las SAS es pleiotrópica. Largo de la lámina y el número de hojas a floración se midieron en las plantas cultivadas en LB (A y D), EOD (B y E) y EODRATIO (C y F). Cada barra representa la media ± SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de t y se indican con letras ($p < 0,05$). nd: no determinado.

Discusión

En el este trabajo se ha estudiado la variación natural de las respuestas de escape al sombreado en tres poblaciones de RILs que comparten un mismo genotipo parental Ler. Se identificaron siete QTLs para LB, seis QTLs para EOD y cinco QTLs para EODRATIO. Se mapearon siete QTL que colocalizaron en LB y EOD. Estos loci podrían ser responsables para la variación en el alargamiento en general sin causar variación en el SAS. El segundo grupo de QTL identificados estuvo asociado a efectos específicos y dependientes del tratamiento lumínico. En este grupo, se mapearon tres QTL específicamente en LB y dos QTLs en EOD. Para identificar QTL específicos asociados con la SAS, se estimó la respuesta al EOD (EODRATIO) como la relación de la longitud del hipocotilo entre EOD/LB, un índice de respuesta de sombra normalizado que fuera utilizado previamente (Botto & Smith, 2002; Botto & Coluccio, 2007). Se mapearon cinco QTL asociados al EODRATIO. *EODRATIO1* colocalizó con un QTL identificado en LB, LB0, siendo los otros cuatro QTL *EODRATIO* específicos y no detectados en las condiciones LB y EOD (Figura 1 y Tabla Anexo 1). La colocalización de *EODRATIO1* y *LB0* sugiere que la base genética de la variación observada para la elongación del hipocotilo en respuesta a la sombra se manifiesta principalmente mediante el control de la elongación del hipocotilo en ambientes de alta relación de luz R/RL típicos de áreas abiertas, donde la densidad de las plantas es baja. Un estudio previo utilizando la misma población de RILs de Ler×No-0 identificó un QTL de tiempo a floración que colocalizó con *EODRATIO1* cuando las plantas de Arabidopsis se encontraban creciendo aisladamente y recibiendo una alta relación R/RL, pero no cuando las plantas fueron crecidas a altas densidades con una baja relación de luz R/RL (Botto & Coluccio, 2007). Por otra parte, mucha de la variación genética que se detecta asociada a la respuesta de las plántulas a la sombra puede ser atribuida a la variación de respuesta a la luz blanca al analizar la variación fenotípica de largo de pecíolo en 180 poblaciones de Arabidopsis que provienen de distintas regiones geográficas (Filiault & Maloof, 2012).

Utilizando la estrategia de gen candidato y mediante el uso de NILs, se confirmó que *ERECTA* es el gen responsable de EOD6. El gen *ERECTA* tiene una repetición rica en

leucina similar al receptor de Ser/Thr quinasa y está implicado en el desarrollo de la planta, controlando la respuesta de elongación celular a través de respuestas bióticas o por el ambiente (Torii et al.,1996; van Zanten et al., 2009; Fu et al., 2009). Se ha descripto que *ERECTA* controla los patrones espaciales y temporales del número y tamaño de células de la epidermis debido a que el alelo *erecta* conduce a una baja tasa de expansión celular (Tisne et al., 2011). Por lo tanto, no es sorprendente que *ERECTA* promueva la elongación de la planta en condiciones de luz LB y EOD. La novedad de este estudio fue la demostración de que es *ERECTA* está implicado en la SAS de una manera dependiente del fondo y que sus efectos son pleiotrópicos a otras respuesta de escape a la sombreado. El alelo *erecta* mutado promovió la respuesta del EOD del crecimiento del hipocotilo en Col y Van-0, pero no en Ler, CVI-0, HIR-1 y WS. Además, la contribución de *ERECTA* en la respuesta al EOD fue significativa para el ángulo foliar, la elongación de la lámina y del pecíolo, y el tiempo de floración, sugiriendo que su papel en ambientes sombreados es relevante para ciertas poblaciones en diferentes fases de desarrollo. Otros estudios de mapeo genético identificaron un QTL fotomorfogénico asociado al marcador *ERECTA* en plántulas cultivadas en oscuridad, luz azul continua, y pulsos de luz rojo y rojo lejano en la población de RILs de LerxCVI-0 (Borevitz et al., 2002; Botto et al., 2003). Recientemente, se ha documentado que los efectos de *ERECTA* en las respuestas de las plantas a la sombra son dependientes de la temperatura (Patel el al., 2013).

Proponemos que *ERECTA* podría participar en procesos de canalización durante las respuestas a la luz sombreada. La canalización es la capacidad de los organismos para amortiguar su desarrollo los procesos contra las fluctuaciones ambientales (Waddington, 1942; Meiklejohn & Hartl, 2002). Existen varias quinasas, tales como *ERECTA*, que son proteínas cliente de Hsp90 que puede actuar como un amortiguador de la variación genética (Jaroszy Linquist, 2010). De hecho, la proteína Hsp90 modula la expresión de la variación genética y la estabilidad de desarrollo del crecimiento del hipocotilo y la floración en *A.thaliana* (Sangster et al, 2008a, b). En uno de estos estudios, HSP90 estuvo asociada a un QTL que controla la longitud del hipocotilo y este QTL fue epistático a la mutación *erecta*, pero no con el alelo salvaje de *ERECTA* sugiriendo que la mutación *erecta* no permite la acción inhibitoria de Hsp90 revelando un segundo locus polimórfico (Sangster et al.,

2008a). En un estudio independiente, Hall y colaboradores (2007) encontraron que *ERECTA* puede contribuir al proceso de canalización microambiental en plantas cultivadas en condiciones de día largo, pero no para las cultivadas en día corto y los efectos del alelo *ERECTA* fueron dependientes del fondo genético. Los procesos de canalización podrían entonces diferir dependiendo de la respuesta analizada y del fondo genético. En algunas circunstancias, la selección favorecería una reducida canalización y aumento de la sensibilidad a variaciones microambientales y consecuentemente los individuos podrían mantener una plasticidad suficiente para responder a esta variación. En resumen, se sugiere que *ERECTA* podría contribuir a la canalización en las respuestas de escape al sombreado dependiendo de la trayectoria evolutiva de cada genotipo en diferentes ambientes de luz.

En este trabajo se ha demostrado que *PHYB* es el gen candidato para *EODRATIO5* mapeado en la población de RILs de Ler×CVI-0, pero no para *EODRATIO1* ni *EODRATIO2* detectados en las poblaciones de RILs de Ler×Col y Ler×No-0 que co-localizan con *EODRATIO5*. También encontramos una respuesta de menor sensibilidad del alelo CVI-PHYB respecto del alelo LER-PHYB en las respuestas LB y EOD. Las plántulas de ambos genotipos expuestas a luz continua también mostraron una respuesta de baja sensibilidad a la luz rojo para las plántulas que llevan el alelo CVI-PHYB con respecto a las que llevan los alelos Ler-PHYB (Filiault et al., 2008). En concordancia con estos resultados, un estudio previo de los polimorfismos en el gen PHYB demostró que las secuencias de la proteína PhyB provenientes de Ler, Col y No-0 segregaron juntas en cluster asociado a Europa central, mientras que la variante CVI-0 se agrupo en un cluster aislado junto con cuatro accesiones españolas (Filiault et al., 2008).

En los cinco *QTLs EODRATIO* identificados en este trabajo, los alelos Ler contribuyeron positivamente a la elongación del hipocotilo. Esto sugiere una función más fuerte de alelos Ler que los alelos Col, CVI-0 y No-0 en la respuesta al EOD. Además de los tres *QTL EODRATIO* que co-localizaron en el cromosoma 2, se mapeó *EODRATIO3* sobre el cromosoma 5 en la población Ler×Col RIL (Tabla 2 Anexo I). *EODRATIO3* colocaliza con un QTL identificado en la población de mapeo de BayxSha al exponer las plántulas de Arabidopsis a señales de sombreado idénticas a las utilizadas en este trabajo (Coluccio et

al., 2011). Los alelos Bay tienen una contribución positiva a la elongación del hipocotilo al EOD. El gen candidato que cae en el intervalo de *EODRATIO3* es *TZP/PLUS3*, un gen que controla la síntesis de la pared celular implicada en la variación de la longitud del hipocotilo entre Bay y Sha (Loudet et al., 2008). Por otra parte, el intervalo de confianza de *EODRATIO4* mapeado en el brazo superior del cromosoma en la población de RIL de Ler×CVI-0 contiene varios genes implicados en las respuestas mediadas por los fitocromos como *PHYA, PIF3* y *CRY2*. Polimorfismos en genes asociados a la señalización de phyA también fueron identificados en mapeos por asociación del genoma completo en plántulas de Arabidopsis expuestas a luz blanca suplementada con luz rojo lejano (Filiault & Maloof, 2012).

Capítulo II-Mapeos de asociación para caracteres vegetativos, florales y reproductivos de plantas de *A.thaliana* cultivadas en el invernáculo.

Introducción

Durante los distintas fases del desarrollo de *A.thaliana*, las respuestas al sombreado son variadas e incluyen el incremento del alargamiento de hipocotilos, pecíolos y entrenudos, una marcada dominancia apical, reducción del número de ramificaciones, aceleración de la floración y reducción en la producción de semillas (Casal, 2012). Como ya hemos visto en el capítulo anterior, la variación natural en las respuestas de escape al sombreado es enorme en el reino vegetal y en particular en *Arabidopsis thaliana*. En la última década y gracias a la secuenciación del genoma completo de esta pequeña crucífera ha sido posible y a bajo costo la secuenciación de centenares líneas naturales (accesiones). La secuenciación masiva del genoma es una herramienta espectacular que permite identificar las bases moleculares que subyacen en los mecanismos de adaptación de las especies en su hábitat (Horton et al., 2012). Con esta herramienta tecnológica, la variación fenotípica puede ser asociada a variantes alélicas secuenciadas en 250000 SNP a lo largo de todo el genoma (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (Weigel, 2012). El consorcio Genoma 1001 ha secuenciado centenares de accesiones recolectadas en distintas regiones geográficas que llevan distintas variantes alélicas con una identidad genética única en respuesta a los principales estímulos ambientales de cada ambiente ecológico (Weigel & Mott, 2009). Mapeos previos del genoma completo, también llamados GWAS (Genome Wide Association Studies) sugieren que algunas asociaciones son difíciles de identificar y existen distintas estrategias para validarlas (Korte & Farlow, 2013).

En el marco de esta tesis, se propuso identificar loci asociados con el síndrome de escape al sombreado utilizando mapeos de asociación del genoma completo (GWAS) en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para alcanzar este objetivo, se diseñó un experimento en condiciones semi-controladas de invernáculo simulando el sombreado natural con filtros de luz verde. Este ensayo se extendió durante todo el ciclo de vida de la planta y se evaluaron un total de once caracteres vegetativos, florales y reproductivos.

Resultados

El ensayo se realizó durante la primavera de 2011 en un invernáculo ubicado en el predio del IFEVA. Las respuestas de escape al sombreado fueron evaluadas en plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en macetas bajo filtros de luz que simulan dos ambientes lumínicos diferentes: sombra y control con radiación natural. El filtro control (FC) disminuyó la radiación natural estableciendo un PAR=213.63 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ y R/RL=1.05 (Figura 1). El filtro verde (FV) simuló condiciones de sombreado con un PAR= 136.73$\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ y R/RL=0.26 con un enriquecimiento de fotones en el espectro de luz verde y luz rojo-lejano (Figura 1).

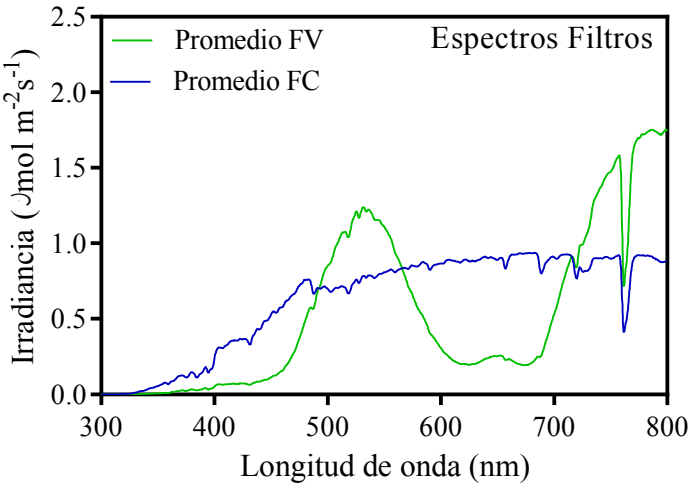


Figura 1. Espectro de transmisión de los filtros usados en el experimento. Se grafica el promedio de 4 mediciones de la irradiancia debajo de los filtros control (FC) o filtro verde (FV) en función de la longitud de onda medida.

Se midieron once caracteres a lo largo del ciclo de vida de *A.thaliana* detallados en la (Tabla1). Si bien se sembraron semillas de más de 100 accesiones, muchas plantas murieron durante el desarrollo del experimento. Solo se pudieron estimar las respuestas fisiológicas para 73 a 102 accesiones dependiendo del caracter y del tratamiento de luz (Tabla 2). El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorizado donde se analizó al menos 2 plantas por tratamiento/accesión.

Fase vegetativa	Fase floral	Fase reproductiva
Largo de pecíolo (LP)	Largo de vástago floral (LV)	Largo de silicua (LS)
Largo de lámina (LL)	Largo del 5to entrenudo (LE)	N° de semilla por silicua (SS)
Lancho de lámina (AL)	Ancho del 5to entenudo (AE)	Peso de 100 semillas (P100)
	N° de ramificaciones (R)	
	Peso seco aéreo (PA)	

Tabla 1. Detalle y abreviaciones de los once caracteres descriptos en las SAS en cada fase (vegetal, floral y reproductiva) del ciclo de vida de la especie modelo *Arabidopsis thaliana.* Las abreviaciones son las que se utilizan para describir a cada caracter.

Estadística descriptiva de los caracteres cuantitativos.

Todos los caracteres respondieron al factor luz a excepción del número de ramificaciones (Tabla 2). Las plantas cultivadas bajo el filtro verde desarrollaron hojas con pecíolo más largos (LP), láminas más cortas (LL) y más anchas (AL), el quinto entrenudo del eje floral principal resultó más largo (LE) y más delgado (AE), menor peso seco aéreo (PA), silicuas más cortas (LS) y menor número de semillas (SS). Por otra parte, el largo de vástago del eje floral principal (LV) fue más corto y el peso de 100 semillas (P100) fue mayor para las plantas cultivadas en la sombra con respecto al tratamiento control (Tabla 2).

Control	LP(mm)	LL(mm)	AL(mm)	LV(cm)	LE(mm)	AE(mm)	R (N°)	PA(gr)	LS(mm)	SS(N°)	P100(mg)
Genotipos	73	88	96	93	90	94	90	100	96	91	91
Media	6.00	7.46	5.31	46.13	27.09	1.06	7.78	0.26	10.50	27.39	2.14
Desvio	0.89	1.06	0.61	3.14	7.24	0.10	1.02	0.06	0.56	3.90	0.29
Vg	1.93	2.20	0.97	49.42	68.17	0.04	2.94	0.01	0.95	29.43	0.14
Vf	4.47	5.80	2.28	72.00	158.45	0.05	4.83	0.02	1.49	57.33	0.24
H2	0.43	**0.38**	0.42	0.69	0.43	**0.76**	0.61	0.53	0.63	0.51	0.56

Sombreado	LP(mm)	LL(mm)	AL(mm)	LV(cm)	LE(mm)	AE(mm)	R (N°)	PA(gr)	LS(mm)	SS(N°)	P100(mg)
Genotipos	74	87	94	92	90	88	88	96	102	99	96
Media	9.52	6.54	4.80	43.87	34.00	0.81	7.92	0.23	10.12	24.04	2.38
Desvio	1.32	0.78	0.60	4.87	7.73	0.15	1.15	0.04	0.59	3.81	0.30
Vg	3.93	1.61	0.62	38.53	70.33	0.04	2.90	0.01	1.26	22.08	0.20
Vf	10.34	3.68	1.44	89.99	198.51	0.07	5.10	0.01	2.02	52.88	0.35
H2	0.38	0.44	0.43	0.43	**0.35**	0.58	0.57	**0.71**	0.62	0.42	0.59
p valor del efecto tratamiento	0.0001	0.0001	0.0001	0.0242	0.0001	0.0001	NS	0.0045	0.0071	0.0001	0.0001

Tabla 2. Descripción de los caracteres para el tratamiento control (arriba) y sombreado (abajo). Se indica el número final de genotipos utilizado en cada tratamiento. Vg, varianza genética. Vf, varianza fenotípica. H2, heredabilidad calculada en sentido amplio, en negrita se resaltan los máximos y mínimos. La última fila indica el p valor de la comparación de medias para cada caracter por separado mediante la prueba de t, para evaluar el efecto tratamiento sombreado. mm=milímetros, cm=centímetros, gr=gramos, mg=miligramos, N°=número.

La heredabilidad calculada en sentido amplio estima la proporción de la variabilidad fenotípica explicada por el genotipo (Falconer & Mackay, 1996). Los valores de heredabilidad variaron en el tratamiento control entre 0.38 y 0.76 que corresponden a las variables largo de lámina (LL) y ancho del quinto entrenudo (AE), respectivamente. La heredabilidad de las variables en el tratamiento sombreado variaron entre 0.35 y 0.71 que corresponden a largo del quinto entrenudo (LE) y peso seco aéreo (PA), respectivamente (Tabla 2).

Previo a los mapeos de asociación, se realizaron análisis de correlaciones entre los once caracteres estudiados. De los análisis de correlación, se encontraron correlaciones comunes en algunos caracteres para ambos tratamientos lumínicos. El largo de lámina (LL) se correlacionó positivamente con los restantes caracteres vegetativos, largo de pecíolo (LP) y ancho de lámina (AL). Para los caracteres florales y reproductivos, se observaron correlaciones positivas para ancho del 5to entrenudo (AE) y peso seco aéreo (PA) con el caracter número de ramificaciones (R); y el largo de silicua (LS) con el número de semillas por silicua (SS). Por otra parte, el número de semilla por silicua (SS) se correlacionó negativamente con el peso de 100 semillas (P100, Tabla 3).

Además, se observó que algunos caracteres correlacionaron entre sí en un determinado tratamiento lumínico, pero no en el otro. En el tratamiento control, los caracteres de ancho del 5to entrenudo (AE) y el largo de silicua (LS) correlacionaron positivamente, mientras que los caracteres largo de vástago (LV) y peso seco aéreo (PA) correlacionaron negativamente (Tabla 3). Correlaciones positivas específicas al tratamiento sombreado fueron identificadas entre los caracteres largo de pecíolo (LP) y ancho de lámina (AL); y entre los caracteres largo de vástago (LV) y peso de 100 semillas (P100).

LP_S	**0,543**	**0,314**	0,071	0,110	0,053	0,134	0,144	0,207	0,006	0,115
	LL_S	**0,679**	-0,139	-0,021	0,021	0,005	0,112	-0,040	-0,030	-0,091
		AL_S	-0,062	0,093	0,095	0,096	0,042	-0,169	-0,113	0,066
			LV_S	0,186	0,166	0,099	0,086	0,178	0,049	**0,304**
LP_C				LE_S	0,004	0,057	-0,165	-0,119	-0,063	0,139
0,344	LL_C				AE_S	**0,433**	**0,511**	0,184	**0,324**	-0,011
0,199	**0,731**	AL_C				PA_S	**0,483**	0,009	-0,032	0,009
-0,204	0,078	-0,056	LV_C				R_C	0,091	0,170	-0,053
-0,183	-0,127	-0,168	0,067	LE_C				LS_S	**0,474**	0,143
0,027	0,037	0,205	-0,049	0,119	AE_C				SS_S	**-0,261**
0,214	-0,078	0,094	**-0,262**	0,065	**0,493**	PA_C				P100_S
0,101	-0,077	0,203	-0,189	0,111	**0,639**	**0,366**	R_C			
0,048	0,004	-0,037	0,179	0,078	**0,322**	0,146	0,096	LS_C		
-0,025	-0,052	-0,120	-0,036	0,123	**0,350**	0,197	0,145	**0,461**	SS_C	
0,209	0,113	0,096	0,109	0,029	-0,126	-0,097	-0,054	-0,040	**-0,317**	P100_C

Tabla 3. Correlaciones (r de Pearson) de cada uno de los caracteres en los respectivos tratamientos sombreado (triángulo superior en verde) y control (triángulo inferior en celeste). Los datos que presentaron p significativos en el análisis de correlación se resaltaron en claro y con negritas.

Algunas consideraciones metodológicas sobre el mapeo de asociación.

Los mapeos de asociación fueron corridos con el programa GWAPP (Seren et al., 2012). El primer paso previo al mapeo de asociación es evaluar la normalidad de los datos fenotípicos obtenidos. Los datos fenotípicos se analizaron con el test de normalidad de Shapiro Wilks (SW). La hipótesis nula de esta prueba es que los datos se ajustan a una distribución normal. La tablas estadísticas del test de SW indican que para un n=50 y un alfa de 0.05, el estadístico toma un valor de 0.947. Por lo cual, se consideró que la distribución de los datos se ajustó a la distribución normal cuando los valores críticos fueron menores al estadístico 0.947. Si los valores críticos resultaron mayores al

estadístico, entonces los datos se transformaron para cumplir con el requisito de normalidad.

Luego se utilizó el método de estadística paramétrica para hacer los mapeos de asociación. Se utilizó el modelo de mixto EMMAX (Efficient Mixed-Model Association eXpedited) que tiene en cuenta la matriz de parentesco para controlar los efectos poblacionales (Seren et al., 2012). Los logaritmos de los p valores del análisis del EMMAX se grafican en función de la posición física de cada SNP en un gráfico de dispersión llamado Manhattan plot. El nivel de significancia lo calcula el programa con el FDR (False Discovery Rate) al 5%. El FDR toma un valor de -logaritmo de pvalor de 6.3 (p valor =10 e-6.3). Todos los SNPs del arreglo de 250Kb que se grafican por debajo del umbral de FDR se consideran no asociados al caracter bajo estudio (Seren et al., 2012). Los SNPs que superan el umbral se consideran asociados a la respuesta fenotípica y se indican como *QTN* (*Quantitative Trait Nucleotide*) y fueron numerados en forma arbitraria.

Una vez que los datos son corridos con el programa GWAPP, se evalúa la estructura de la población con la prueba de Kormogorov-Smirnov (KS) y se grafican los resultados de este análisis en los gráficos de QQplot. Con la prueba de KS se evalúa si la distribución de los p valores obtenidos por el EMMAX están sobreestimados o subestimados, es decir si los logaritmos de estos p valores siguen una distribución de valores esperados (Seren et al., 2012). La hipótesis cero de esta prueba es el buen ajuste a la distribución empírica. Los datos de p valor están expresados como el logaritmo del p valor y se utiliza un pvalor de 0,05, siendo el-log (pvalor=0.05) igual a 1.30. La hipótesis de ajuste (Ho) se acepta cuando los valores del estadístico estimado son menores a 1.30. En los casos que KS superó el valor de 1.30 se considera que la población tiene datos que son sobreestimados o subestimados debidos a efectos de estructura poblacional.

Los once caracteres descriptos fueron mapeados en los dos tratamientos (control y sombreado). En total se analizaron veintidós salidas de mapeos. Solo se describirán los caracteres en los que se identificaron asociaciones significativas: a) largo de lámina en el tratamiento control y b) largo de vástago del eje floral en el tratamiento sombreado. También se presentan los resultados del mapeo asociativo de los caracteres correlacionados significativamente con a) que es el ancho de lámina y con b) que es el peso de 100 semillas. El resto de los mapeos de los caracteres que no presentaron asociaciones significativas se presentan en el AnexoII.

Mapeo de asociación para largo y ancho de lámina en el tratamiento control.

Los caracteres ancho de lámina y largo de lámina en el tratamiento control ajustaron una distribución normal con Shapiro Wilk test: 0.43 y 0.04, respectivamente (Figura 2). Se utilizó el modelo EMMAX de estadística paramétrica y se mapearon cada uno de los caracteres. La distribución de los valores de asociación mostraron leves desvíos en los QQplot, que no son significativos en el caracter largo de lámina según la prueba de Kolmogorov-Smirnov (-logaritmo p valor= 0.679), pero si para el caracter ancho de lámina (-logaritmo p valor= 1.422). Por lo tanto, el mapeo de largo de lámina no tiene efectos de estructura poblacional (Figura 3).

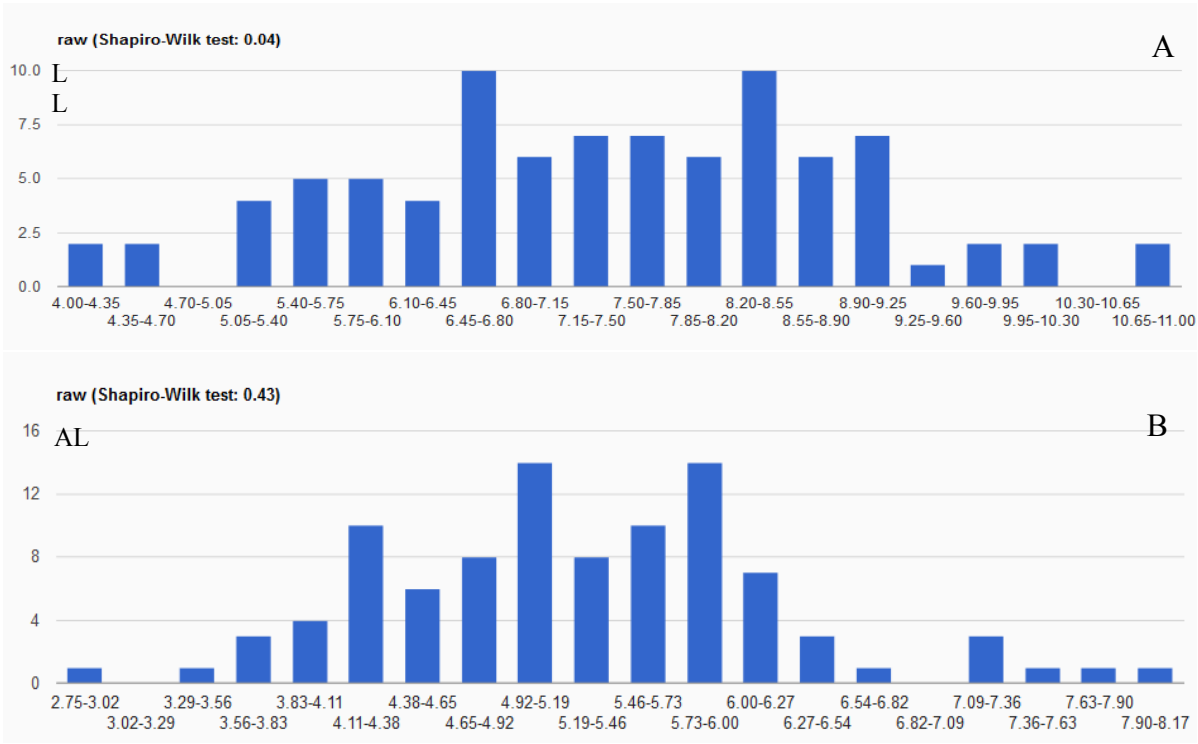


Figura 2. Distribución de frecuencias de caracteres largo de lámina (A) y ancho de lámina (B) en el tratamiento control.

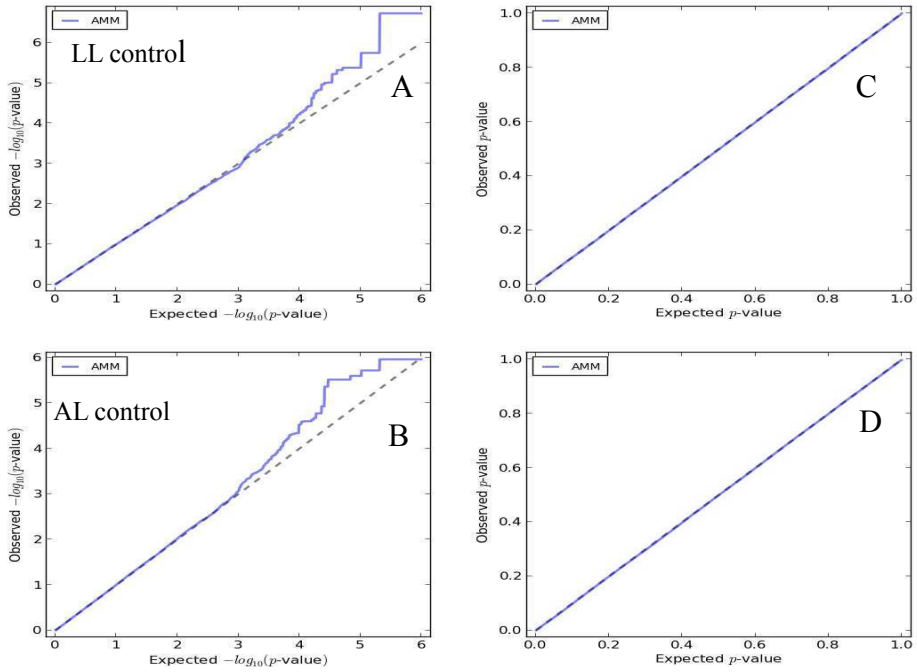


Figura 3. Gráficos de QQplots para los caracteres largo de lámina (A y C) y ancho de lámina (B y D) en el tratamiento control. En azul, la distribución de los logaritmos de pvalores (A y B) y de p valores (C y D) observados en función de los esperados. Recta teórica (45°) graficada como una línea punteada diagonal.

En los gráficos de Manhattan plot, se encontró una asociación significativa en el caracter largo de lámina (LL) con un SNP en la posición 22178509 en el extremo del cromosoma 3 que se le dio el nombre de *QTN1* (pvalor=6.73, MAF=0.37). Para el ancho de lámina (AL), el pvalor de la asociación en esta posición esta cercano a la significancia, pvalor= 5.77 pero no superó el umbral de asociación por lo que concluimos que este SNP no está asociado con este parámetro (Figura 4). En el intervalo de confianza de *QTN1* (10Kb a ambos lados de *QTN1*) se identificaron cuatro genes que colocalizan en esta posición: AT3G60040 que codifica para una F-box, AT3G60050 que codifica para una proteína de repetición pentatricopeptido (PPR), AT3G60060 que codifica para una NAD(P) de unión a Rossmann plegada y AT3G60070 que codifica para una proteína facilitadora principal.

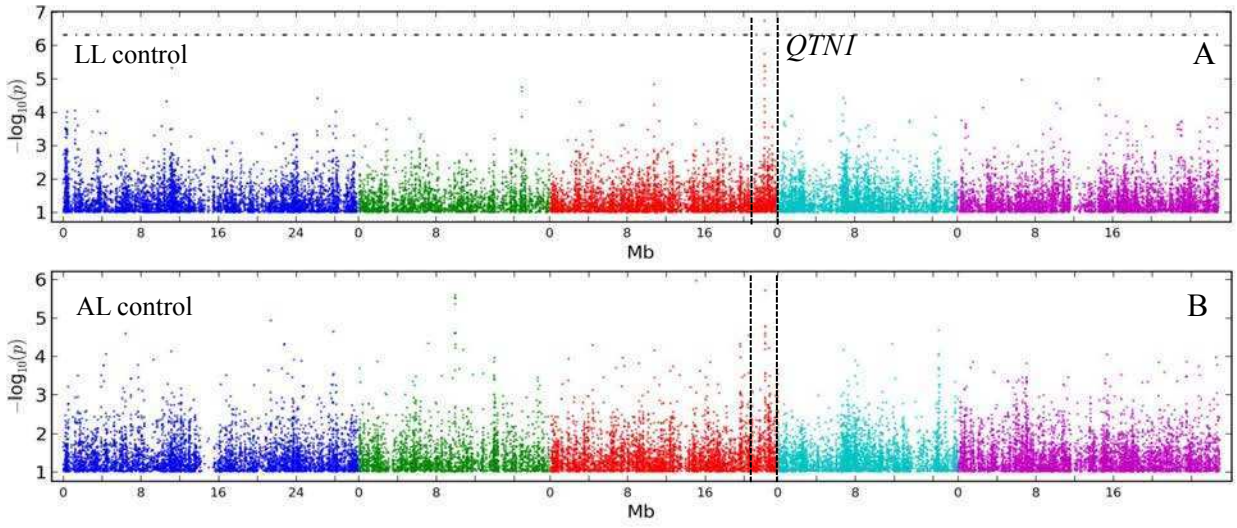


Figura 4. Gráficos de dispersión de Manhattan plot para los caracteres ancho de lámina y largo de lámina en el tratamiento control. Dispersión de los logaritmos de los p valores detectados en función de la posición física de los caracteres largo de lámina (A) y ancho de lámina (B) a lo largo de todo el genoma de *A.thaliana.* En azul se indica el cromosoma 1, en verde el cromosoma 2 en rojo el cromosoma 3 en turquesa el cromosoma 4 y en violeta el cromosoma 5. La línea punteada horizontal indica el umbral de asociación del FDR calculado al 5% (-log(pvalor)=6.3) y aparece graficada solo si hay SNPs que superan este umbral.

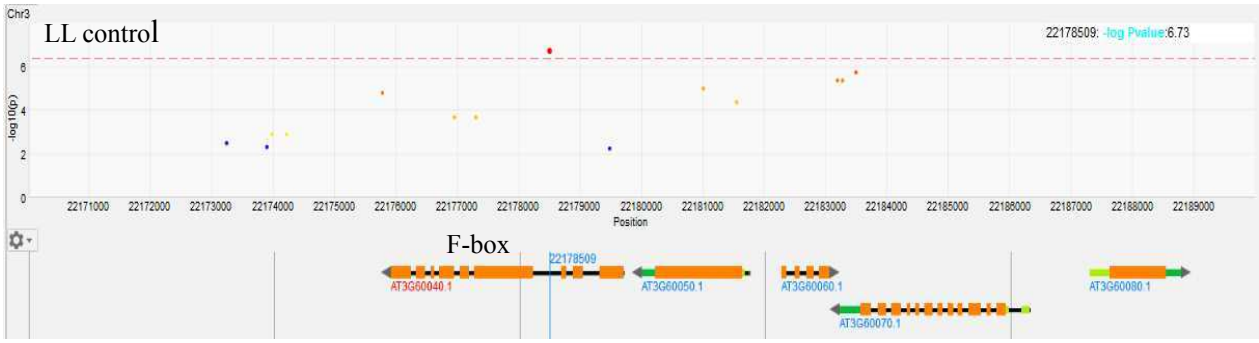


Figura 5. Detalle del intervalo de confianza de los SNPs en LD con el SNP asociado en la posición 22178509 del cromosoma 3 del caracter largo de lámina mapeado en el tratamiento control. El r2 del LD es más fuerte si esta en rojo y más débil si va hacia el amarillo. La línea punteada horizontal indica el umbral de asociación del FDR calculado al 5% (-log(pvalor)=6.3).

Mapeo de asociación para largo de vástago y peso de 100 semillas en el tratamiento sombreado.

Los caracteres largo de vástago (LV) y peso de 100 semillas (P100) fueron dos caracteres que correlacionaron positivamente en el tratamiento sombreado. Los datos medidos mostraron una distribución normal para el caracter largo de vástago (Figura 6), pero no fue normal en el caracter peso de 100 semillas (SW=2.32, datos no mostrados). Para ajustar los valores del caracter peso de 100 semillas a una distribución normal, los datos fueron transformados con la transformación box-cox (Figura 6). La prueba estadística del test de Kormogorov-Smirnov para largo de vástago el valor de-logaritmo de (p valor)=3.91 fue mucho mayor al esperado de 1.30, se observó que la distribución de los logaritmos de p valores observados fueron mayores a la distribución esperada en el gráfico de QQplot, infiriendo que hay un componente de estructura poblacional (Figura 7). La prueba estadística del test de Kormogorov-Smirnov para peso de 100 semillas dio un -logaritmo de p valor=1.12, en este caso no hay efectos de estructura poblacional.

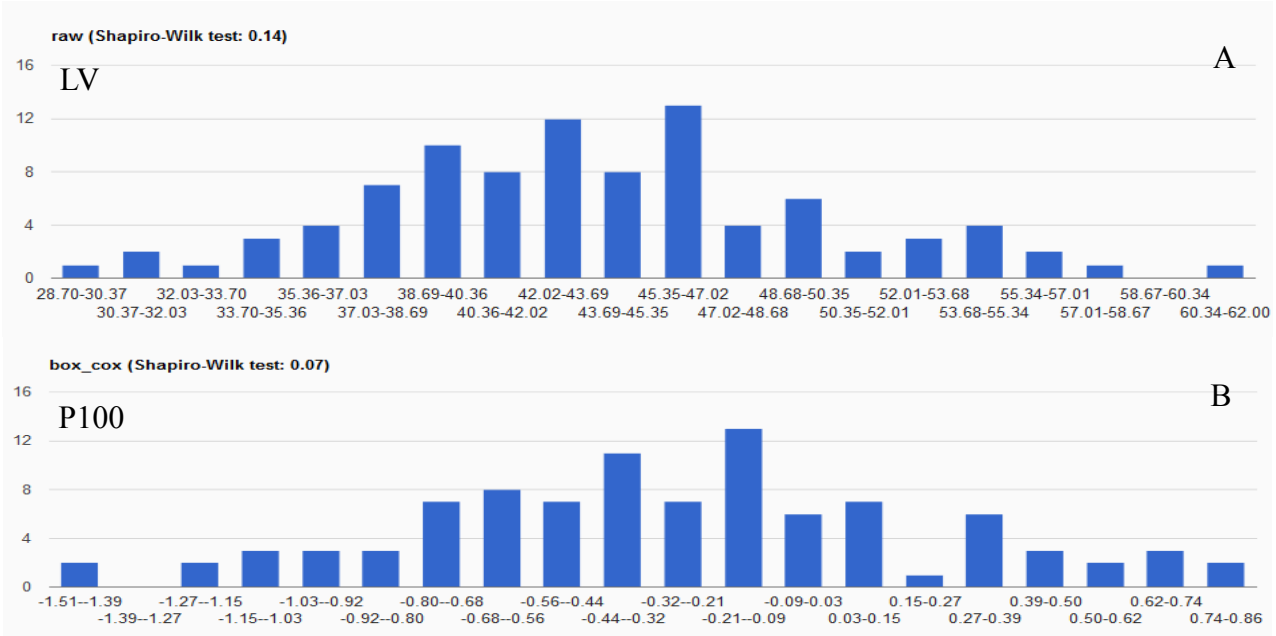


Figura 6. Distribución de frecuencias de los caracteres largo de vástago (A) y peso de 100 semillas (B) en el tratamiento sombreado. Los datos de largo de vástago y peso de 100 semillas fueron transformados con la transformación box-cox para su ajuste a la distribución normal.

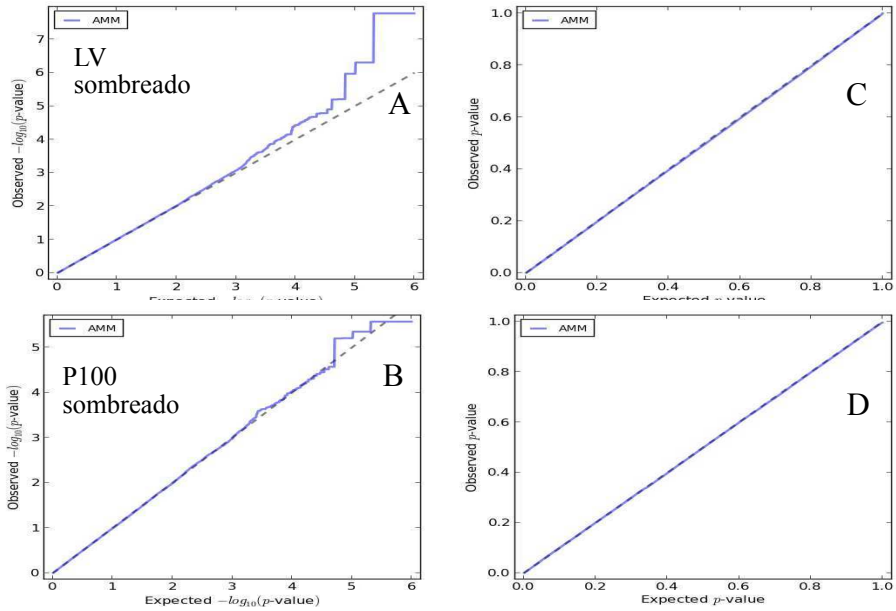


Figura 7. Gráfico de QQplot para el caracter largo de vástago (A y C), peso de 100 semillas (B y D) en el tratamiento sombreado. En azul, la distribución de los logaritmos de pvalores (A y C) y de p valores (B y D) observados en función de los esperados. Recta teórica (45°) graficada como una línea punteada diagonal.

En el gráfico de Manhattan plot, el caracter largo de vástago en sombra se asoció un SNP en la posición 6905773 del cromosoma 3 con un logaritmo del p valor de 7.78 y un MAF de 0.17 (*QTN2*, Figura 8 A). El SNP asociado mapea en el último exón de un gen que codifica para una proteína bHLH (basic Helix-Loop-Helix), llamada *bHLH121* (Figura 9). Para el caracter peso de 100 semillas en el tratamiento sombreado, no hay SNP detectados en esta posición. El SNP detectado más cercano al umbral de asociación alcanzó un p valor de 5.57 en la posición 16987185bp en el mismo cromosoma 3, pero no se puede considerar como significativo (Figura 8 B).

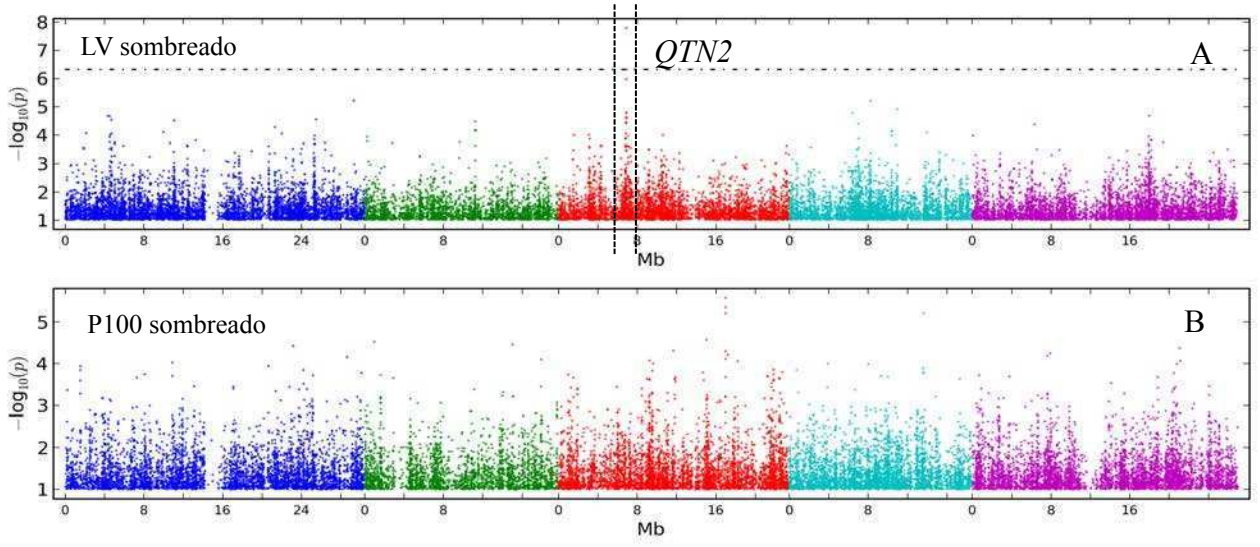


Figura 8. Gráficos de Manhattan plot para los caracteres largo de vástago (A) y P100 sombreado (B) en el tratamiento sombreado. Dispersión de los logaritmos de los p valores detectados en función de la posición física a lo largo de todo el genoma de *A.thaliana.* En azul se indica el cromosoma 1, en verde el cromosoma 2 en rojo el cromosoma 3 en turquesa el cromosoma 4 y en violeta el cromosoma 5. Las líneas punteadas verticales colocalizan indicando regiones de alta detección. La línea punteada horizontal indica el umbral de asociación del FDR calculado al 5% (-log(pvalor)=6.3) y aparece graficada solo si hay SNPs que superan este umbral.

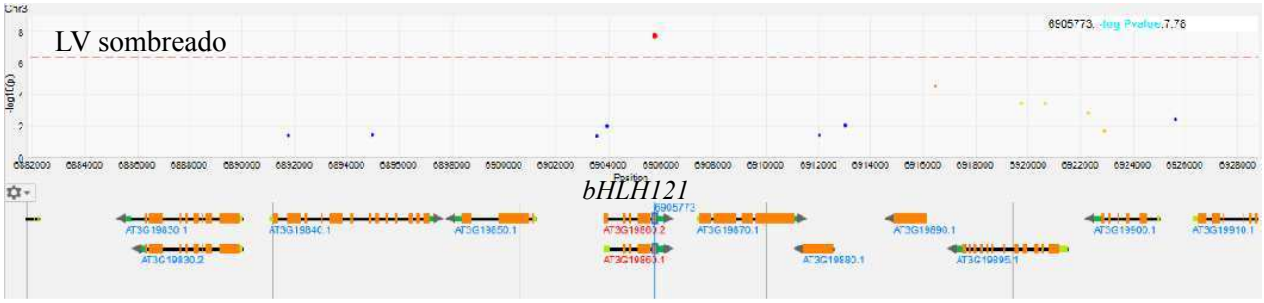


Figura 9. Gráfico de Manhattan plot para el caracter largo de vástago en sombreado (B) y detalle del SNP de la posición 6905773 del cromosoma 3con el LD en una región de 20Kb. El r2 del LD es más fuerte si esta en rojo y más débil si va hacia el amarillo. La línea punteada horizontal indica el umbral de asociación del FDR calculado al 5% (-log(pvalor)=6.3).

Discusión

En este trabajo se han evaluado once caracteres vegetativos, florales y reproductivos de plantas de Arabidopsis cultivadas en condiciones semi-controladas de invernáculo con luz de radiación natural (control) y sombreado. La población de accesiones de *A.thaliana* que se utilizaron respondieron a la luz de sombra para la mayoría de los caracteres analizados con excepción de número de ramificaciones en el eje floral (Tabla 2). Los caracteres estudiados, muestran una importante plasticidad fenotípica en respuesta a la luz de sombra (Tabla 2). La heredabilidad, que es la proporción de variación fenotípica explicada por el genotipo fue relativamente baja y vario entre 0.35 a 0.76 dependiendo del caracter y del tratamiento lumínico evaluado. El análisis de correlaciones entre caracteres indica que sólo unas pocas correlaciones fueron significativas (Tabla 3). Algunas de estas correlaciones significativas fueron detectadas en ambos tratamientos de luz como el largo de lámina que se correlaciona positivamente con largo de pecíolo y ancho de lámina; el ancho del eje floral y el peso seco aéreo que se asociaron positivamente con número de ramificaciones; y el número de semillas por silicua que se correlacionó positivamente con el largo de silicua y negativamente con el peso de 100 semillas. Otras correlaciones fueron específicas al tratamiento de luz. Por ejemplo, en el tratamiento control, el largo de la silicua y ancho del eje floral se correlacionaron positivamente, mientras que el largo de vástago floral y peso seco aéreo se correlacionaron negativamente. En sombra, se detectaron correlaciones positivas entre largo de pecíolo y ancho de lámina, y entre largo de vástago floral y peso de 100 semillas (Tabla 3). Algunas de estas correlaciones sugieren que la relocalización de recursos puede ser dependiente del tratamiento de luz. Por ejemplo, las plantas que producen vástagos florales largos tuvieron reducciones significativas en el peso seco aéreo solo en el tratamiento control pero no en el tratamiento sombreado. Sin embargo, otros caracteres muestran asociaciones independientes a la luz como, el aumento de peso de semillas que reduce el número de semillas en la silicua. Hay otros trabajos que observaron en otras condiciones de cultivo que el peso de las semillas esta correlacionado negativamente con el número de semillas en la silicua sugiriendo que ambos caracteres tienen un fuerte componente genético que es independiente al efecto del ambiente (Alonso Blanco et al., 1999).

Los mapeos de GWAS realizados en el marco de esta tesis permitieron identificar un bajo número de asociaciones significativas para los 11 caracteres analizados en el tratamiento control y en sombra. Las asociaciones fueron significativas sólo en un 9% de los casos mapeados (2 QTN significativos sobre 22 analizados). *QTN1* se asoció significativamente a largo de lámina (LL) en condiciones de luz de radiación natural (control) y también se observó marginalmente asociado con

ancho de lámina (AL), un caracter correlacionado positivamente con LL (Tabla 3 y Figura 4). *QTN2* se asoció significativamente con largo del eje floral principal (LV) en sombra. Además, se detectó un QTN marginal en esta posición con una probabilidad de asociación en el límite inferior al umbral de significancia para el peso de 100 semillas (P100), un caracter que se correlacionó positivamente con LV en sombra (Figura 8B). El bajo número de QTN detectados en este estudio puede deberse a varios motivos. a) La naturaleza cuantitativa de los caracteres. Numerosas evidencias sugieren que los caracteres cuantitativos se asocian con QTL/QTN de pequeños efectos. Por tal motivo, son difíciles de identificar las asociaciones con caracteres que están regulados por muchas variantes que tienen efectos chicos (efectos poligénicos) ya que sus efectos no superan el umbral de asociación (Asimit & Zeggini, 2010; Korte & Farlow, 2013). b) El número bajo de accesiones utilizadas en el mapeo pueden haber limitado la capacidad de detección de QTN en nuestro análisis de GWAS. En los mapeos se utilizaron datos fisiológicos de entre 73 a 100 accesiones dependiendo del caracter y condición de luz (Tabla 2). Si bien hay discusión acerca del número de genotipos a usar en los mapeos de GWAS para obtener salidas de calidad, en general, se estima la cantidad de accesiones recomendada para estos mapeos en 200 (Korte & Farlow, 2013). Sin embargo, hay mapeos con 96 accesiones y otros con 80 que han demostrado una asociación con el caracter (Chan et al., 2011; Rosas et al., 2013). c) La estructura poblacional de los caracteres estudiados puede afectar negativamente los mapeos de asociación. Desde los primeros mapeos de asociación realizados para 107 fenotipos en 200 accesiones, las asociaciones por GWAS no han resultado simples debido a efectos confusos como resultado de la estructura de la población (Atwell et al., 2010). En estos primeros estudios se usaron modelos de estadística no paramétrica con los cuales se asociaron genes relacionados con defensa y fitness y genes de tolerancia a la sal y floración (Tedesco et al., 2010; Baxter et al., 2010; Brachi et al., 2010). Con el tiempo, los análisis de GWAS incluyeron el desarrollo de modelos mixtos (de efectos fijos y aleatorios) de estadística paramétrica donde se incorporaron al modelo los parámetros de estructura poblacional y el parentesco, dando lugar a asociaciones menos confusas (Kang et al., 2010). Con estos modelos mixtos se asociaron genes de resistencia al cadmio y genes de elongación de raíz descubriendo la función de un gen F-box, entre otros (Chao et al., 2012; Meijón et al., 2014). Aún así, algunas variantes alélicas (SNP) son difíciles de identificar en el GWAS, ya sea por la frecuencia en la que se encuentran o el efecto que tienen sobre el fenotipo.

QTN1 mapeo asociado al largo de lámina en el tratamiento control cuando las plantas son cultivadas bajo radiación natural. En los mapeos, *QTN1* tuvo un pvalor de asociación de 6.73 que fue significativo y mapeo en la posición 22168509-22188509 bp del cromosoma 3 (Figura 8 A y 9). QTN1 colocalizó con un QTL con pico máximo de detención en la posición 78.1 cM para cuatro

caracteres de la arquitectura de la séptima hoja adulta en la población de mapeo de RILs de LerxCol-4 cultivadas en condiciones de luz blanca continua (Pérez-Pérez et al., 2002). Los alelos Ler tuvieron una contribución mayor que los alelos Col en esta posición para el área de la lámina, el perímetro de la lámina, el largo de la lámina y el ancho de la lámina foliar (Pérez-Pérez et al., 2002). En el intervalo de 10Kb del *QTN1* mapearon cuatro genes: AT3G60040 que codifica para una F-box, AT3G60050 que codifica para una proteína de repetición pentatricopeptido (PPR), AT3G60060 que codifica para una NAD(P) de unión a Rossmann plegada y AT3G60070 que codifica para una proteína facilitadora principal (figura 5). Entre ellas, el gen que codifica para una proteína F-Box es un gen candidato de interés. Las proteínas F-box pueden estar involucradas en las respuestas fotomorfogénicas (Dieterle et al., 2001; Somers et al., 2004). En *A.thaliana* existen 660 genes F-box pertenecientes a una gran superfamilia multigénica. La F-box forman parte de la ubiquitin ligasa E3 conformada por el complejo SCF de la proteínas Skp1, Cullin, Rbx1, y F-box. Tanto la proteína TIR1 como las proteínas AFB son F-box que interaccionan con las auxinas, hormonas involucradas en las respuestas al sombreado (Ruegger et al., 1998; Dharmasiri et al., 2005). Evolutivamente, *TIR* y *AFB2* se generaron por una duplicación reciente cuyas isoformas se produjeron por pequeños diferencias en la región C-terminal. Estos cambios permiten reconocer a diferentes miembros de la familia *AUX/IAA* (Xu et al., 2009).

Por otro lado, QTN2 mapeo en el último exón de un gen que codifica para una proteína bHLH (basic Helix-Loop-Helix), llamada *bHLH121* (Figura 9). *QTN2* mapeo asociado al largo del vástago floral principal en el tratamiento sombreado. El SNP de más alta probabilidad de asociación está en la posición 6905773 del cromosoma 3 y tuvo un pvalor significativo de 7.78. Hay numerosas evidencias previas que demuestran un rol importante de otras bHLH en la sombra (Carabelli et al., 1996; Jiao et al. 2007; Lorrain et al., 2008; Leivar et al., 2008; Lorrain et al., 2008). bHLH como *PIF, SPATULA, ALC* han sido ampliamente caracterizados en las respuestas a la luz (revisado por Leiva & Quail; 2010). Los dominios bHLH tiene una secuencia de ~15 aminoácidos básicos involucrada en la unión al DNA y una región de ~60 aminoácidos HLH involucrada en la dimerización (Li et al., 2011). En *A.thaliana* se han identificado más de 133 genes con dominio bHLH pertenecientes a 12 familias de reguladores transcripcionales que pueden actuar como heterodímeros u homodímeros. La *bHLH121* pertenece al subgrupo IVb conformado por tres genes *POPEYE o bHLH047*, *bHLH011* y la *bHLH121* Estos genes se caracterizan por tener un dominio L-ZIP río abajo del dominio bHLH. El dominio L-ZIP le conferiría la capacidad de dimerización (Heim et al., 2003). La función, más recientemente descripta para *bLH121,* es la de su participación en la vía de la regulación de la absorción de potasio por la raíz (Hong et al., 2013). Resulta interesante explorar en el futuro la función de *bHLH121* en la sombra mediante otras

aproximaciones experimentales.

La plasticidad de las respuestas adaptativas en las SAS ha sido extensamente estudiada (Casal & Smith, 1989; Schmitt, 1997; Schmitt et al., 2003). La hipótesis de la plasticidad adaptativa en las SAS predice que los fenotipos de las plantas cultivadas en la sombra tienen un mayor fitness en canopeos densos, pero tienen menor fitness cuando crecen en baja densidad. Por ejemplo, la mayor elongación a baja relación de luz R/RL es una respuesta adaptativa porque se favorece un fenotipo apropiado para la competencia por la luz. Pero, si el alargamiento en respuesta a bajo R/FR no resulta en una mayor intercepción de la luz, las plantas podrían sufrir los costos de la asignación de recursos para la elongación del tallo a expensas de otros órganos. En este estudio, exploramos la plasticidad fenotípica en distintas respuestas vegetativas, florales y reproductivas de un grupo importante de accesiones, pero aparentemente no suficiente para identificar asociaciones significativas en nuestras condiciones experimentales. Conclusiones similares fueron extraídas por Filiault y Maloof (2012) al hacer mapeos de asociación para largo de hipocotilo de plántulas cultivadas en cámaras de crecimiento simulando el sombreado. En ese estudio de GWAS para elongación de hipocotilo se detectaron bajos niveles de asociación. Sin embargo, mediante técnicas de meta análisis complementarias que incluyeron datos de expresión, ontología de genes, y otras anotaciones de categorización se identificaron genes candidatos a priori y de novo que podrían estar asociados con la respuesta a la sombra (Filiault & Maloof, 2012). Por otra parte, es importante destacar, que el componente ambiental (factor E) que determina el fenotipo de los caracteres cuantitativos es más relevante cuando los experimentos se diseñan bajo condiciones semi-naturales o naturales, como en nuestro caso. En el futuro, la arquitectura de los caracteres fenotípicos de sensibilidad a la luz deberían ser examinados identificando los alelos que explican las interacciones de GxE (GenotipoxAmbiente). Estos alelos son los que les confieren a las poblaciones la adaptación a los ambientes cambiantes (Via & Lande, 1985). Identificar las bases genéticas de GxE es importante para los modelos de predicción de la variación fenotípica, diversidad y distribución de las especies y estabilidad de los rendimientos de los cultivos en ambientes cambiantes (Nicotra et al., 2010).

Capítulo III- Un nuevo genotipo de *A.thaliana* en Patagonia, Argentina.

Introducción

A.thaliana es una especie originaria de Eurasia que muestra una estructura poblacional baja en América del Norte como consecuencia probable de flujos génicos recientes asociados a la actividad humana (Platt et al., 2010). La estructura poblacional de las poblaciones europeas es elevada y está definida por efectos del aislamiento geográfico asociados a los eventos glaciares del pleistoceno (Beck et al., 2008; Bomblies et al., 2010; Platt et al., 2010). La variación natural en la vernalización y en las respuestas de escape al sombreado de las accesiones de *A.thaliana* recolectadas en el Hemisferio Norte es enorme (Botto & Smith, 2002; Lempe et al., 2005; Shindo et al., 2005; Filiault & Maloof, 2012). Todos estos estudios sugieren que las poblaciones recolectadas en distintas posiciones geográficas y en diversos ambientes ecológicos han permitido acumular variantes genéticas que tienen polimorfismos beneficiosos para que el fenotipo resultante sea el mejor adaptado a las condiciones ambientales a las que está expuesto a lo largo del tiempo evolutivo (Roff, 1992; Meyers & Bull, 2002; Whitman & Ananthakrishnan, 2009). A pesar de la distribución cosmopolita de esta especie, la presencia de esta especie en el Hemisferio Sur es muy reducida y limitada, se la ha descripto en Argentina y Uruguay (Al-Shehbaz & O´Kane, 2002). En América del Sur, la presencia de *A.thaliana* ha sido reportada en la Patagonia, Argentina por el Prof. de Botánica de la FAUBA Ing Agr. Boelcke (1967). Posteriores visitas de especialistas documentaron la presencia de esta pequeña crucífera en áreas geográficas de Chile y Argentina próximas a la citada con anterioridad según el Catálogo de Plantas Vasculares de la Flora del Cono-Sur del Instituto de Botánica Darwinion-Conicet y el Herbario de la Flora Patagónica del INTA-Castelar (Sanchez, 1986; Gunckel, sin fecha). Hasta la fecha, no hay ningún trabajo enfocado a la recolección y posterior caracterización fisiológica y genética de las poblaciones de Arabidopsis documentadas en América del Sur. Teniendo en cuenta la importancia de esta especie como un sistema modelo para la integración de aproximaciones que van desde la genética, la fisiología, la biología de poblaciones y la evolución, la caracterización genética y fisiológica de las poblaciones patagónicas podrían contribuir al estudio de las bases moleculares y genéticas de la adaptación en esta especie.

En el marco de estos antecedentes, uno de los objetivos de esta tesis fue recolectar, analizar la diversidad genética y caracterizar algunas respuestas fisiológicas de las genotipos de *A.thaliana* que habían sido documentadas previamente en la Patagonia, Argentina.

Resultados

Caracterización ecológica, fisiológica, y genética de poblaciones de *Arabidopsis thaliana* recolectadas en la Patagonia Argentina.

A.thaliana es una especie exótica en el continente americano cuya presencia fue documentada en la zona austral de la Argentina (Boelcke & Romanczuk, 1984). Antes de realizar el viaje de recolección y poder definir la ruta a seguir durante el viaje de campaña, se realizó una búsqueda de información de los ejemplares previamente recolectados en el herbario de Boelcke de la Cátedra de Botánica, FAUBA (1967), y en el herbario de Sánchez del INTA Castelar (1986). Además, se encontró una cita *online* de un grupo inglés que documentaba la presencia de *A.thaliana* creciendo en una Estancia situada a pocos kilómetros de El Calafate (Birks, 2006). El viaje de recolección duró una semana a principios de Enero de 2010 y se recorrió una transecta de 600 km desde El Calafate hasta el lago La Plata que corresponde a la zona occidental de las Provincia de Santa Cruz y el sur de Chubut, Argentina, respectivamente. El método de búsqueda para recolectar plantas de *A.thaliana* consistió en el recorrido de caminos y huellas que nos llevaron a los lugares previamente documentados y otros que durante el viaje de campaña nos parecían ambientes ecológicos potenciales de ser colonizados por esta pequeña crucífera como los mallines (ambientes donde había sido documentada su presencia según la descripción en herbarios). En ciertos lugares y para una observación más detallada, la inspección ocular de los sitios se realizó caminando superficies aproximadas de 1 a 2 hectáreas. Se realizaron aproximadamente de 4 a 5 descensos por día. Los individuos de *A.thaliana* fueron encontrados en cuatro sitios ubicados al norte y sur del Lago Buenos Aires, Provincia de Santa Cruz, Argentina. La presencia de *A.thaliana* en esta zona había sido documentada por Sanchez (1986). El viaje de campaña fue realizado junto a mi director y el Profesor Emérito Rolando JC León, ecólogo especialista de la flora patagónica.

Características ecológicas de los sitios de recolección.

Se identificaron cuatro sitios donde se encontraron plantas verdes o secas de *A.thaliana* que correspondieron a dos pastizales, un matorral y un matorral incendiado. Los pastizales estuvieron situados en el lado sur del Lago Buenos Aires separados por una distancia de 5 km longitud sobre la ladera de la misma montaña (Tabla 1). Las plantas de Arabidopsis recolectadas en estos pastizales estaban secas y protegidas por arbustos o herbáceas. El porte de las plantas en su mayoría secas era muy pequeño y no desarrollaron más de 5/7 hojas sugiriendo que las plantas florecieron rápido y que estaban bajo estrés. Los matorrales situados en el lado Norte del Lago Buenos Aires, se encontraron separados por una huella de camino consolidado (Tabla 1, Figura 1 A). En esta región,

los incendios son frecuentes y actúan como un condicionante fuerte del estado de desarrollo de la comunidad de plantas (Oesterheld et al., 1999). Si bien ambos matorrales lindaban entre sí, la composición vegetal de ambos sitios era muy diferente. El matorral incendiado se encontraba en la zona más elevada y había sufrido un incendio el año anterior (citado por los baqueanos del lugar) presentando un suelo desnudo con colonización de especies herbáceas tempranas. En este sitio encontramos una abundancia alta de plantas de *Arabidopsis thaliana* en distintos estados fenológicos desde el vegetativo hasta el reproductivo (Figura 1 B y 1 D). El matorral no incendiado se encontraba situado en una posición altitudinal más baja lindando con el lago Buenos Aires (Figura 1 C). Este sitio estaba colonizado por una comunidad de plantas arbustivas y herbáceas más madura. Debajo y protegidos, en los márgenes de los arbustos, se encontraron plantas de Arabidopsis secas con unos pocos ejes florales y de porte similar a las recolectadas en los dos pastizales previamente comentados. Se encontraron algunas pocas plantas verdes de mucho menor tamaño que las previamente descriptas para el matorral incendiado.

Sitio	Altitud (msm)	Latitud	Longitud
Pastizal 1	859	46º 51´S	71º 52´ O
Pastizal 2	807	46º 50,62´ S	71º 51,97´ O
Matorral incendiado	530	46º 14,27´ S	71º 38,68´ O
Matorral	520	46º 14,27´ S	71º 38,68´ O

Tabla1. Descripción geográfica de los sitios de recolección de *A.thalina* en Patagonia, Argentina

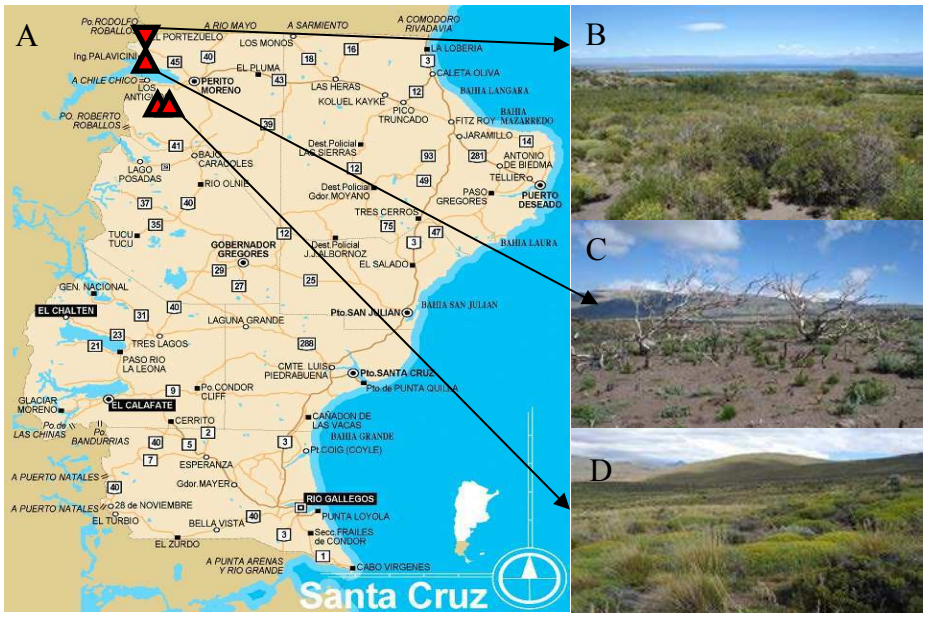


Figura 1.Mapa de la Provincia de Santa Cruz, Argentina (A). Los triángulos rojos indican los sitios de recolección de *A.thaliana* al Norte y Sur del Lago Buenos Aires. Fotos del Matorral (B) y el Matorral incendiado (C) ubicados en el lado Norte del Lago Buenos Aires y de uno de los Pastizal (D) ubicado en el lado Sur del Lago Buenos Aires, Santa Cruz, Argentina.

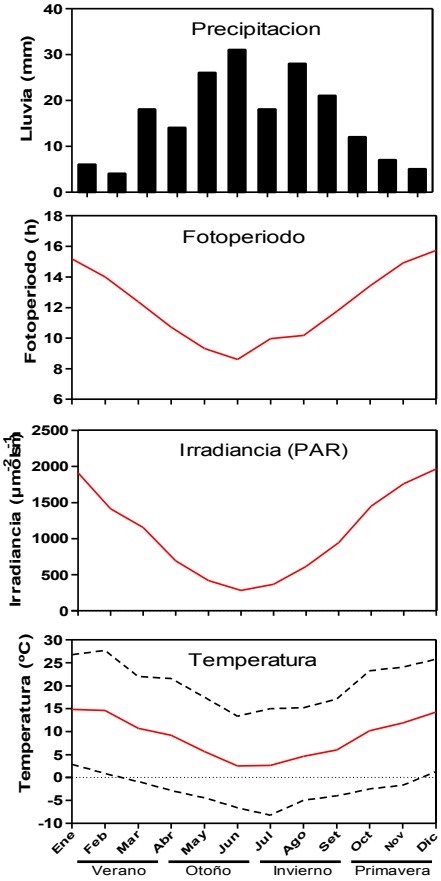


Figura 2. Datos climáticos de la estación meteorológica del INTA Los Antiguos, Provincia de Santa Cruz, Argentina. Datos mensuales de Precipitaciones (A), Fotoperíodo (B), Irradiancia (C), Temperatura (D). Las barras y la línea roja indican promedios mensuales. Las líneas punteadas negras indican máximos y mínimos de temperaturas mensuales.

Los datos climáticos que se recolectaron en la zona de recolección de las plantas de Arabidopsis indican que las temperaturas, y precipitaciones son similares a las que se pueden encontrar en algunas zonas de Europa donde *Arabidopsis thaliana* está ampliamente distribuida. Se recolectaron datos de temperatura, precipitación, fotoperíodo e irradiancia correspondientes a los últimos 10 años de la estación meteorológica de la Estación INTA de los Antiguos, cercana a los sitios de recolección (Figura 2). En la región, las temperaturas promedio mensuales son de 15°C en verano y llegan a valores cercanos de 0°C en los meses de invierno (Figura 2). Las precipitaciones mayores están concentradas en los meses de invierno con 20 a 30 mm mensuales y disminuye entre 5 a 10 mm mensuales para los meses estivales. La irradiancia en los meses estivales es de 1800 $\mu m\text{-}^{2}s^{-1}$ y en los meses invernales disminuye a 500 $\mu m^{-2}s^{-1}$. El fotoperíodo es de 15 hs de luz en verano y disminuye a 9-8 hs de luz en invierno.

Las plantas de *A.thaliana* presentaban una elevada plasticidad fenotípica al comparar las que provenían del matorral incendiado con respecto a los otros tres sitios (Figura 3). Las plantas recolectadas debajo de otras plantas herbáceas o arbustos presentaban un estado fenológico muy avanzado, en su mayoría eran plantas secas con 3 a 4 hojas con un solo eje floral y pocas semillas, mientras que las plantas que crecían en suelo descubierto estaban en un estadio de activo crecimiento vegetativo y en algunos casos la floración ya estaba inducida. Los individuos presentaban numerosas hojas y ejes florales. El peso seco de las plantas recolectadas en el sitio descubierto era hasta 10 veces mayor que las plantas que provenían de los otros tres sitios que presentaban cobertura vegetal (Figura 3).

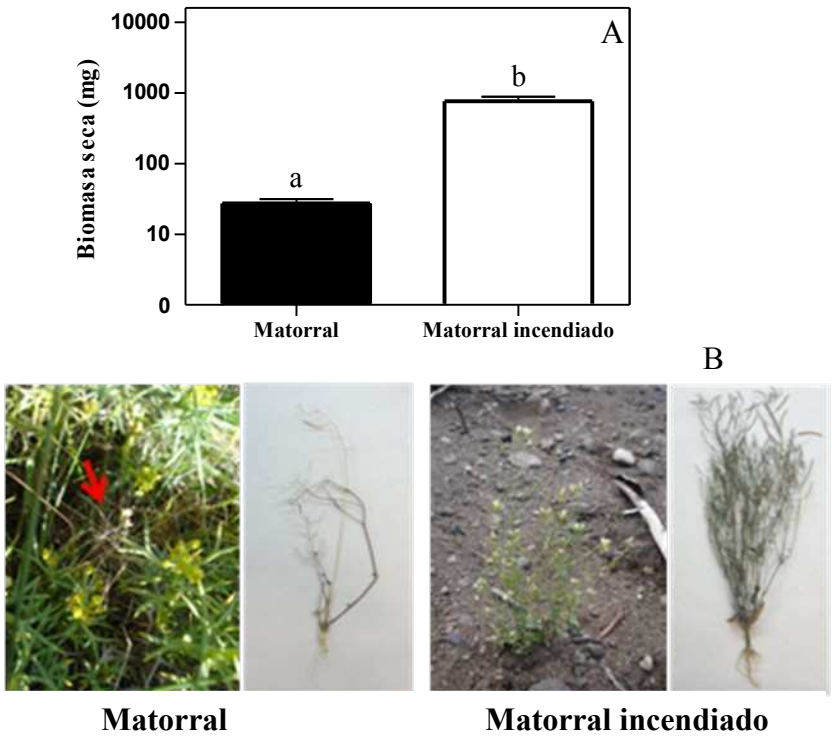


Figura 3. Biomasa de las plantas recolectas en el matorral y matorral incendiado (B). Fotografía de plantas *in situ* y secadas del matorral y matorral incendiado (C). Cada barra representa la medía ± SEM. Las diferencias significativas entre medías se realizaron mediante la prueba de t y se indican con letras ($p< 0.05$).

Como se comentó previamente, los sitios de recolección presentaban distintas niveles de cobertura vegetal. Mientras que los dos pastizales y el matorral no incendiado tenían una cobertura de 80-95%, el matorral incendiado presentaba una cobertura muy baja cercana al 5%. En los pastizales, la altura de la vegetación no superaba el metro de altura mientas que en el matorral no incendiado la altura de la vegetación llegaba a la los 2 metros de altura. En el matorral incendiado, las plantas de

Arabidopsis thaliana crecían en un suelo descubierto, mientras que, en los tres sitios restantes, los individuos recolectados crecían debajo de arbustos, principalmente plantas de Neneo (*Mulinum espinosum*), que generaban un ambiente sombreado protegido con baja radiación. La comunidad de los pastizales presentaban una composición de especies donde se encontraron *Mulinum espinosum*, *Festuca pallences*, *Senecio filaienoides*, *Taraxacum officinale*, *Erodium cicutarium*, *Capsella bursa-pastoris*, *Cerastium arvense*, *Tripticum achilleae*, *Myosotis stricta, Circium sp*, *Loasa* sp, *Nardophillum obtusifolium*, *Rumex acetosella*, *Acaena ovalifolia* y *Trifolium repens*. La comunidad de los matorrales estaba compuesta por especies como *Mulinum espinosum, Schinus polygamus, Berberis heterophylla*, *Colliguaya integerrina*, *Adesmia boronioides*, *Sicymbrium altissimun, Erodium cicutarium*, *Descurania* sp, *Oenothera contorta*, *Solanum* sp, *Acaena ovalifolia, Microsteris gracitis* y *Chenopodium* sp.

La irradiancia y la composición lumínica en los sitios de recolección de las plantas de *A.thaliana* fue muy variable y dependía del grado de cobertura. El matorral incendiado, donde las plantas crecían a cielo abierto, la PAR promedio fue de 1100 µmoles.m^{-2}s^{-1} y la relación R/RL de 1.0, mientras que en los sitios de recolección sombreados la PAR fue cercana a 100 µmoles.m^{-2}s^{-1} variando la proporción de luz R:RL entre 0,70 y 0,50, en el pastizal y en el matorral, respectivamente (Figura 4). Como era de esperar en los sitios sombreados, la cantidad de fotones de luz rojo, azul y rojo lejano fueron bajas, pero proporcionalmente mayor para el rojo lejano comparado a los fotones de rojo (Figura 4).

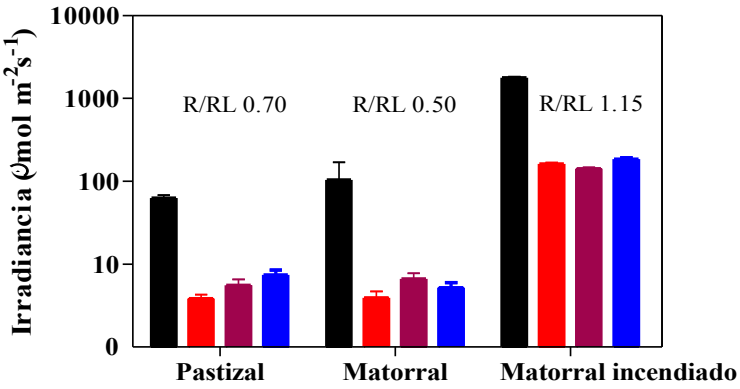


Figura 4. Variación lumínica entre sitios de recolección sensada en el espectro de la luz fotosintéticamente activa, PAR (400-700nm, representadas con barras negras), y en longitudes de onda correspondientes a la luz R (660nm, representadas con barras rojas), RL (730nm, representadas con barras bordó) y A (450nm, representadas con barras azules) (A).

En tres de los cuatro sitios de recolección se tomaron muestras de suelo que fueron analizadas posteriormente en el Laboratorio de Manejo y Conservación de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. El pastizal se caracterizó por tener suelos con altas proporciones de arena y limo, correspondiente a una clase textural franca, con un alto porcentaje de humedad y materia orgánica (Tabla 2). En cambio, los matorrales tuvieron suelos más arenosos de clase textural definidos como franco-areno-gravillosa y areno-franco-gravillosa para el matorral incendiado y no incendiado, respectivamente. El pH del suelo fue neutro en todos los casos.

Sitio	% Humedad	% C t	% M.O.	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)	pH
Pastizal 1	45,9	4,00	6,90	42,50	18,00	39,50	7,0
Matorral incendiado	40,5	2,74	4,72	76,80	7,50	15,70	7,2
Matorral	37,3	2,54	4,38	77,85	5,75	16,40	7,0

Tabla 2. Componentes orgánicos indicados con porcentajes para determinar la textura del suelo y pH del suelo descripto para los sitio de recolección.

La diversidad genética de las poblaciones patagónicas.

Para tener una primera aproximación sobre la diversidad genética de las poblaciones de Arabidopsis recolectadas en la Patagonia, llevamos a cabo un análisis de diversidad genética utilizando un microarreglo compacto de 149 SNPs y el secuenciador de Mass Array. Se recolectaron 90 muestras de ADN de tejido verde de plantas cultivadas en Buenos Aires a partir de semillas cosechadas a campo. Para el procesamiento de las muestras se utilizó el mismo protocolo experimental utilizado por el Dr Justin Borevitz y colaboradores (Platt et al., 2010). La información del análisis de los SNPs de nuestras muestras fueron comparadas con 5600 muestras provenientes de plantas recolectadas en otras partes del mundo. El resultado del estudio de similitud mostró que las poblaciones recolectadas en Patagonia son muy similares entre sí y se diferencian del resto de los genotipos analizados (Figura 5). A pesar de la alta similitud genética entre los genotipos de Patagonia no se pudo determinar el país o la región de donde proviene probablemente por efectos de mezclas alélicas de diversos orígenes. En este análisis de similitud, los genotipos patagónicos se encontraron agrupados muy cerca de accesiones recolectadas en distintos países europeos como

Italia, representada por las accesiones TIV-1, Belmonte y Bolsena, y cercana a otras accesiones checos, franceses (TOU) y norteamericanos (PHW). La más cercana por su índice de similitud es la accesión italiana, TIV-1. Además, dada la alta similitud entre los genotipos de Patagonia (PAT), se tomó un genotipo al azar para realizar la posterior caracterización fisiológica.

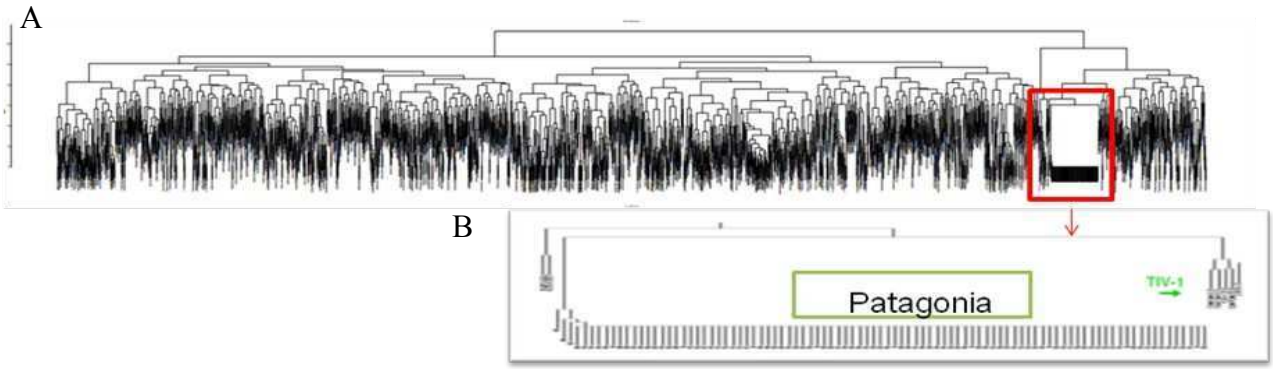


Figura 5. Dendograma de los 90 genotipos de Patagonia junto con otras 5700 accesiones (A). Los genotipos se agruparon por similitud genética. La escala de distancia se indica con una regla a la derecha del gráfico. Detalle de la agrupación de los 90 genotipos de Patagonia indicando el genotipo más cercano TIV-1 (B). El procesamiento de las muestras en el secuenciador MassArray y análisis de similitud se hicieron en el lab de Borevitz (Chicago, EEUU).

Caracterización fisiológica del genotipo Patagonia.

El genotipo Patagonia en la respuesta de de-etiolación en luz roja.

Las semillas fueron sembradas en cajitas plásticas transparentes, incubadas en frío por 5 días y luego expuestas a un pulso de luz para inducir la germinación. A las 24h, una vez que las semillas estaban germinadas en oscuridad, se expusieron las plántulas a distintas intensidades de luz roja. A los 4 días, el largo del hipocotilo fue evaluado. En oscuridad los hipocotilos de las plántulas Col y Patagónicas fue de 10.7 mm y 10.3 mm, respectivamente. Las plántulas de las cuatro poblaciones crecidas a distintas intensidades de luz R fueron hiposensibles con respecto al control Columbia. Es decir, en el rango de intensidades evaluadas, la luz R inhibió menos el hipocotilo de las plántulas Patagónicas con respecto a Columbia. No se observaron diferencias entre sitios (p= 0.06). En el rango de irradiancias 0.6 a 30µmoles.m^{-2}.s^{-1} las plántulas de las líneas patagónicas mostraron hipocotilos de 9.5 mm a 7.35 mm mientras que el hipcotilo de las plántulas de Col fue de 8.84 mm a 4.9 mm, respectivamente. (Figura 6 A). Además, la variabilidad natural en la respuesta al rojo es

significativa entre tres genotipos cercanos genéticamente, TOU recolectada en Francia, PHW recolectada en Estados Unidos y TIV recolectada en Italia (Figura 6 B y C).

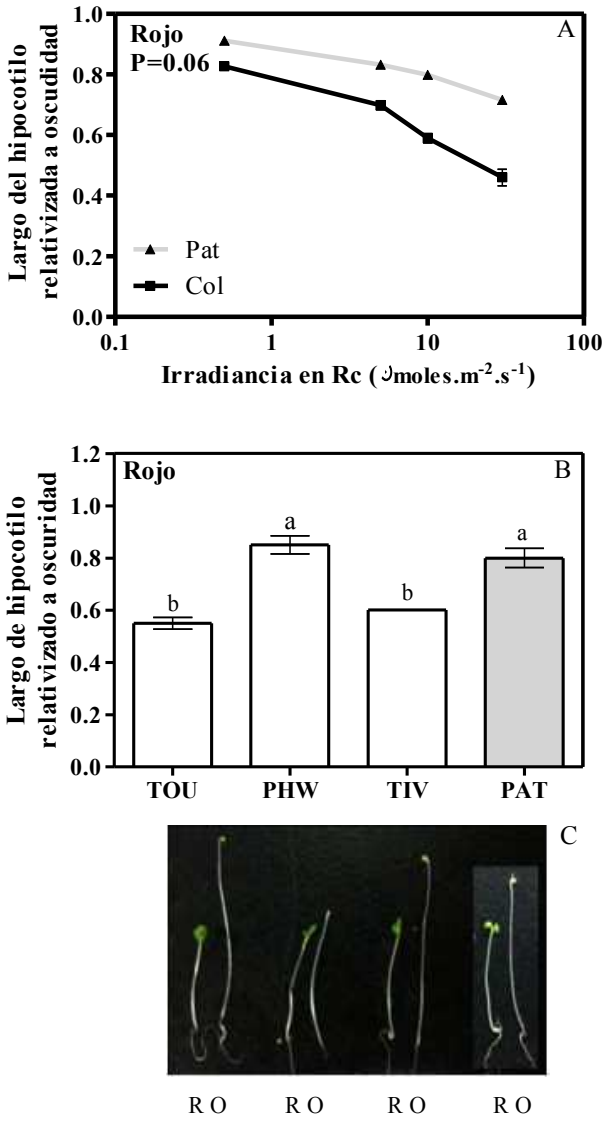


Figura 6. Curva de sensibilidad a la radiación por luz roja continua (A). Comparación de la respuesta al rojo en la máxima intensidad evaluada en la curva de respuesta con genotipos cercanos genéticamente (B). Fotos de las plántulas creciendo en luz roja (R) y en oscuridad (O) (C). Los puntos y triángulos representan la media ± SEM. La comparación de las pendientes se realizó posteriormente aplicación de la transformación logarítmica de los datos mediante un análisis de regresión lineal. La línea gris representa el promedio de las cuatro poblaciones de Patagónicas. Las barras representan la media ± SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de ANOVA con comparación de medias por la prueba de Tuckey y se indican con letras ($p < 0.05$).

El genotipo Patagonia en la respuesta al sombreado.

Respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis son la repuesta de hiponastía (analizada con el ángulo que se forma entre las hojas de la roseta y el suelo), el alargamiento de pecíolos y una acelerada floración (Casal, 2012). Utilizando un protocolo de sombra simulada se evaluó la respuesta de escape al sombreado. Para ello, las plantas fueron crecidas en dos cámaras idénticas de luz fluorescente con una temperatura de 21°C y con fotoperíodo de día corto con 8hs de luz blanca fluorescente y 16 hs de oscuridad (LB). Un día después de la germinación, las plantas fueron expuestas al tratamiento de sombra simulada que consiste en adicionar al fotoperíodo de día corto un pulso de 30 minutos de luz RL al final del día (EOD). A los 15 días se midieron los siguientes caracteres: ángulo de la última hoja totalmente extendida y largo de pecíolo (Figura 7)

En la respuesta de hiponastía, los genotipos PAT y TIV respondieron de igual manera en el tratamiento de LB formando ángulos de 55° promedio entre la hoja y el suelo (Figura 8 A). Mientras que el genotipo Col formó ángulos de 20° promedio, significativamente menores que los ángulos formados en los genotipos PAT y TIV. En el tratamiento EOD, los tres genotipos formaron ángulos similares de 57,7° promedio sin mostrar diferencias en esta respuesta (Figura 8 B).

El largo de pecíolo en el tratamiento de luz blanca fue de de 17,5 mm promedio en el genotipo PAT resultando significativamente mayor que los genotipos Col y TIV cuyos largos promedio fueron de 13,7 mm (Figura 8 D). En el tratamiento de EOD, los genotipos PAT y TIV elongaron sus pecíolos hasta 22,3 mm promedio en respuesta a la sombra simulada, mientras que Col elongó 23,9 mm promedio (Figura 8 E). El genotipo Col respondió al tratamiento de EOD mostrando una elongación significativamente mayor que los genotipos PAT y TIV.

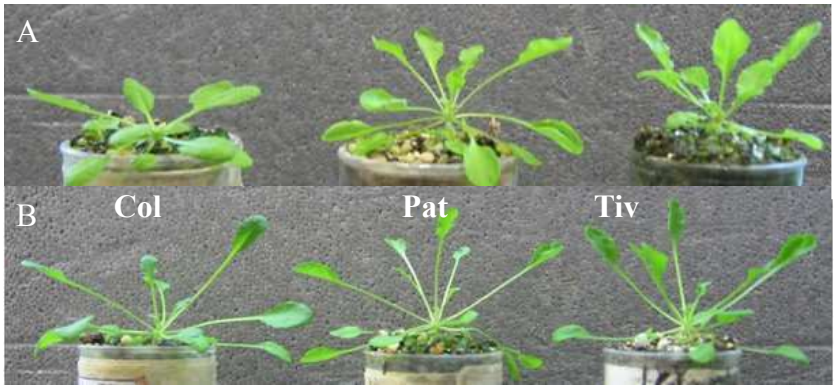


Figura 7. El genotipo Patagonia presenta una baja respuesta hiponástica al tratamiento de sombreado. Fotografía de las rosetas de plantas cultivadas en cámaras de crecimiento a temperatura constante de 21°C con fotoperíodo de día corto (8hs luz blanca fluorescente/16hs oscuridad) con luz blanca fluorescente (A) y con luz blanca fluorescente suplementada con un pulso de 30 min de luz RL al final del día (B) de lo genotipos Col, PAT y TIV.

Para evaluar la respuesta al sombreado, se calculó el EODRATIO como la relación de EOD/LB. El genotipo Patagonia mostró una reducida respuesta al EODRATIO para el ángulo de la hoja (Figuras 8 C) debido a la posición erecta de las hojas en el tratamiento de LB (Figura 8 A y B). Análogamente, PAT mostró una reducida respuesta al EODRATIO para el caracter largo de pecíolo (Figuras 8 F) principalmente debido a un pronunciado alargamiento de los pecíolos en los tratamiento de LB (Figura 8 C y D). También se evaluó la respuesta a floración. El genotipo PAT desarrolló 17,3 hojas promedio en el tratamiento LB y 13,5 hojas promedio en el tratamiento EOD, un número de hojas significativamente mayor que los genotipos Col y TIV (Figura 8 G y H). Consecuentemente, el genotipo Patagonia tuvo EODRATIO cercano a1 indicando una hiporespuesta de floración a la sombra. En oposición, la luz de sombra aceleró la floración en los genotipos Col y TIV que mostraron una marcada respuesta al EODRATIO cercanos a 0,5 (Figura 8 I).

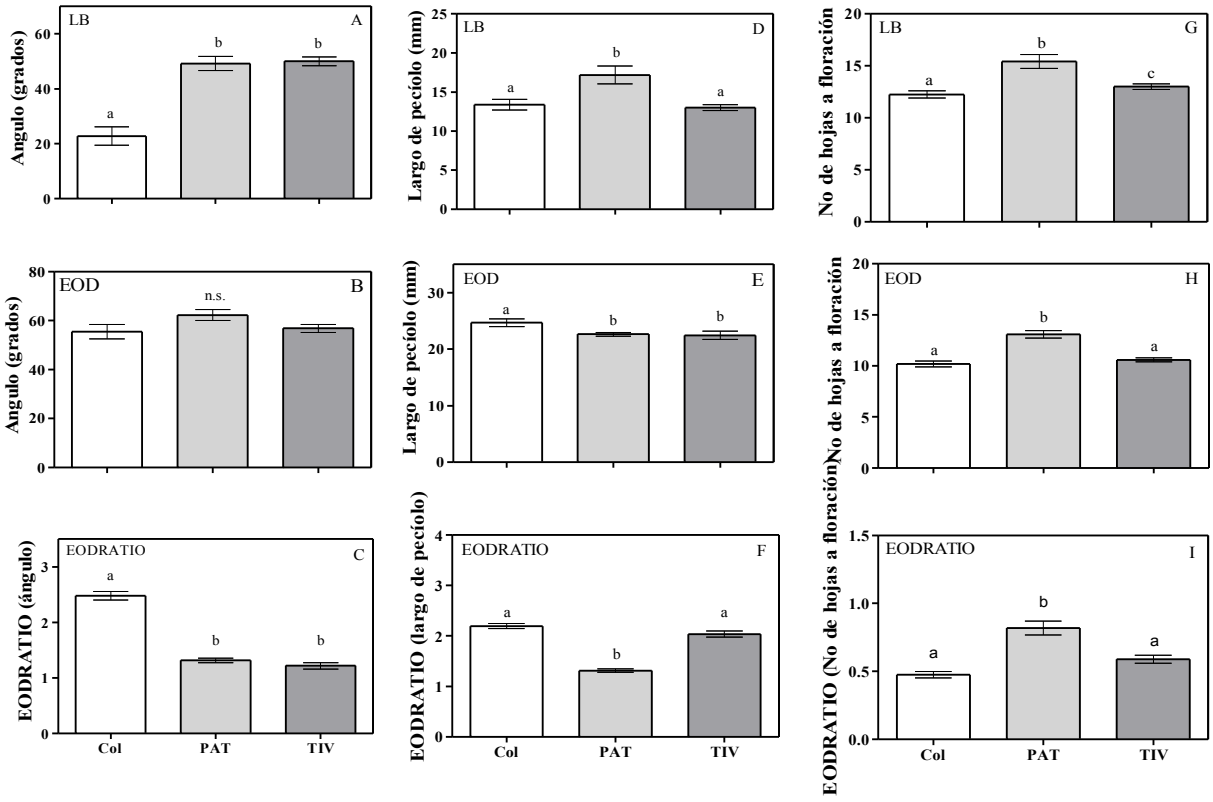


Figura 8. El genotipo Patagonia presenta una respuesta constitutiva a las SAS en caracteres de fase vegetativa. Respuesta hiponástica, largo de pecíolo en el tratamiento de luz blanca y número de hojas a floración (A, D y G), tratamiento de luz blanca más un pulso de luz roja lejano al final del día (B, E y H), y la relación entre los tratamientos, EODRATIO (C, F e I). Cada barra representa la media ± SEM. Las diferencias significativas entre las medias se realizaron mediante la prueba de ANOVA con comparación de medias por la prueba de Tuckey y se indican con letras ($p < 0.05$).

El genotipo Patagonia en respuesta a la vernalización.

Arabidopsis es una planta de día largo facultativa, esto quiere decir que las plantas florecen antes cuando son cultivadas con un fotoperíodo por encima de un valor crítico. Es decir, en general, las plantas de *A.thaliana* aceleran la floración cuando son cultivadas en un fotoperíodo largo de 16hs luz y 8h oscuridad y retrasan la floración cuando son cultivadas en un fotoperíodo corto de 8hs luz y 16h oscuridad. Para evaluar los requerimientos fotoperiódicos de la accesión PAT se diseñó un ensayo exponiendo las plantas de PAT a condiciones de día corto y largo y se evalúo el tiempo a floración en días y hojas comparándolas con el genotipo control Col. Los genotipos PAT y Col mostraron diferencias en el número de hojas a floración de manera dependiente del fotoperíodo (Figura 9 y 10). El genotipo Patagonia florece con un promedio de 110 hojas en día largo y 130

hojas en día corto mientras que Col florece con un promedio de 10 hojas en día largo y 60 hojas en día corto. La aceleración de la floración debida a la señal fotoperíodica produce una reducción en el número de hojas a floración en ambos genotipos, sin embargo, la disminución del número de hojas a floración es menor en el genotipo PAT que en el genotipo Col en respuesta al fotoperíodo (GxP=0,001) (Figura 8).

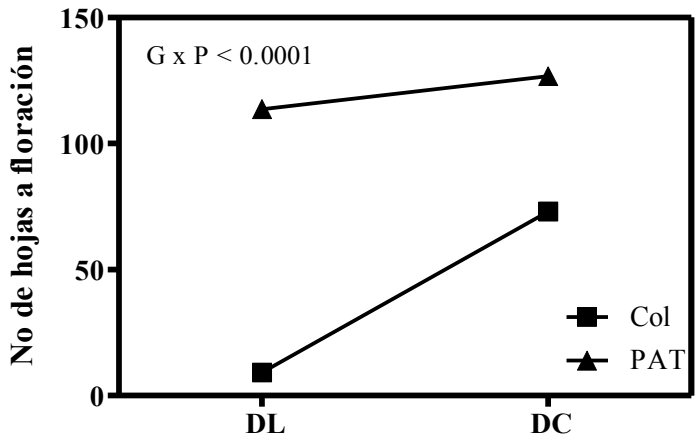


Figura 9. Plasticidad del genotipo Patagonia a cambios en el fotoperíodo. Plantas creciendo en cámaras de cultivo a temperatura constante de 21°C y fotoperíodo de día largo, LD (16hs luz, 8 hs oscuridad) y día corto, SD (8hs luz, 16hs oscuridad) (A). Normas de reacción analizadas por una prueba de ANOVA de dos factores, p de interacción genotipo-ambiente (GxE)<0.001. Los triángulos y cuadrados indican las medias. Los SEM se indican con barras (son despreciables)

Figura 10. Fotografía de plantas creciendo en cámaras de cultivo a temperatura constante de 21°C y fotoperíodo de día largo (16hs de luz/8hs de oscuridad) con luz blanca fluorescente. Comparación de Columbia Col y Pat luego de 30 días del trasplante (A) y un genotipo de Pat a los100 días del trasplante (B).

En *Arabidopsis thaliana*, la floración puede ser promovida si las plantas reciben un tratamiento de bajas temperaturas por un período prolongado. En estos casos, se dice que las plantas requieren vernalización para florecer (Amasino, 2000). numerosas accesiones de *A.thaliana*, tienen requerimientos de vernalización y existe una enorme variación natural presente en esta especie (Lempe et al., 2005, Shindo et al., 2005). Se realizó un experimento para evaluar los requerimientos de vernalización en PAT. Para estudiar esta respuesta, se utilizó un protocolo donde las semillas fueron primero estratificadas a 5°C y oscuridad luego expuestas por 7 días a luz blanca con fotoperíodo de día largo (16hs de luz y 8hs de oscuridad) a 21°C para inducir la germinación y promover la de-etiolación de las plántulas. Posteriormente, las plántulas fueron vernalizadas en luz blanca a 5°C durante 0, 15, 30 y 60 días. Al finalizar el tratamiento de vernalización, las plántulas se trasplantaron en macetas y se cultivaron en fotoperíodo de día largo bajo luz blanca fluorescente a 21°C. Se contó la cantidad de hojas primarias hasta floración. El tratamiento de vernalización no tuvo efectos en la accesión Col como era de esperar porque es un genotipo que no responde a las bajas temperaturas (Figura 11). Col florece con menos de 20 hojas independientemente de que hayan sido expuestas a 5°C durante 0, 15, 30 ó 60 días (Figura 11). Además en este ensayo incluimos a Sf-2, un genotipo que lleva alelos fuertes de *FLC* y *FRI* que le confieren requerimientos de vernalización (Lee & Amasino, 1995). En nuestras condiciones, las plantas Sf-2 florecen un promedio de hojas mayor a 50 hojas sin vernalización y 15 días de exposición a 5°C es suficiente para saturar los requerimientos de vernalización floreciendo con menos de 15 hojas promedio. Las plantas PAT tienen requerimientos de vernalización mayores que Sf-2. Sin vernalización las plantas florecen con alrededor de 100 hojas promedio, y sólo cuando son expuestas a 5°C por al menos 30 días, las plantas florecen con 25 hojas en promedio. El incremento de la vernalización a 60días sólo reduce marginalmente el número de hojas a floración en las plantas de PAT (Figura 11).

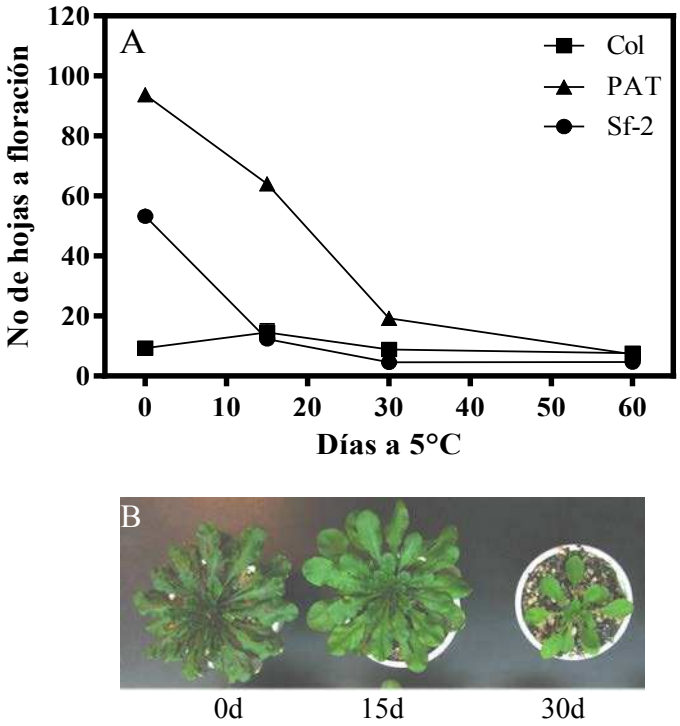


Figura 11. El genotipo Patagonia tiene requerimientos de vernalización. Curva de respuesta a la exposición al frío prolongado (A). Fotografía de plantas creciendo en cámaras de cultivo a temperatura constante de 21°C y fotoperíodo de día largo (16hs de luz/8hs de oscuridad) con luz blanca fluorescente. Fotografía comparando plantas del genotipo Patagonia a los 30 días del trasplante. Tratamiento sin vernalizar (0d), vernalizadas por 15 días (15d) y vernalizadas durante 30días (30d) (B). Los puntos, triángulos y cuadrados indican las medias. Los SEM se indican con barras.

En otro ensayo, cultivamos las plantas de Col, Sf-2 y PAT a distintas temperaturas durante todo el ciclo de vida e idénticas condiciones de luz fluorescente. Las plantas fueron cultivadas en cuatro regímenes térmicos de 10, 15, 20 y 25°C sin el tratamiento de vernalización (Figura 12). El tiempo a floración en Col fue de alrededor 20 hojas a 10°C y se redujo levemente cuando las plantas fueron cultivadas a temperaturas mayores hasta 25°C. Sf-2 floreció con alrededor de 10 hojas a 10°C y tuvo alrededor de 40 hojas a 25°C. Por otra parte, las plantas PAT florecieron con 20 hojas promedio a 10°C y con casi 100 hojas cuando fueron cultivadas a 25°C. Estos resultados demuestran que la temperatura de crecimiento de las plantas afectó la respuesta a floración en los genotipos que tienen requerimientos de vernalización como PAT y Sf-2, pero no en los que no tienen requerimientos de frío como Col. Estos resultados sugieren que la vernalización podría lograrse cuantitativamente en un rango limitado de temperaturas superiores a 5ºC. A medida que las plantas son cultivadas a mayores temperaturas los requerimientos cuantitativos de vernalización no son cubiertos y, por lo tanto, la planta tarda más tiempo en florecer.

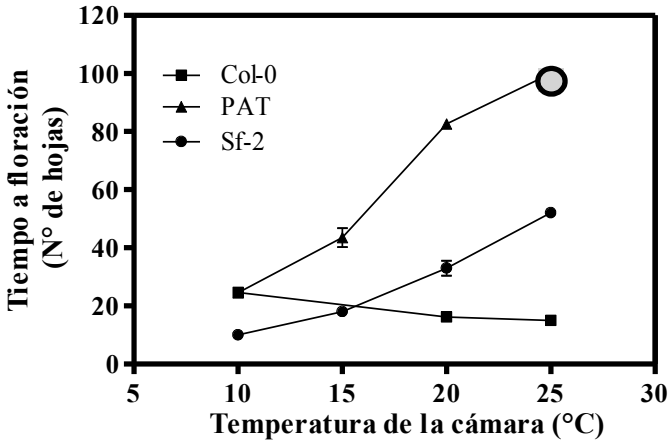


Figura 12. El genotipo Patagonia adelanta su floración de manera dependiente de la temperatura de cultivo. La curva de frío en el tiempo a floración con los genotipos Col, Pat y Sf-2 creciendo en simultáneo en cámaras de cultivo a temperatura constante de 10°C, 15°C, 20°C y 25°C y luz blanca fluorescente continua. Los puntos, triángulos y cuadrados indican las medias. Los SEM se indican con barras. El círculo gris indica que el promedio de hojas con las plantas murieron sin florecer.

FT es un fuerte promotor de la floración e integrador de muchas vías de señalización (Michaels et al., 2005). La vernalización está regulada por el control epigenético de la expresión de *FLC* (Song et al., 2012). Para indagar acerca de la expresión génica de estos dos genes que regulan la floración en *Arabidopsis thaliana,* se midió la expresión génica de *FLC* y *FT* en las accesiones de Col y PAT. En este ensayo, se utilizó el protocolo de vernalización descripto anteriormente. Las semillas fueron primero estratificadas a 5°C y oscuridad luego se colocaron durante 7 días en luz blanca en fotoperíodo de día largo (16hs de luz y 8hs de oscuridad) a 21°C para que las plántulas emergieran y de-etiolarán. Las plántulas de-etioladas fueron vernalizadas en luz blanca a 5°C durante 0 días (no vernalizadas) ó 30 días (vernalizadas). Y finalmente se trasplantaron en macetas y se cultivaron en fotoperíodo de día largo bajo luz blanca fluorescente y a 21°C. Luego de 17 días, se extrajo tejido foliar de hojas adultas, las muestras fueron procesadas y se midió por qRT-PCR la expresión de *FLC* y *FT*. Como esperábamos, en las plantas de Col, la expresión de *FLC* fue despreciable e independiente de la vernalización. Por otra parte, *FLC* se expresó fuertemente en las plantas PAT no vernalizadas y su expresión se redujo significativamente con la vernalización (Figura 13 A). En cambio, la expresión de *FT* fue nula en las plantas PAT sin vernalización y la vernalización, indujo ligeramente su expresión. Además, la expresión de *FT* en Col es significativamente mayor que en PAT en plantas vernalizadas y no vernalizadas (Figura 13 B).

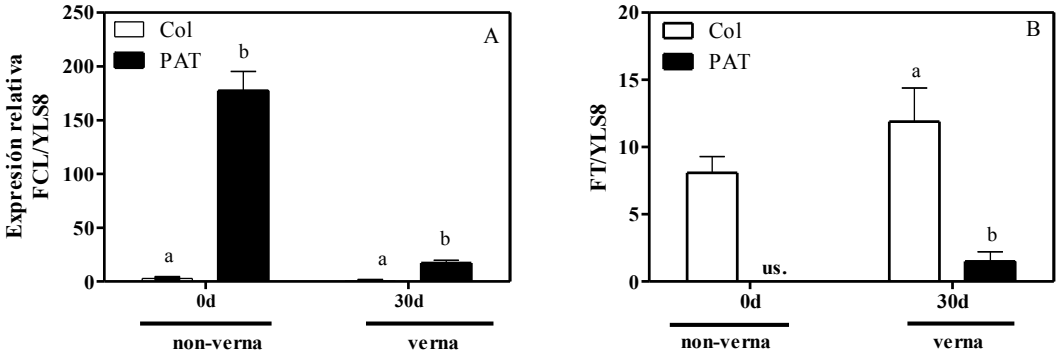


Figura 13. Los requerimientos de vernalización del genotipo Patagonia están moduladas por los niveles de expresión de *FLC.* Los niveles de expresión de *FLC* (A) y *FT* (B) fueron relativizados al control endógeno *YLS8* en plantas vernalizadas (verna) y no vernalizadas (non-verna). Las plántulas vernalizadas recibieron 30 días a 5°C en condiciones no inductivas de día corto y luego trasplantadas y cultivadas por 17 días en condiciones de día largo hasta la cosecha de muestras foliares para realizar los análisis de QRT-PCR. Cada barra representa la medía ± SEM.

Discusión

Este trabajo es el primer estudio que estudia la diversidad genética de los individuos recolectados en la Patagonia y su posterior caracterización fisiológica. La PAT es una genotipo recolectado en la región más austral donde se haya documentado la presencia *Arabidopsis thaliana*. En América del Sur, *A.thaliana* es una especie exótica (Al-Shehbaz & O´Kane, 2002). Las especies exóticas son un componente importante en muchos ecosistemas de América del Sur y en particular de la región Patagónica. La presencia de especies exóticas en la región de la estepa y los pastizales-matorrales patagónicos ha sido baja en dominancia y número a excepción de los lugares donde habita el hombre como son las zonas urbanas, peri domésticas y corredores (Golluscio et al., 1982; Rapoport, 1993). Los cuatro sitios de recolección de PAT estuvieron ubicados en el Distrito Occidental de la región Patagónica que se caracteriza como estepa gramíneo-arbustiva con un clima templado frio semejante a otras regiones europeas donde se encuentra distribuida (León et al., 1998; Alonso Blanco & Koorneef, 2000).

En este trabajo hemos encontrado cuatro poblaciones de *A.thaliana* confinadas a las cercanías del Lago Buenos Aires, en la localidad de Los Antiguos, Provincia de Santa Cruz, Argentina, aunque no se descarta la presencia de otras poblaciones que podrían estar habitando en la Patagonia teniendo en cuenta los registros de herbarios y condiciones climáticas similares a las que se encuentran en los sitios de origen. El fenótipo de los ejemplares recolectados a campo sugieren que el ciclo de vida de las plantas de Arabidopsis que habitan la Patagonia es corto y que las plantas pueden florecer con solo 5-7 hojas dependiendo de las relaciones de competencia a las que se hallen expuestas. El corto ciclo de vida junto con las condiciones climáticas, en particular el fuerte viento, fueron factores que probablemente minimizaron las posibilidades de detección de estas plantas en la Patagonia durante nuestro viaje de recolección.

Si bien análisis de haplotipos indican que la región Caucásica es el lugar ancestral de origen de *A.thaliana* (Beck et al., 2008), existen fuertes evidencias que la diversidad genética y la fuerte estructura geográfica de las poblaciones españolas presentes en los refugios glaciares de la península Ibérica pudieron haber contribuido a la colonización postglaciación en Europa (Picó et al., 2008). Por otra parte, análisis genéticos de accesiones recolectadas fuera de Europa como líneas japonesas y norteamericanas muestran un muy bajo patrón de estructura geográfica sugiriendo una colonización reciente proveniente de diversos orígenes (Todokoro et al., 1995; Jorgensen et al., 2004; Platt et al., 2010). Sin embargo, un estudio genético de ADN nuclear y cloroplástico de poblaciones chinas mostraron una alta diversidad genética y estructura geográfica sugiriendo una

rápida colonización Oeste-Este proveniente de Asia Central (Yin et al., 2010). En esta tesis, utilizamos un microarreglo compacto de 149 SNPs para investigar la diversidad genética de 90 individuos recolectados en la Patagonia para luego comparar las similitudes genéticas contra 5700 individuos recolectados alrededor del mundo y que fueron previamente documentados (Platt et al., 2010). Dos fueron las conclusiones de este análisis a) los 90 individuos PAT tienen una homogeneidad muy elevada entre ellos, todos ellos pertenecen a un mismo haplogrupo y b) el grupo de haplotipos PAT comparten una alta similitud con accesiones italianas representadas por TIV-1, Belmonte y Bolsena y con un poco menos de similitud con genotipos checos, franceses y norteamericanos (Figura 5). Por lo cual, el origen de la *A.thaliana* que habita en la Patagonia no ha podido ser aun definitivamente resuelto y necesita de mayor exploración mediante otras aproximaciones como la secuenciación del genoma completo. Por ejemplo, la secuenciación del genoma completo de 180 líneas suecas permitió identificar regiones polimórficas específicas asociadas a la variación genética de las accesiones que provienen de esa región, como por ejemplo una masiva variación en el número de copias del ADN ribosomal 45S en las líneas que provienen de la región nórdica que muestran adaptaciones locales con una fuerte estructura poblacional con respecto a las líneas del sur de Suecia que según evidencias previas sugieren que pertenecen al mismo grupo genético de accesiones europeas recolectadas al Sur de Suecia (Nordborg et al., 2005). Estos resultados sugieren que la divergencia de los patrones genéticos observados por aislamiento por distancia se deben a cambios de frecuencias alélicas más que a acumulaciones de mutaciones que podrían deberse a una separación genética ancestral con poco flujo génico (Long et al., 2013). En ese sentido, los estudios de secuenciación del genoma completo en las cuatro poblaciones de PAT y de los ejemplares de herbario recolectados en el pasado por Boelcke (1967) podrían ser una herramienta complementaria a los estudios de diversidad genética explorados en esta tesis.

En la Patagonia, las semillas de Arabidopsis germinan luego de los deshielos del invierno, durante la primavera. PAT tiene requerimientos de vernalización para asegurar el éxito reproductivo que son cubiertos en forma cuantitativa (Figura 11). Las condiciones de fotoperíodo afectan sólo marginalmente el tiempo de floración y este efecto es inferior al de la accesión Col, que no tiene requerimientos de vernalización (Figura 9). Esta observación sugiere que los requerimientos de vernalización podrían estar enmascarando los requerimientos fotoperiódicos en PAT. Las plantas de PAT vernalizadas por 30 días redujeron los niveles de expresión de FLC en hasta 8 veces con respecto a plantas del mismo genotipo no vernalizadas (Figura 13). La variación natural en la respuesta el requerimiento de vernalización es muy amplia y se encontró en muchas accesiones de *A.thaliana* (Johansson et al., 2000; Michaels et al., 2003; Werner et al., 2005; Shindo et al., 2005).

FRI y *FLC* son genes maestros que controlan los requerimientos de vernalización en accesiones de floración tardía. Al respecto, se ha observado que la floración se puede acelerar si *FLC* no está activo aunque *FRI* si esté presente (Johansson et al., 2000; Michaels et al., 2003; Werner et al., 2005). La mayoría de los alelos implicados en la variación natural a la vernalización en *A.thaliana* son variantes alélicas raras o únicas cuando se las compara con otras accesiones recolectadas a nivel mundial que no tienen requerimientos de vernalización (revisado por Alonso-Blanco et al., 2009; Salomé et al., 2011). Se identificaron al menos dos mecanismos de regulación de la expresión en cis en la misma región génica de *FLC* que controla la variación natural en la respuesta de vernalización (Sanchez-Bermejo et al., 2012; Coustham et al., 2012). Una deleción puntual en el alelo *FLC* incrementa la sensibilidad a la vernalización de la accesión española Ll-0 (Sánchez-Bermejo et al., 2012). Por otra parte, la combinación de cuatro polimorfismos en cis es responsable del silenciamiento epigenético y cuantitativo de *FLC* en la accesión Lov-1 recolectada en el norte de Suecia (Coustham et al., 2012). El mecanismo de regulación de *FLC* y su asociación con los requerimientos de vernalización de PAT documentados en este capítulo son desconocidos y quedan por ser dilucidados en el futuro.

En sus ambientes naturales en Patagonia, Arabidopsis muestra una plasticidad enorme que podría estar aparentemente asociada a variaciones en la calidad y cantidad de luz, entre otros factores. Las plantas de Patagonia tienen una alta biomasa, numerosas ramificaciones y un ciclo de vida más largo en las zonas abiertas en comparación con los que crecen en lugares sombreados (Figura 3). En condiciones de crecimiento en cámaras, los resultados de los ensayos fisiológicos de de-etiolacion y sombra sugieren que el genotipo Patagonia podría tener alterada la vía de señalización del fitocromo B. Durante la de-etiolación, PAT es hiposensible a la luz R y no muestra diferencias con respecto a Col (Figura 6). Por otra parte, las plántulas PAT expuestas a la luz blanca con fotoperíodo corto que se utiliza como tratamiento control en los ensayos de escape al sombreado muestran hipocotilos más largos que Columbia y una respuesta similar en el tratamiento luz blanca con adición de rojo lejano al final del día que resulta de una respuesta constitutiva a la sombra evaluado como EODRATIO (Figura 7 y 8). Se ha documentado que hay variación natural en Arabidopsis a nivel de los fotorreceptores como *PHYB, PHYC, PHYD* y *CRY2* (Filiault et al., 2008; Aukerman et al., 1997; Balabrusamanian et al., 2006; El-Assal et al., 2001). El gen *PHYD* de la accesión Ws (Wassileskija) que tiene una pequeña deleción de 14 bp en *PHYD*. Este polimorfismo es raro y no se han vuelto a encontrar en más de 1000 accesiones en estudio. El alelo *PHYD*-Ws afecta la sensibilidad a la luz en el crecimiento del hipocotilo y el alargamiento de la hoja (Aukerman et al., 1997, Cao et al., 2011). Filiault y colaboradores (2008) demostraron que el alelo CVI-PHYB es menos sensible que Ler-PHYB alelo en la elongación hipocotilo por luz. Por otro lado, alelo CVI-

CRY2 es más sensible a pulsos de rojo lejano de alelo LER-CRY2 para la apertura de cotiledón durante de-etiolación (Botto et al., 2003). La causa molecular de las respuestas disfuncionales a la luz roja y a la luz de sombra en la accesión Patagonia es un objetivo que debería ser encarado en un futuro trabajo. Una posible hipótesis de trabajo es que la hiposensibilidad a la luz roja en PAT es el resultado de polimorfismos asociados a nivel del fotorreceptor phyB (u otro fitocromo estable involucrado en la respuesta a la sombra como phyD y phyE) o de algún/os componentes moleculares río debajo de la señalización del/los fotorreceptores.

Discusión general.

En este trabajo se pusieron a prueba tres hipótesis asociadas a tres objetivos particulares. Estos objetivos se cumplieron a través del diseño de ensayos específicos utilizando distintas aproximaciones experimentales. El análisis de los resultados obtenidos ha contribuido a mejorar el conocimiento que tenemos acerca de la arquitectura genética de las respuestas asociadas al SAS.

En el Capítulo I se puso a prueba **la hipótesis que la respuesta de elongación del hipocotilo en plántulas de *A.thaliana* en respuesta a las señales de luz rojo lejano al final del día (EOD) está bajo control de un grupo común de loci en tres poblaciones de mapeo que comparten una misma línea parental.**

Para poner a prueba esta hipótesis se mapearon QTL asociados a la respuesta de elongación de hipocotilos en plántulas de *A.thaliana* cultivadas en luz blanca (LB) y EOD. Se utilizaron tres poblaciones de RILs que comparten un mismo genotipo parental, Landsberg erecta, que lleva el alelo *erecta* mutado. Se acepto parcialmente la hipótesis. Si bien se identificaron loci que colocalizan en los mapeos de QTL entre las poblaciones de mapeo, los análisis posteriores mediante aproximaciones experimentales independientes sugieren que son distintos genes candidatos responsables. Por ejemplo, *PHYB* es el gen candidato para un el QTL de EODRATIO mapeado en la población LerxCVI en el brazo superior del cromosoma 2 (*EODRATIO5*), pero no para los QTL EODRATIO que colocalizan en las otras dos poblaciones de mapeo (*EODRATIO1* y *EODRATIO2* para LerxNo-0 y LerxCol, respectivamente). Por otra parte, identificamos tres QTL de EOD que colocalizaron para las tres poblaciones de mapeo sobre el marcador *ERECTA (EOD2, EOD4* y *EOD6* para LerxNo-0, LerxCol y LerxCVI-0, respectivamente). El gen *ERECTA* fue confirmado como el gen responsable de *EOD6*. El gen *ERECTA* participa en la SAS y sus efectos fueron dependientes del fondo genético y del caracter estudiado. Por ejemplo, hay una contribución positiva de los alelos *erecta* en Col y Van-0, pero no en Ler, CVI-0, HIR-1 y WS para la respuesta al EOD (EODRATIO) en la elongación del hipocotilo. También encontramos efectos pleiotrópicos de ERECTA para la respuesta al EOD asociada a la elongación del pecíolo y lámina, hiponastía y tiempo a floración. Durante el desarrollo de mi Tesis, se publicó un trabajo en donde se demuestra que *ERECTA* regula la hiponastía y el crecimiento celular en forma dependiente de la temperatura, es decir alelos *ERECTA* en fondo Ler restituyen la respuesta a la sombra en plantas cultivadas a 16°C por lo que se ha sugerido que participa en la aclimatación a bajas temperaturas y la luz de sombra (Patel et al., 2013). También se ha documentado que *ERECTA* promueve la hiponastía inducidas por el etileno (van Zanten et al., 2010) y se ha sugerido que hormonas como las citoquininas y las auxinas también podrían regular el crecimiento celular a través de la acción de

este gen. La mutación *erecta* reduce el alargamiento de diversos órganos de la planta: láminas foliares, pecíolos, vástago, entrenudos, sépalos, pétalos, estambres, pistilos y silicuas (Torii et al., 1996, 2003). *ERECTA* está involucrado en el desarrollo de los estomas (Shpak et al., 2005) y en las respuestas a los agentes patógenos. Por ejemplo, se ha observado que las accesiones que llevan los alelos *ERECTA* salvaje son más susceptibles a la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Godiard et al., 2003), el hongo necrotrófico *Plectosphaerella cucumerina* (Llorente et al., 2005; Sánchez-Rodríguez et al., 2009), y el patógeno omicete *Pythium irregulare* (Adie et al., 2007). Todas estas evidencias indican que *ERECTA* actúa como un loci central y mayor en la arquitectura genética de una diversidad amplia de caracteres del crecimiento y desarrollo como de la respuesta a los agentes bióticos y abióticos.

En el Capítulo II se puso a prueba **la hipótesis que los loci identificados mediante GWAS para caracteres vegetativos, florales y reproductivos asociadas al SAS tienen efectos pleiotrópicos en la expresión de otros caracteres.**

Esta hipótesis no pudo ser confirmada. Los mapeos de GWAS de 11 caracteres estimados en plantas cultivadas en condiciones semi-naturales de invernáculo bajo filtros verdes y neutros permitieron identificar solo dos QTN (*QTN1* y *QTN2*). El número bajo de SNP asociados a las respuestas analizadas probablemente este fundada en razones diversas como puede ser la propia naturaleza de la arquitectura genética de los caracteres estudiados, el número reducido de accesiones analizadas y/o por efectos de estructura poblacional. En los GWAS analizados se encontró un SNP asociado con largo de lámina (QTN1) en la condición de luz control y otro SNP asociado con largo del vástago floral (QTN2) en la condición de luz de sombra. Genes candidatos para QTN1 y QTN2 son un gen que codifica para una F-box y el gen *bHLH121,* respectivamente. Si bien, la asociación de la *bHLH121* presentó efectos de estructura poblacional que pueden dar lugar a falsos positivos, las evidencias en la literatura acerca de la función de los factores de transcripción del tipo bHLH en la sombra es abundante (revisado por Leivar & Quail, 2011). Resulta interesante en futuros trabajos investigar en posible rol de este gen en las respuestas al sombreado y la variación genética natural. También es conveniente complementar los GWAS con otras aproximaciones experimentales como son los mapeos de QTLs y eQTL con el objetivo de confirmar los resultados de los mapeos de asociación (Korte & Farlow, 2013). Por ejemplo, genes de tiempo a floración como *FT*, *FRI* y *FCL* fueron asociados a la respuesta de floración tanto en los mapeos de asociación como en los mapeos de poblaciones de RILs (Brachi et al., 2010; Li et al., 2010). Si bien *ERECTA* y *PHYB* son genes que frecuentemente son mapeados en un grupo diversos de caracteres en respuesta a la luz durante la de-etiolación (Borevitz et al., 2002; Botto et al., 2003; Magliano et al., 2005) y en las SAS (Botto & Coluccio, 2007; Filiault et al., 2008; Filiault & Maloof, 2012), en nuestro estudio de GWAS no

pudieron ser detectados.

En el Capítulo III, se puso a prueba **la hipótesis que las poblaciones de *Arabidopsis thaliana* que provienen de la Patagonia expresan diferencias fisiológicas y genéticas respecto de las poblaciones ancestrales originarias de Europa**. Para ello, se realizó un viaje a campo para la recolección de material genético. Se identificaron 4 poblaciones y se recolectaron semillas provenientes de 90 individuos. Se estudiaron diversas respuestas fisiológicas como la de-etiolación, respuestas asociadas al SAS y la floración en respuesta al fotoperíodo y a la vernalización. Las respuestas analizadas se contrastaron con la respuesta del genotipo de referencia Columbia, encontrándose que la accesión Patagonia es hiposensible a la luz roja y a la SAS (hiponastía, largo de pecíolo y tiempo a floración). El genotipo Patagonia (PAT) tiene requerimientos de vernalización y los patrones de expresión de *FLC* en PAT se correlacionan con la respuesta observada. Los estudios de diversidad genética utilizando un microarreglo compacto de 149 SNP en comparación con más de 5600 poblaciones recolectadas alrededor del mundo sugieren que los genotipos recolectados en Patagonia son similares entre ellos y cercanos a genotipos europeos que probablemente provienen de Italia (Tivoli, el más cercano). Estos resultados sugieren que PAT pudo haber llegado al continente Sudamericano a través de las corrientes migratorias que colonizaron la zona oeste de la Patagonia durante el SXX con epicentro en Los Antiguos y Lago Buenos Aires, Santa Cruz, Argentina. Las condiciones climáticas de la Patagonia donde fueron recolectadas las poblaciones de Arabidopsis probablemente son similares a las que hay en su zona de origen lo que pudo haber favorecido su establecimiento en el Sur de la Argentina. Finalmente, esta tesis ha contribuido a la incorporación de un nuevo genotipo de *A.thaliana* al germoplasma de esta especie que puede ser de interés para estudios futuros.

Materiales y Métodos

Referentes al Capítulo 1-Mapeo de QTLs.

Material genético.

Las accesiones de Arabidopsis se obtuvieron del Centro de Arabidopsis Biological Resource (ABRC, la Universidad Estatal de Ohio, EEUU). Las poblaciones de líneas endogámicas recombinantes (RILs) derivadas de cruces entre Ler y No-0 (Magliano et al., 2005), Ler y Col (Lister & Dean, 1993), y Ler y CVI-0 (Alonso Blanco et al., 1998) también se obtuvieron de la ABRC. En este trabajo se utilizaron las líneas isogénicas cercanas (NIL) polimórficas para ERECTA entre Ler y CVI-0 genotipos (Keurentjes et al., 2007); líneas transgénicas de PHYB portadoras 35S::PHYB-CVI y 35S::alelos PHYB-Ler en el fondo genético *phyB-9* mutante Col (Filiault et al., 2008.); la línea transgénicas de *ERECTA*-Col en el fondo genético Landsberg erecta (Ler), Vancouver-0 (Van-0) y Hiroshima (Hir-1) (van Zanten et al., 2009), y ER-104 (Torii et al., 1996) y ER-2 (CS3401), mutantes erecta en los fondos genéticos Ws y Col, respectivamente.

Condiciones experimentales

El material genético se reprodujo en condiciones de fotoperíodo de día largo de 16hs luz/8hs oscuridad a 23°C. Se recolectaron las semillas y se mantuvieron en seco y en oscuridad. Para los experimentos, quince semillas de cada genotipo fueron sembradas en agar al 0,8% dentro de cajas de plástico transparente y se incubaron en la oscuridad a 5ºC durante cuatro días. Luego, las cajas con las semillas se transfirieron a 22°C y se irradió con una luz roja (R) durante 3 hs para promover una germinación homogénea. Y después de una incubación de 24 hs en la oscuridad, las plántulas fueron expuestas a tratamientos de LB y EOD. El tratamiento de LB consistió en colocar las cajas con semillas en una cámara de luz blanca con fotoperíodo de día corto (8 hs de luz blanca fluorescente y 16 hs oscuridad) a 22ºC (LB, 85µmol m^{-2} s^{-1} de lo contrario se indica en el texto). El tratamiento de EOD consistió en colocar las cajas con 15 semillas por genotipo en una cámara de luz blanca con fotoperíodo de día corto (8 hs de luz blanca fluorescente y 16 hs oscuridad) a 22ºC y se adicionó un pulso de 30 min de luz roja lejana al final del día (RL, 40 µmol$m^{-2}s^{-1}$). La luz RL fue proporcionada por lámparas incandescentes en combinación con un filtro de RG9 (Schott, Alemania). Al 4to día, se midieron los diez hipocotilos más altos de 15 plántulas inicialmente sembradas en para cada genotipo utilizando como media final al menos tres repeticiones. Cada caja

fue una réplica. Para todas las mediciones de luz realizadas a lo largo de este trabajo con un espectrofotómetro (SpectroSense2 / 2 + Skye Instrumento Ltd, Reino Unido).

Para los caracteres vegetativos y el caracter de floración, se realizó el mismo protocolo experimental como se indicó anteriormente. Luego, las plántulas fueron de-etiladas en una cámara con fotoperíodo de días corto (8hs de luz/16hs de oscuridad) durante 5 días posteriores a la germinación, y finalmente fueron trasplantadas en una mezcla de musgo de turba:vermiculita:perlita (1:3:3 ratio) contenida en macetas de plástico en el invernáculo. Las macetas se transfirieron y se distribuyeron aleatoriamente en una cámara bajo condiciones de día corto (8hs luz y 16 hs oscuridad) a 22ºC. El tratamiento de la luz se hizo con las lámparas de mercurio (60 mol µmol m^{-2} s^{-1}). Al final del fotoperíodo, la mitad de las macetas recibieron un pulso de 30 min de la luz RL (RL=45 µmol m^{-2} s^{-1}, proveniente de lámparas incandescentes en combinación con un filtro de RG9 (Schott, Alemania). A las seis semanas, se midió la longitud del pecíolo y lámina, y el ángulo de la hoja en la hoja más joven completamente expandida utilizando una regla. El ángulo de la hoja, que se define como el ángulo entre el pecíolo y una línea perpendicular a la superficie del suelo, se midió a las 4hs de iniciado el fotoperiodo con un transportador. El tiempo a floración fue evaluado como el número de hojas primarias de la roseta y fueron contabilizadas marcando cada hoja con un marcador visible a tiempo prolongado para evitar errores de conteo. El tiempo a floración se estimó cuando el vástago principal alcanzó 2cm de alto momento en el cual es inconfundible la formación de la inflorescencia (Lempe et al., 2005).

Recolección de datos y análisis estadístico

Se calculó un índice de respuesta de sombra como la relación de EOD / LB. siguiendo protocolos similares utilizados antes (Botto & Smith, 2002). En pocas palabras, hemos estimado EODRATIO como el cociente normalizado a la media de la longitud del hipocotilo en LB. Un criterio similar se utilizó para calcular pecíolo y la longitud de la lámina, y el ángulo de la hoja. Debido a que el tiempo de floración es acelerada por el tratamiento del EOD, se estimó la respuesta EOD para la floración como LB/EOD para mantener el índice de respuesta de sombra entre un rango de valores similares de los otros rasgos (Botto & Smith, 2002). Las diferencias medias entre tratamientos se analizaron mediante el test t de Student. Los análisis se realizaron con GraphPad Prism, versión 5.01 (GraphPad Sofware, Inc, La Jolla, CA, EE.UU.).

Análisis de la cartografía de QTL

Los 46, 66 y 99 marcadores obtenido de las poblaciones de RILs LerxNo-0 (Magliano et al., 2005), LerxCol (Lister & Dean, 1993), y LerxCVI (Alonso-Blanco et al., 1998) se utilizaron para el análisis de QTL, respectivamente. MAPMAKER/EXP 3.0 se utilizó para construir el mapa de ligamiento (Lander et al., 1987). Los grupos de ligamiento fueron verificados con un nivel de detalle mínimo = 2.5 y una distancia máxima de 50 cm (función Kosambi). Tanto los datos de ligamiento del mapa como los datos fenotípicos de las RIL, fueron importados a QTL Cartógrafo versión 2.0 obtenida a partir de http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm (Wang et al., 2004). Para el análisis de QTL, se incluyeron 94 líneas para la población RIL de LerxNo-0, 85 líneas para la población RILs LerxCol y 127 líneas para la población de RIL de LerxCVI. Se corrieron los datos con los valores absolutos de LB, EOD y EODRATIO. La probabilidad, ubicación del efecto aditivo y el porcentaje de varianza explicada de cada QTL se calcularon utilizando el modelo 6 de mapeo basado en el método de intervalos compuestos (CIM) (Zeng, 1994). Los cofactores de los QTL fueron seleccionados inicialmente por el uso de regresión múltiple por pasos adelante-atrás. El mapeo se llevó a cabo con una velocidad de caminado de 0,5 cM y un tamaño de ventana de 3 cM. Para la determinación precisa de QTL significativo, los umbrales de LOD para cada grupo de ligamiento se calcularon mediante un método de prueba de permutación (Doerge & Churchill, 1996) con 1.000 permutaciones en el nivel de significación de permutación ($p<0.05$). El intervalo de apoyo de cada QTL se construyó utilizando la regla 2-LOD con los intervalos de confianza se definen por todos aquellos valores que caen dentro del valor máximo de 2-LOD (Lynch & Walsh, 1998).

Ensayos de confirmación QTL

Para reducir el intervalo de QTL de *EODRATIO1* en LerxNo-0 RIL población, se generaron líneas endogámicas heterogéneas (HIF) utilizando la ventaja de que algunas RILs tienen regiones limitadas que siguen segregando individualmente (Tuinstra et al., 1997). Por técnicas de PCR, a partir de los individuos F7 de RIL152 que era heterocigotas para el marcador PLS5, se seleccionó en la descendencia la HIF152 polimórfica en PSL5 marcador y con alelos homogéneos en el resto del genoma. Además, se seleccionaron HIF recombinante (rHIF) por PCR sucesivas utilizando 7 marcadores polimórficos (InDels) en el intervalo entre los marcadores CIW3 y NGA1126 (Salathia et al., 2007). Y se incluyeron dos marcadores polimórficos en dos posiciones de PHYB (sitios 3 y 12, Filiault et al., 2008). Para el análisis de complementación cuantitativa de PHYB, se cruzaron las líneas parentales No-0, Col, CVI-0 y Ler con PHYB + (alelo no mutado) o *phyB* mutante en el

fondo genético Ler (phyB-1) o Col (SALK_069700) (Mackay, 2001). La complementación cuantitativa con la mutación *phyB*, el fenotipo de los individuos F1 se analizaron en un ANOVA de dos factores con el genotipo Tester (factor de genotipo) y la mutación *phyB* (factor de phyB).

Referentes al Capítulo II-Mapeos de asociación del genoma completo.

Material genético

Semillas de 217 accesiones de *Arabidopsis thaliana* del pool de 360 del Dr. Justin Borevitz detalladas al final de esta sección y obtenidas del TAIR (www.arabidopsis.org) (Tabla 1) fueron utilizadas para los mapeos genéticos.

Condiciones experimentales

Quince semillas de 217 accesiones fueron sembradas en cajitas de Petri de plástico transparente que contenían una superficie de 4mm de alto de agar-agua al 0,8%. Las cajas sembradas en condiciones de esterilidad fueron estratificadas durante 4 días a 5ºC en oscuridad y luego colocadas en cámaras de crecimiento con luz blanca provista por tubos fluorescentes (80µmol m^{-2} s^{-1}) en fotoperíodo día corto (8hs luz/16hs oscuridad) a una temperatura constante de 22ºC durante una semana para promover la germinación y de-etiolación de las plántulas. Posteriormente fueron vernalizadas manteniéndolas a 5ºC en iguales condiciones de luz y fotoperíodo. Las plántulas que germinaron y de-etiolaron fueron trasplantadas en 1600 macetas con mezcla de turba:perlita:vermiculita en proporción 1:3:3 en un invernáculo del IFEVA-CONICET durante la primavera de 2011 (del 16 de Septiembre al 31 de Diciembre de 2011) con orientación este-oeste. En total se trasplantaron 2 plántulas de cada genotipo por maceta. Se utilizaron 4 réplicas/genotipo en cada tratamiento. Cuando las plantas desarrollaban el primer par de hojas verdaderas fueron raleadas dejando un genotipo por maceta siendo esta la unidad experimental. El riego se realizó una vez por semana durante todo el ensayo con el fertilizante *Hakaphos*® NPK(S) 18-18-18 con micronutrientes. El diseño experimental consistió en 4 réplicas iguales por genotipo y por tratamiento (LB y sombreado) Los tratamientos control se realizaron colocando las plantas bajo filtros neutros que consistieron en un filtro difusor (N°216, La Casa del Acetato) que no modificaban la calidad espectral, pero reducían la PAR (tratamiento control, PAR = 136,73 µmol$m^{-2}s^{-1}$; y R/RL=1.05). Los tratamientos sombreado se simularon con filtros verdes (N°089, La Casa del Acetato) que modificó la calidad de luz enriqueciéndola en luz roja lejano (tratamiento sombreado, PAR = 213,63 µmol$m^{-2}s^{-1}$; y R/RL=0.26). La temperatura del invernáculo osciló entre los 16°C de min durante la noche y

30°C de max durante el día en los días de máxima demanda atmosférica. La temperatura promedio durante el experimento fue 25°C.

Recolección de datos

La recolección de los datos se realizó en tres etapas. A los 15 días posteriores al trasplante se midieron los caracteres de la fase vegetativa (largo de pecíolo, largo de lámina y ancho de lámina). Luego que las plantas florecieron, se secaron y se cortaron las cinco silicuas más grandes a la altura media del vástago principal floral, se cosecharon las semillas y se midieron los caracteres florales de largo de vástago, largo y ancho del 5to entrenudo y se contó el número de ramificaciones. Para la determinación del peso seco, se cortó la biomasa aérea al ras del suelo sin la raíz y se la colocó en una bolsa de papel madera para dejarla secando en la estufas 70°C durante una semana y luego se evaluó el peso seco con una balanza de precisión. Para las mediciones de los caracteres reproductivos, se midió el largo de cinco silicuas, se contaron las semillas contenidas en las cinco silicuas y se separaron 100 semillas de las recolectadas por cada planta para pesarlas. Para las mediciones de estos 11 caracteres se utilizó una regla con una precisión de 0.5 mm para medir el largo de pecíolo, largo de lámina, ancho de lámina largo del 5to entrenudo, largo de vástago y largo de silicua. Un calibre para medir el ancho del 5to entrenudo con una precisión de 0.01mm. Y para las mediciones de peso seco aéreo y de peso de 100 semillas se utilizó una balanza analítica con una precisión de 0.0005 gr. Se analizaron los datos como medias independientes con un número mínimo de réplicas por tratamiento/genotipo. Las plantas sobrevivientes fueron cerca de la mitad de las plantas trasplantadas debido a que las condiciones del invernáculo no fueron favorables para el establecimiento de las plántulas y muchas de ellas murieron.

Mapeo de asociación del genoma completo

Los mapeos de asociación fueron realizados con el programa Gwapp (Huang et al., 2011, Seren et al., 2011). Se utilizó el modelo mixto EMMAX (Efficient *Mixed-Model* Association eXpedited) porque tiene en cuenta la matriz de parentesco para controlar los efectos de poblacional y está modificado para aumentar la velocidad en la que se obtiene un resultado *online* (Seren et al., 2012). Los logaritmos de los p valores del análisis del EMMAX se graficaron en función de la posición física de cada SNP en un gráfico de dispersión llamado Manhatan plot. El nivel de significancia lo calcula el programa con el FDR (False Discovery Rate) al 5%, es decir con una probabilidad de 0.05 de falsa asociación. Los SNPs que superan el umbral del FDR se consideran asociados a la respuesta fenotípica y fueron indicados como *QTN* (*Quantitative Trait Nucleotide*) y numerados en

forma arbitraria. El umbral toma un valor de -logaritmo de pvalor de 6.3 (p valor =10 e-6.3) (Seren et al., 2012).

Referentes al Capítulo III- Genotipo Patagonia.

Las condiciones experimentales y mediciones de caracteres del genotipo Patagonia.

Las semillas recolectadas de los genotipos de Patagonia fueron reproducidas en el laboratorio. Para ello se sembraron las semillas en 0.8% agar dispuesto homogeneamente en cajas de plástico transparentes. Las semillas se colocaron en oscuridad a 5ºC y luego transferidas a cámaras con fotoperíodo de día largo (16hs de luz/ 8 hs de oscuridad) a 23°C. Después de la emergencia y de-etiolación de las plántulas se las trasplantó a macetas en una mezcla de turba:vermiculita:perlita en una proporción 1:3:3 y se fertilizaron con Hakaphos® NPK(S) 18-18-18. Las semillas reproducidas fueron cosechadas, rotuladas y mantenidas en seco y en oscuridad.

Genotipado, diversidad genética y análisis de similitud.

Para el genotipado se utilizaron 100mg de tejido de hoja de roseta adulta. Cada hoja se maceró vertiendo nitrógeno liquido sobre el tejido hoja de roseta colocado en un tubo eppendorf de 1,5. El pulverizado se resuspendió con 750 µl de buffer CTAB (2X), 2% de CTAB, 100 mM de tris base pH 8,0, 10 mM de EDTA, 0,7 M de NAC1 y 30 µl de 2Bβ mercaptoetanol llevando a volumen final de 500 ml con H2Omq agitando suavemente. Se incubó por 30 min a 65°C. Luego se agregaron 300 µl de cloroformo, mezclando por inversión. Se centrifugó 5 min a 10.000 g y se separó la fase superior (fase acuosa) colocándola en un tubo con 500 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugo 15 min a 10.000g. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN dos veces con 500 µl de Etanol:Agua al 70%. Luego se secó el ADN a 50°C por 30 min y se resuspendió con 50 µl de H2Omq autoclavada. Todas las muestras de ADN se normalizaron a 10 ng/ul, y luego genotipo utilizando el sistema de Sequenom MassArray (compacto) (San Diego, CA). El procesamiento de las muestras de ADN con el microarreglo de 149 SNP se hizo en el laboratorio de Justin Borevitz (Chicago University, USA). Las agrupaciones fueron analizados utilizando cada planta como único haplogrupo único y se definieron mediante un algoritmo de clustering QT-modificado (Platt et al., 2010). El análisis de similitud se hizo entre los 90 genotipos patagónicos contra un total de 5.707 líneas analizadas previamente (Platt et al., 2010).

Tratamiento de sombra simulada por adición de un pulso de RL al final del día (EOD).

Para los experimentos de sombra simulada, se sembraron quince semillas de cada genotipo en 0.8% de agar en cajas de plástico transparentes. Las semillas se colocaron inmediatamente en oscuridad a 5ºC y se incubaron allí durante 4 días. Las cajas con las semillas se irradiaron con una luz roja (R) durante 3hs a 22°C para promover una germinación homogénea. Después de una incubación de 24hs en la oscuridad, las plántulas fueron expuestas a tratamientos LB y EOD. El tratamiento de LB consistió en colocar las cajas con semillas en una cámara de luz blanca con fotoperíodo de día corto (8 hs de luz blanca fluorescente y 16 hs oscuridad) a 22ºC. El tratamiento de EOD consistió en colocar las cajas con semillas en una cámara de luz blanca con fotoperíodo de día corto (8 hs de luz blanca fluorescente y 16 hs oscuridad) a 22ºC y se adicionó un pulso de 30 min de luz roja lejana al final del día (PAR, 80 μmol m^{-2} s^{-1}; RL, 40 μmol m^{-2} s^{-1}). Para cada tratamiento se utilizaron dos cámaras idénticas Cámara de crecimiento Percival). Todas las mediciones de luz se realizaron con un espectrofotómetro (SpectroSense2 / 2 + Skye Instrumento Ltd, Reino Unido).

Las medición de las variables medidas bajo este tratamiento se describen a continuación:

*Medición de hipocotilos se realizó como el protocolo descripto en el mapeo de poblaciones de RILs

*Medición de los caracteres de roseta: Plántulas de-etioladas en el tratamiento de LB fueron trasplantadas a maceta conteniendo una mezcla de turba:vermiculita:perlita en una proporción 1:3:3. Las macetas se transfirieron y distribuyeron aleatoriamente en cada una de las cámara de LB o EOD. El largo del pecíolo, el largo de lámina y el ancho de lámina se midieron con una regla con una precisión de 0.5 mm y se promediaron los valores de al menos 10 plantas. El ángulo de la hoja, se definió como el ángulo entre el pecíolo y la normal y se midió con un transportador. Para evitar efectos rítmicos de las hojas, todas las mediciones se realizaron a las 4hs de iniciado el fotoperíodo. En todos los casos, todos estos parámetros se midieron en la última hoja totalmente expandida de la roseta que correspondió a la hoja número entre 13 a 16 de plantas no florecidas.

*Medición del número de hojas a floración: Las hojas primarias de la roseta fueron contabilizadas marcando cada hoja con un marcador visible a tiempo prolongado. El número de hojas paró de contarse cuando el vástago principal alcanzó 2cm de alto momento en el cual es inconfundible la formación de la inflorescencia (Lempe et al., 2005).

Medición de la expresión de genes

Hojas de tres plantas independientes de 17 días de edad se recolectaron para formar una réplica. Un total de las tres réplicas biológicas fueron utilizadas. ARN total fue extraído con un kit de extracción de RNA (Plan ARN NucleoSpin ®) y se sometió a un tratamiento de DNasa con RQ1 RNasa libre de DNasa (Promega). ADNc derivado de este RNA se sintetizó usando M-MLV transcriptasa inversa (Promega) y un cebador oligo (dT). Dos repeticiones técnica de los ADNc sintetizados fueron amplificados con FastStart universal SYBR Green Maestro (Roche) usando el sistema en tiempo real de PCR 7500 (Applied Biosystems) ciclador. Los primers de FT-primer fueron diseñados a partir de secuencias de lectura corta comparando las regiones codificantes idénticas entre Colombia y la Patagonia. Yellow 8 (YSL 8) gen se usó como el control de normalización (Hong et al., 2010).

Bibliografía

Adams S, Allen T, Whitelam G. (2009) Interaction between the light quality and flowering time pathways in Arabidopsis. The Plant Journal 60(2): 257-267.

Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, Godoy M, Sánchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R. (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. Plant Cell 19, 1665–1681.

Ahmad M, Jarillo JA, Cashmore AR. (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. Plant Cell 10: 197-208.

Alonso-Blanco C, Aarts MG, Bentsink L, Keurentjes JJ, Reymond M, et al. (2009) What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? Plant Cell 21: 1877–1896.

Alonso-Blanco C, Blankestijn-de-Vries H, Hanhart CJ, Koornneef M. (1999) Natural allelic variation at seed size loci in relation to other life history traits of Arabidopsis thaliana. PNAS USA 96:4710–4717.

Alonso-Blanco C, Koornneef M. (2000) Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. Trends Plant Sci. 5: 22–29.

Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Koornneef M, Lister C, Dean C, van der Bosch N, Pot J, Kuiper MTR. (1998) Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. Plant Journal 14: 259-271.

Amasino R. (2004) Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. Plant Cell, 16: 2553–2559.

Andel F, Lagarias JC, Mathies RA. (1996) Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. Biochemistry 35: 15997-16008.

Ang LH, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A, Deng XW. (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. Mol. Cell 1: 213-222.

Anwer MU & Davis SJ. (2013) Seminars in Cell & Developmental Biology 24: 422– 429.

Asimit J & Zeggini E. (2010) Rare Variant Association Analysis Methods for Complex Traits. Annual Review of Genetics 44: 293-308.

Atwell S, Huang YS, Vilhjalmsson BJ, Willems G, Horton M, et al. (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in Arabidopsis thaliana inbred lines. Nature 465: 627–631.

Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA. (1997) A deletion in the PHYD gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. Plant Cell 9: 1317–1326.

Balasubramanian S, Sureshkumar S, Agrawal M, Michael T, Wessinger C, et al. (2006) The PHYTOCHROME C photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of Arabidopsis thaliana. Nat Genet 38: 711–715.

Ballaré CL (1999). Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. Trends Plant Sci, 4:97-102.

Baxter I, Brazelton JN, Yu D, Huang YS, Lahner B, Yakubova E, Li Y, Bergelson J, Borevitz JO, and Nordborg M, et al.(2010) A coastal cline in sodium accumulation in Arabidopsis thaliana is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1;1. PLoS Genet. 6, e1001193.

Beck JB, Schmuths H, Schaal BA. (2008) Native range genetic variation in Arabidopsis thaliana is strongly geographically structured and reflects Pleistocene glacial dynamics Mol. Ecology 17:902-915.

Birks J (2006) Grupo Erskine expedition to Central Patagonia. List of species seen and localities visited. November-December 2006. Published online.

Boelcke O & Romanczuk M. (1984) Cruciferae, en M. Correa (ed.). Flora Patagónica. Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 8(4):508-526.

Bomblies K, Yant L, Laitinen RA, Kim S-T, Hollister JD, et al. (2010) Local-Scale Patterns of Genetic Variability, Outcrossing, and Spatial Structure in Natural Stands of Arabidopsis thaliana. PLoS Genet 6(3): e1000890.

Borevitz JO, Maloof J, Lutes J, Dabi T, Redfern JL, Trainer GT, Werner JD, Asami T, Berry CC, Weigel D, Chory J. (2002) Quantitative trait loci controlling light and hormone response in two accessions of Arabidopsis thaliana. Genetics, 160:683–696.

Botto JF & Coluccio MP. (2007) Seasonal and plant-density dependency for quantitative trait loci affecting flowering time in multiple populations of Arabidopsis thaliana. Plant, Cell & Enviroment 30:1465-1479.

Botto JF & Smith H. (2002) Differential genetic variation in adaptative strategies to a common environmental signal in Arabidopsis accessions: phytochrome-mediated shade avoidance. Plant, Cell and Environment 25:53-63.

Botto JF, Alonso-Blanco C, Garzaron I, Sanchez RA, Casal JJ. (2003) The Cape Verde Islands allele of cryptochrome 2 enhances cotyledon unfolding in the absence of blue light in Arabidopsis. Plant Physiology 133:1547–1556.

Bou-Torrent J, Galstyan A, Gallemí M, Cifuentes-Esquivel N, Molina-Contreras MJ, Salla-Martret M, Jikumaru Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Martínez-García JF. (2014) Plant proximity perception dynamically modulates hormone levels and sensitivity in Arabidopsis J. Exp. Bot. First published online. doi: 10.1093/jxb/eru083

Brachi B, Faure N, Horton M, Flahauw E, Vazquez A, et al. (2010) Linkage and Association Mapping of Arabidopsis thaliana Flowering Time in Nature. PLoS Genet 6(5): e1000940.

Bradshaw, A. D., 1972, Some of the evolutionary consequences of being a plant. Evol. Biol. 5:244.
Breitling R, Jansen RC. (2009) System-wide molecular evidence for phenotypic buffering in Arabidopsis. Nature Genetics 41:166-167.
Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ (1993) DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. PNAS USA, 90: 287–291.
Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Günther T, Bender S, et al. (2011) Whole-genome sequencing of multiple Arabidopsis thaliana populations. Nature Genetics 43: 956–963.

Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I. (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. PNAS USA, 93:3530-5.

Carabelli M, Sessa G, Baima S, Morelli G, Ruberti I. (1993). The Arabidopsis Athb-2 and -4 genes are strongly induced by far-redrich light. Plant J. 4: 469-479.

Casal JJ. (2012) Shade avoidance. The Arabidopsis Book 10:11-19 e0157.

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y-J (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. Science 284:760B765.

Castle L & Meinke D (1994) A FUSCA gene of Arabidopsis encodes a novel protein essential for plant development. Cell 6:25-41.

Chan EKF, Rowe HC, Corwin JA, Joseph B, Kliebenstein DJ (2011) Combining Genome-Wide Association Mapping and Transcriptional Networks to Identify Novel Genes Controlling Glucosinolates in Arabidopsis thaliana. PLoS Biol 9(8): e1001125.

Chao D-Y, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, et al. (2012) Genome-Wide Association Studies Identify Heavy Metal ATPase3 as the Primary Determinant of Natural Variation in Leaf Cadmium in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet 8(9):e1002923.

Choi J, Hyun Y, Kang MJ et al. (2009) Resetting and regulation of flowering locus C expression during Arabidopsis reproductive development. Plant J. 57: 918–931.

Choi K, Kim J, Hwang HJ, Kim S, Park C, Kim SY, et al. (2011) The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in Arabidopsis, by recruiting chromatin modification factors. Plant Cell, 23:289–303.

Chory J (1992) A genetic model for light-regulated seedling development in Arabidopsis. Development 115:337–354.

Chory J, Peto C, Feinbaum R., Pratt L, Ausubel, F. (1989). Arabidopsis thaliana mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. Cell 58, 991-9.

Clack T, Mathews S, Sharrock RA. (1994) The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. Plant Mol Biol. 25:413–427.

Clark RM, Shweikert G, Toomanjian C, Ossowski S, et al. (2007) Common sequence polymorfisms shaping genetic diversity in Arabidopsis thaliana. Science 317:338-342.

Clough RC & Vierstra RD. Phytochrome degradation (1997) Plant Cell Environ. 20:713–721.

Coluccio MP, Sanchez SE, Kasulin L, Yanovsky MJ, Botto FJ. (2011) Genetic mapping of natural variation in a shade avoidance response: ELF3 is the candidate gene for a QTL in hypocotyl growth regulation. Journal of Experimental Botany 62(1):167-176.

Coustham V, Li P, Strange A, Lister C, Song J, et al. (2012) Quantitative modulation of polycomb silencing underlies natural variation in vernalization. Science 337: 584–587.

Crocco CD, Holm M, Yanovsky MJ, Botto JF. (2010) AtBBX21 and COP1 genetically interact in

the regulation of shade avoidance. Plant Journal 64(4):551–562.

Crocco CD, Holm M, Yanovsky MJ, Botto JF. (2011) Function of B-BOX proteins under shade. Plant Signaling Behavior 6:101–104.

Deng XW, Quail PH (1999) Signalling in lightBcontrolled development. Semin Cell Dev Biol 10: 121-129

Deng, X. W., Caspar, T. & Quail, P.H. (1991). cop1: a regulatory locus involved inlight-controlled development and gene expression in Arabidopsis. Genes & Dev. 5:1172-82.

Devlin PF, Yanovsky MJ, Kay SA (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. Plant Physiol. 133, 1617 - 1629.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435: 441-445.

Dieterle M et al. (2001) EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. Genes & Dev. 15: 939-944.

Djakovic-Petrovic T, de Wit M, Voesenek LACJ, Pierik R. (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. Plant Journal 51:117–126.

Doerge RW & Churchill GA. (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. Genetics 142:285–294.

Duek PD, Fankhauser C. (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. Trends Plant Sci 2005:10:51–54.

El-Assal S, Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Raz V, Koornneef M. (2001) A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2. Nat Genet. 29(4):435–440.

Falconer DS & Mackay TFC. (1996) Introduction to quantitative genetics. Pearson Prentice Hall. Fourth edition.

Filiault DL & Maloof JN. (2012) A genome-wide association study identifies variants underlying the Arabidopsis thaliana shade avoidance response. PLoS Genetics 8: e1002589.

Filiault DL, Wessinger CA, Dinneny JR, Lutes J, Borevitz JO, Weigel D, Chory J, Maloof JN. (2008) Amino acid polymorphisms in Arabidopsis phytochrome B cause differential responses to light. PNAS 105(8):3157-3162.

Francois O, Ancelet S and Guillot G. (2006) Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. Genetics 174: 805–816.

Frankhauser C & Chory J. (1997). Light control of plant development Annual Review of Cell and Developmental Biology, 13:203-229

Franklin KA & Quail PH (2010) Phytochrome functions in Arabidopsis development. J. Exp. Bot. 61 (1): 11-24.

Franklin KA & Whitelam GC. (2005) Phytochromes and shade avoidance responses in plants. Ann.

Bot. (Lond.) 96: 169–175.

Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. Nature 415: 806-809.

Fu J, Keurentjes JJB, Bouwmeester H, America T, Verstappen FWA, Ward JL, Beale MH, de Vos RCH, Dijkstra M, Scheltema RA, Johannes F, Koornneef M, Vreugdenhil D, Rainer

Gangappa SN, Crocco CD, Johansson H, Datta S, Hettiarachchi C, Holm M, Botto JF. (2013) The Arabidopsis B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis. The Plant Cell 25: 1243–1257.

Geraldo N, Baurle I, Kidou S, Hu X, Dean C. (2009) FRIGIDA delays flowering in Arabidopsis via a cotranscriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear cap-binding complex. Plant Physiol. 150(3):1611-1618.

Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y. (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. Plant Journal 36:353-65.

Golluscio RA, León RJC, Perelman SB. (1982) Caracterización fitosociológica de la estepa del oeste del Chubut: Su relación con el gradiente ambiental. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica (21) 299-324.

Gómez A & Lunt D (2006) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula, pp. 155–188 in Phylogeography of Southern European Refugia, editedby S. Weiss and N. Ferrand. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Goosey L, Palecanda L, Sharrock RA. (1997) Differential patterns of expression of the Arabidopsis PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. Plant Physiol.115:959–969.

Hall MC, Dworkin I, Ungerer MC, Purugganan M. (2007) Genetics of microenvironmental canalization in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 104:13717–13722.

Hao Y, Oh E, Choi G, Liang Z, Wang ZY (2012) Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. Mol Plant 5: 688 – 697.

Heijde, M., and Ulm, R. (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. Trends Plant Sci. 17: 230–237

Hennig L, Büche C, Eichenberg K, Schäfer E. (1999). Dynamic properties of endogenous phytochrome A in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol. 121:571-7.

Hoffmann MH. (2002) Biogeography of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (Brassicaceae). J Biogeogr 29: 125–134.

Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW. (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1Bmediated control of light dependent gene expression in Arabidopsis. Genes Dev, 16: 1247–1259.

Holmes MG & Smith H. (1977). The function of phytochrome in the natural environment. 2. The

influence of vegetation canopies on spectral energy distribution of natural daylight. Photochem. Photobiol. 25 : 539–545.

Hong JP, Takeshi Y, Kondou Y, Schachtman DP, Matsui M, Shin R. (2013) Identification and characterization of transcription factors regulating Arabidopsis HAK5.Plant Cell Physiol 54 (9): 1478-1490

Hong SM, Bahn SC, Lyu A, Jung HS, Ahn JH. (2010) Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 51: 1694–1706.

Horton MW, Hancock AM, Huang YS, Toomajian C, Atwell S, Auton A, Muliyati NW, Platt A, Sperone FG, Vilhjalmsson BJ, et al. (2012) Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide Arabidopsis thaliana accessions from the RegMap panel. Nat Genet, 44(2):212

Huang YS, Horton MW, Vilhjálmsson BJ, Seren Ü, Meng D, Meyer C, Ali Amer M, Borevitz JO, Bergelson J, Nordborg M. (2011) Analysis and visualization of Arabidopsis thaliana GWAS using Web 2.0 technologies. Database (Oxford) 2011: bar014.

Jarosz DF & Linquist S. (2010) Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. Science 330:1820-1824.

Jiao Y, Lau OS, Deng XW((2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. Nat Rev Genet, 8:217-230.

Jiménez-Gómez JM, Wallace AD, Maloof JN. (2010) Network Analysis Identifies ELF3 as a QTL for the Shade Avoidance Response in Arabidopsis. PLoS Genetics 6: e1001100.

Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. Science 290: 344-347.

Jorgensen S & Mauricio R (2004) Neutral genetic variation among wild North American populations of the weedy plant Arabidopsis thaliana is not geographically structured. Mol Ecol 13:3403–3413.

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C. (2010) Light-regulated plant growth and development. Curr. Top. Dev. Biol. 91: 29–66.

Kang HM et al. (2010) Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. Nature Genetics 42: 348–354.

Kepinski S & Leyser O (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435: 446-451.

Keurentjes JJB, Fu J, Terpstra IR, Garcia JM, van den Ackerveken G, Snoek LB, Peeters AJ, Vreugdenhil D, Koornneef M, and Jansen RC. (2007) Regulatory network construction in Arabidopsis by using genome-wide gene expression quantitative trait loci. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 104:1708–1713.

Kim DH, Doyle MR, Sung S, Amasino RM (2009) Vernalization winter and the timing of flowering in plants. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 25, 277–299.

Kim W-Y, Fujiwara S, Suh S-S, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE. (2007) ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. Nature 449:356-360.

Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D. (2004) Naturally occurring genetic variation in Arabidopsis thalianaAnnu Rev Plant Biol. 55:141-152.

Koornneef M, Rolff E, Spruit CJP. (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana. Z. Pflanzenphysiol. 100:147–160.

Korte A & Farlow A. (2013) The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. Plant Methods 9:29

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174–181.

Lasky JR, Des Marais DL, McKay JK, Richards JH, Juenger TE, Keitt TH (2012) Characterizing genomic variation of Arabidopsis thaliana: the roles of geography and climate . Molecular Ecology 22:5512 -552.

Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng XW. (2007). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. Plant Cell 19: 731-749.

Leivar P & Quail PH. (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. Trends in Plant Science 16(1):19-28.

Leivar P, Monte E, Al-Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR, Quail PH (2008). The Arabidopsis Phytochrome-Interacting Factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. The Plant Cell 20:337-352.

Lempe J, Balasubramanian S, Sureshkumar S, Singh A, Schmid M, et al. (2005) Diversity of flowering responses in wild Arabidopsis thaliana strains. PLoS Genet 1: e6.

León R JC, Bran D, Collantes M, Paruelo J, Soriano A (1998). Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extraandina. Ecología Austral 8(2); 125-144.

Li J, Li G, Wang H, Deng XW. (2011) Phytochrome Signaling Mechanisms. The Arabidopsis Book, Number 9.

Li Y, Huang Y, Bergelson J, Nordborg M, Borevitz JO. (2010) Association mapping of local climate-sensitive quantitative trait loci in Arabidopsis thaliana. PNAS 107(49): 21199-21204.

Lin C., Yang H., Guo H., Mocker T., Chen J., and Cashmore A.R. (1998) Enhancement of blue light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7686–7699.

Lippert C et al. (2011) FaST linear mixed models for genome-wide association studies. Nature Methods 8: 833–835.

Lister C. & Dean C. (1993) Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in Arabidopsis thaliana. Plant Journal 4:745–750.

Llorente F, Alonso-Blanco C, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L, Molina A. (2005) ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus Plectosphaerella cucumerina. Plant Journal 43:165-80.

Lorrain S, Allen T, Duek PD, Whitelam GC, Fankhauser C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. Plant Journal 53:312–323.

Loudet O, Michael TP, Burger BT, Le Metté C, Mockler TC, Weigel D, Chory J. (2008) A zinc knuckle protein that negatively controls morning-specific growth in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 105:17193–17198.

Lynch M & Walsh J. (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Mackay TFC. (2001) Quantitative trait loci in Drosophila. Nature Review Genetics 2:11-20.

MaglianoTM, Botto JF, Godoy AV, Symonds VV, Lloyd AM, et al. (2005) New Arabidopsis recombinant inbred lines (Landsberg erecta×Nossen) reveal natural variation in phytochrome-mediated responses. Plant Physiology 138:1126–1135.

Maloof JN, Borevitz JO, Babi T, Lutes J, Nehring RB et al. (2001) Natural variation in light sensitivity of Arabidopsis. Nat Genet 29:441–446.

Mancinelli AL (1994) The physiology of phytochrome action. En: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) Photomorphogenesis in plants, 2 edn, pp 211B269. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Marme D, Marshal B, Schafer E (1971). A detailed analysis of phytochrome decay and dark reversion in mustard cotyledons. Planta, 100:331B336.

Meiklejohn CD & Hartl DL. (2002) A single mode of canalization. Trends in Ecology & Evolution. 17:468–473.

Meyers LA & Bull JJ. (2002) Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. Trends in Ecology & Evolution, 17(12): 551-557.

Michaels SD & Amasino RM (2000). Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. Plant Cell Environ. 23, 1145–1153.

Michaels SD & Amasino RM. (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS omain protein that acts as a repressor of flowering. Plant Cell, 11: 949–956.

Michaels SD & Amasino RM. (2000) Memories of winter: vernalization and the competence to flower. Plant, cell & environment 23:1145–1153.

Michaels SD, Himelblau E, Kim SY, Schomburg FM, Amasino RM. (2005) Integration of flowering signals in winter-annual Arabidopsis. Plant Physiol. 137: 149–156.

Mitchell-Olds T & Schmitt J. (2006) Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in Arabidopsis. Nature 441:947-952.

Morelli G & Ruberti I. (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. Plant Physiol 122, 621-626.

Nagel DH & Kay SA. (2012) Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. Current Biology 22:648-657.

Nagy F, Kircher S, Schafer E. (2001). Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. J Cell Sci. 114, 475-80.

Nicotra A, Atkin O, Bonser S, Davidson A, Finnegan E, et al. (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. Trends Plant Sci. 15: 684-88.

Nordborg M, Hu TT, Ishino Y, Jhaveri J, Toomajian C, et al. (2005) The pattern of polymorphism in Arabidopsis thaliana PLoS Biology 3(7): e196.

Oesterheld M, Loreti J, Semmartin M, Paruelo JM. (1999) Grazing, fire, and climate effects on primary productivity of grasslands and savannas. En Walker L. (ed.) 'Ecosystems of disturbed grounds'. Series Ecosystems of the World. Vol 16: 287-306.

Osterlund MT & Deng XW (1998) Multiple photoreceptors mediate the light induced reduction of GUSBCOP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei. Plant Journal 16:201-208.

Osterlund MT, Hardtke CH, Deng XW. (2000) Targeted destabilization of HY5 during light regulated development of Arabidopsis. Nature 405:462B466.

Pacín M, Legris M, Casal JJ. (2013) COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. The Plant Journal, 75:631–641.

Patel D, Basu M, Hayes S, Majláth I, Hetherington FM, et al. (2013) Temperature-dependent shade avoidance involves the receptor-like kinase ERECTA. Plant J. 73(6):980-92.

Pérez-Pérez JM, Serrano-Cartagena J, Micol JL (2002). Genetic analysis of natural variations in the architecture of Arabidopsis thaliana vegetative leaves. Genetics 162: 893–915

Picó FX, Mendez-Vigo B, Martinez-Zapater JM, Alonso-Blanco C (2008) Natural genetic variation of Arabidopsis thaliana is geographically structured in the Iberian Peninsula. Genetics 180:1009–1021.

Pigliucci M & Kolodynska A. (2002) Phenotypic Plasticity and Integration in Response to Flooded Conditions in Natural Accessions of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh (Brassicaceae). Annals of Botany 90(2): 199-207.

Platt A, Horton M, Huang YS, Li Y, Anastasio AE, et al. (2010) The Scale of Population Structure in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet 6(2): e1000843.

Quail PH (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. Annu. Rev. Genet. 25:389B409.

Quail PH (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. Nat Rev Mol Cell Biol. 3:85–93.

Quail PH. (1997). The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? BioEssays 19: 571-579.

Quail, P. H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y. & Wagner, D. (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. Science 268, 675-80.

Rapoport EH. (1993) The process of plant colonization in small settlements and large cities. Capítulo 16 en: McDonnell MJ & Pickett STA (editors). Humans as Components of Ecosystems. Springer-Verlag, New York: 190-207.

Reymond MC, Brunoud G, Chauvet A, Martínez-Garcia JF, Martin-Magniette ML, Monéger F, et al. (2012) A light-regulated genetic module was recruited to carpel development in Arabidopsis following a structural change to SPATULA. Plant Cell, 24: 2812- 25.

Risk J, Laurie RE, Macknight RC, Day CL. (2010) FRIGIDA and related proteins have a conserved central domain and family specific N-and C-terminal regions that are functionally important. Plan Mol Biol 73:493-505.

Roff DA (1992) The evolution of life histories. Chapman and Hall, New York.

Roig-Villanova I, Bou J, Sorin C, Devlin PF, Martinez-García JF. (2006). Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in arabidopsis. Plant Physiol. 141: 85-96.

Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, Carretero-Paulet L, Portolés S, Rodriguez Concepción M, Martínez García JF. (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. The EMBO Journal 26(22): 4756-67.

Rosas U, Cibrian-Jaramillo A, Ristova D, Banta JA, Gifford ML, et al. (2013) Integration of responses within and across Arabidopsis natural accessions uncovers loci controlling root systems architecture. PNAS 110(37): 15133-15138.

RueggerM, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. Genes Dev 12:198-207.

Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, Deng XW (2003) The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. Genes Dev. 17:2642–2647.

Salathia N, Lee HN, Sangster TA, Morneau K, Landry CR, Schellenberg K, Behere AS, Gunderson KL, Cavalieri D, Jander G, Queitsch C. (2007) Indel arrays: An affordable alternative for genotyping. Plant Journal 51: 727-737.

Sánchez-Bermejo E, Méndez-Vigo B, Picó FX, Martínez-Zapater JM, Alonso-Blanco C. (2012) Novel natural alleles at FLC and LVR loci account for enhanced vernalization responses in Arabidopsis thaliana. Plant, Cell & Environment 35: 1672–1684.

Sánchez-Rodríguez C, Estévez JM, Llorente F, Hernández-Blanco C, Jordá L, Pagán I, Berrocal M, Marco Y, Somerville S, Molina A. (2009) The ERECTA receptor‐like kinase regulates cell wallmediated resistance to pathogens in Arabidopsis thaliana. Mol. Plant Microbe Interact. 22, 953–963.

Sangster TA, Salathia N, Lee HN, Watanabe E, Schellenberg K, Morneau K, et al. (2008b) HSP90-buffered genetic variation is common in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy

of Sciences, USA 105(8): 2969–2974.

Sangster TA, Salathia N, Undurraga S, Milo R, Schellenberg K, et al. (2008a) HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 105(8): 2963–2968.

Schmalhausen II (1949) Factors of evolution: the theory of stabilizing selection. Oxford, England: Blakiston. xiv 327 pp.

Schmitt J, Stinchcombe JR, Heschel MS, Huber H. (2003). The adaptive evolution of plasticity: phytochrome-mediated shade avoidance responses. Integrative and Comparative Biology 43: 459–469

Schmitt J. (1997) Is photomorphogenic shade avoidance adaptative? Perspectives from population biology. Plant, Cell and Environment 20: 826–830.

Segura V, Vilhjálmsson BJ, Platt A, Korte A, Seren Ü, et al. (2012) An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. Nat Genet 44(7): 825–830.

Selby CP & Sancar A (2006) A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 103:17696–17700.

Sellaro, R., Yanovsky, M.J., and Casal, J.J. (2011). Repression of shade-avoidance reactions by sunfleck induction of HY5 in Arabidopsis. Plant J. 68, 919-928.

Seren U, Vilhjalmsson BJ, Horton MW, Meng D, Forai P, Huang YS, Long Q, Segura V, Nordborg M. (2012) GWAPP: A Web Application for Genome-Wide Association Mapping in Arabidopsis. Plant Cell 24(12):4793

Sharbel TF, Haubold B, Mitchell-Olds T. (2000) Genetic isolation by distance in Arabidopsis thaliana: Biogeography and postglacial colonization of Europe. Mol Ecol 9: 2109–2118.

Sharrock RA & Quail PH (1989) Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev. 3:1745–1757.

Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES (1999) The FLF MADS box gene. A repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. Plant Cell, 11: 445–458.

Sheldon CC, Hills, MJ, Lister C, Dean C, Dennis ES, Peacock WJ (2008) Resetting of FLOWERING LOCUS C expression after epigenetic repression by vernalization. PNAS USA, 105: 2214–2219.

Shindo C et al. (2005) Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis. Plant Physiol. 138: 1163–1173.

Shpak ED, McAbee JM, Pillitteri LJ, Torii KU. (2005) Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. Science 309:290–293.

Smith H & Whitelam GC. (1997) The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by

multiple phytochromes. Plant, Cell & Environment 20(6): 840-844.

Somers DE, Kim W-Y, Geng R. (2004) The F-Box Protein ZEITLUPE Confers Dosage-Dependent Control on the Circadian Clock, Photomorphogenesis, and Flowering Time. The Plant Cell 16(3): 769-782.

Song J, Angel A, Howard M, Dean C. (2012) Vernalization-a cold-induced epigenetic switch. J Cell Sci 125: 3723–3731.

Sorin C, Salla-Martret M, Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF. (2009) ATHB4, a regulator of shade avoidance,modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. Plant J. 59:266-277.

Taiz L & Zeiger E (2006) Plant Physiology, 4th edition, Sinauer Associates, Inc.

Tao Y, Ferrer JL, Ljung K., Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP & Chory J. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133: 164-176.

Tisne S, Barbier F, Granier C. (2011) The ERECTA gene controls spatial and temporal patterns of epidermal cell number and size in successive developing leaves of Arabidopsis thaliana. Annals of Botany 108: 159–168.

Todesco M, et al. (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in Arabidopsis thaliana. Nature 465(7298):632–636.

Todokoro S, Terauchi R, Kawano S (1995) Microsatellite polymorphisms in natural populations of Arabidopsis thaliana in Japan. Jpn J Genet 70:543–554.

Torii KU, Hanson LA, Josefsson CA, Shpak ED. (2003) Regulation of inflorescence architecture and organ shape by the ERECTA gene in Arabidopsis. In: Sekimura T, ed. Morphogenesis and Patterning in Biological Systems. Springer-Verlag, Japan, Tokyo. pp. 153–164.

Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. (1996) The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. Plant Cell 8: 735–746.

Trontin C, Tisné S, Bach L, Loudet O. (2011) What does Arabidopsis natural variation teach us (and does not teach us) about adaptation in plants? Current Opinion in Plant Biology, 14(3):225-231.

Ulijasz AT, Cornilescu G, Cornilescu CC, Zhang J, Rivera M, Markley JL,Vierstra RD. (2010) Structural basis of the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. Nature 463:250-254.

Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Adám E, Oakeley EJ, Schäfer E, Nagy F.(2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:1397-402.

van Zanten M, Snoek LB, Proveniers MC, Peeters AJ. (2009) The many functions of ERECTA. Trends Plant Science 14: 214–218.

van Zanten M, Snoek LB, van Eck-Stouten E. (2010) Ethylene-inducedhyponastic growth in

Arabidopsis thaliana is controlled by ERECTA. Plant Journal 61: 83–95.

Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 9829-9834.

Via S & Lande R. (1985) Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. Evolution 39: 505–522.
Waddington CH. (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. Nature 150: 563–565.

Wang X, Korstanje R, Higgins D, Paigen B. (2004) Haplotype analysis in multiple crosses to identify a QTL gene. Genome Research 14: 1767–1772.

Wei N & Deng XW. (1992) COP9: A new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in Arabidopsis. Plant Cell 4, 1507-18.

Weigel D & Mott R. (2009) The 1001 genomes project for Arabidopsis thaliana. Genome Biol. 10(5): 107.

Weigel D. (2012) Natural variation in Arabidopsis: from molecular genetics to ecological genomics. Plant Physiol 158: 2–22.

Werner JD, Borevitz JO, Warthmann N, Trainer GT, Ecker JR, et al. (2005) Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation. PNAS USA 102: 2460–2465.

Whitman DW & Ananthakrishnan TN (2009) Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences.

Xu G, Ma H, Nei M, Kong H (2009) Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 106, 835–840.

Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T (2005) TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. Plant Cell Physiol. 46: 1175–1189.

Yin P, Kang J, He F, Qu LJ, Gu H (2010) The origin of populations of Arabidopsis thaliana in China, based on the chloroplast DNA sequences. BMC Plant Biol 10:22.

Zeng ZB. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1457–1468.

Zhou P, Song M, Yang Q, Su L, Hou P, Gou L, Zheng X, Xi Y, Meng F, Xiao Y, Yang L, Yang J (2014) Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 Promote Seedling Photomorphogenesis in Multiple Light Signaling Pathways. Plant Physiol. (164):841–852.

Zhoux& Stephens M. (2012) Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. Nature Genetics 44: 821–824.

Anexo I

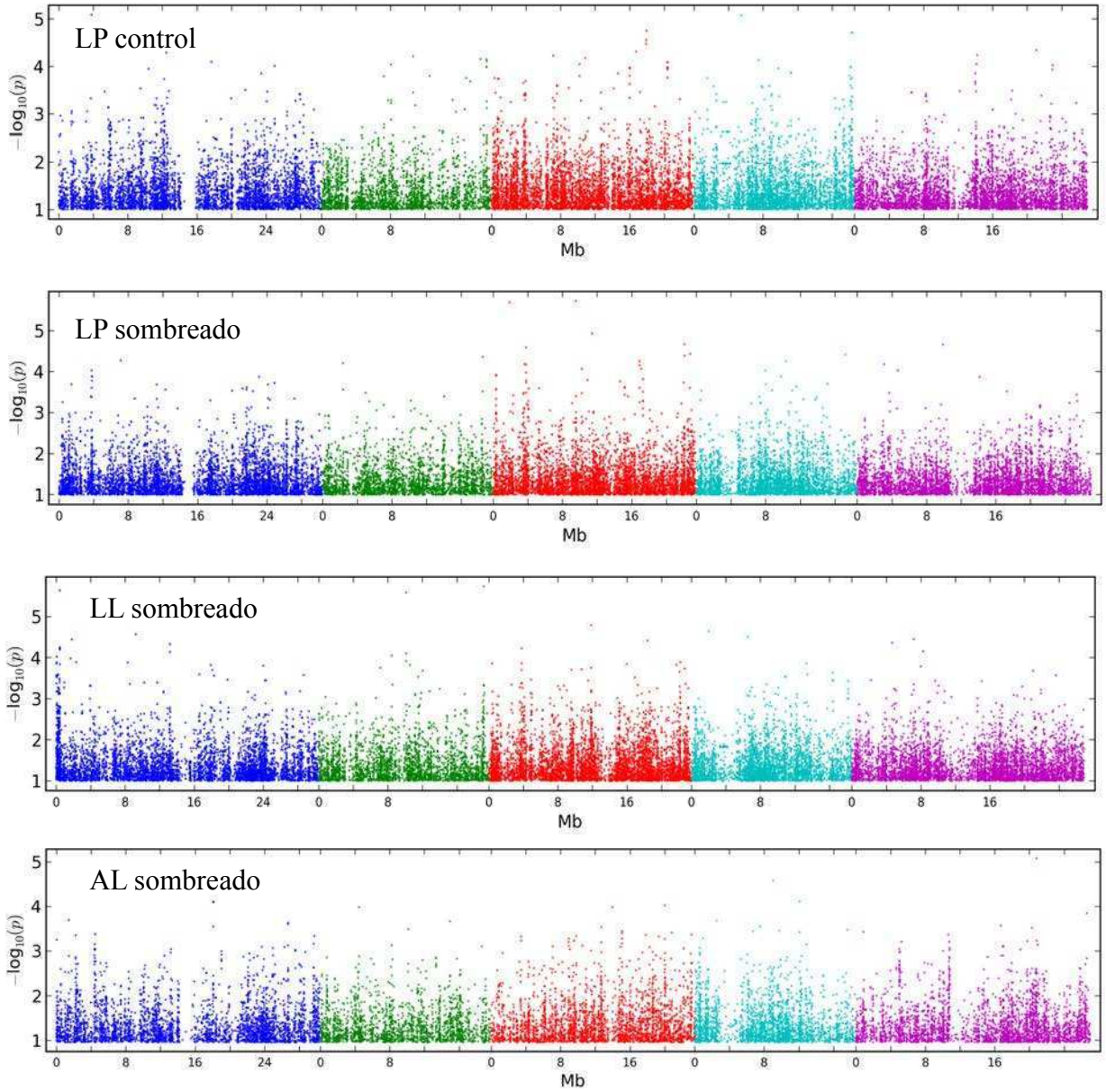
	LB	EOD	EODRATIO
LerxNo-0			
Ler	6.21 ± 0.15	7.53 ± 0.18	1.21 ± 0.02
No-0	8.67 ± 0.31	9.73 ± 0.26	1.13 ± 0.05
RIL media	7.41 ± 0.25	8.78 ± 0.25	1.20 ± 0.02
RIL max – min	10.93 – 4.47	11.80 – 6.28	1.71 – 1.00
[Vg]1	2.011	1.675	0.019
[Ve]2	0.312	0.262	0.007
[H2]3	0.845	0.844	0.633
[CVg]4	19.14	14.73	11.53
LerxCol			
Ler	2.05 ± 0.15	4.03 ± 0.32	1.89 ± 0.10
Col	1.77 ± 0.10	4.33 ± 0.12	2.47 ± 0.19
RIL media	2.10 ± 0.12	4.40 ± 0.05	2.13 ± 0.12
RIL max-min	3.10 – 1.28	5.98 – 2.88	2.68 – 1.52
[Vg]	0.180	0.633	0.161
[Ve]	0.057	0.212	0.111
[H2]	0.684	0.664	0.312
[CVg]	20.21	18.08	18.83
LerxCVI-0			
Ler	3.47 ± 0.14	6.94 ± 0.42	2.02 ± 0.17
CVI-0	5.38 ± 0.47	8.26 ± 0.10	1.56 ± 0.11
RIL media	4.20 ± 0.22	7.13 ± 0.17	1.75 ± 0.11
RIL max-min	6.31 – 2.40	8.97 – 4.71	2.72 – 1.16
[Vg]	1.110	1.500	0.240
[Ve]	0.516	0.619	0.169
[H2]	0.540	0.590	0.300
[CVg]	25.14	17.20	27.9

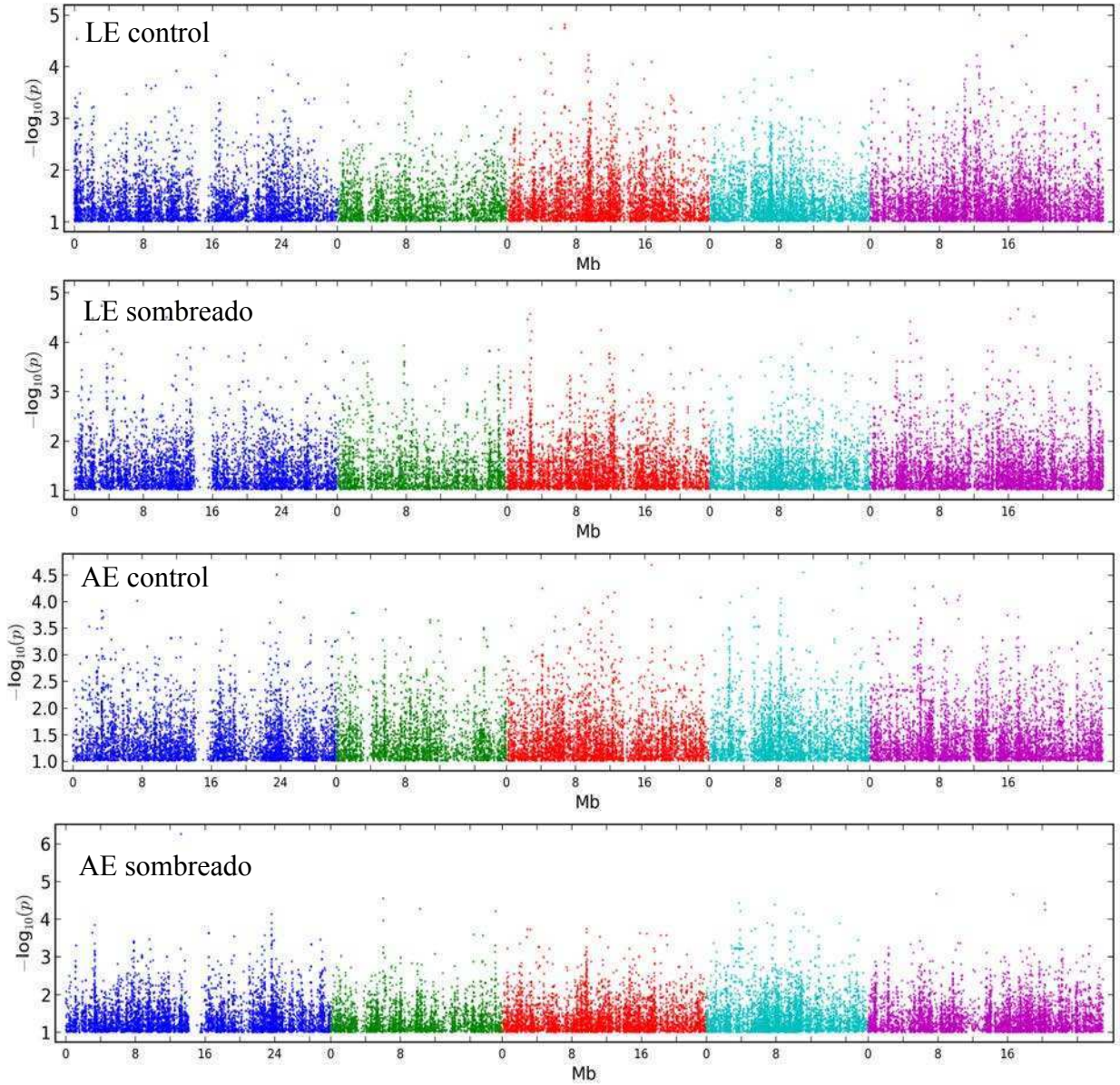
Tabla 1: Descripción estadística del largo del hipocotilo en los tratamientos de LB, EOD y EODRATIO. Los datos de medias están medidos en (mm) ± SEM. Vg es el componente de varianza genética entre las lineas de RILs para cara tratamiento. Ve es el componente de varianza residual o error. H2 es la heredabilidad definida en sentido amplio indica la proporción de la varianza fenotípica total que corresponde a la varianza genética (Vg/(Vg+Ve)). CV es el coeficiente de variación genética calculado como (100 x√Vg)/media.

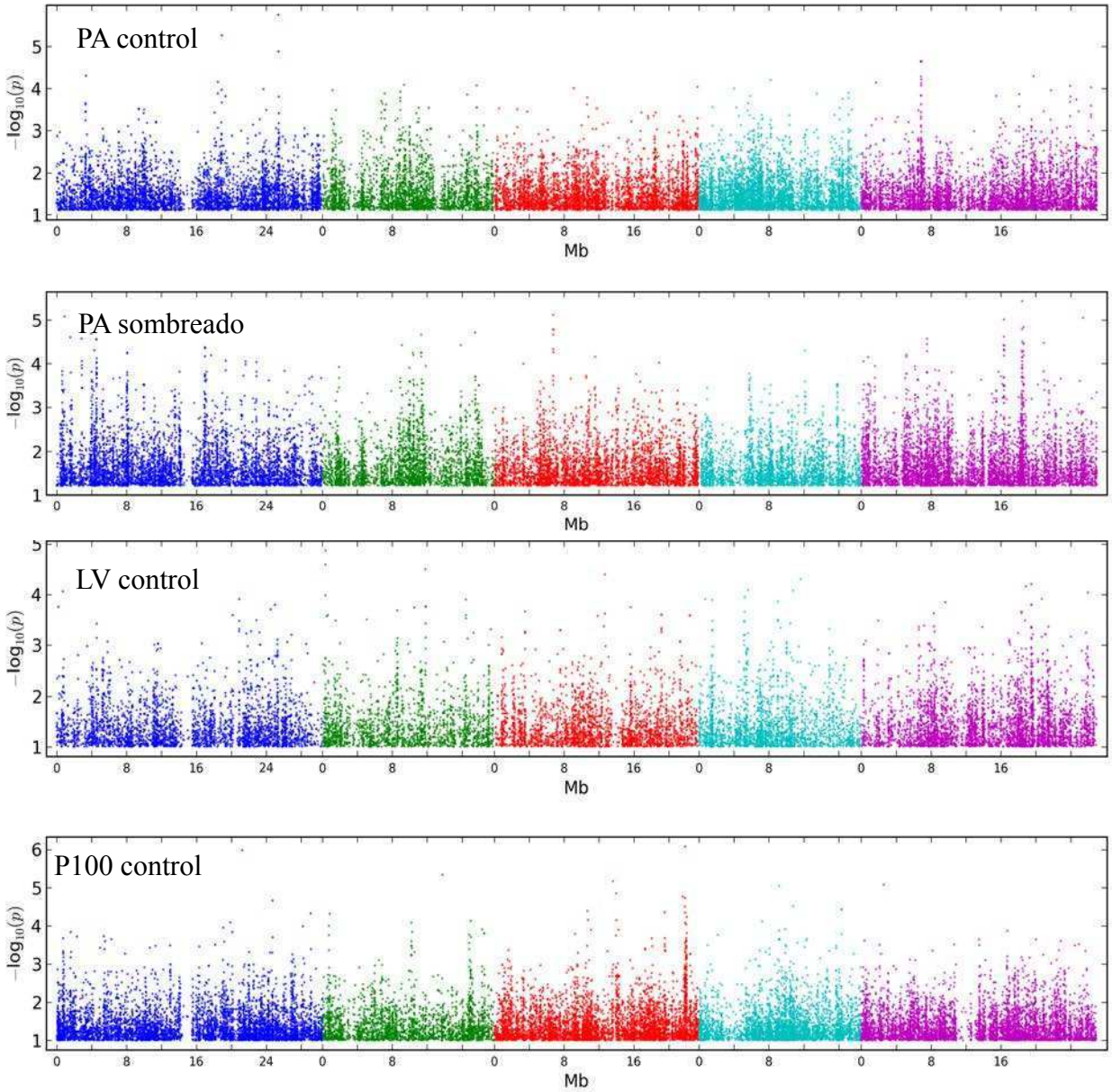
			LB				EOD				EODRATIO			
QTL	Marcador cercano	Pos cM[1]	LOD	Intervalo	ADD	%	LOD	Intervalo	ADD	%	LOD	Intervalo	ADD	%
LerxNo-0														
LB1	C4_CIW7	52 (304)	3.58	45-61	0.82	9	2.45	36-68	0.65	6				
EOD1	C1_NGA111	99 (99)	2.93	88-102	-0.9	11	2.99	87-100	-0.77	10				
EOD2	C2_NGA1126	43 (145)	9.38	26-40	-1.49	33	12.48	37-47	-1.5	37				
EODRATIO1	C2_PSL5	31 (133)	9.38	26-40	-1.49	33					3.58	2-35	0.096	17
LerxCol														
LB2	C1_GAPB	61 (61)	3.55	35-65	0.26	14								
LB3	C3_g4708	24 (213)	5.38	0-25	-0.3	17	4.18	0-25	-0.48	13				
LB4	C4_PG11	75 (331)	2.65	40-102	-0.21	9								
LB5	C5_O6569	18 (369)	4.11	0-28	0.26	12	3.68	0-22	0.44	10				
LB6	C5_m435	109 (460)	2.95	82-109	-0.26	13								
EOD3	C1_m315	97 (97)					2.55	77-107	0.41	9				
EOD4	C2_g6842	47(168)					6.92	44-51	0.75	20				
EODRATIO2	C2_m216	34 (156)									4.35	25-46	0.18	15
EODRATIO3	C5_m247	74 (426)									5.5	60-84	0.27	33
LerxCVI-0														
LB7	C5_DF119L	110 (470)	3.00	105-112	-0.45	7.5	2.4	90-112	-0.45	6				
EOD5	C2_FD.150L	44 (170)					2.5	102-105	0.16	6				
EOD6	C2_*ERECTA*	47 (172)	2.67	39-49	-041	6.4	3.67	39-49	-0.91	11				
EODRATIO4	C1_EC.66C	28 (28)									4.62	14-30	0.068	14
EODRATIO5	C2_FD81L	15 (140)									2.41	6-19	0.07	7

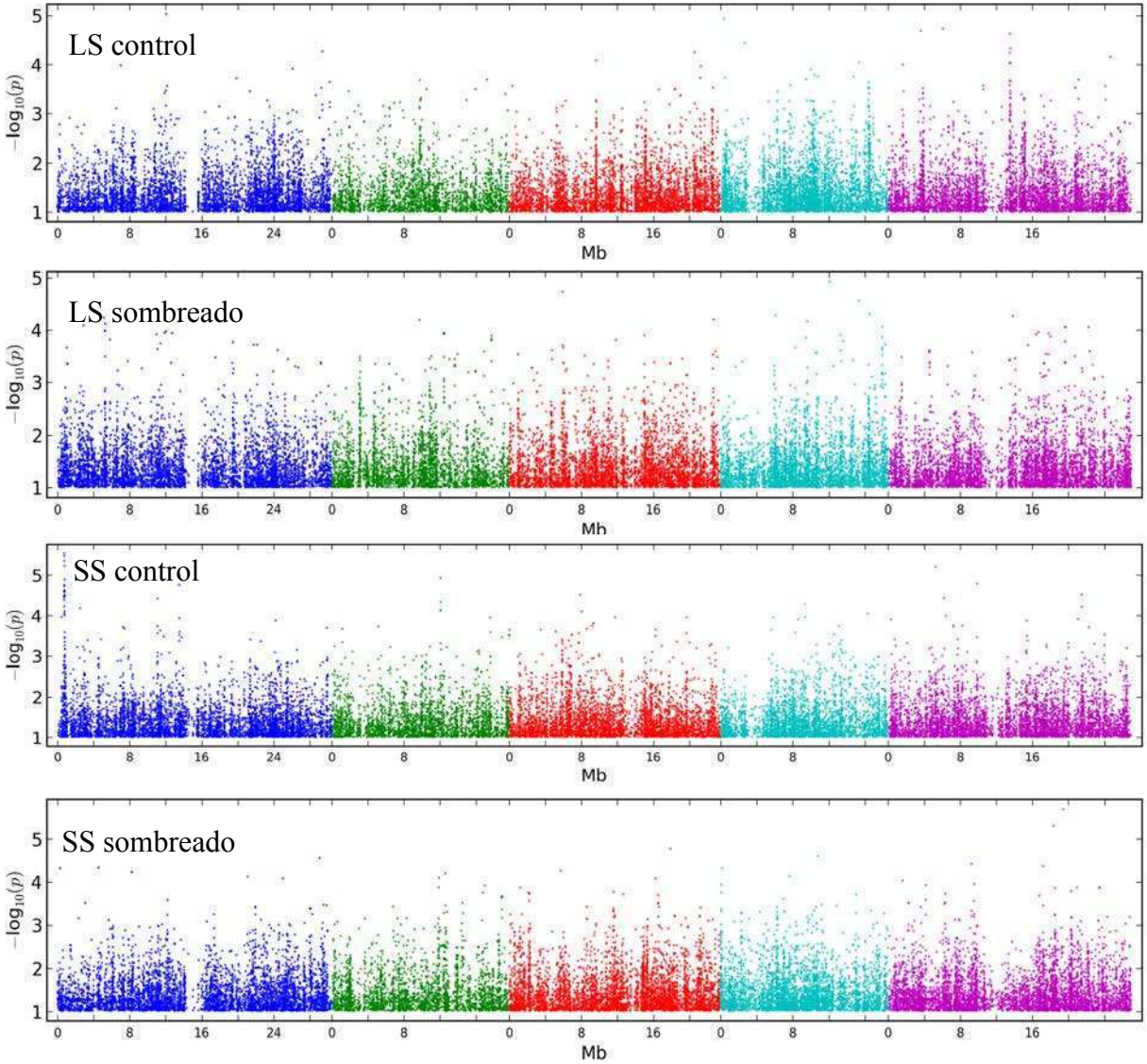
Tabla 2: Mapeo de QTL para el largo del hipocotilo (mm) en LB, EOD y EODRATIO en las tres poblaciones de RILs que comparten el mismo genotipo parental Ler. La distancia acumulativa de los cinco cromosomas de Arabidopsisestá indicada entre paréntesis.

Anexo II


LP control
LP sombreado
LL sombreado
AL sombreado
$-\log_{10}(p)$
Mb


LE control
LE sombreado
AE control
AE sombreado
$-\log_{10}(p)$
Mb


PA control
PA sombreado
LV control
P100 control
$-\log_{10}(p)$
Mb
0
8
16
24
1
2
3
4
5
6


LS control
LS sombreado
SS control
SS sombreado
$-\log_{10}(p)$
Mb

Figuras anexo II. Gráficos de Manhattan plot de los mapeos de asociación de cada caracter identificado por tratamiento y complementarios al Capítulo II. Dispersión de los logaritmos de los p valores detectados en función de la posición física en cada tratamiento LB (A), EOD (B) y EODRATIO (C) a lo largo de todo el genoma de *A.thaliana.* En azul se indica el cromosoma 1, en verde el cromosoma 2 en rojo el cromosoma 3 en turquesa el cromosoma 4 y en violeta el cromosoma 5. Las líneas punteadas verticales colocalizan indicando regiones de alta detección.Gráficos de Manhattan plot de los mapeos de asociación de cada caracter identificado por tratamiento y complementarios al Capítulo II.

	No de Stock en el ABRC	Ecotypeid	Nombre	No de stock parental	Nombre del recolector	Latitud	Longitud	Sitio de recolección	País
1.	CS76194	8429	N13	CS22491	Savushkin	61.36	34.15	Konchezero	RUS
2.	CS76087	8251	Ag-0	CS22630	Kranz	45	1.3	Ag	FRA
3.	CS76091	8253	An-1	CS22626	Kranz	51.2167	4.4	An	BEL
4.	CS76094	8260	Bay-0	CS22633	Kranz	49	11	Bay	GER
5.	CS76099	5837	Bor-1	CS22590	Nordborg	49.4013	16.2326	Bor	CZE
6.	CS76100	8268	Bor-4	CS22591	Nordborg	49.4013	16.2326	Bor	CZE
7.	CS76101	8269	Br-0	CS22628	Kranz	49.2	16.6166	Br	CZE
8.	CS76105	8272	Bur-0	CS22656	Kranz	54.1	-6.2	Bur	IRL
9.	CS76106	8273	C24	CS22620	Kranz	41.25	-8.45	Co	POR
10.	CS76111	8276	CIBC-17	CS22603	Crawley	51.4083	-0.6383	CIBC	UK
11.	CS76113	8279	Col-0	CS22625	Kranz	38.3	-92.3	Col	USA
12.	CS76114	8280	Ct-1	CS22639	Kranz	37.3	15	Ct	ITA
13.	CS76116	8281	Cvi-0	CS22614	Kranz	15.1111	-23.6167	Cvi	CPV
14.	CS76125	8287	Eden-2	CS22573	Nordborg	62.877	18.177	Eden	SWE
15.	CS76126	8288	Edi-0	CS22657	Kranz	56	-3	Edi	UK
16.	CS76127	8291	Est-1	CS22629	Kranz	58.3	25.3	Est	RUS
17.	CS76128	8293	FÃ¤b-4	CS22577	Nordborg	63.0165	18.3174	FÃ¤b	SWE
18.	CS76129	8294	Fei-0	CS22645	Alonso-Blanco	40.5	-8.32	Fei	POR
19.	CS76133	8295	Ga-0	CS22634	Kranz	50.3	8	Ga	GER
20.	CS76136	8299	Got-7	CS22608	RÃ¶bbelen	51.5338	9.9355	GÃ–T	GER
21.	CS76139	8302	Gy-0	CS22631	Kranz	49	2	Gy	FRA
22.	CS76144	8309	HR-5	CS22596	Crawley	51.4083	-0.6383	HR	UK
23.	CS76154	8318	Kno-18	CS22567	Bergelson	41.2816	-86.621	Knox	USA
24.	CS76164	8324	Ler-1	CS22618	Koornneef	47.984	10.8719	Ler	GER
25.	CS76175	6046	LÃ¶v-5	CS22575	Nordborg	62.801	18.079	LÃ¶v	SWE
26.	CS76176	8332	Lp2-2	CS22594	Cetl	49.38	16.81	Lp2	CZE

27.	CS76177	8333	Lp2-6	CS22595	Cetl	49.38	16.81	Lp2	CZE
28.	CS76179	8336	Lz-0	CS22615	Kranz	46	3.3	Lz	FRA
29.	CS76191	8339	Mrk-0	CS22635	Kranz	49	9.3	Mrk	GER
30.	CS76192	8341	Mt-0	CS22642	Kranz	32.34	22.46	Mt	LIB
31.	CS76193	8342	Mz-0	CS22636	Kranz	50.3	8.3	Mz	GER
32.	CS76197	8344	Nd-1	CS22619	Kranz	50	10	Nd	SUI
33.	CS76198	8345	NFA-10	CS22599	Crawley	51.4083	-0.6383	NFA	UK
34.	CS76203	8352	Oy-0	CS22658	Kranz	60.23	6.13	Oy	NOR
35.	CS76213	8359	Pna-17	CS22570	Bergelson	42.0945	-86.3253	PNA	USA
36.	CS76214	8360	Pro-0	CS22649	Bergelson	43.25	-6	Pro	ESP
37.	CS76215	8361	Pu2-23	CS22593	Cetl	49.42	16.36	Pu2	CZE
38.	CS76218	8367	Ren-1	CS22610	RÃ¶bbelen	48.5	-1.41	REN	FRA
39.	CS76220	8371	Rmx-A180	CS22569	Bergelson	42.036	-86.511	RMX	USA
40.	CS76226	8379	Se-0	CS22646	Kranz	38.3333	-3.53333	Se	ESP
41.	CS76227	8248	Shahdara	CS22652	Vizir	38.35	68.48	Pamiro-Alay	TJK
42.	CS76230	8385	Sq-8	CS22601	Crawley	51.4083	-0.6383	SQ	UK
43.	CS76244	8390	Tamm-2	CS22604	Savolainen	60	23.5	Tamm	FIN
44.	CS76268	8392	Ts-1	CS22647	Kranz	41.7194	2.93056	Ts	ESP
45.	CS76293	8396	Ull2-3	CS22587	Nordborg	56.0648	13.9707	Ull2	SWE
46.	CS76294	8397	Ull2-5	CS22586	Nordborg	56.0648	13.9707	Ull2	SWE
47.	CS76296	8399	Uod-7	CS22613	Koch	48.3	14.45	Uod	AUT
48.	CS76297	8400	Van-0	CS22627	Kranz	49.3	-123	Van	CAN
49.	CS76298	8401	VÃ¥r2-1	CS22580	Nordborg	55.58	14.334	VÃ¥r2	SWE
50.	CS76301	8404	Wei-0	CS22622	Holub	47.25	8.26	Wei	SUI
51.	CS76303	8405	Ws-0	CS22623	Kranz	52.3	30	Ws	RUS
52.	CS76304	8407	Wt-5	CS22637	Kranz	52.3	9.3	Wt	GER
53.	CS76305	8408	Yo-0	CS22624	Kranz	37.45	-119.35	Yo	USA
54.	CS76306	8410	Zdr-6	CS22589	Nordborg	49.3853	16.2544	Zdr	CZE
55.	CS76083	8610	11ME1.32	NA	Bergelson	42.093	-86.359	ME (Benton Harbor)	USA

56.	CS76084	8796	11PNA4.101	NA	Bergelson	42.0945	-86.3253	PNA	USA
57.	CS76088	8252	Alc-0	N1656	Roldan	40.31	-3.22	Alc	ESP
58.	CS76096	8261	Bg-2	CS22342	Winterer	47.6479	-122.305	BG	USA
59.	CS76097	8264	Bla-1	N971	Kranz	41.6833	2.8	Bla	ESP
60.	CS76098	8265	Blh-1	N1031	Kranz	48	19	Blh	CZE
61.	CS76102	8231	BrÃ¶1-6		Nordborg	56.3	16	BrÃ¶msebro	SWE
62.	CS76103	8271	Bu-0	N1007	Kranz	50.5	9.5	Bu	GER
63.	CS76109	8274	Can-0	N1065	Hauser	29.2144	-13.4811	Can	ESP
64.	CS76110	8275	Cen-0	N1067	Kranz	49	0.5	Cen	FRA
65.	CS76152	8420	Kelsterbach-4	CS6041	Williams	50.0667	8.5333	Kelsterbach	GER
66.	CS76117	8283	Dra3-1		Nordborg	55.76	14.12	Dra3	SWE
67.	CS76118	8284	DraII-1		Nordborg	49.4112	16.2815	DraII	CZE
68.	CS76124	6008	Duk		Nordborg	49.1	16.2	Duk	CZE
69.	CS76130	8422	FjÃ¤1-1		Nordborg	56.06	14.29	FjÃ¤1	SWE
70.	CS76134	8296	Gd-1	N1185	Kranz	53.5	10.5	Gd	GER
71.	CS76135	8297	Ge-0	N1187	Kranz	46.5	6.08	Ge	SUI
72.	CS76137	8300	Gr-1	N1199	Hauser	47	15.5	Graz	AUT
73.	CS76138	8234	Gul1-2		Nordborg	56.3	16	Gullabo	SWE
74.	CS76140	8304	Hi-0	N1227	Kranz	52	5	Hi	NED
75.	CS76141	8235	Hod		Nordborg	48.8	17.1	Hodonin	CZE
76.	CS76142	8306	Hov4-1		Nordborg	56.1	13.74	Hovdala	SWE
77.	CS76143	6039	Hovdala-2		Nordborg	56.1	13.74	Hovdala	SWE
78.	CS76145	8310	Hs-0	N1237	Kranz	52.24	9.44	Hannover (Hannover)	GER
79.	CS76146	8236	HSm		Nordborg	49.33	15.76	Horni Smrcne	CZE
80.	CS76147	8311	In-0	N1239	Kranz	47.5	11.5	In	AUT
81.	CS76149	8314	Ka-0	N1267	Kranz	47	14	Ka	AUT
82.	CS76155	8239	KÃ¶ln	CS6003	Williams	51	7	KÃ¶ln	GER
83.	CS76156	8240	Kulturen-1		Nordborg	55.705	13.196	Kulturen	SWE

84.	CS76168	8325	Lip-0	N1337	Kranz	50	19.3	Lip	POL
85.	CS76169	8326	Lis-1		Nordborg	56	14.7	Lis	SWE
86.	CS76171	8430	Lisse	CS6033	Williams	52.25	4.5667	Lisse	NED
87.	CS76173	8329	Lm-2	N1345	Kranz	48	0.5	Lm	FRA
88.	CS76174	6042	Lom1-1		Nordborg	56.09	13.9	Lom1	SWE
89.	CS76178	8335	Lund		Nordborg	55.71	13.2	Lund	SWE
90.	CS76195	8343	Na-1	N1385	Kranz	47.5	1.5	Na	FRA
91.	CS76196	8246	NC-6		Bergelson	35	-79.18	NC	USA
92.	CS76201	6074	Ã–r-1		Nordborg	56.45	16.11	Ã–rrevet	SWE
93.	CS76202	8351	Ost-0	N1431	Kranz	60.25	18.37	Ost	SWE
94.	CS76204	8353	Pa-1	N1439	Kranz	38.07	13.22	Pa	ITA
95.	CS76210	8354	Per-1	N1445	Kranz	58	56.3167	Per	RUS
96.	CS76211	8355	Petergof	N926	Vizir	59	29	Petergof	RUS
97.	CS76222	8374	Rsch-4	CS1494	Holub	56.3	34	Rsch	RUS
98.	CS76224	8378	Sap-0	N1507	Kranz	49.49	14.24	Sap	CZE
99.	CS76231	8387	St-0	N1535	Kranz	59	18	St	SWE
100.	CS76302	8419	Wil-1	N1595	Kranz	54.6833	25.3167	Wil	LTU
101.	CS76121	5889	DraIV 1-7	NA	Nordborg	49.4112	16.2815	DraIV 1	CZE
102.	CS76123	6005	DraIV 6-35	NA	Nordborg	49.4112	16.2815	DraIV 6	CZE
103.	CS76108	66	CAM-61	NA	Roux	48.2667	-4.58333	CAM	FRA
104.	CS76182	173	MIB-22	NA	Roux	47.3833	5.31667	MIB	FRA
105.	CS76183	178	MIB-28	NA	Roux	47.3833	5.31667	MIB	FRA
106.	CS76115	81	CUR-3	NA	Roux	45	1.75	CUR	FRA
107.	CS76089	1	ALL1-2	NA	Roux	45.2667	1.48333	ALL1	FRA
108.	CS76184	223	MIB-84	NA	Roux	47.3833	5.31667	MIB	FRA
109.	CS76299	390	VOU-1	NA	Roux	46.65	0.166667	VOU	FRA
110.	CS76163	149	LDV-58	NA	Roux	48.5167	-4.06667	LDV	FRA
111.	CS76254	286	TOU-A1-12	NA	Roux	46.6667	4.11667	TOU-A1	FRA
112.	CS76090	2	ALL1-3	NA	Roux	45.2667	1.48333	ALL1	FRA

113.	CS76257	333	TOU-A1-67	NA	Roux	46.6667	4.11667	TOU-A1	FRA
114.	CS76252	281	TOU-A1-115	NA	Roux	46.6667	4.11667	TOU-A1	FRA
115.	CS76205	258	PAR-3	NA	Roux	46.65	-0.25	PAR	FRA
116.	CS76206	259	PAR-4	NA	Roux	46.65	-0.25	PAR	FRA
117.	CS76207	260	PAR-5	NA	Roux	46.65	-0.25	PAR	FRA
118.	CS76265	380	TOU-I-6	NA	Roux	46.6667	4.11667	TOU-I	FRA
119.	CS76267	386	TOU-K-3	NA	Roux	46.6667	4.11667	TOU-K	FRA
120.	CS76221	267	ROM-1	NA	Roux	45.5333	4.85	ROM	FRA
121.	CS76112	78	CLE-6	NA	Roux	48.9167	-0.48333	CLE	FRA
122.	CS76104	15	BUI	NA	Roux	48.3667	0.933333	BUI	FRA
123.	CS76180	2057	Map-42	NA	Byers	42.166	-86.412	Map	USA
124.	CS76186	1967	MNF-Jac-32	NA	Byers	43.5187	-86.1739	MNF-Jack	USA
125.	CS76165	641	LI-OF-095	NA	Bossdorf	40.7777	-72.9069	Organic Farm-OF	USA
126.	CS76209	2187	Pent-1	NA	Byers	43.7623	-86.3929	Pent	USA
127.	CS76131	6019	FjÃ¤1-2	NA	Nordborg	56.06	14.29	FjÃ¤1	SWE
128.	CS76219	6076	Rev-2	NA	Nordborg	55.7	13.4	Rev2	SWE
129.	CS76229	6085	Sparta-1	NA	Nordborg	55.7097	13.0489	Sparta (Student corridor)	SWE
130.	CS76233	6094	T1040	NA	Nordborg	55.6494	13.2147	Staff 4	SWE
131.	CS76234	6096	T1060	NA	Nordborg	55.6472	13.2225	Staff 8	SWE
132.	CS76240	6119	T620	NA	Nordborg	55.7	13.2	Trastv.	SWE
133.	CS76248	6190	TDr-3	NA	Nordborg	55.7686	14.1381	TDr	SWE
134.	CS76247	6203	TDr-18	NA	Nordborg	55.7714	14.1208	TDr	SWE
135.	CS76228	2274	SLSP-30	NA	Byers	43.665	-86.496	SLSP	USA
136.	CS76269	6318	UduI 1-34	NA	Nordborg	49.2771	16.6314	UduI 1	CZE
137.	CS76271	5729	UKID22	NA	Holub	54.7	-3.4	Cockermouth	UK
138.	CS76272	5742	UKID37	NA	Holub	51.3	1.1	Fordwich	UK
139.	CS76280	4997	UKSE06-062	NA	Holub	51.3	0.5	East Malling Research Station	UK
140.	CS76281	5056	UKSE06-192	NA	Holub	51.3	0.5	East Malling Research	UK

								Station	
141.	CS76283	5122	UKSE06-278	NA	Holub	51.3	0.4	East Malling village	UK
142.	CS76291	5341	UKSE06-628	NA	Holub	51.1	0.4	Scotney Castle	UK
143.	CS76275	5380	UKNW06-059	NA	Holub	54.4	-3	Ambleside to Rydal wall population	UK
144.	CS76279	5628	UKNW06-460	NA	Holub	54.7	-3.4	Cockermouth	UK
145.	CS76307	6448	ZdrI 2-24	NA	Nordborg	49.3853	16.2544	ZdrI 2	CZE
146.	CS76308	6449	ZdrI 2-25	NA	Nordborg	49.3853	16.2544	ZdrI 2	CZE
147.	CS22689	8372	RRS-10		Dritz	41.5609	-86.4251	RRS	USA
148.	CS28007	7000	Aa-0	CS6600	Kranz	50.9167	9.57073	Aa	GER
149.	CS28013	6989	Alst-1	CS22550	Koornneef	54.8	-2.4333	Alst	UK
150.	CS28014	6990	Amel-1	CS22526	Koornneef	53.448	5.73	Amel	NED
151.	CS28018	6992	Ang-0	CS6605	Kranz	50.3	5.3	Ang	BEL
152.	CS28090	7035	Blh-2	CS6657	Kranz	48	19	Blh	CZE
153.	CS28091	7026	Boot-1	CS22551	Koornneef	54.4	-3.2667	Boot	UK
154.	CS28099	7031	Bsch-0	CS6630	Kranz	40.0167	8.6667	Bsch	GER
155.	CS28108	7056	Bu-8	CS6639	Kranz	50.5	9.5	Bu	GER
156.	CS28128	7062	Ca-0	CS6658	Kranz	50.2981	8.26607	Ca	GER
157.	CS28135	7071	Chat-1	CS22521	Koornneef	48.0717	1.33867	Chat	FRA
158.	CS28140	6727	CIBC-2	CS22221	Crawley	51.4083	-0.6383	CIBC	UK
159.	CS28141	6729	CIBC-4	CS22223	Crawley	51.4083	-0.6383	CIBC	UK
160.	CS28158	7075	Cit-0	CS1080	Kranz	43.3779	2.54038	Cit	FRA
161.	CS28163	7078	Co-2	CS6670	Kranz	40.12	-8.25	Co	POR
162.	CS28201	7460	Da(1)-12	CS917	Vizir	NA	NA	Unknown-Czech Republic	CZE
163.	CS28208	7098	Di-1	CS6681	Kranz	47	5	Di	FRA
164.	CS28210	7102	Do-0	CS6683	Kranz	50.7224	8.2372	Do	GER
165.	CS28214	7105	Dra-2	CS6687	Kranz	49.4167	16.2667	Dra	CZE
166.	CS28217	7110	Ede-1	CS22532	Koornneef	52.0333	5.66667	Ede	NED

167.	CS28236	7123	Ep-0	CS6697	Kranz	50.1721	8.38912	Ep	GER
168.	CS28252	7139	Fi-1	CS6705	Kranz	50.5	8.0167	Fi	GER
169.	CS28268	7135	Fr-4	CS6710	Kranz	50.1102	8.6822	Fr	GER
170.	CS28274	7141	Ga-2	CS6715	Kranz	50.3	8	Ga	GER
171.	CS28279	7143	Gel-1	CS22533	Koornneef	51.0167	5.86667	Gel	NED
172.	CS28282	7151	Go-0	CS6721	Kranz	51.5338	9.9355	GÃ¶	GER
173.	CS28336	7163	Ha-0	CS6733	Kranz	52.3721	9.73569	Ha	GER
174.	CS28343	7164	Hau-0	CS6734	Kranz	55.675	12.5686	Hau	DEN
175.	CS28344	7166	Hey-1	CS22534	Koornneef	51.25	5.9	Hey	NED
176.	CS28345	7169	Hh-0	CS6735	Kranz	54.4175	9.88682	Hh	GER
177.	CS28364	7181	Je-0	CS6742	Kranz	50.927	11.587	Je	GER
178.	CS28394	7199	Kl-5	CS6761	Kranz	50.95	6.9666	Kl	GER
179.	CS28395	7186	Kn-0	CS6762	Kranz	54.8969	23.8924	Kn	LTU
180.	CS28407	6810	KNO-11	CS22411	Bergelson	41.2816	-86.621	Knox	USA
181.	CS28419	7201	Kr-0	CS6764	Kranz	51.3317	6.55934	Kr	GER
182.	CS28420	7206	Kro-0	CS6766	Kranz	50.0742	8.96617	Kro	GER
183.	CS28423	7205	Krot-2	CS3888	Clauss	49.631	11.5722	Krot	GER
184.	CS28457	7227	Li-5:2	CS6909	Kranz	50.3833	8.0666	Li	GER
185.	CS28459	7229	Li-6	CS6777	Kranz	50.3833	8.0666	Li	GER
186.	CS28495	7244	Mnz-0	CS6794	Kranz	50.001	8.26664	Mnz	GER
187.	CS28510	7446	N4	CS22482	Savushkin	61.36	34.15	SolomennoyeÂ	RUS
188.	CS28550	6847	NFC-20	CS22201	Crawley	51.4083	-0.6383	NFC	UK
189.	CS28564	7275	No-0	CS3081	Kranz	51.0581	13.2995	No	GER
190.	CS28573	7258	Nw-0	CS6811	Kranz	50.5	8.5	Nw	GER
191.	CS28575	7260	Nw-2	CS6813	Kranz	50.5	8.5	Nw	GER
192.	CS28578	7263	Nz1	CS22661	Campanella	-37.79	175.283	Nz1	NZL
193.	CS28580	7277	Ob-1	CS6817	Kranz	50.2	8.5833	Ob	GER
194.	CS28587	7282	Or-0	CS6822	Kranz	50.3827	8.01161	Or	GER

195.	CS28610	7479	PHW-10	CS6055	Williams	51.2878	0.0565	Kent (PHW)	UK
196.	CS28613	7482	PHW-13	CS6060	Williams	51.2878	0.0565	Kent (PHW)	UK
197.	CS28633	7504	PHW-33	CS6092	Williams	52.25	4.5667	Lisse	NED
198.	CS28635	7506	PHW-35	CS6096	Williams	48.6103	2.3086	Bretagny Sur Orge	FRA
199.	CS28636	7507	PHW-36	CS6098	Williams	48.6103	2.3086	Bretagny Sur Orge	FRA
200.	CS28645	7307	Pn-0	CS6838	Kranz	48.0653	-2.96591	Pn	FRA
201.	CS28650	7306	Pog-0	CS6842	Kranz	49.2655	-123.206	Pog	CAN
202.	CS28692	7320	Rou-0	CS6847	Kranz	49.4424	1.09849	Rou	FRA
203.	CS28713	7514	RRS-7	CS22564	Dritz	41.5609	-86.4251	RRS	USA
204.	CS28720	7472	S96	CS914	Administrator	NA	NA	UNKNOWN	UNK
205.	CS28729	7333	Sei-0	CS6853	Kranz	46.5438	11.5614	Sei	ITA
206.	CS28732	7344	Sg-1	CS6858	Kranz	47.6667	9.5	Sg	GER
207.	CS28734	7331	Sh-0	CS6860	Kranz	51.6832	10.2144	Sh	GER
208.	CS28739	7337	Si-0	CS6861	Kranz	50.8738	8.02341	Si	GER
209.	CS28743	7343	Sp-0	CS6862	Kranz	52.5339	13.181	Sp	GER
210.	CS28759	7354	Ting-1	CS22549	Koornneef	56.5	14.9	Ting	SWE
211.	CS28760	7355	Tiv-1	CS22525	Koornneef	41.96	12.8	Tiv	ITA
212.	CS28780	7373	Tsu-0	CS6874	Kranz	34.43	136.31	Tsu	JPN
213.	CS28787	7378	Uk-1	CS6879	Kranz	48.0333	7.7667	Uk	GER
214.	CS28800	7384	Ven-1	CS22538	Koornneef	52.0333	5.55	Ven	NED
215.	CS28809	7391	Wag-4	CS22543	Koornneef	51.9666	5.6666	Wag	NED
216.	CS28822	7411	Wl-0	CS6920	Kranz	47.9299	10.8134	Wl	GER
217.	CS28833	7408	Wt-3	CS6894	Kranz	52.3	9.3	Wt	GER
218.	CS28847	7418	Zu-1	CS6903	Kranz	47.3667	8.55	Zu	SUI

Tabla de accessiones utilizadas para el mapeo de GWAs

.