

Variación natural en respuesta a la luz y temperatura en *Arabidopsis thaliana*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Daniel Claudio Matsusaka Quiliano

Licenciado en Biología - Universidad Nacional Federico Villarreal - 2017

Lugar de trabajo: IFEVA – Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Javier Francisco Botto

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Codirector

Diego Hernan Sanchez

Bioquímico (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Bioquímica (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Javier Edgardo Moreno

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Biología (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Jose Manuel Estevez

Licenciado en Biología (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Biología (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Carlos Alberto Dezar

Licenciado en Genética (Universidad Nacional de Misiones)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral)

Fecha de defensa de la tesis: 18 de 08 de 2023

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mi madre que me apoyo a lo largo del proyecto.

Agradecimientos

Agradezco de corazón a mis compañeros de laboratorio, quienes me ayudaron en mis desafíos diarios y también tuvieron la paciencia de acompañarme en este arduo camino.

A mi director y codirector, les estoy profundamente agradecido por la oportunidad de crecer en este largo proyecto. Su guía y apoyo fueron fundamentales para el desarrollo de la tesis.

A Axel y la increíble banda de Palermo Soho, les agradezco por ser de gran ayuda en los buenos y malos momentos.

A Mónica y Lucas, por las buenas charlas y compañía

A Lucianita, quien ha sido una fuente constante de buenas vibras durante los últimos años del doctorado.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Lic. Biología. Matsusaka Quiliano Daniel Claudio

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.**Artículos Académicos**

Matsusaka, D., Filiault, D., Sanchez, D. H., & Botto, J. F. (2021). Ultra-High-Density QTL Marker Mapping for Seedling Photomorphogenesis Mediating Arabidopsis Establishment in Southern Patagonia. *Frontiers in Plant Science*, 12 (July), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.677728>.

Ruiz, J.*, Matsusaka, D.*, Cascales, J., Sánchez, D. H., Sánchez-, M., Cerdán, P. D., & Botto, J. F. (2022). Functional analysis of PHYB polymorphisms in Arabidopsis thaliana collected in Patagonia, *Frontiers in PlantScience*, 8 (September), 1–13.<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.952214>.

*Los autores contribuyeron de igual manera.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1: Introducción General.....	1
1.1 Estudio de la variación natural.....	2
1.2. Los fotoreceptores en las plantas	3
1.3. Las respuestas de las plantas a la luz	7
1.3.1 La señalización durante la desetiología de las plántulas	7
1.3.2. La señalización de las respuestas al sombreado.....	8
1.4. Floración	10
1.4.1. Respuesta al fotoperiodo en la floración.....	11
1.4.2. Respuesta a las bajas temperaturas: Vernalización.....	13
1.4.2.1 Procesos que ocurren antes de la vernalización	14
1.4.2.2 Procesos que ocurren durante la vernalización	14
1.4.2.3 Procesos que ocurren después de la vernalización.....	15
1.4.3. Transición de la floración por la vía termosensorial en <i>A. thaliana</i>	16
1.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo para el estudio de la variación natural	17
1.6. La accesión de <i>Arabidopsis</i> recolectada en la Patagonia	19
1.7. Objetivos e Hipótesis	21
1.7.1. Objetivo general.....	21
1.7.2. Objetivos específicos	21
1.7.3. Hipótesis	22
1.8. Estructura de la tesis	22
CAPÍTULO 2: Generación y caracterización de la población de 163 líneas endocriadas y recombinantes entre Col-0 y Pat.	24
2.1. Introducción	24
2.2. Materiales y Métodos.....	27
2.2.1 Material Vegetal.....	27
2.2.2. Extracción de ADN para la secuenciación de la población de mapeo	27
2.2.3. Construcción del mapa genético de la población de mapeo.....	28
2.2.4. Validación de la distribución alélica de los marcadores del brazo superior del cromosoma IV.....	29
2.2.5. Experimentos fisiológicos en la población de mapeo de 163 RILs	30
2.3. Resultados	32
2.3.1. Construcción de la población de 163 RIL entre Col-0 y Pat.....	32
2.3.2. Construcción del mapa genético de la población de 163 RIL entre Col-0 y Pat.....	32

2.3.3. Confirmación de la segregación alélica del brazo superior del cromosoma IV.	34
2.3.4. Descripción del mapa genético de la población de mapeo de Col-0 y Pat.	36
2.3.5. Experimentos fisiológicos en la nueva población de mapeo entre Col-0 y Pat38	
2.4. Discusión.	40
CAPÍTULO 3: Identificación y validación de QTL en respuesta a la luz en la población de mapeo de Col-0 y Pat.	43
3.1. Introducción	43
3.2. Materiales y Métodos	45
3.2.1. Material Vegetal.	45
3.2.2. Diseño y condiciones experimentales	45
3.2.3. Mapeo de QTLs	47
3.2.4. Construcción de HIF	48
3.2.5. Confirmación por de HIFs de los QTL más relevantes.	49
3.2.6. Identificación de los genes candidatos de los QTL más relevantes	49
3.3. Resultados	51
3.3.1. Variabilidad natural en la respuesta de desetiología y en la respuesta de escape al sombreado en Col-0 y Pat	51
3.3.2. Mapeo de QTL en la respuesta de desetiología y escape al sombreado en la población de mapeo de RILs.	53
3.3.3. Confirmación de <i>Rc1</i> QTL y <i>Bc1/SHADE</i> QTL en las HIFs en las respuestas de desetiología y escape al sombreado	57
3.3.4. Exploración de genes candidatos en <i>Rc1</i> QTL y <i>Bc1/SHADE</i> QTL.	60
3.4. Discusión.	64
CAPÍTULO 4: Identificación y validación de QTL asociados al fotoperiodo y a la vernalización en floración en la población de mapeo de Col-0 x Pat.	68
4.1. Introducción	68
4.2. Materiales y Métodos	71
4.2.1. Material Vegetal.	71
4.2.2. Diseño y condiciones experimentales	71
4.2.3. Mapeo de QTLs	72
4.2.4. Construcción de NILs y confirmación de QTL en HIFs y NILs.	73
4.2.5. Exploración de genes candidatos en los QTL de interés.	74
4.3. Resultados	76
4.3.1. Variación natural para caracteres vegetativos y floración entre Col-0 y Pat.	76
4.3.2. Variación natural para caracteres vegetativos y floración en la población de mapeo de 163 RILs	78
4.3.3. Mapeo de QTL asociados al fotoperiodo y vernalización en floración	83
4.3.4. Confirmación de <i>VERNI</i> QTL en HIFs	85
4.3.5. Confirmación de <i>VERNI</i> QTL en NILs	88
4.3.6. Evaluación del fenotipo de las NILs para <i>VERNI/Bc</i> QTL en las respuestas de desetiología y a la luz de sombra	91

4.3.7. Selección de genes candidatos en <i>VERNI</i> QTL y caracterización de líneas mutantes en floración.....	93
4.3.8. Caracterización de líneas mutantes asociadas a <i>VERNI</i> QTL en desetiología.....	96
4.4. Discusión.....	99
Capítulo 5. Discusión General	104
5.1. Contraste de las hipótesis planteadas	104
5.2. Aportes e implicancias de las tesis.....	108
5.3. Investigaciones futuras.....	110
Bibliografía	113
Cuadros Suplementarios de los capítulos 2, 3 y 4.....	129
Figuras suplementarias de los capítulos 2,3 y 4.....	180

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1: <i>Primers</i> CAPS usados para evaluar la distorsión de segregación en el cromosoma IV.....	30
Cuadro 2.1: Resumen de los marcadores utilizados en cada cromosoma para contruir el mapa genético de la población RIL entre Col-0 x Pat.	37
Cuadro 4.1: QTLs asociados a genes relevantes de floración. La tabla muestra la población de mapeo, los tratamientos evaluados y los genes candidatos asociados a los QTL significativos.....	69
Cuadro 4.2: Medias del fenotipo de las HIFs 20 y 71 condiciones de vernalización. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los alelos Col -0 y Pat para cada tratamiento analizadas por la prueba de Student <i>t</i> -test ($p < 0.05$).....	87
Cuadro 4.3: Medias del fenotipo de las NILs 218 y 236 en condiciones de vernalización. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los alelos Col -0 y Pat para cada tratamiento analizadas por la prueba de Student <i>t</i> -test ($p < 0.05$).....	90
Cuadro 4.4. Media de los fenotipos en tratamientos de luz para las mutantes en estudio. .	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Espectro de luz solar y en sombra.	6
Figura 1. 2: Red de señalización en respuesta la luz adaptada de Oka & Yamamoto 2018. .6	6
Figura 2. 1: Construcción de la población RIL.....	32
Figura 2. 2: (A) Caracterización genética de la población Col-0 x Pat RIL.	33
Figura 2. 3: Evaluación de la segregación por PCR CAPS en los alelos del cromosoma IV en cuatro posiciones en individuos Col-0, Pat, F1 y F2.....	35
Figura 2. 4: Evaluación de la segregación por PCR CAPS en los alelos del cromosoma IV en cuatro posiciones en RILs.	36
Figura 2. 5: Localización, ausencia y presencia de marcadores.	38
Figura 2. 6: Evaluación del fenotipo en la elongación del hipocótilo entre Col-0 y Pat.....	39
Figura 2. 7: Evaluación del fenotipo de la población RIL en tratamientos de NaCl y KNO ₃ para el carácter del largo del hipocótilo.	39
Figura 3. 1: Esquema de los experimentos de desetiación (A) y escape al sombreado (B) en plántulas de la población RIL Col-0 y Pat	47
Figura 3. 2: Longitud del hipocótilo en tratamientos desetiación en plántulas en Col-0 y Pat.....	51
Figura 3. 3: Longitud del hipocótilo en tratamientos luz y sombra simulada en plántulas en Col-0 y Pat.....	52
Figura 3. 4: Distribución de plántulas en la población RIL	54
Figura 3. 5: Distribución de plántulas en la población RIL en respuesta a la luz blanca y sombra.....	55
Figura 3. 6: Polimorfismos de <i>PHYB</i> entre Col-0 y Pat.	56
Figura 3. 7: Mapeo de QTLs en plántulas.....	57
Figura 3. 8: Confirmación de <i>Rcl</i> y <i>Bcl</i> QTL por dos HIF independientes.	58
Figura 3. 9: Confirmación del <i>Bcl</i> QTL por dos HIF independientes en sombra simulada.....	59
Figura 3. 10: TZP1 y ABA1 como genes candidatos para <i>Rcl</i> y <i>Bcl</i> QTL, respectivamente.....	62
Figura 4. 1: Esquema del diseño experimental para los cuatro tratamientos de día largo (LD) y día corto (SD) tanto vernalizado (VERN) como no vernalizado (No-VERN).....	72
Figura 4. 2: Caracterización fenotípica de Col-0 y Pat	77
Figura 4. 3: Histograma de la población de mapeo Co-0 x Pat para los días a floración en un fotoperiodo de (A) día largo y (B) día corto.....	80
Figura 4. 4: Histograma de la población de mapeo Col-0 x Pat para el número de hojas, longitud del peciolo, longitud de la hoja y ancho de la hoja en un fotoperiodo de (A) día largo y (B) día corto.....	81
Figura 4. 5: Correlación entre caracteres evaluados en la población RIL Col-0 x Pat.....	82
Figura 4. 6: Plasticidad fenotípica en respuesta al ambiente de la población RIL.....	83
Figura 4. 7: Mapeo de QTLs en condiciones de No-VERN/LD y NO-VERN/SD.....	85
Figura 4. 8: Mapeo de QTLs en condiciones de VERN/LD y VERN/SD.....	85
Figura 4. 9: Confirmación de <i>VERNI</i> QTL para las HIFs 20 y 71	88
Figura 4. 10: Confirmación de <i>VERNI</i> QTL para las NILs 218 y 236.....	91
Figura 4. 11: Fenotipo de las NILs 218 y 236 durante la desetiación en luz Bc, RLc y oscuridad y en sombra simulada (SA)	93
Figura 4. 12: Fenotipo de floración de las mutantes <i>maf2</i> (<i>maf2-64</i> y <i>maf2-72</i>), <i>eip9</i> , <i>ham1</i> y <i>hen4-2</i> en los tratamientos de (A) VERN/LD: vernalización y día largo y (B) VERN/SD: vernalización y día corto.....	95
Figura 4. 13: Fenotipo de las mutantes <i>maf2</i> (<i>maf2-64</i> y <i>maf2-72</i>), <i>eip9</i> , <i>ham1</i> y <i>hen4-2 flm3</i> y <i>maf3</i> en los tratamientos de oscuridad, Bc, RLc y sombra simulada (SA), así como el control en oscuridad	97

ABREVIATURAS

<i>aba1</i>	<i>ABA DEFICIENT 1</i> mutante de síntesis del ácido absísico
Bay	Accesión Bayreuth
Bc	Tratamiento en luz azul continua
bp	Pares de bases
Col-0	Accesión Columbia
Chr	cromosoma
cM	centimogans
CMG	Componente de variancia para cada carácter en las líneas RIL
CME	Componente de variancia residual (error) para cada tratamiento entre las líneas RIL
CO	CONSTANS
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
CRY	criptocromo
Cvi	Accesión isla del cabo verde
EIP9	EMF1-INTERACTING PROTEIN 9
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
FRI	FRIGIDA
HIF	Familia de líneas Introgresadas Heterocigotas (<i>Heterogeneous Inbred Lines</i>)
H ₂	Heredabilidad
HAM1	HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE MYST FAMILY1
HEN4	HUA ENCANCER 4
Ler	Accession Landsberg erecta
LD	Día largo
MAF1	MADS AFFECTING FLOWERING 1
MAF2	MADS AFFECTING FLOWERING 2
MAF3	MADS AFFECTING FLOWERING 3
MAF4	MADS AFFECTING FLOWERING 4
MAF5	MADS AFFECTING FLOWERING 5
NIL	Líneas Isogénicas Cercanas (<i>Near Isogenic Lines</i>)
No-VERN	Tratamiento sin vernalización
PAR	radiación fotosintéticamente activa
Pat	Accesión Patagonia
Pfr	Fitocromo en su forma activa
PHY	Fitocromo
PIFs	PHYTOCHROME INTERACTING PROTEINS
Pr	Fitocromo en su forma inactiva
Osc	Tratamiento en oscuridad
QTL	Locus de rasgo cuantitativo (<i>Quantitative trait loci</i>)
Rc	Tratamiento en luz roja continua
RIL	Líneas recombinantes y Endocriadas (<i>Recombined Inbred Lines</i>)
RLc	Tratamiento en luz Roja lejana continua
SA	Tratamiento de sombra simulada
SAS	Síndrome del escape al sombreado (<i>Shade-Avoidance Syndrome</i>)
Sha	Accesión Shadara
SD	Día corto
TZP	TANDEM ZINC KNUCKLE PROTEIN
VERN	Tratamiento de vernalización
UV-B	luz ultravioleta B
VG	Variancia genotípica
VF	Variancia fenotípica
WL	Tratamiento en luz blanca

RESUMEN

La adaptación permite a las plantas crecer y reproducirse con éxito, incluso en condiciones desfavorables y transitorias. Etapas importantes como el establecimiento inicial de las plántulas y la transición a la fase reproductiva son momentos cruciales para la trascendencia de la especie. El objetivo de esta tesis fue investigar la variación genética natural en respuestas de desetiación, escape al sombreado y floración en una nueva población de mapeo de líneas recombinantes y endocriadas (RILs) entre las accesiones de Col y Pat de *Arabidopsis thaliana*. Se validó y caracterizó el mapa genético resultante y se identificó un área cromosómica en el brazo superior del cromosoma IV con distorsión de segregación en la población RIL. El mapeo genético reveló siete loci de rasgos cuantitativos (QTLs) significativos del crecimiento del hipocótilo para la respuesta de desetiación y cuatro QTLs relevantes para la respuesta de escape al sombreado. Se identificó a *Rc1* QTL, asociado con el tratamiento de luz roja (Rc), mientras que *Bc1* QTL se asoció con los tratamientos de luz azul (Bc), rojo lejano (RLc) y oscuridad (Osc) para la desetiación, y para el tratamiento de sombra simulada (SA) en la respuesta de escape al sombreado. Mediante la generación de familias de líneas independientes HIFs se validaron los efectos aditivos de *Rc1* y *Bc1* QTLs, y con el uso de mutantes disponibles se infirió que *TZP* sería el gen candidato para explicar la causalidad en *Rc1* QTL. También se realizaron experimentos de floración combinando dos condiciones de fotoperiodo (día largo y día corto) y temperatura (con o sin vernalización). Se evaluaron los caracteres de tiempo y número de hojas a floración como así también caracteres foliares (largo y ancho de hoja y largo de peciolo). Se identificaron seis QTLs. Uno de los QTL más significativos, *VERNI* QTL, se asoció a los fenotipos de días a floración y la longitud de la hoja, y colocalizó con *Bc1* QTL. La caracterización

fisiológica de HIFs y líneas isogénicas cercanas (NILs) generadas en esta tesis confirmaron los efectos aditivos de los alelos en *VERNI* QTL para el fenotipo de días a floración, y también los efectos aditivos de la respuesta de elongación de hipocótilo en los tratamientos de luz Bc y RLc. Los resultados sugieren que *MAF2* es el gen candidato más sólido para *VERNI* QTL. Proponemos que *MAF2* participaría en distintas etapas de desarrollo, integrando respuestas fotomorfogénicas y de vernalización. La información generada en esta tesis ayuda a comprender mejor las bases funcionales de la variabilidad genética natural en procesos relevantes del crecimiento y desarrollo de las plantas que pueden impactar sobre los rendimientos de los cultivos.

Palabras clave: Variación genética natural, adaptación, desetiolación, floración, vernalización, QTL.

ABSTRACT

Adaptation enables plants to grow and reproduce successfully even under unfavorable and transient conditions. Important stages such as the initial establishment of seedling and the transition to the reproductive phase are crucial moments for the transcendence of the species. The aim of this thesis was to investigate natural genetic variation in de-etiolation, shade avoidance and flowering responses in a new recombinant inbred lines (RILs) mapping population between from Col-0 and Pat accessions of *Arabidopsis thaliana*. The resulting genetic map was validated and characterize, and a chromosomal region on the upper arm of chromosome IV with segregation distortion in the RIL population was identified. Genetic mapping revealed seven significant hypocotyl growth quantitative trait locus (QTLs) for de-etiolation response and four relevant QTL for shade avoidance response. The *Rc1* QTL was identified and associated with red light (Rc), while the *Bc1* QTL was associated with blue light (Bc), far red light (RLc), and darkness (Osc) treatments for de-etiolation and simulated shade (SA) treatment for shade avoidance response. By generating independent HIFs lines, the additive effects of *Rc1* and *Bc1* QTLs were validated, and with the use of available mutants *TZP* was inferred as the candidate gene to explain the causality in *Rc1* QTL. Flowering experiments were also conducted under two photoperiod (long and short days) and temperature (with or without vernalization) conditions. Characters of time and number of leaves at flowering as well as foliar characters (length and width of leaf and petiole length) were evaluated. Six QTLs were identified. One of the most significant QTLs, *VERN1* QTL, was associated with flowering time and leaf length phenotypes and co-located with *Bc1* QTL. Physiological characterization of HIFs and near isogenic lines (NILs) generated in this thesis confirmed the additive effects of the alleles in *VERN1* QTL

for the flowering days phenotype, and also the additive effects of hypocotyl elongation response in Bc and RLC light treatments. We propose that *maf2* would participate in different stages of development, integrating photomorphogenic and vernalization responses. The information generated in this thesis helps to better understand the functional bases of natural variability in plant growth and development processes that can impact crops yields.

Keywords: Natural genetic variation, adaptation, de-etiolation, shade avoidance, flowering, vernalization, QTL

CAPÍTULO 1: Introducción General

Un aspecto fascinante que alberga el mundo biológico es la gran diversidad natural. Estas variaciones se observan entre las especies de organismos, entre las poblaciones de una especie, e incluso entre individuos dentro de una población. La variación natural dentro de una especie refleja la diversidad genética, y su análisis permite dilucidar las bases moleculares de las diferencias fenotípicas relacionadas con la adaptación en distintos ambientes naturales, así como determinar los procesos ecológicos y evolutivos que mantienen esta variación.

El ambiente terrestre contiene infinidad de variables abióticas y bióticas que fluctúan diaria y estacionalmente. Las plantas, como organismos sésiles, ajustan su crecimiento y desarrollo al entorno circundante, seleccionando redes de señalización que les permiten integrar múltiples estímulos, maximizando su ajuste y mitigando efectos potencialmente deletéreos de diversos factores ambientales. La población de cualquier especie biológica está expuesta a una constante presión de selección debido a las fluctuaciones del ambiente. La selección natural es el principal camino que da forma a la variación fenotípica dentro de las poblaciones (Rieseberg et al., 2002). En las plantas, la adaptación local ha sido estudiada ampliamente desde la introducción de su concepto básico por Turesson en 1922 (Leimu & Fischer, 2008). Sin embargo los mecanismos ecológicos, evolutivos y genéticos que ha proporcionado la adaptación local siguen siendo un área de interés permanente.

La variabilidad genética, al interaccionar con las condiciones ambientales, conduce a una selección de individuos mejor adaptados, obteniendo características que le proporcionen una ventaja en su entorno local (Kawecki & Ebert, 2004). La

presión selectiva y la adaptación local contribuyen al mantenimiento de la variabilidad genética natural dentro de las especies (Linhart & Grant, 1996), que tiene como consecuencia la eventual especiación cuando las poblaciones se separan (Kawecki & Ebert, 2004).

1.1 Estudio de la variación natural

En genética, la variación natural se refiere a la diversidad genética de una sola especie en la naturaleza, y su análisis permite dilucidar las bases moleculares de las diferencias fenotípicas relacionadas con la adaptación en distintos ambientes naturales y determinar los procesos ecológicos y evolutivos que mantienen esta variación en la naturaleza. (Mitchell-Olds et al., 2007).

Las plantas, como organismos sésiles, deben desplegar una serie de respuestas adaptativas para enfrentar los cambios ambientales, brindándoles la capacidad de crecer y reproducirse incluso en condiciones no favorables. Para hacerle frente a condiciones ambientales cambiantes y desafiantes, las plantas exhiben una amplia gama de respuestas integradas que generan una variación cuantitativa compleja, promoviendo cambios en el perfil transcriptómico en respuesta al estrés. Seguidamente, estos imponen restricciones fisiológicas en las plantas para finalmente evocar cambios fenotípicos (Trontin et al., 2011), resultando en variación fenotípica entre individuos en rasgos específicos como la altura de la planta, largo de hoja, número de hojas, días a floración, resistencias a patógenos, etc; que a menudo se explican por una combinación de mutaciones, interacciones moleculares y efectos ambientales (Jiménez-Gómez, 2014). De este modo, el balance de polimorfismos mantienen loci funcionales dentro de las poblaciones o especies a través de mecanismos como la sobredominancia (Tishkoff

et al., 2001), la selección espacio temporal de alelos alternativos (Tian et al., 2002), la adaptación local a diferentes ambientes (Schulte et al., 2000) y la selección epistática (Kroymann & Mitchell-Olds, 2005). El equilibrio de la selección resulta de la convergencia entre los mecanismos anteriormente mencionados, y dan como resultado marcas moleculares similares a nivel genómico. Además, algunas de las diferencias fenotípicas presentes en las plantas silvestres o cultivadas se deben a variantes alélicas monogénicas (Alonso-Blanco et al., 2009). Comprender cómo las plantas se establecen y ajustan su crecimiento y desarrollo a su ambiente ha sido por décadas de gran interés para la comunidad científica que trabaja en los mecanismos fundamentales de la adaptación, buscando variantes naturales que puedan explicar las características genotípicas y fenotípicas involucradas. Estos fenotipos son estudiados como resultado de la variación genética natural regulando genes que pueden contribuir a las diferencias adaptativas (Schulte et al., 2000; Tian et al., 2003). El enfoque molecular de estas preguntas se ha aplicado principalmente a la crucífera *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis).

1.2. Los fotoreceptores en las plantas

Las plantas ajustan finamente su crecimiento y desarrollo a su entorno sensando distintas señales del ambiente como la luz, la temperatura, los nutrientes, la disponibilidad de agua, entre otros. La luz visible está compuesta de distintas longitudes de onda que son detectadas por distintos fotoreceptores en las plantas que decodifican la señal lumínica en señales químicas, que en última instancia, regulan la maquinaria transcripcional que promueve las respuestas de las plantas a la luz. La luz es percibida por los fitocromos (PHY) absorben luz roja/rojo lejano, los criptocromos (CRY) y las fototropinas (PHOT) que absorben fotones de UV-A y luz

azul; mientras que el fotoreceptor UVR8 es eficiente en la absorción de luz UV-B (Casal, 2000; Quail, 2002; Chen et al., 2004; Jiao et al., 2007; Chen & Chory, 2011; Xu et al., 2015; Sanchez et al., 2020). Los fotoreceptores detectan las fluctuaciones de la calidad (longitud de onda percibida), cantidad (fluencia), dirección y horas de luz (Chen et al., 2004; Chen et al., 2004; Quail, 2002; Oka & Yamamoto, 2018).

Los fitocromos absorben la luz roja (R, 600-700 nm) y roja lejana (RL, 700-750 nm) y son responsables de inducir numerosas respuestas a la luz en las plantas. En *Arabidopsis*, la familia de fitocromos (phyA-phyE) promueven respuestas como la germinación de las semillas, la desetiología de la plántula, las respuestas de escape al sombreado, la floración, entre otros (Franklin & Quail, 2010). Los fitocromos tienen dos isoformas fotointerconvertibles: se sintetizan en forma inactiva (Pr) y al absorber luz R se fototransforman a su forma biológicamente activa (Pfr), la que es capaz de absorber eficientemente luz FR (Casal, 2013; Legris et al., 2019). Las respuestas mediadas por los fitocromos estables (phyB y otros) dependen de la cantidad del fotoequilibrio (Pfr/Pfr+Pr) que se establece en las células y se correlaciona directamente con la proporción de luz R/RL que perciben las plantas del ambiente (Smith, 1982).

Los criptocromos son flavoproteínas que se activan con la percepción de luz azul y UV-A, estando presentes en muchos organismos que van desde bacterias hasta plantas y humanos (Chaves et al., 2011; Oka & Yamamoto, 2018). En *Arabidopsis*, la familia de criptocromos contiene a CRY1, CRY2 y CRY3; de este último aún queda por aclarar su relevancia fisiológica. cry1 y cry2 pueden promover distintas respuestas a la luz como la desetiología de las plántulas y la floración mediada por el fotoperiodo en *Arabidopsis* (Liu et al., 2016). En términos fotobiológicos, cry1 es más estable en alta irradiancia, y tiene un rol importante regulando la desetiología

en plántulas en respuesta a la luz azul; mientras que *cry2* es funcionalmente activo en baja irradiancia y regula la floración en respuesta a la duración del día (Lin et al., 1998; Valverde et al., 2004; Liu et al., 2011). Por lo tanto, *cry2* tiene un mejor desempeño en condiciones de poca luz o donde la luz es limitante. Las fototropinas son receptores de luz azul y luz ultravioleta A (UV-A) con actividad quinasas. La activación de los receptores PHOT1 y PHOT2 regulan la orientación de hojas y tallos, la apertura de estomas, la foto-reubicación del cloroplasto y la morfología de la hoja en respuesta a luz azul y UV-A (Christie et al., 2015). PHOT1 y PHOT2 están mayormente localizados en la membrana plasmática (Sakamoto & Briggs, 2002; Kong et al., 2006).

Las señales de la luz ultravioleta B (UV-B) son mediadas por la proteína UVR8, que fue identificada como un fotoreceptor que regula la fotomorfogénesis (Yin & Ulm, 2017). UVR8 está involucrado en la respuesta de inhibición de elongación del hipocótilo, la acumulación de flavonoides y antocianinas, las respuestas a la luz de sombra y defensas, entre otras (Demkura & Ballaré, 2012; Hayes et al., 2014; Mazza & Ballaré, 2015). En ausencia de UV-B la proteína UVR-8 forma un dímero inactivo que se disocia en su monómero al estar en su forma activa en respuesta a la luz ultravioleta (Yin & Ulm, 2017). Los monómeros se acumulan en el núcleo e interactúan directamente con CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), promoviendo la acumulación nuclear de UVR8 (Favory et al., 2009; Rizzini et al., 2011; Yin & Ulm, 2017).

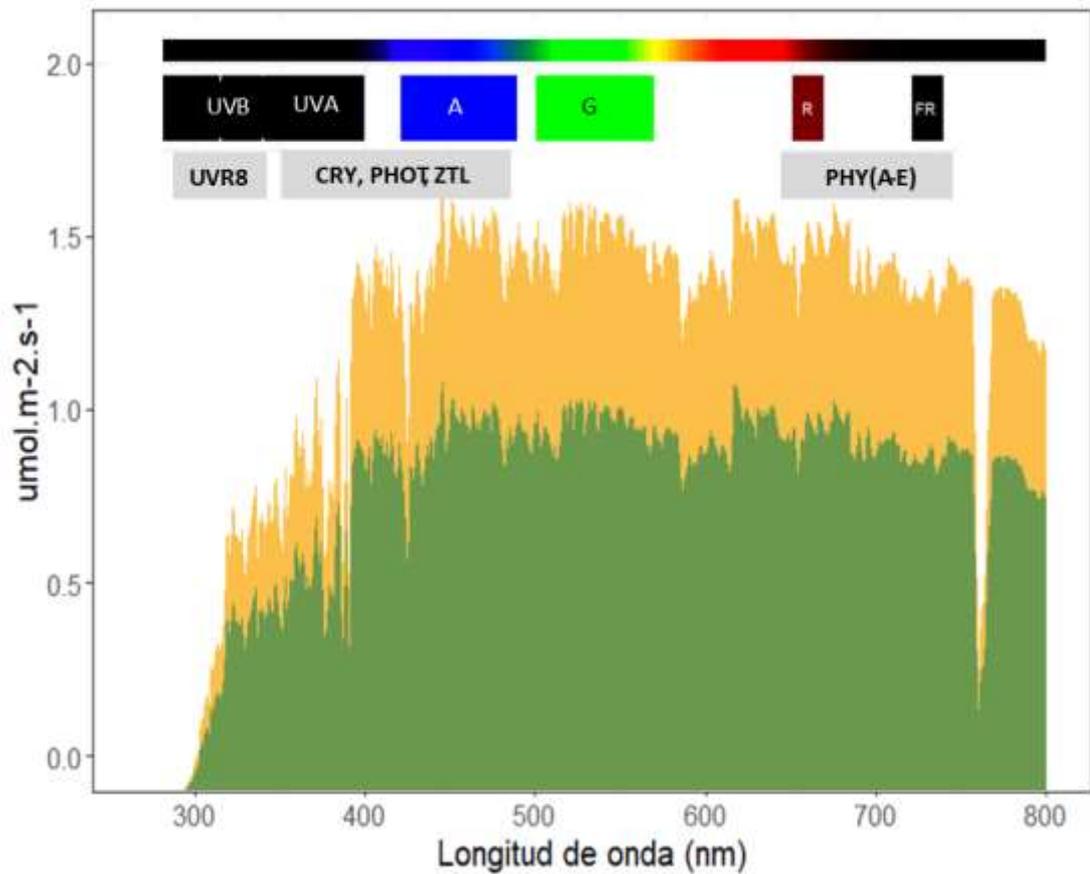


Figura 1. 1. Espectro de luz solar y en sombra. En la parte superior se muestra la barra del espectro luz (400-700nm) y los fotoreceptores implicados correspondientes a cada longitud de onda en particular. El área amarilla muestra el espectro de luz solar, y por debajo se muestra la sombra (área verde).

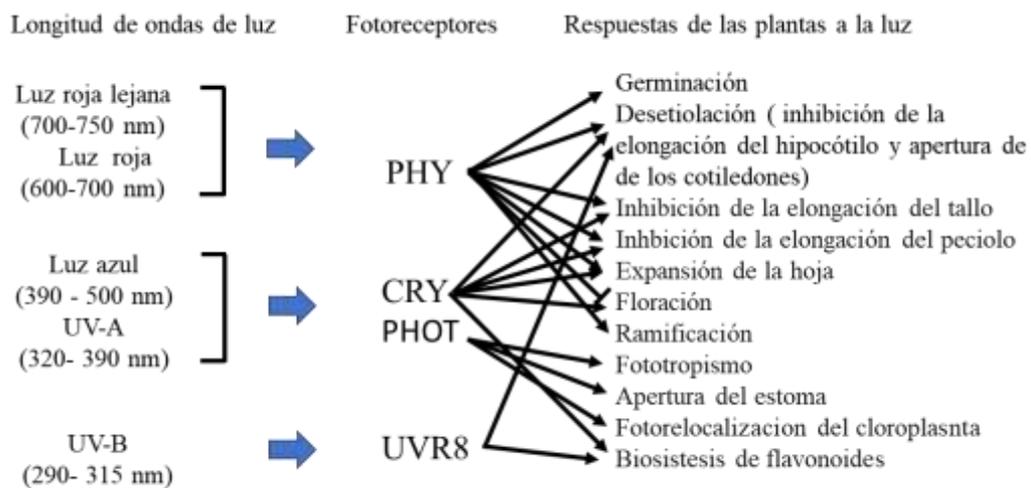


Figura 1. 2. Red de señalización en respuesta a la luz adaptada de Oka & Yamamoto 2018.

1.3. Las respuestas de las plantas a la luz

La luz es utilizada por las plantas como fuente de energía para la síntesis de moléculas carbonadas a través del proceso de la fotosíntesis pero también, y no menos relevante, la luz es fuente de información del entorno donde las plantas crecen y desarrollan durante el ciclo de vida. El ciclo de vida de una planta se inicia con la germinación; en esta etapa, la semilla se encuentra por debajo del perfil del suelo, donde las condiciones necesarias promueven la emergencia de la radícula y posteriormente el crecimiento del vástago (que se compone del hipocótilo y cotiledones). El desarrollo de la plántula en oscuridad, llamado escotomorfogénesis, se caracteriza por tener hipocótilos largos y cotiledones no expandidos sin pigmentos fotosintéticos, protegidos por el gancho apical a medida que la plántula se abre paso a través del suelo. Posteriormente, la fotomorfogénesis da inicio cuando la plántula etiolada emerge por sobre el suelo y percibe las primeras señales lumínicas durante la transición de la completa oscuridad a la luz. La luz roja, rojo-lejana y azul promueven la fotomorfogénesis mientras que la oscuridad promueve la escotomorfogénesis. Los procesos de desetiación mediados por luz incluyen la inhibición de la tasa de crecimiento del hipocótilo, la expansión de los cotiledones, y la síntesis de clorofila para la activación de la maquinaria fotosintética (Chory et al., 1989; Deng et al., 1991; Casal, 2000; Chen, et al., 2004).

1.3.1 La señalización durante la desetiación de las plántulas

En *A. thaliana* existen muchos genes activados por la luz que han sido estudiados en la respuesta de desetiación de la plántula. En total oscuridad (escotomorfogénesis) la plántula esta etiolada y desarrolla largos hipocótilos, los cotiledones están cerrados y la maquinaria fotosintética esta inactiva. *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)* (Deng et al., 1991; Deng et

al., 1992; Wei & Deng, 1992) junto con *DE-ETIOLATED*, *DET* (Chory et al., 1989), y *FUSCA* (Castle & Meinke, 1994) impiden que la plántula se desetiole, proceso que ocurre cuando las plántulas perciben los fotones de luz. La desetiología promueve la inhibición del crecimiento del hipocótilo, la apertura de los cotiledones y la maquinaria fotosintética se vuelve activa. Los fotorreceptores tienen un rol activo en el proceso de desetiología porque actúan río arriba de *DET*, *COP* y *FUS* en la cadena de traducción de señales fotomorfogénicas (Chory, 1992; Kwok et al., 1996; Osterlund et al., 1999).

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 (Gangappa & Botto, 2016). En la oscuridad, la actividad de HY5 es reprimida por COP1 (Osterlund et al., 2000; Saijo et al., 2003), HY5 es ubiquitinado y de esta forma marcado para la degradación por la vía del proteasoma 26S (Holm et al., 2002). La percepción de la luz por los fotorreceptores induce 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).

1.3.2. La señalización de las respuestas al sombreado

Una vez establecida la plántula, las estructuras fotosintéticas crecen en tamaño y las plantas comienzan a competir por luz. En muchas especies de “sol” las plantas desarrollan el síndrome de escape al sombreado (en inglés, *Shade-Avoidance Syndrome*, SAS) que incluyen un conjunto de respuestas fisiológicas como la elongación de tallos y peciolos, la aceleración de la floración, entre otras. Las plantas cuentan con varios mecanismos moleculares para inducir las respuestas del escape al sombreado. Si bien el phyB es el fotorreceptor más relevante, existen otros

fitocromos, como el phyD y el phyE, que son esenciales para el ajuste preciso de las respuestas asociadas con la elongación del peciolo y el tiempo a floración en las respuestas del escape al sombreado (Devlin et al., 1998; Casal, 2012). Las redes de señalización que se encuentra por debajo de los fotorreceptores incluyen factores de transcripción que regulan la expresión de centenares de genes dependiendo del fotoequilibrio establecido por las variaciones de luz R/RL que rodea a las plantas. Entre los factores de transcripción centrales de la respuesta de escape al sombreado se encuentran los pertenecientes a la familia de PHYTOCHROME INTERACTING PROTEINS (PIF) que aumentan su abundancia en ambientes sombreados cuando los fitocromos están mayormente en su forma Pr desactivados en el citosol. Las bajas relaciones de luz R/RL permite que los factores de transcripción PIFs se acumulen y se unan a los promotores de genes involucrados en la elongación entre otros. Por otro lado, cuando existe una alta relación de luz R/RL, el phyB activo se trasloca al núcleo e interacciona físicamente con los PIFs fosforilándolos y luego degradándolos, evitando la expresión de genes de elongación y otros, y como consecuencia la tasa de crecimiento en hipocótilos, tallos y peciolos se reduce drásticamente debido a la degradación de los PIFs (Casal, 2012). En Arabidopsis, PIF4, PIF5 y PIF7 regulan las respuestas del escape al sombreado. Por un lado, el complejo COP1/SPA, es una E3 ligasa responsable de la degradación de proteínas, actuando como regulador negativo de la fotomorfogénesis. En plántulas bajo condiciones de luz con baja relación de luz R/RL, COP1 se acumula en el núcleo e induce la elongación del hipocótilo (Pacín et al., 2013). COP1 se acumula rápidamente en el núcleo celular cuando las plantas crecen en ambientes sombreados y su regulación transcripcional es parcialmente redundante con los PIFs (Pacín et al., 2016). Por otro lado, existen los reguladores negativos de la elongación del hipocótilo en las respuestas a sombra

como el factor de transcripción LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED (HFR1) que interacciona físicamente con PIF4 y PIF5 activando la expresión de genes de sombra en forma rápida, para luego inhibirlos y evitar respuestas pronunciadas de elongación, la mutante de *hfr1* muestra una promoción exagerada del crecimiento del hipocótilo (Sessa et al., 2005; Lorrain et al., 2008; Hornitschek et al., 2009). Los fenotipos de plantas mutantes de otros factores de transcripción como PIL1, PAR1 y PAR2 son similares al mutante *hfr1* y actúan como reguladores negativos de SAS en ambientes sombreados (Roig-Villanova et al., 2007). Además, PAR1, PAR2 y PIL1 forman heterodímeros inactivos con PIFs inhibiendo las respuestas de escape al sombreado (Roig-Villanova et al 2007; Hornitschek et al., 2009).

Las respuestas de escape al sombreado son reguladas por redes de señalización asociadas con distintas hormonas vegetales destacando las giberelinas, auxinas, etileno y brasinosteroides (BR) que promueven el crecimiento celular, mientras que las hormonas como ácido abscísico (ABA), citoquininas y ácido jasmónico pueden inhibirlas (Yang & Li, 2017; Wang et al., 2020). A modo de ejemplo, en los ambientes de sombra, la acumulación de PIF promueve la expresión de los genes *YUCCA*, que están asociados con la síntesis de la hormona auxina (IAA), mientras que siendo los mutantes nulos *yucca* incapaces de responder a los cambios en la relación de luz R/RL (Hornitschek et al., 2012; de Wit et al., 2016). Por otra parte, en sombra, se induce la expresión localizada del transportador de auxinas PINFORMED 3 (PIN3) para promover la respuesta de elongación (Keuskamp et al, 2010).

1.4. Floración

El éxito reproductivo de las plantas requiere la correcta transición de la fase

vegetativa a la floración. Distintas vías de señalización asociadas a la floración han sido descritas en *Arabidopsis* (Simpson & Dean 2002). Por medio de análisis moleculares y genéticos se han llegado a identificar las principales vías que controlan estrictamente la floración, que son: (i) la vía fotoperiódica, (ii) la vía termosensorial que regula el tiempo de floración en respuesta a los cambios de temperatura ambiental; (iii) la vía autónoma; (iv) la vía de giberelinas (GAs); (v) la edad; (vi) la vernalización (Blázquez et al., 2001; Amasino & Michaels, 2010; Srikanth & Schmid, 2011; Song et al., 2013; Romera-Branchat et al., 2014; Capovilla et al., 2015; Blackman, 2017; Kim, 2020). En esta tesis sólo vamos a detallar algunos aspectos asociados a las vías fotoperiódica, de vernalización y termosensorial.

1.4.1. Respuesta al fotoperiodo en la floración

La percepción de las horas de luz durante el día es un factor importante para que las plantas puedan percibir los cambios estacionales, donde los días cortos (“short-days”, SD) indican invierno y los días largos (“long-days”, LD) indican verano. Los componentes involucrados en la vía fotoperiódica son *CONSTANS (CO)*, *GIGANTEA (GI)*, *FLAVIN KELCH F BOX1 (FKF1)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Putterill et al., 1995; Fowler et al., 1999; Imaizumi et al., 2003). En *A. thaliana*, los niveles de ARN mensajero (mRNA) de *FT* determinan el momento de la aparición del escapo floral. Como planta facultativa de LD, *A. thaliana* muestra una mayor expresión de *FT* en fotoperiodos largos, mientras que en SD muestra una expresión reducida (Searle & Coupland, 2004; Turck et al., 2008).

En un fotoperiodo LD, aumenta la estabilidad de la proteína CO por mayor cantidad de horas de luz (Yanovsky & Kay, 2002; Valverde et al., 2004). CO promueve la floración al iniciar la transcripción de los genes *FT* y *TWIN SISTER OF FT (TSF)*; *TSF* actúa redundante a *FT*. Durante la noche, COP1 y SUPPRESSOR OF

PHYA – 105 (SPA) son abundantes, favoreciendo su interacción física para formar el complejo COP1/SPA que funciona como una E3 ligasa que ubiquitina a CO y dirige su degradación, reduciendo así su abundancia (L. J. Liu et al., 2008). Por otro lado, durante el día, los CRY1 y CRY2 interactúan con COP1 y SPA y evitan la interacción física COP1/SPA con CO. Por lo tanto, los CRY1 y CRY2 facilitan la estabilización de CO favoreciendo a la floración (L. J. Liu et al., 2008). Además, se ha mostrado que las mutantes *cry1* y *cry2* muestran una floración tardía, corroborando la función de los criptocromos en la floración. Por otra parte, el phyB actúa retrasando la floración porque modula la abundancia de CO durante el día. La mutante *phyb* tiene incrementada la abundancia de CO, resultando en fenotipos de floración temprana (Chory & Cerdán, 2003; Halliday et al., 2003). Por otro lado, PHYB suprime a PFT1/MED25, que actúa favoreciendo la expresión de FT en luz (Chory & Cerdán, 2003). Por otro lado, phyA mejora la estabilidad de CO al inhibir la actividad del complejo COP1/SPA. Como es de esperar, la mutante de *phyA* muestra un fenotipo de floración tardía (Yanovsky & Kay, 2002).

En *A. thaliana*, las señales de luz están estrechamente relacionadas con el reloj circadiano (Guerriero et al., 2014). La información de luz percibida por los fotorreceptores es entregada al sistema de reloj circadiano para modular un conjunto de genes involucrados en el proceso de transición hacia la floración (Imaizumi, 2010; Nakamichi, 2011). La red de componentes del reloj circadiano comprende cuatro complejos reguladores que están interconectados formando un red de retroalimentación a nivel transcripcional (Hsu & Harmer, 2014; Shim & Imaizumi, 2015). El complejo al amanecer, contiene a los complejos *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* que son abundantes y directamente suprimen los otros tres complejos del medio día, tarde y

noche (Adams et al., 2015; Gendron et al., 2012). Además, el complejo de medio día contiene varios genes *PSEUDO RESPONSE REGULATOR* (*PRR5*, *PRR7* y *PRR9*); desde la mañana hasta la tarde, las proteínas PRR se expresan abundantemente y actúan reprimiendo la expresión de *CCA1* y *LHY* (Nakamichi, 2011). Como resultado, los genes del complejo de la tarde *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*), *ELF4*, and *LUX ARRHYTHMO* (*LUX*) (Kamioka et al., 2016) se vuelven dominantes durante la tarde, y luego el complejo ELF3/ELF-4/LUX suprimen a los genes PRR del complejo del medio día (Dixon et al., 2011). Finalmente, el complejo de noche incluye al gene *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*), cuya proteína se vuelve abundante durante la noche, y es represora de los anteriores tres complejos (Gendron et al., 2012). A medida que finaliza la noche, la represión mediada por TOC1 es inhibida por la acción de ZEITLUPE (*ZTL*), FKF1, and LOV KELCH PROTEIN 2 (*LKP2*) (Baudry et al., 2010).

1.4.2. Respuesta a las bajas temperaturas: Vernalización

La exposición a semanas de frío acelera la transición a la floración, fenómeno denominado vernalización (Amasino, 2004; Kim et al., 2009; Amasino & Michaels, 2010). A diferencia de la respuesta de aclimatación al frío, la vernalización no se desencadena inmediatamente por un estímulo de frío de corta duración (Amasino, 2004; Amasino, 2005). En *A. thaliana*, la floración es controlada a través de una cascada de factores de transcripción, donde los genes *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*, que actúa como represor de la floración) y *FRIGIDA* (*FRI*, que promueve la expresión de *FLC*) son los principales responsables del retraso de la transición a la fase reproductiva en las accesiones de *Arabidopsis* con requerimiento de frío (Amasino, 2005; Henderson et al., 2003). *FLC* es una proteína MADS-box, cuya

función es suprimir la floración inhibiendo la expresión de los genes *FT*, *SOC1* y *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 15 (SPL15)*, reconociendo directamente los promotores para bloquear su transcripción (Michaels & Amasino, 1999; Deng et al., 2011). Por lo tanto, la inhibición de *FLC* mediada por la vernalización es un requisito previo para la transición floral de la próxima primavera.

1.4.2.1 Procesos que ocurren antes de la vernalización

Previo a las estaciones invernales, la proteína FRI reconoce y se ancla cerca de la región del sitio de iniciación de la transcripción de *FLC*, y se asocia con otros coactivadores transcripcionales para formar con FRI un complejo multiproteico (Supercomplejo- FRI), se establece alrededor del locus de *FLC* con modificaciones de cromatina (trimetilaciones de H3K4 y H3K36) y una topología de *FLC* (5' a 3') que conduce a la formación de mensajeros activos de *FLC*. La expresión de *FLC* genera una rápida elongación y un eficiente *splicing* del premRNAs de *FLC*, resultando en un incremento elevado de *FLC* mRNA que como consecuencia reprime a la expresión de *FT*, que previene la floración (Andrés & Coupland, 2012).

1.4.2.2 Procesos que ocurren durante la vernalización

El frío invernal induce el silenciamiento de *FLC* a través de las proteínas Polycomb (PcG) a través de la vía de vernalización (He & Li, 2018). Las proteínas del PcG se ensamblan en el complejo polycomb repressive complex 2 (PCR2) para depositar la histona trimetil H3 lisina 27 (H3K27me3), lo que compacta la cromatina y resulta en silenciamiento transcripcional de *FLC* (Wood et al., 2006; De Lucia et al., 2008). Además, VIN3-LIKE 1 (VIL1), VERNALIZATION 5 (VRN5) y VIN3 se unen a PRC2 conformando el complejo Plant Homeo Domain PHD (VIN3)-PRC2 que reprime a *FLC* (Sung & Amasino, 2004; Sung et al., 2006) mediante la

trimetilación H3K27 en la cromatina de *FLC* durante la exposición al frío que es necesario para el mantenimiento del silenciamiento de *FLC* después del regreso a temperaturas cálidas. Esto garantiza el silenciamiento de *FLC* durante y después de la exposición al clima invernal (Yuan et al., 2016).

Durante la continua exposición al frío, también se induce la expresión de ARN no codificantes largos (lncARNs) involucrados en el silenciamiento de *FLC*. Existen tres tipos de lncRNA que incluyen COLDAIR (*cold assisted intronic noncoding RNA*), COLDWARAP (*cold of winter-induced noncoding RNA from the promoter*), y COOLAIR (*cold induced long antisense intragenic RNA*). Los tres se transcriben del locus *FLC* (Csorba et al, 2014; Kim & Sung, 2017; Kim et al., 2017). COOLAIR son transcriptos anti-sentido iniciados desde la región 3' en *FLC*, mientras que COLDAIR y COLDWARAP interactúan con *FLC* para silenciarlo durante la vernalización (Kim & Sung, 2017).

Otros factores de transcripción homólogos dentro de la familia de *FLC* también son blancos de la vernalización. Entre ellos, *FLOWERING LOCUS M (FLM)/MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF1)*, *MAF2*, *MAF3*, *MAF4* y *MAF5* actúan como represores florales moderados (Ratcliffe et al., 2003; Capovilla et al., 2015). Por ejemplo, en plantas expuestas al frío durante largos periodos, el PHD-PRC2 se dirige al grupo *MAF1-5* mediando la trimetilación de H3K27, y de esta manera puede silenciar estos genes (Kim & Sung, 2013).

1.4.2.3 Procesos que ocurren después de la vernalización

Al retornar las temperaturas cálidas por el cambio de estación de invierno a primavera, la acumulación de H3K27me3 inducida por el frío se extiende por todo el locus *FLC*, manteniéndose el estado silenciado de la cromatina a través de las

divisiones mitóticas durante el crecimiento y desarrollo (Finnegan & Dennis, 2007; Yang et al., 2017). Esto permite que las plantas “recuerden” su experiencia durante la vernalización, conservando epigenéticamente la cromatina supresora a lo largo de las divisiones celulares, lo que es llamado “memoria epigenética del frío invernal” (He & Li, 2018; Kim et al., 2009). Si bien la expresión de *VIN3* es desactivada (Sung & Amasino, 2004), *VIL1* permanece asociado a PRC2 activando más suavemente la catalización de H3K27me3 sobre la cromatina de *FLC* para mantener desactivado a *FLC* durante las divisiones mitóticas en temperaturas cálidas (Finnegan & Dennis, 2007; Yang et al., 2017).

1.4.3. Transición de la floración por la vía termosensorial en *A. thaliana*

Además de la vernalización, efectos moderados de temperaturas durante el periodo de activo crecimiento pueden afectar la floración por la vía termosensorial (Capovilla et al., 2015; Lutz et al., 2017). *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, *FLC*, *FLOWERING LOCUS M (FLM; MAF1)* y *MADS AFFECTING FLOWERING-2-4 (MAF2–MAF4)* han sido implicados en la vía termosensorial (Gu et al., 2013).

Si bien la expresión de *MAF2* es regulada negativamente por la exposición a largos periodos de frío, también se ha documentado que *MAF2* mantiene su expresión por periodos de frío más cortos. *MAF2* actuaría como represor de la floración inducida por un breve períodos de frío (Helliwell et al, 2006; Li et al., 2008). *MAF2* es capaz de interactuar con *SVP* para reprimir la floración y los mutantes *maf2* tienen una expresión alta de *SOC1* y *FT* (Gu et al., 2013; Ratcliffe et al., 2003). Además, *MAF2* presenta dos isoformas por *splicing* alternativo (*var1* y *var2*), que cambian los niveles de expresión por la temperatura. *MAF2 var1* se forma preferentemente a temperaturas de 4C°, mientras que *MAF2 var2* es favorecido a 21C° (Rosloski et al., 2013).

1.5. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para el estudio de la variación natural

Arabidopsis es una pequeña hierba anual perteneciente a la familia de las brassicáceas. Su primera caracterización taxonómica fue en el siglo XVI por Johannes Thal. Posteriormente, no fue hasta 1943 en un artículo de Federico Laibach, padre de la investigación en *Arabidopsis*, que fue propuesta como especie modelo, debido a su corto ciclo de vida (2-3 meses en invernadero), fecundidad, facilidad de cruce y generación de mutantes (Maarten Koornneef & Meinke, 2010).

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* fue la primera completada en plantas, lográndose en el año 2000 y aportando nuevos conocimientos sobre la genética de las plantas superiores (the *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Recientemente, además se alcanzó el ensamblaje casi completo del genoma de *Arabidopsis* de ~120 Mb en cinco cromosomas (Hou et al., 2022). La amplia disponibilidad de información, metodologías y recursos hacen que esta siga siendo una especie modelo *de facto* para la comunidad científica. *Arabidopsis* permite el descubrimiento rápido y preciso de genes (Bevan & Walsh, 2004; Provar et al., 2016), habiéndose convertido en una planta modelo para el estudio de la variación natural por su amplia distribución geográfica en el hemisferio norte (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002; Hoffmann, 2002) y su rango de distribución más austral documentada en la Patagonia Argentina (Kasulin et al., 2017).

Arabidopsis, muestra una amplia gama de variaciones genéticas y fenotípicas entre las accesiones recolectadas en el campo. La detallada descripción fenotípica de los genotipos recolectados es un pre-requisito para estudios genéticos y moleculares posteriores. La genética cuantitativa ha contribuido a entender la arquitectura genética de los caracteres a partir de la descripción de los fenotipos y la contribución

de los genotipos a la variabilidad observada. El estudio la variación genética natural no sólo busca asociar el fenotipo con el genotipo, sino también contribuir a la identificación de nuevos genes causales de la respuesta fenotípica. La intercepción entre la variabilidad genética y la fenotípica ha permitido abordar áreas asociadas a la evolución y ecología en *Arabidopsis*. En las últimas décadas el estudio de los mecanismos moleculares que mantiene esta variación fenotípica en la naturaleza ha sido abordada con mayor profundidad por el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas.

Para estudiar la variación genética en *Arabidopsis*, se utilizan mapeos genéticos para identificar los loci, por su relevancia y localización, responsables del carácter cuantitativo bajo estudio. El análisis de *Quantitative Trait Loci* (QTL) ha permitido la localización de regiones genéticas asociadas a caracteres fenotípicos importantes. Se han realizado mapeos genéticos con poblaciones biparentales inmortales para floración en las poblaciones de Columbia x Landsberg erecta (Col-0 x Ler) (Mitchell-Olds, 1996), y Wsileswskija x Hannover/Munden (Kowalski et al, 1994). También se han realizado mapeos de QTL para otros caracteres como crecimiento del hipocótilo asociado a diferentes condiciones de luz tanto para desetiación (Borevitz et al., 2002; Loudet et al., 2002; Botto et al., 2003) como para las respuestas de escape al sombreado (Coluccio et al., 2011; Kasulin et al., 2013). En muchos casos, a partir de los mapeos genéticos se identificó el gen causal asociado al carácter bajo estudio como es el caso de *CRY2* para la regulación por el fotoperiodo en la población de Landsberg erecta x The Cape Verde Island (Ler x Cvi) (El-Assal et al., 2001) o *ELF3* en la respuesta de escape al sombreado en la población de Bayreuth x Shadara (Bay x Sha) (Coluccio et al., 2011; Jiménez-Gómez, 2014).

1.6. La accesión de *Arabidopsis* recolectada en la Patagonia

Al comenzar esta tesis, el laboratorio contaba con una accesión de *Arabidopsis* recolectada en la Patagonia, Argentina. Esta accesión fue re secuenciada y los análisis filogenéticos determinaron que es un haplogrupo homogéneo que tiene afinidad genética con las accesiones que provienen de Italia, los Balcanes y el Cáucaso (Kasulin et al 2017). La caracterización fisiológica de Pat, como se llamó a esta accesión, indica que es un genotipo hiposensible a luz tanto en la respuesta de desetiación como en la respuesta de escape al sombreado. Además, se documentó que Pat tiene requerimientos de vernalización para florecer. Es interesante notar, que la hiposensibilidad a la luz fue asociada principalmente a la percepción de los fotones de luz R, respuesta mediada principalmente por el phyB. El alelo de *PHYB*-Pat presenta 4 polimorfismos en la región codificante que pueden ser causales del fenotipo de hiposensibilidad a la luz. Estudios que se hicieron en paralelo al desarrollo de esta tesis demostraron la relevancia funcional de los polimorfismos del *PHYB* en distintas respuestas fotomorfogénicas (Ruiz et al., 2022). Por otra parte, mediante RT-qPCR, se demostró que la expresión *FLC* en Pat es alta sin vernalización y disminuye con vernalización lo que promueve la expresión de *FT*. Estos resultados sugieren que la floración tardía en Pat es mediada por la señalización de FLC.

Los mecanismos ecológicos y genéticos que promueven la adaptación local siguen siendo aún poco descriptos (Kawecki & Ebert, 2004). En este proyecto, se investigó la variabilidad genética natural en las respuestas de desetiación, escape al sombreado y floración utilizando una población biparental de 163 RIL (líneas recombinantes y endocriadas) entre las accesiones Columbia (Col-0) y Patagonia (Pat). Como parte importante de los resultados de esta tesis se describe la construcción y el desarrollo del mapa genético de la nueva población

de mapeo para la identificación, validación y caracterización de los loci asociados con las respuestas de las plantas a la luz y a la vernalización.

1.7. Objetivos e Hipótesis

1.7.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es estudiar la variación genética natural en las respuestas a la luz y a las señales fotoperiódicas y vernalización en una población de mapeo de dos accesiones contrastantes de *Arabidopsis thaliana*

1.7.2. Objetivos específicos

- 1.** Generar una población de mapeo de líneas recombinantes y endocriadas (RIL) entre Col-0 y Pat.
- 2.** Construir el mapa genético de la población de mapeo generada en el objetivo específico 1.
- 3.** Identificar los loci de caracteres cuantitativos (QTL) vinculados a las respuestas fotomorfogénicas de desetiología de plántulas.
- 4.** Identificar los loci de caracteres cuantitativos (QTL) vinculados a las respuestas de escape al sombreado.
- 5.** Identificar los loci de caracteres cuantitativos (QTL) vinculados a las respuestas al fotoperíodo y vernalización.
- 6.** Generar nuevos genotipos de familias de líneas introgresadas heterocigotas (HIFs) y líneas cercanas introgresadas (NILs).
- 7.** Validar los loci más relevantes identificados en los objetivos específicos 3, 4 y 5 mediante HIFs y NILs obtenidas en el objetivo específico 6.
- 8.** Estudiar las bases genéticas y funcionales del QTL *VERNI*.

1.7.3. Hipótesis

1. QTL para la respuesta de desetiología de plántulas se mapean en la población de RILs entre Col-0 y Pat porque las líneas parentales de la población de mapeo tienen fenotipos contrastantes.
2. La hiposensibilidad a la luz de Pat es explicada por polimorfismos de genes fotomorfogénicos que mapean en QTL identificados en las respuestas de desetiología y escape al sombreado.
3. QTL de vernalización se mapean en la población de RILs entre Col-0 y Pat porque las líneas parentales de la población de mapeo son contrastes en la respuesta de floración.
4. Los requerimientos de vernalización de Pat son explicados por polimorfismos de genes de floración que mapean en los intervalos de confianza de los QTL identificados.
5. La colocación de QTL para fotomorfogénesis y vernalización ocurre porque un mismo gen causal controla ambas respuestas fisiológicas.

1.8. Estructura de la tesis

La tesis se estructura en cinco capítulos. El capítulo 1 (Introducción General) se introducen los conceptos de la temática a estudiar en la tesis con la documentación bibliográfica asociada. El capítulo 2 (Generación y caracterización de la población de 163 líneas endocriadas y recombinantes entre Col-0 y Pat) se enfoca en la construcción y validación de la población de 163 líneas endocriadas y recombinantes (RIL) que provienen de las accesiones Columbia (Col-0) y Patagonia (Pat) de *Arabidopsis*. El capítulo 3 (Identificación y validación de QTL en respuesta a la luz en la población de mapeo de Col-0 y Pat) trata sobre el estudio de QTL asociados al proceso de la desetiología y a la respuesta de escape al sombreado en la población

de mapeo generada en el capítulo 2. Además, se aportan evidencias independientes que confirman los QTL más relevantes del mapeo a través de la generación y caracterización de los genotipos provenientes de las familias de líneas endocriadas y heterogéneas (HIFs). En el capítulo 4 (Identificación y validación de QTL asociados al fotoperiodo y a la vernalización en floración en la población de mapeo de Col-0 x Pat) se desarrollan mapeos de QTL asociados con la floración inducida por fotoperiodo y vernalización en la población de mapeo generada en el capítulo 2. Además, se construyeron líneas isogénicas y cercanas (NIL) para confirmar el QTL de vernalización más relevante por HIF y NILs. Además, se hicieron estudios comparativos de floración y desetiología para caracterizar el QTL más relevante en ambas respuestas. Finalmente, en el capítulo 5 (Discusión General) se discute el cumplimiento de los objetivos planteados en la tesis y la confirmación o rechazo de las hipótesis planteadas en el capítulo 1. El capítulo 5 concluye con los aportes de la tesis al conocimiento de la temática y las futuras investigaciones que se podrían generar a partir de los descubrimientos de esta tesis.

CAPÍTULO 2: Generación y caracterización de la población de 163 líneas endocriadas y recombinantes entre Col-0 y Pat.

2.1. Introducción

Las poblaciones de *Arabidopsis* crecen en climas y hábitats muy diferentes en todo el mundo, incluidos los entornos antropogénicos como campos agrícolas, muros de piedra y bordes de caminos, así como sitios alterados naturalmente como laderas rocosas y bosques mediterráneos (Hoffmann, 2002; Hoffmann et al., 2005). La amplia y constante variación climática y ambiental en su rango ecológico nos indica que *Arabidopsis* está perfectamente adaptada a entornos locales, y se presume que parte de la variación intraespecífica observada para muchos rasgos podría reflejar una variación adaptativa.

La variabilidad genética se puede estudiar mediante el uso de genotipos alterados artificialmente como las líneas mutantes. Lamentablemente, las colecciones de mutantes actualmente disponibles se han obtenido utilizando un número limitado de accesiones de *Arabidopsis*, como Col-0 (Columbia), Ler (Landsberg erecta), Ws (Wassilevskaja) y C24, que solo abarca una pequeña porción de la variabilidad estimada a nivel de especie (Alonso-Blanco et al., 2009). Por lo tanto, la variación natural es un recurso complementario relevante para descubrir funciones genéticas novedosas, así como variantes alélicas que interactúan con el fondo genético y/o medio ambiente, o alelos que muestran pequeños efectos en el fenotipo (Benfey & Mitchell-Olds, 2008). El estudio de la variabilidad genética natural en *Arabidopsis* ha proporcionado un amplio número de genes y polimorfismos de nucleótidos responsables de en variadas respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos como así también a respuestas morfológicas y bioquímicas, entre otras (Alonso-Blanco et al., 2005).

Las bases genéticas de la variación natural están determinadas por enfoques genéticos cuantitativos, que en la práctica consisten en análisis de *loci* de rasgos cuantitativos (QTL), donde la variación fenotípica se asocia con la variación alélica de marcadores moleculares; es decir la correlación de marcador genético y fenotipo (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). El mapeo de QTL permite identificar el número y la posición genómica de los *loci* que controlan un rasgo, estimar los efectos aditivos, detectar las interacciones ambientales y detectar los efectos epistáticos entre QTL. Posteriores estudios con herramientas genéticas y moleculares pueden ayudar a identificar la variante alélica que es causativa de un fenotipo. Para ello se requiere el mapeo fino del *loci* de interés para reducir la región física que contiene el gen responsable para luego a través de aproximaciones transgénicas en un fondo mutante nulo del gen en cuestión validar el polimorfismo causal del fenotipo (Borevitz & Chory, 2004; Koornneef et al., 2004).

El análisis de QTL puede ser llevado a cabo utilizando poblaciones de mapeo biparentales como F2 y *Back-Cross* (BC). Este tipo de poblaciones han sido usadas para el análisis de QTLs en algunos caracteres (Kowalski et al., 1994; Werner et al., 2005), pero necesitan ser genotipadas en cada estudio debido a su alta heterocigosidad. Las poblaciones de líneas recombinantes y endocriadas (RIL) provienen de la cruce de dos líneas contrastantes que luego por sucesivas autofecundaciones se obtiene una población F6 o F7 cuyas líneas auto-fecundantes son altamente homocigotas. Es por ello que las poblaciones RIL son llamadas también poblaciones inmortales por tener muy baja heterocigosidad y, en consecuencia, pueden propagarse indefinidamente para ser utilizadas repetidamente en mapeos de QTLs (Takuno *et al*, 2012). Para mapear QTLs es necesario asociar el fenotipo con su genotipo. Por ello la población de RIL debe ser genotipada para

generar el mapa genético de la población mediante marcadores moleculares o más recientemente mediante técnicas de resecuenciación genómica con marcadores moleculares conocidos como SNP por su sigla en inglés “*Single Nucleotide Polimorphism*”. Las poblaciones RILs son las poblaciones de mapeo más comunes utilizadas en *Arabidopsis*, donde existen actualmente más de 50 publicadas y disponibles, derivadas de más de 24 accesiones parentales (Alonso-Blanco et al. 1998; Deslandes et al., 1998; O. Loudet et al., 2002; Clerkx et al., 2004; Mouchel et al. 2004; Magliano et al., 2005; Törjék et al., 2006; El-Lithy et al., 2006; Simon et al., 2008).

A la fecha de inicio de esta tesis, nuestro laboratorio había realizado estudios fisiológicos que demostraron que Pat es una accesión con poca respuesta a la luz y con altos requerimientos de frío para florecer. Además, se secuenció el genoma de cuatro genotipos Pat recolectados en cuatro hábitats ecológicos distintos en las cercanías de la Ciudad de los Antiguos en el noroeste de la Provincia de Santa Cruz. Estos estudios revelaron que sólo una pequeña fracción del genoma es segregante y que su probable sitio de origen sería Italia y/o los países del Caúcaso/Balcanes (Kasulin et al., 2017). Estas características definen a Pat como un genotipo interesante para explorar las bases genéticas y moleculares que explican los fenotipos observados cuando fue introducida en la Patagonia probablemente con la inmigración europea a principios del siglo XX. En este capítulo se describe la construcción de una nueva población de 163 líneas recombinantes endocrinas (RILs) entre Col-0 y Pat. La accesión Col-0 fue elegida línea de referencia por tener un fenotipo contrastante con Pat en las respuestas a la luz y a la vernalización.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1 Material Vegetal

La generación de una población de líneas recombinantes y endocriadas (RIL) a partir de las accesiones Columbia (Col-0) y Patagonia (Pat) procede a través de híbridos descendientes de una semilla. La población biparental entre Col-0 y Pat originalmente comprendió 181 líneas independientes de 6^{ta} generación genotipadas usando secuenciación masiva. Las líneas parentales y la población RIL fueron depositados en el centro de Arabidopsis de Nottingham: N2110026 (RILs), N2109973 (Pat), y N2109974 (Col-0).

2.2.2. Extracción de ADN para la secuenciación de la población de mapeo

La extracción de ADN del material vegetal fue realizada usando el método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Posteriormente, la población RIL y los parentales se secuenciaron en baja profundidad de pequeños intervalos por secuenciación de nueva generación (NGS, *Next-Generation-Sequencing*). Las bibliotecas de NGS se prepararon de acuerdo al protocolo de transposasa Tn5 (Reznikoff, 2008), con multiplexación de muchas muestras en un carril único secuenciado en una plataforma HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). Se secuenciaron las librerías para 181 RILs de 6^{ta} generación más 3 bibliotecas individuales en cada parental Col-0 y Pat. Las lecturas se mapearon al genoma de referencia TAIR10 utilizando BWA (Li et al., 2009; Li, 2013) con parámetros predeterminados, mientras los llamados de polimorfismos de simple nucleótido (SNP, *single-nucleotide-polymorphism*) se realizaron siguiendo el protocolo GATK (McKenna et al., 2010) como es descrito en Pisupati et al. (2017). La secuenciación de las líneas se hizo en colaboración con Daniele Filiault del laboratorio de Gregor Mendel de Viena. Los datos obtenidos

fueron depositados en ArrayExpress1 con número E-MTAB-10387, <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-10387/>.

2.2.3. Construcción del mapa genético de la población de mapeo

La construcción del mapa genético requiere la recuperación de un conjunto de SNP fiables de los genotipos parentales. Con ese objetivo, se utilizaron los archivos de mapeo de las tres bibliotecas disponibles en cada accesión, que luego se filtraron para el llamado de homocigotas. En primer lugar, se eliminaron los SNP que potencialmente podrían presentar heterocigotas espurias, debido a la existencia de heterocigotos en bibliotecas parentales por errores de secuenciación, o heterocigotos que resultan del mapeo subóptimo en elementos transponibles repetitivos. Posteriormente, estas variantes fueron llamadas en cada una de las RILs, filtrando los SNP resultantes para incluir solo aquellos con frecuencias poblacionales entre el 40% y 60%, con excepción del cromosoma IV donde el intervalo de umbrales fue más amplio (explicado más abajo). El llamado de cada genotipo se infirió a partir de las variantes utilizando los modelos de Markov implementados dentro del paquete HMM (Himmelmann, 2015), prediciendo así el genotipo en cada posición polimórfica. La llamada de genotipo se afinó luego mediante el agrupamiento de SNP, estableciendo intervalos consecutivos de 100 kilobases (Kb) de coordenadas cromosómicas físicas. El genotipo de cada intervalo estuvo determinado por la mayoría de SNPs sea parental Col-0 o Pat, descartándose ventanas con ninguna mayoría y/o menos de 10 variantes. Posteriormente, se eliminaron los marcadores binarios (Col-0 o Pat) que presentaban más del 25% de las observaciones faltantes, así como aquellos con una frecuencia inusual, manteniendo la frecuencia alélica entre 35% y 65% en todas las líneas. Estos umbrales usados fueron tomados arbitrariamente para maximizar la cantidad de marcadores que se usaron posteriormente. Luego de tener definida la

cantidad de marcadores se construyó el mapa de ligamiento por cromosoma usando el software MST (Wu et al., 2008). Los argumentos usados en el software para ajustar el mapa de ligamiento fueron: (i) Tipo de función: Kosambi, (ii) Tipo de población: RILs de sexta generación, (iii) *Logarithm of the odds* (LOD): grupo de ligamiento único, (iv) número de líneas en la población: 163, (v) tamaño del mapa: 2, (vi) umbral de datos faltantes: 25%, (vii) umbral de distancia de mapeo: 5 cM.

El mapa genético ensamblado presento 920 marcadores informativos entre los cinco cromosomas. Para evitar un inflado artificial por el alto número de marcadores disponibles en la distancia en cM en cada cromosoma, las distancias genéticas de la salida del MST se corrigieron con la función quickEst del paquete ASMap (Taylor and Butler, 2017). En estos análisis se eliminó la porción superior del cromosoma IV (~ 49%) debido a una severa distorsión de segregación (ver más abajo). El mapa genético obtuvo una salida final y definitiva de 920 marcadores informativos.

2.2.4. Validación de la distribución alélica de los marcadores del brazo superior del cromosoma IV

La inusual distribución de frecuencias de marcadores en el brazo superior del cromosoma IV fue validada utilizándose marcadores adicionales de secuencia polimórfica implicada cortada (CAPS, *cleavage-amplified-polymorphic-sequence*) (Konieczny & Ausubel, 1993). Los cebadores fueron generados en diferentes posiciones de la primera porción del cromosoma IV para confirmar el genotipo esperado en las generaciones RIL, evaluándose mediante la técnica de PCR. Las condiciones de PCR fueron 45 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 C°, 30 segundos de *annealing* a 57 C° y 45 segundos de extensión a 72 C° (Cuadro 1.1). Los alelos Col-0 y Pat en cada una de RIL fueron identificados utilizándose enzimas

de restricción específicas (*EcoRI* y *BamHI*).

Cuadro 1.1: *Primers* CAPS usados para evaluar la distorsión de segregación en el cromosoma IV.

	Ubicación	Enzimas	Cebador (5' a 3')	Cebador inverso (5' a 3' opuesto a la hebra)
I D	en el cromosom a IV	de restricció n		
P 1	1791198 bp	BamHI	GCCCGACCTTCTACAGCT	TCCTGTTTTGCCCTCTCCC
P 2	2024691 bp	EcoRI	GCCAGCCCTAAACGACGT	CCATCCATGACTGCTCCGT
P 3	2997579 bp	EcoRI	GCTGTAGAGAGTGGGCTG C	CGTGGAGCTTCTGGGATC TC
P 4	7290161 bp	EcoRI	ACCACCACTACCAGTACT CT	ACGCAATGCAAAACCCTG G

2.2.5. Experimentos fisiológicos en la población de mapeo de 163 RILs

Las semillas se sembraron en un medio de agar al 0,8 %, se estratificaron en la oscuridad a 5 °C durante 4 días, y luego se expusieron a un pulso de luz roja de 2 h. Posteriormente, las semillas se mantuvieron 24 h en la oscuridad para lograr una germinación homogénea, luego las cajitas transparentes con plántulas fueron colocadas en un fotoperiodo de 14h(luz)/10h(oscuridad) de luz blanca (PAR: 110 R/FR: 1.1) durante dos días para la completa desetiología de las plántulas. Al tercer día se iniciaron los tratamientos con KNO₃ (20 mM) o NaCl (100 mM). Al quinto día, las plántulas fueron fotografiadas para medir la longitud del hipocótilo con el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Los experimentos en los tratamientos de KNO₃ y NaCl, con sus respectivos controles, tuvieron tres repeticiones independientes. En cada tratamiento se midieron las 10 plántulas más altas por RIL, mientras que las líneas parentales se usaron como control midiendo al menos 40

plántulas por replica, es decir un total de 30 plántulas por RIL y 120 para los parentales.

2.3. Resultados

2.3.1. Construcción de la población de 163 RIL entre Col-0 y Pat

La generación de una nueva población de mapeo RIL biparental de la cruce entre Col-0 y Pat se obtuvo con las líneas descendientes de la F1 que segregaron por autofecundación hasta la sexta generación (Figura 2.1). En F6, se cosechó ADN de todas las líneas generadas para su secuenciación.

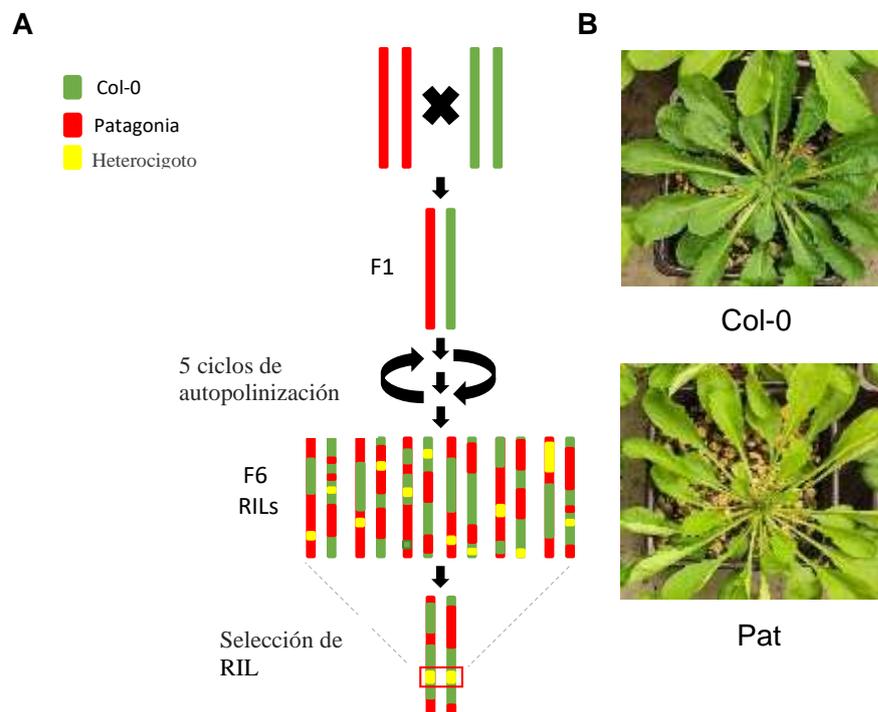


Figura 2. 1: Construcción de la población RIL. (A) La población resulta del cruce entre las accesiones Col-0 y Pat a partir de una F1 híbrida, prosiguiéndose a construir las siguientes generaciones por segregación de una semilla hasta la sexta generación (F6), donde el porcentaje de heterocigosis teórico sería menor al 5%. (B) Parentales Col-0 y Pat en condiciones de crecimiento a 22 °C en un fotoperiodo 8/16 (luz/oscuridad), foto tomada a los 40 días.

2.3.2. Construcción del mapa genético de la población de 163 RIL entre Col-0 y Pat

La secuencia genética de las RILs F6 y las líneas parentales fueron exploradas por secuenciación de nueva generación (NGS) con lecturas cortas y a baja profundidad, con la finalidad de construir un mapa genético de ultra-alta densidad. Utilizamos los polimorfismos informativos para obtener marcadores genéticos en intervalos de 100kb en los cinco cromosomas. La frecuencia genética de los marcadores a nivel de la población global se ajustó al 35-65% de homocigocidad para cada parental, presentando menos del

10% de los marcadores en heterocigosis (figura 2.2.A). Por último se realizó un plot para comprobar la frecuencia de recombinación entre los marcadores y con el fin de evaluar si existe más de un grupo de ligamiento por cromosoma. Los resultados obtenidos muestran que el mapa genético generado tiene un solo grupo de ligamiento por cada uno de los cinco cromosomas y una fuerte frecuencia de recombinación entre los pares de marcadores (Figura 2.2.B).

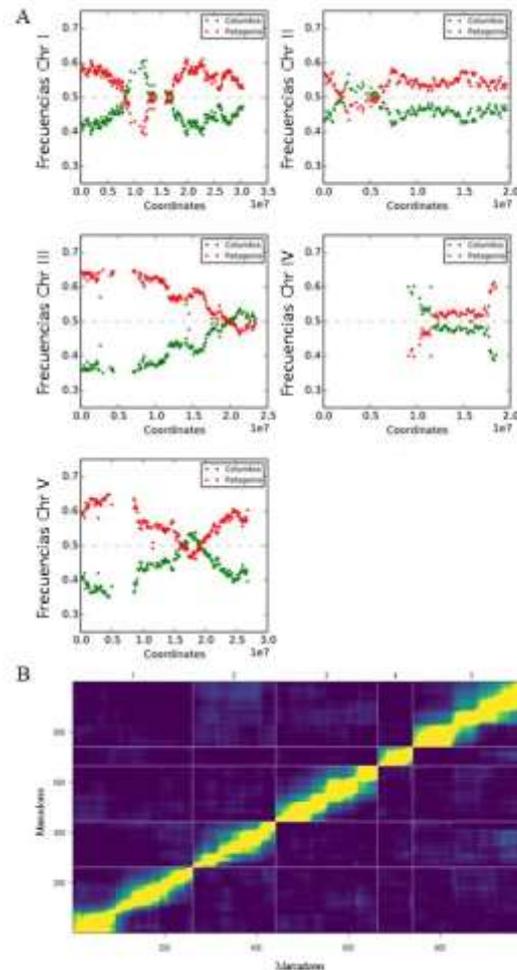


Figura 2. 2: (A) Caracterización genética de la población de mapeo de 163 RIL entre Col-0 x Pat. La frecuencia alélica para cada marcador genotipado en la población para cada cromosoma de Arabidopsis. Las figuras muestran la distribución de marcadores, y como la segregación de Col-0 y Pat (color verde y rojo, respectivamente) está entre 0 (no presencia) y 1 (100% de presencia). En todos los cromosomas, los marcadores se clasificaron para los alelos Col-0 o Pat entre 35 y 65% de ocurrencia, con la excepción de la primera porción del brazo del cromosoma IV (datos no mostrados). (B) La fracción de recombinación y la puntuación LOD. Los pares de marcadores de la población RIL se muestran en los triángulos superior izquierdo e inferior derecho, para los cinco cromosomas. Una alta correlación entre los marcadores indica un mayor vínculo del marcador mostrarse en amarillo, mientras que una correlación baja entre marcadores se muestra de color azul. Los 920 marcadores disponibles se asignan numéricamente y se colocan en orden genético físico, mientras que cada cromosoma está limitado por las líneas blancas verticales y horizontales.

2.3.3. Confirmación de la segregación alélica del brazo superior del cromosoma IV.

Se testearon las líneas F1 híbridas e individuos elegidos al azar de progenies posteriores, así como parentales que se replicaron en paralelo. Los resultados confirmaron el correcto ensamblaje de la población, siendo la F1 estrictamente heterocigota en las cuatro ubicaciones probadas con CAPS, mientras que en las generaciones posteriores presentaron alelos heterocigotos u homocigotos, como se esperaba (Figura 2.3 A-B). En los análisis de PCR con CAPS incluimos algunas RILs. La selección de RILs se hizo con herramientas bioinformáticas para seleccionar las líneas más informativas a partir de los datos de secuenciación. Se seleccionaron las líneas RIL153, 216 y 238 que segregan con el alelo Pat y las líneas RIL76, 111, 202 que segregan con el alelo Col-0 (Figura 2.4). Los resultados de las PCR y su análisis en geles de poliacrilamida confirman los datos bioinformáticos.

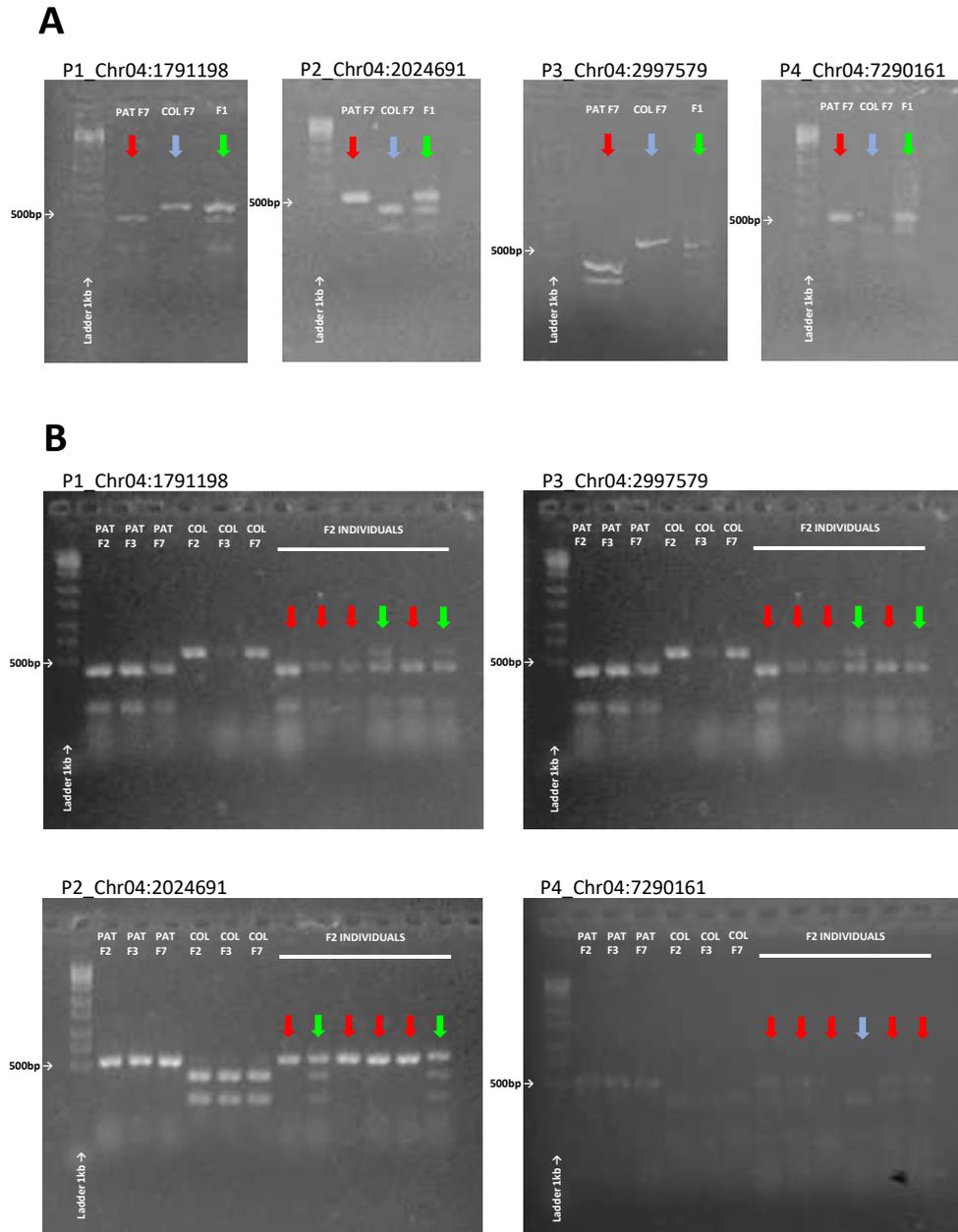


Figura 2. 3: Evaluación de la segregación por PCR CAPS en los alelos del cromosoma IV en cuatro posiciones en individuos Col-0, Pat, F1 y F2. (A) la figura muestra geles para cada uno de los cuatro marcadores CAPS con puntos de restricción específicos, los parentales en la generación F7 (expandida al mismo tiempo que la población RIL) y en heterocigosis el individuo F1 original en las cuatro coordenadas del cromosoma IV. (B) segregación en F2 en 6 individuos RIL para las coordenadas anteriores. Las flechas apuntan a los genotipos inferidos (Rojo = Pat, Azul = Col 0, Verde = heterocigoto). Se utilizaron diferentes enzimas de restricción: BamHI para P1 y EcoRI para P2 a P4.

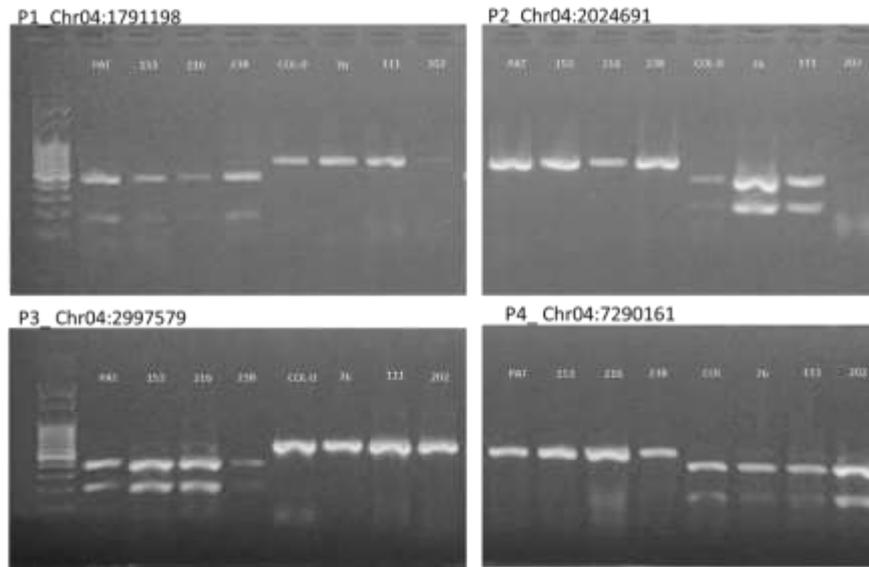


Figura 2. 4: Evaluación de la segregación por PCR CAPS en los alelos del cromosoma IV en cuatro posiciones en RILs. La figura muestra alelos homocigos parentales y RILs que segregan con el alelo Col o Pat en la segunda porción del cromosoma IV.

2.3.4. Descripción del mapa genético de la población de mapeo de Col-0 y Pat

Luego de confirmar una correcta construcción de la población RIL, así como una correcta distribución de alelos en los todos los cromosomas (exceptuando la primera porción del cromosoma IV), se decidió excluir a los marcadores correspondientes a ciertas micro-regiones regiones que también presentaban cierta distorsión de segregación (por encima del 65%). El mapa genético finalmente se construyó con 920 marcadores informativos robustos utilizando el algoritmo de árboles de expansión mínimos (Wu et al., 2008). Se obtuvo una distancia genética total corregida de 400,84 cM, comparable con anteriores reportes (Serin et al., 2017), una distancia promedio entre marcadores (considerando los 5 cromosomas) de 2.29 cM, y un ventana máxima promedio de 4.67 cM (Cuadro S2.1). El orden de los marcadores en el mapa genético se usó para realizar un análisis de ligamiento de marcadores por pares mostrando correspondencia a través de los cromosomas (Figura 2.2B).

Finalmente se analizó la distribución de los marcadores a lo largo de los cinco cromosomas en cM, con la finalidad de corroborar si se formaban agrupaciones o

solapamientos entre marcadores en las 163 RILs, evitando marcadores con la misma posición en cM. Se puede apreciar que existe un mayor apilamiento de marcadores en la mitad del cromosoma III, mientras que en los otros cromosomas se muestra levemente la cercanía entre marcadores (Figura 2.5.A). En el caso del cromosoma IV, sólo se muestra la distribución de marcadores de la segunda mitad del cromosoma (Figura 2.5.A). Paralelamente se evaluó la cantidad de marcadores informativos en los cinco cromosomas. Se muestra que de las 163 RILs el 55% segregó con el alelo Pat y el 45% con el alelo Col-0 (Figura 2.5.B).

Cuadro 2.1: Resumen de los marcadores utilizados en cada cromosoma para contruir el mapa genético de la población RIL entre Col-0 x Pat.

Cromosoma (Chr)	Marcador	Longitud total(cM)	Distancia promedio (cM)	Ventana máxima (cM)
chr 1	260	102.82	2.53	4.02
chr 2	180	94.19	1.91	2.99
chr 3	184	83.85	2.19	5.47
chr 4	77	34.26	2.25	3.27
chr 5	219	85.71	2.55	7.64
Total	920	400.84	2.29	4.67

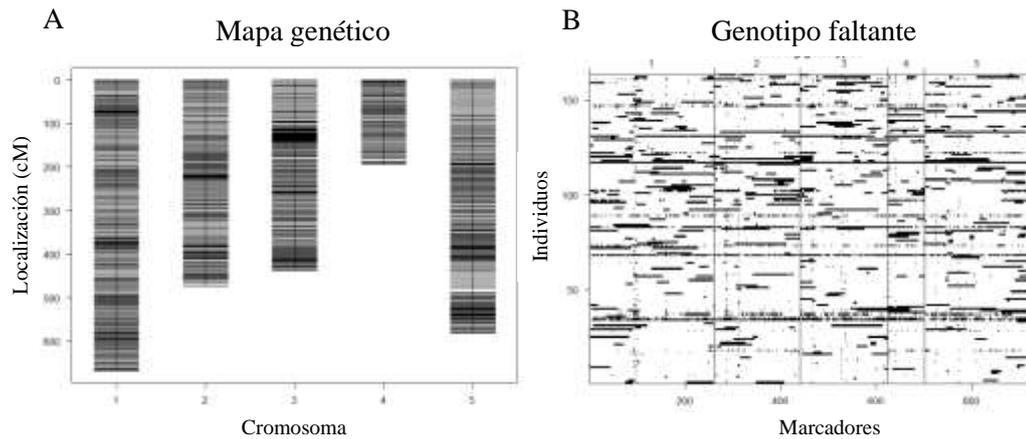


Figura 2. 5: Localización, ausencia y presencia de marcadores. (A) El gráfico muestra la posición del marcador en centimogans (cM) en función de los cinco cromosomas (ejes x), sólo se muestra la porción del cromosoma IV sin distorsión de segregación. Las barras horizontales en el gráfico representan la posición del marcador en el mapa genético. En algunas áreas, hay marcadores saturados en el mapa. (B) El gráfico ilustra datos de genotipo de 920 marcadores (ejes x) en los cinco cromosomas (divididos por líneas verticales negras) con puntos negros para 163 individuos de población entre Col-0 y Pat (eje y). De los 163 RIL, el 55 % se segregó como Pat y el 45 % se segregó como Col-0 (líneas heterocigóticas no incluidas).

2.3.5. Experimentos fisiológicos en la nueva población de mapeo entre Col-0 y Pat

Habiendo generado una población de mapeo, se evaluó si caracteres fenotípicos se distribuirían cuantitativamente entre las 163 RILs en condiciones de laboratorio. Para ello, se analizó la longitud del hipocótilo en condiciones ambientales donde el fenotipo es contrastante entre los parentales, como la disponibilidad diferencial de nitrógeno (KNO₃) y la alta concentración de NaCl (Figura 2.6). La distribución de fenotipos aproximadamente normal en las RILs, con casos de líneas con un fenotipo menor o superior a los parentales (transgresoras) respecto a los parentales Col y Pat (Cuadro S2.2, Figura 2.7), sugiere que la nueva población de mapeo de 163 RIL entre Col-0 y Pat es una excelente herramienta para identificar QTL asociados a caracteres cuantitativos.

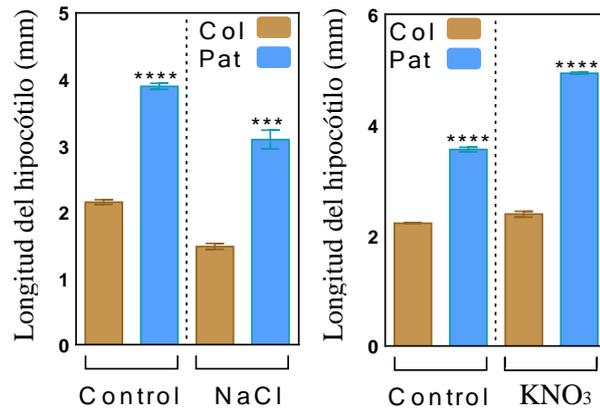


Figura 2. 6: Evaluación del fenotipo en la elongación del hipocótilo entre Col-0 y Pat. Las plántulas estuvieron creciendo dos días antes de empezar el tratamiento, la mitad fueron transferidas a un medio con NaCl (100mM) y la otra mitad a KNO₃ (20 mM) durante 3 días, la longitud del hipocótilo fue medida al quinto día de edad en Col-0 y Pat. Las barras muestran (n=3) \pm SE, mientras que las estrellas indican diferencias significativas entre ambos parentales en cada tratamiento analizado por la prueba de *t-Student* (****p-valor <0,0001).

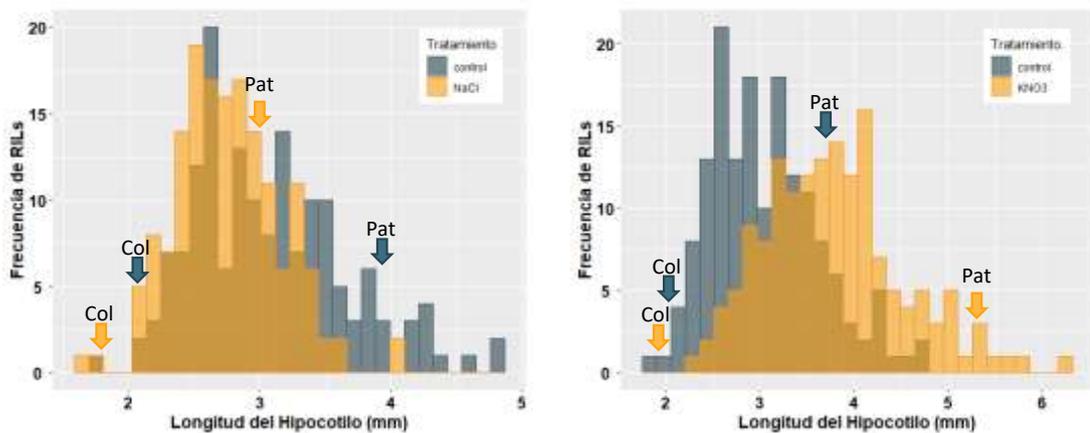


Figura 2. 7: Evaluación del fenotipo de la población RIL en tratamientos de NaCl y KNO₃ para el carácter del largo del hipocótilo. Las plántulas crecieron bajo las mismas condiciones hasta finalizar el segundo día de edad, donde se empezaron los tratamientos de KNO₃ (20 mM) o NaCl (100 mM) hasta el quinto día. Los histogramas muestran la distribución de la población RIL.

2.4. Discusión

En este capítulo se han reunido evidencias genéticas y fisiológicas que confirman que la nueva población de 163 RIL generada a partir de las accesiones Col-0 y Pat son un recurso genético de calidad para hacer posteriores mapeos de QTL de caracteres de interés. La selección de Col-0 y Pat como líneas parentales de esta nueva población de mapeo se fundamentó en que previamente se habían documentado rasgos contrastantes para la respuesta a la luz en plántulas y en los requerimientos de vernalización para florecer (Kasulin et al., 2017).

En esta tesis, se muestran los resultados de la construcción de una población de 163 RIL F6 entre Col-0 y Pat y el desarrollo del mapa genético asociado que contiene 920 marcadores altamente informativos de densidad alta con una distancia promedio entre marcadores de 2.295 cM para los cinco cromosomas (Cuadro S2.1). Si bien la mayoría de las regiones genómicas mapeadas tienen una segregación parental entre 35% y el 65% (Figura 2.2 A), se observó una distorsión de segregación para la primera porción de cromosoma IV (brecha de 9.100.000 Kb), donde los alelos de Col-0 se encontraron ampliamente sobrerrepresentados. Esto no sería debido a una incorrecta construcción de la población, ya que se demostró que los alelos en el híbrido F1 son estrictamente heterocigotos en todas las posiciones probadas; mientras que en la F2 se encontraron aleatoriamente alelos heterocigotos u homocigotos, como sería esperable por una segregación similar a la Mendeliana (Figura 2.3). La presencia del área de distorsión de segregación en el cromosoma IV incluye una inversión paracéntrica previamente reconocida (Fransz et al., 2016). A pesar del impacto que tienen las inversiones sólo existen pocas publicaciones del tema (Fransz et al., 2016; Zapata et al., 2016). Los eventos de segregación alélica distorsionada en poblaciones de mapeo, evidenciados por el desmesurado aumento de la frecuencia alélica de una línea parental específica durante la

generación de RILs pueden ser comunes y se han documentado como consecuencia de incompatibilidades parentales que conducen a problemas de fertilidad/esterilidad (Alonso-Blanco et al., 1998; Loudet et al., 2002; Törjék et al., 2006). Por otro lado, se sabe que los eventos de inversión en las regiones suprimen de maneras más drástica para la recombinación meiótica, en consecuencia, se espera que el intercambio genético entre los dos alelos de una inversión se minimice (Kirkpatrick, 2010). Esto podría explicar la distorsión de segregación 3 a 1 a favor de Col. Otro aspecto que causan las inversiones es que también pueden generar problemas estructurales con la meiosis, como ocurre con algunas inversiones pericéntricas pudiendo tener efectos deletéreos.

Un aspecto favorable de las inversiones en plantas es el caso en el que puede generar una ventaja adaptativa (Kirkpatrick, 2010). De hecho, se han informado los efectos ventajosos de las inversiones cromosómicas. Por ejemplo, la contribución de una inversión a la adaptación local (Fang et al., 2012; Lowry & Willis, 2010). Las inversiones parecen ser la variante estructural cromosómica a gran escala más común en las poblaciones naturales. Estudios recientes han vinculado a la inversión de cromosoma IV en 170 acciones de Europa y el norte de América (Alonso-Blanco et al., 2016), además se encontró por medio de un análisis de SNP el origen de la inversión para el sureste europeo y el alelo *FRI*-Col al noreste de Europa, y la asociación entre la fertilidad y la sequía (Fransz et al., 2016). Estos últimos datos sugieren que es posible que el origen de la inversión paracéntrica de la accesión Pat sea la misma a la que pertenece al sureste europeo, región a la cual se asocia el haplogrupo al que pertenece Pat según los datos publicados por Kasulin et al., 2017. En esta región del cromosoma IV donde se encuentra la inversión se localiza *FRIGIDA* (*FRI*) que es un regulador positivo de *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) el cual regula negativamente la floración. Los primeros estudios en *Arabidopsis* identificaron un alto *Linkage disequilibrium* (*LD*) en la parte superior del

brazo pequeño del cromosoma IV asociado con la pérdida de función el gen *FRI* (Nordborg et al., 2002). Existen múltiples mutaciones nulas de *FRI* y sustituciones de aminoácidos en el alelo *FRI* así como múltiples sustituciones (Shindo et al., 2005). Shindo et al., (2005) evaluó 176 accesiones e identificó 104 accesiones con alelos funcionales de *FRI*. Dentro de las 104 accesiones, 88 tienen alta expresión del gen *FLC* y solo 16 accesiones expresan bajos niveles de *FLC*. Ambos grupos generaron fenotipos de floración temprana y tardía; indicando que altos niveles de *FRI* y *FLC* se requieren para el retraso de la floración. Curiosamente el alelo *FRI*-Pat tiene dos sustituciones en la posición 46 aa y 148 aa, los cuales son reportados por Shindo et al., 2005. Estas sustituciones podrían estar asociadas con la floración tardía observada en Pat.

La población de 163 RIL entre Col-0 x Pat generada en esta tesis es un nuevo recurso genético que puede ser valioso para identificar genes o variantes alélicas involucradas en distintas redes de señalización como respuestas al estrés biótico o abiótico, o algún futuro rasgo de interés. El estudio de la arquitectura genética de caracteres de interés puede ayudar a identificar las bases genéticas y moleculares de rasgos adaptativos asociados a la variación fenotípica que pueden estar relacionados con la adaptación y/o aclimatación de *Arabidopsis* en la Patagonia.

CAPÍTULO 3: Identificación y validación de QTL en respuesta a la luz en la población de mapeo de Col-0 y Pat

3.1. Introducción

Las poblaciones de mapeo son herramientas valiosas para estudiar la variación natural presente en la naturaleza. En particular, las poblaciones inmortales de líneas recombinantes y endocriadas a partir de dos líneas parentales (RILs) han sido muy útiles para identificar nuevos genes involucrados en las respuestas de las plantas a su ambiente en *A. thaliana*. Por ejemplo, estudios de floración en la población de mapeo entre Ler x Cvi de *A. thaliana* identificaron el *EDI* QTL como responsable de la percepción del fotoperiodo en día corto. El mapeo fino del *EDI* QTL usando aproximaciones genéticas y moleculares demostraron que el gen causal del *EDI* QTL es el fotorreceptor de luz azul criptocromo 2 (*CRY2*) Mediante transgénesis de las dos versiones polimórficas del gen *CRY2* en Ler y Cvi en el fondo mutante *cry2*, se demostró que un cambio aminoacídico entre valina (Ler) por metionina (Cvi) en la posición del aminoácido 367 es responsable causal de una versión alélica rara que es insensible al fotoperiodo en floración en la línea Cvi de Arabidopsis (El-Assal et al., 2001). Además, la variación natural de *CRY2* es responsable de la apertura de cotiledones en respuesta a la luz rojo-lejana mediada por el *phyA* (Botto et al., 2003). Otras poblaciones de mapeo fueron muy informativas para identificar QTLs fotomorfogénicos en los tratamientos de luz azul, rojo, rojo lejano y luz blanca así como su control en oscuridad (Borevitz et al., 2002; Botto et al., 2003; Wolyn et al., 2004; Magliano et al., 2005; Loudet et al., 2008). Por ejemplo, los mapeos genéticos permitieron identificar QTLs significativos donde colocalizan genes de relevancia para la respuesta de desetiación en plántulas de Arabidopsis, como *TZP* (Olivier Loudet et al., 2008) y para la respuesta de escape al sombreado como *ELF3* (Jimenez-Gomez et al 2010; Coluccio et al., 2011) en la población de mapeo de Bay x Sha de Arabidopsis.

Las respuestas a luz en las poblaciones naturales son muy variables y dependen de la cantidad, calidad y fotoperiodo lumínicos, por lo que comprender la arquitectura genética de caracteres fotomorfogénicos puede ser de gran interés. La accesión Pat recientemente recolectada en una de las zonas más australes de su rango de distribución global es un recurso genético novedoso de interés para ser explorado en las bases genéticas y moleculares de las respuestas a la luz. Las evidencias fisiológicas y moleculares sugieren que la accesión Pat es hiposensible en respuesta a la luz (Kasulin et al., 2017). Para indagar en las respuestas a la luz de Pat, en este capítulo de la tesis identificamos y caracterizamos QTL asociados a la luz en la nueva población de mapeo de 163 RIL entre Col-0 y Pat descrita en el capítulo 2. En particular, estudiamos las respuestas de desetiología y escape al sombreado. Una vez identificados los QTL de interés, caracterizamos los *loci* más relevantes mediante herramientas genéticas adicionales. Al final del capítulo, en la discusión se discute que los resultados obtenidos en esta tesis son valiosos para en un futuro poder caracterizar funcionalmente los genes responsables de las respuestas hiposensibles a la luz de la accesión Pat.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Material Vegetal

Se usó la población de mapeo Col-0 x Pat RIL de 163 líneas y sus dos líneas parentales Col-0 y Pat. Además, se usaron las líneas mutantes nulas de TANDEM ZINC KNUCKLE PROTEIN (TZP) (*tzp-1* y *tzp-2*) en el fondo Col-0 (Zhang et al., 2018) y ABA DEFICIENT 1 (ABA1) (*aba1-1-NW21-* y *aba1-6-CS3772-*) en los fondos genéticos de Ler y Col-0, respectivamente. Incluimos en algunos de los experimentos de este capítulo las accesiones: Ting-1 (CS76612), Tamm-2 (CS76610), Tamm-27 (CS77341), Sq-1 (CS77266), Got-22 (CS76884), Chat-1 (CS76463), y Ts-1 (CS76615) que comparten polimorfismos con el alelo *TZP*-Pat; y RRS-10 (CS76592), Ag-0 (CS76430), Pna-17 (CS76575), Dem-4 (CS76794) y Ts-1 (CS76615) que comparten polimorfismos con el alelo *ABA1*-Pat.

3.2.2. Diseño y condiciones experimentales

Las semillas se sembraron en un medio de agar al 0,8 %, se estratificaron en la oscuridad a 5 °C durante 4 días, y luego se expusieron a un pulso de luz roja de 2 hs. Posteriormente, las semillas se mantuvieron 24 hs. en la oscuridad para lograr una germinación homogénea. Para los experimentos de desetiación, las plántulas se expusieron durante 5 días a luz roja continua (Rc; 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), luz roja lejana continua (RLc; 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o luz continua luz azul (Bc; 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); realizándose en paralelo un tratamiento de oscuridad (Osc) como control. La cantidad de luz se midió a 660 nm (R), 730 nm (FR) y 470 nm (B) con el espectroradiómetro SpectroSense2/2 + meter (Skye Instruments Ltd., Powys, Reino Unido).

Por otro lado, se realizaron experimentos para evaluar la respuesta de escape al sombreado en la población de mapeo entre Col-0 y Pat. Las semillas fueron tratadas de igual manera que los experimentos de desetiación descritos previamente. Una vez que

las semillas germinaron después de 24hs en oscuridad a 25 °C, las cajitas transparentes con plántulas fueron colocadas en un fotoperiodo de 14h(luz)/10h(oscuridad) de luz blanca durante dos días para la completa desetiología de las plántulas. El tratamiento de luz blanca (WL) consistió en tubos fluorescentes combinado con focos de luz incandescente para simular la relación de luz rojo: rojo-lejano presente en la naturaleza (PAR= 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, R/RL = 1,1). Al tercer día, se establecieron dos tratamientos lumínicos para evaluar la respuesta de escape al sombreado. La mitad de las cajitas con los genotipos se mantuvieron en la condición de luz blanca con una relación de luz R: RL= 1,1, mientras que la otra mitad de las cajitas con plántulas fueron colocadas debajo de un filtro verde (LEE Filters, <http://www.leefilters.com>) que simula la luz de sombra debajo de un canopeo. El tratamiento de sombreado (SA) reduce la radiación fotosintéticamente activa (PAR=14), y los fotones de luz roja y azul reduciendo la relación R/RL (R=0,27, RL = 2,72, B= 1.20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plántulas fueron sometidas a las condiciones de WL por cinco días cuando se evaluó el crecimiento del hipocótilo.

Al finalizar los experimentos de desetiología y escape al sombreado, las plántulas fueron fotografiadas para medir la longitud del hipocótilo con el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Los experimentos de desetiología y escape al sombreado, con sus respectivos controles, tuvieron tres repeticiones independientes en el tiempo. En cada fecha, y en cada tratamiento lumínico, se midieron las 10 plántulas más altas por RIL y 40 plántulas de las dos líneas parentales. Se estimó el valor de cada réplica como el valor promedio de 10 plántulas. En total, se midieron los hipocótilos de 30 plántulas por RIL y 120 para los parentales. Además, se obtuvieron los datos relativos de longitud del hipocótilo en cada condición lumínica relativizada por los valores promedios del tratamiento de oscuridad (Rc/Osc, Bc/Osc, RLC/Osc). En el experimento de escape al sombreado, se estimó el

índice de respuesta al sombreado como el valor relativo entre la respuesta en sombra y en luz blanca (SA/WL). Los datos fueron analizados estadísticamente por ANOVA.

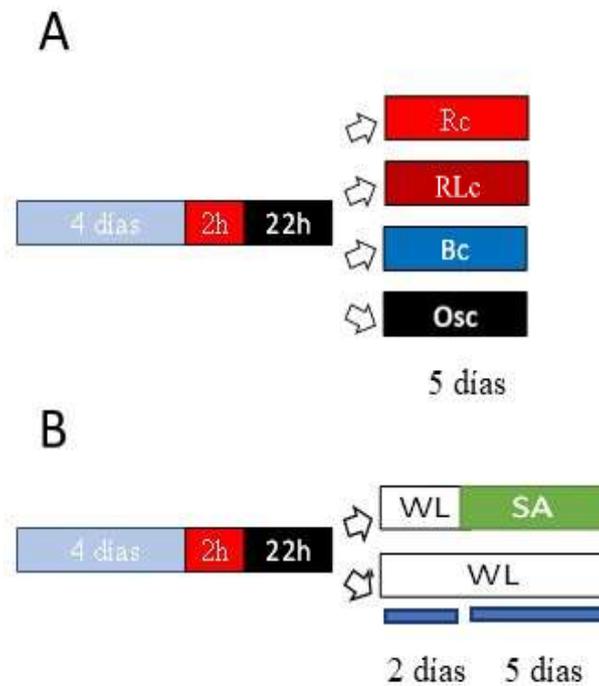


Figura 3.1: Esquema de los experimentos de desetiología (A) y escape al sombreado (B) en plántulas de la población RIL Col-0 y Pat.

3.2.3. Mapeo de QTLs

Los datos fenotípicos de los dos experimentos de desetiología y respuesta de escape al sombreado fueron procesados en forma independiente (Cuadro S3.2). El análisis estadístico se analizó con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2001). Se estimó el cuadrado medio (MS) de ANOVA, el cuadrado medio del genotipo (MSG, entre el componente de varianza de línea RIL para cada tratamiento), el cuadrado medio residual (MSE, componente de varianza del error residual), la varianza genotípica (GV: MSG menos el cuadrado medio del residual que se divide por el número de repeticiones), la varianza fenotípica (PV: MSG dividido por el número de repeticiones) y la heredabilidad en sentido amplio (H^2 ; promedio de la varianza genética dividido por PV).

Para realizar el mapeo de QTL, los datos fenotípicos fueron sujetos a la

transformación de la biblioteca Box Cox de MASS para convertir residuos fenotípicos no normales en una distribución normal con homocedasticidad (Venables y Ripley, 2002). Con el paquete lme4 (Bates et al., 2015), extrajimos los valores ajustados del mejor modelo calculando los BLUEs (*best-linear-unbiased-estimates*) y los BLUPs (*best-linear-unbiased-predictions*). Estos datos se utilizaron para el mapeo de QTL, realizado con el paquete R/qtl (Arends et al., 2010). Eliminamos los marcadores no informativos con la función drop.nullmarkers, usamos la función est.rf para estimar las fracciones de recombinación por pares entre todos los pares de marcadores y las graficamos, y aplicamos la función calc.genoprob para calcular las probabilidades condicionales del genotipo dados los datos del marcador multipunto observado, con posible concesión de errores de genotipado. Posteriormente, se aplicó el mapeo de intervalos compuestos (CIM) con el método "hk" (Knott & Haley, 1992) para calcular las coordenadas del intervalo genético y la puntuación LOD. El LOD se consideró significativo con un $\alpha < 0,1$ después de 10.000 permutaciones realizadas con la función n.perm, mientras que el % de variabilidad explicada (Var) se obtuvo ajustando un modelo de múltiples-QTL utilizando la función fitqtl (Arends et al., 2010). Los QTL recibieron el nombre del tratamiento de luz indicando con números la relevancia del QTL con respecto al LOD y/o el % de variabilidad explicado.

3.2.4. Construcción de HIF

Se construyeron familias de líneas endocriadas y heterogéneas, HIFs (del inglés, *heteroneous inbred lines*) a partir de las RILs 20, 71, 88 y 136. Estas líneas muestran dentro del intervalo de confianza del QTL heterocigosidad en un fondo genético homogéneo. Para la obtención de las HIFs, la segregación dentro del QTL de interés se identificaron los alelos homocigotos usándose marcadores CAPS específicos (Cuadro S3.1).

3.2.5. Construcción de HIFs de los QTL más relevantes

Para confirmar la presencia y los efectos alélicos en los *Rcl* QTL y *Bcl* QTL, desarrollamos líneas endocriadas y heterogéneas (HIF) a partir de RILs individuales que aún se segregan para confirmar la presencia y los efectos alélicos en *Rcl* QTL y *Bcl* QTL (Tuinstra et al., 1997; Laserna et al 2008). La progenie de la sexta generación RIL autofecundada que presenta áreas heterocigotas abarcando esos QTLs de interés (inferidos de la secuenciación de la población RIL), seleccionamos las RIL88 y RIL136 para *Rcl* QTL, y las RIL20 y RIL71 para *Bcl* QTL. Utilizamos marcadores moleculares *Cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS) para genotipar dentro y fuera de los intervalos QTL, recuperando la séptima generación homocigota informativa. Las condiciones de PCR fueron 45 ciclos de 30s 94°C desnaturalización; 30 s, 72°C hibridación; y 45 s, 72°C extensión, mientras que los cebadores están disponibles en el Cuadro S3.4. Las HIF se evaluaron en experimentos de desetiología junto con Col-0 y Pat como controles, siguiendo los protocolos experimentales descritos en la sección previa.

3.2.6. Identificación de los genes candidatos de los QTL más relevantes

Para seleccionar genes candidatos en los intervalos *Rcl* QTL y *Bcl* QTL, primero reconocimos genes relacionados con la luz dentro de cada intervalo QTL utilizando genes cuya función ha sido confirmada en trabajos publicados previamente o aquellos cuya función es inferida gracias a bases de datos de *Gene Ontology Annotations*. Las publicaciones seleccionadas para esta búsqueda fueron Bae & Choi, 2008; Casal, 2013; Chen & Chory, 2011; Stamm & Kumar, 2010; Xu et al., 2015 y Wang et al., 2020. Al no tener evidencia *a priori* de que la variación fenotípica se basa en la expresión diferencial o en variantes estructurales, nos enfocamos en analizar los SNPs específicos de Pat para

cada gen, tomando como referencia la anotación funcional de los polimorfismos derivada del software SnpEff (<https://pcingola.github.io/SnpEff/>). Los polimorfismos se agruparon en categorías de alto impacto funcional, como variantes con cambio de sentido (*missense variant*), variante donante de empalme (*splice donor variant*), variante aceptora de empalme (*splice acceptor variant*), codón inicial perdido (*start lost*), codón de terminación ganado (*stop gained*) y codón de terminación perdido (*stop lost codon*) (Cingolani et al., 2012).

3.3. Resultados

3.3.1. Variabilidad natural en la respuesta de desetiología y en la respuesta de escape al sombreado en Col-0 y Pat

Kasulin et al. (2017) demostraron que Col-0 y Pat tienen fenotipos contrastantes durante la desetiología de las plántulas de *Arabidopsis*. En esta tesis, confirmamos que la elongación del hipocótilo de Pat es mayor que Col-0 cuando las plántulas son expuestas por 5 días a los tratamientos de luz Rc, RLc y Bc (Figura 3.2). Los fenotipos fotomorfológicos más contrastantes entre accesiones se observaron en Rc (Col-0 = $6,36 \pm 0,33$ mm y Pat = $11,75 \pm 0,38$ mm). En el tratamiento control en oscuridad continua (Osc), la longitud del hipocótilo también fue significativamente diferente entre las accesiones (Col-0 = $14,22 \pm 0,2$ mm y Pat = $16,22 \pm 0,13$ mm). Para estandarizar la respuesta de desetiología por luz, calculamos la respuesta de inhibición del hipocótilo en relación con la oscuridad (es decir, Rc/ Osc en Col-0 = $0,45 \pm 0,02$ mm y Pat = $0,72 \pm 0,02$ mm). Además, encontramos diferencias significativas, aunque menores, para la respuesta de inhibición del hipocótilo en RLc (Col-0 = $3,24 \pm 0,12$ mm y Pat = $5,85 \pm 0,19$ mm) y Bc (Col-0 = $2,95 \pm 0,08$ mm y Pat = $3,98 \pm 0,06$ mm) (Figura 3.2 y Cuadro S3.3). Estos resultados confirman que la accesión de Pat es hiposensible a la luz, y la respuesta es particularmente significativa en el tratamiento de luz Rc (Figura 1 y Kasulin et al., 2017).

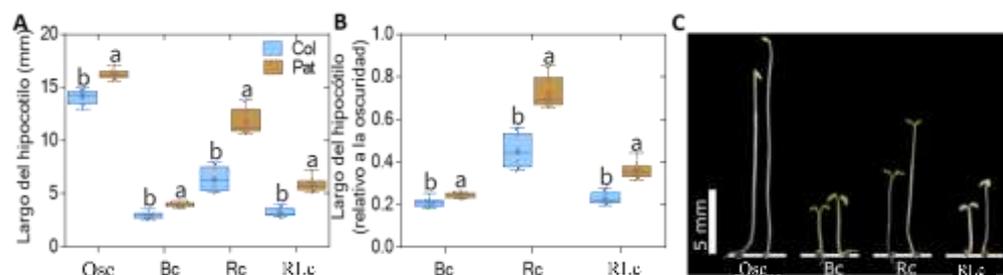


Figura 3.2: Longitud del hipocótilo en tratamientos desetiología en plántulas en Col-0 y Pat. Longitud del hipocótilo como (A) absoluta o (B) relativa a la oscuridad (Osc) para las accesiones Col-0 y Pat en luz continua Rc, RLc y Bc. Los datos se muestran como medias y Error Estándar, las diferencias significativas entre las medias se indican con letras diferentes (prueba LSD, valor de $p < 0,05$). (C) La foto muestra plántulas representativas en cada tratamiento de luz.

En el experimento de la respuesta de escape al sombreado, las plántulas fueron expuestas a luz blanca (WL) y sombra (SA) por 5 días luego de la completa desetiología por dos días en luz blanca. En estas condiciones lumínicas también corroboramos que la accesión Pat muestra una menor respuesta de escape al sombreado (Figura 3.3). El largo del hipocótilo de las dos accesiones fue de 2.19 ± 0.03 mm para Col-0 y 3.45 ± 0.38 mm para Pat en luz blanca. En el tratamiento de sombra, la longitud del hipocótilo también fue significativamente diferente entre las accesiones: Col-0 = 4.63 ± 0.14 mm y Pat = 5.99 ± 0.09 mm siendo el índice de respuesta de escape al sombreado (SA/WL) significativamente mayor para Col-0 con respecto a Pat (2,2 y 1,73 para Col-0 y Pat, respectivamente).

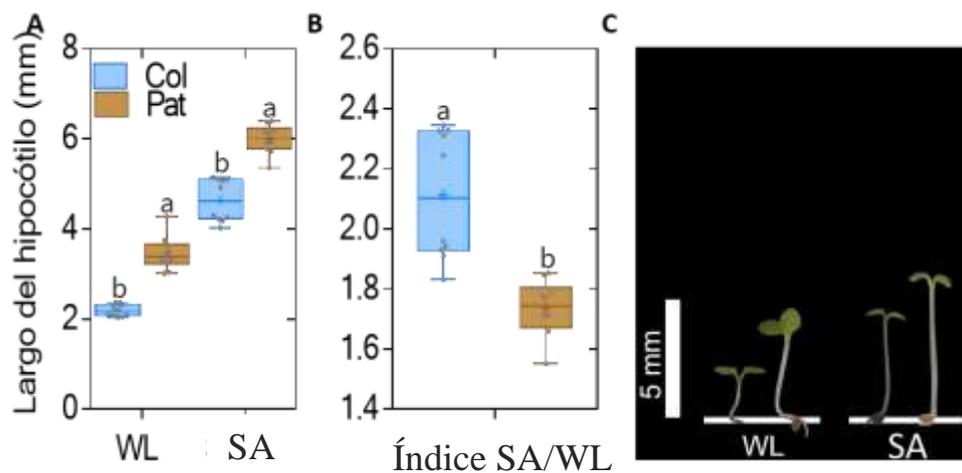


Figura 3.3: Longitud del hipocótilo en tratamientos luz y sombra simulada en plántulas en Col-0 y Pat. Longitud del hipocótilo como (A) absoluta o (B) SA índice (SA/WL) para las accesiones Col-0 y Pat. Los datos se muestran como medias y Error Estándar, las diferencias significativas entre las medias se indican con letras diferentes (prueba LSD, valor de $p < 0,05$). (C) La foto muestra plántulas representativas en cada tratamiento de luz.

Las respuestas fotomorfogénicas contrastantes entre las accesiones Col-0 y Pat sugieren que el mapeo de QTL en la nueva población de 163 RIL generada entre ambos genotipos puede ser una excelente herramienta genética para explorar la arquitectura genética de los rasgos relacionados con el crecimiento de la planta en diferentes entornos de luz.

3.3.2. Mapeo de QTL en la respuesta de desetiación y escape al sombreado en la población de mapeo de RILs

Teniendo en cuenta los resultados de la sección anterior, decidimos diseñar dos experimentos de gran escala para mapear QTLs para la desetiación de plántulas y para la respuesta de escape al sombreado. En el primer experimento de desetiación las plántulas fueron expuestas a la luz Rc, RLc, Bc y Osc por 5 días. Se evaluó el largo del hipocótilo al finalizar los tratamientos lumínicos (Cuadro S3.2). La población RIL mostró una amplia transgresión en todos estos rasgos (Figura 3.3). Se observó una amplia variación fenotípica en la longitud del hipocótilo para las plántulas RIL en todos los tratamientos, siendo más importante en la oscuridad (RIL max-min: 18,94-9,32) y Rc (RIL max-min: 14,07-5,11) (Figura 3.4 y Cuadro S3.3). Por otra parte, los caracteres evaluados mostraron valores elevados de heredabilidad. En los tratamientos lumínicos de Rc, RLc, Bc y oscuridad, el índice de heredabilidad en sentido amplio (H²) estuvo entre 0,73 y 0,95; lo que sugiere que una alta proporción de la variación fenotípica se explica por el componente genético en el experimento de desetiación (Cuadro S3.3).

En el segundo experimento de escape al sombreado, las plántulas fueron primero desetiadas por dos días en luz blanca y después fueron expuestas a la luz blanca, y sombra por cinco días adicionales. Se evaluó el largo del hipocótilo al finalizar los tratamientos lumínicos (Cuadro S3.1). La respuesta de las RILs a los tratamientos de WL y SA muestra un rango amplio de variabilidad fenotípica para el largo del hipocótilo que va de 4,3 mm a 1,75mm en WL y 6,63 mm a 3,41 mm en SA (Figura 3.5). La heredabilidad en WL y SA fue de 71% y 83%, respectivamente, indicando que el fenotipo observado está mayoritariamente determinado por el componente genético (Cuadro S3.4). Estos resultados sugieren que los datos fenotípicos obtenidos en ambos experimentos podrían ser informativos para la identificación de QTL asociados a los procesos fotomorfogénicos de desetiación y a la respuesta de escape al sombreado en

Arabidopsis.

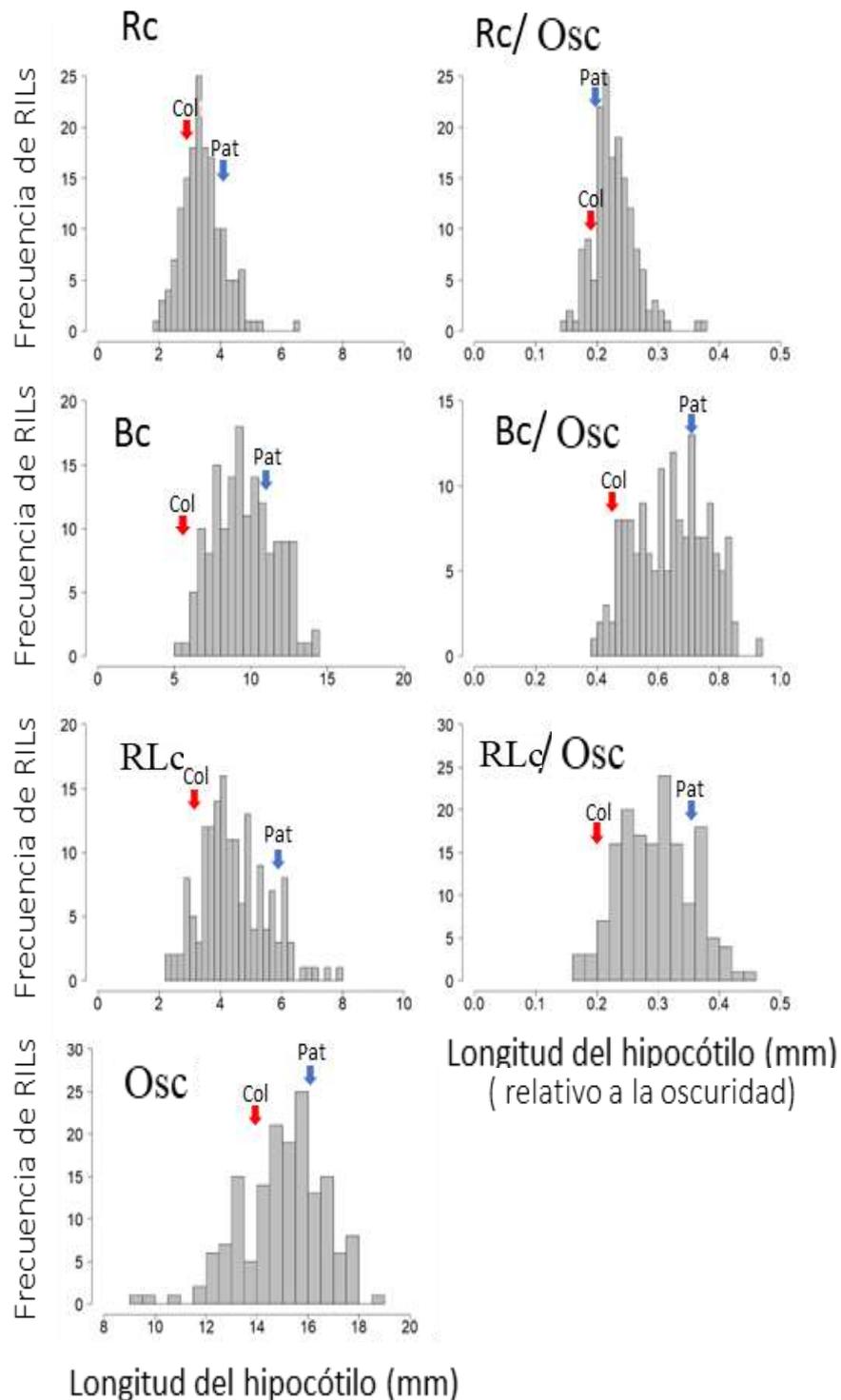


Figura 3.4: Distribución de plántulas en la población RIL. Las figuras muestran la distribución longitud de largo del hipocótilo (mm) en condiciones de luz de Rc, Bc, RLc de luz y el control en oscuridad. Además, se muestra el valor relativizado en cada tratamiento de luz, las flechas roja y azul indican la respuesta de Col-0 y Pat respectivamente.

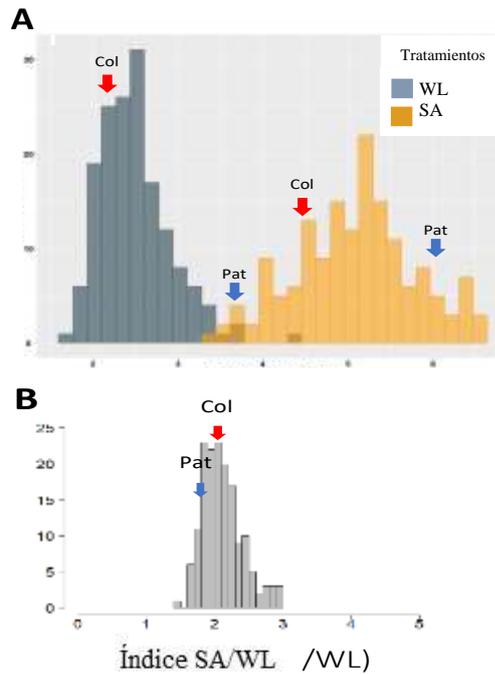


Figura 3.5: Distribución de plántulas en la población RIL en respuesta a la luz blanca y sombra. Las figuras muestran la distribución longitudinal del hipocótilo (mm) en condiciones WL y SA. Además, se muestra el valor índice de la relativización (SA/WL), las flechas roja y azul indican la respuesta de Col y Pat respectivamente.

En el experimento de desetiación, se mapearon siete QTLs para los tratamientos lumínicos de Rc, RLc, Bc y oscuridad (Figura 3.7, Figura S3.1 y Cuadro S3.5). El más significativo de los QTL de desetiación fue *Rc1* QTL que mapeo para los tratamientos de Rc y Rc/ Osc en el medio del cromosoma V (LOD = 9,4, Var = 22%). *Bc1* QTL se mapeó para Bc, RLc y Osc en el brazo inferior del cromosoma V (LOD = 8, Var = 16%). Los efectos aditivos de ambos QTLs indican que los alelos Pat aumentaron la longitud del hipocótilo. Por otra parte, *RLc1* QTL se mapeó en el brazo superior del cromosoma V, aumentando la respuesta el alelo Col-0 (LOD = 6,5 y Var = 16%). Además, otros QTLs de menor relevancia fueron (i) *Bc2* QTL y *DARK1* QTL que se mapearon en el cromosoma III para Bc y Osc, respectivamente; (ii) *Bc3* QTL que se mapeó para Bc/ Osc en el cromosoma IV; y (iii) *Rc2* QTL que se encontró para Rc/ Osc en el medio del

cromosoma II (Figura S3.1 y Cuadro S3.5).

Por otra parte, en el experimento de escape al sombreado se identificaron cuatro QTLs para los tratamientos de WL, SA e índice SA/WL. Un QTL mapeo en la condición de sombra y colocalizó con *SHADE1* QTL. *WL1* y *WL2* QTL mapearon en los cromosomas V y II respectivamente en el tratamiento de luz blanca (Figura 3.7, Figura S3.1 y Cuadro S3.6). Para el índice de respuesta al sombreado estimada como SA/WL se mapeo *SARI* QTL en el cromosoma II que contiene en su intervalo de confianza al gen *PHYB*. Curiosamente, el gen *PHYB* de Pat tiene varios polimorfismos en su región promotora y codificante cuando se lo compara con la accesión de referencia Col-0. Los estudios de la secuencia de *PHYB* de Pat indican que tiene una inserción de dos nucleótidos en la posición -390 y una delección de 8 nucleótidos en la posición -414/421. En la región codificante de *PHYB* de Pat se encontró una delección de cuatro aminoácidos en la posición Δ 13-16 y tres sustituciones no sinónimas, una en la región amino terminal y otras dos en la región carboxi terminal (I143L, V980I y L1072V) (Ruiz et al., 2022).

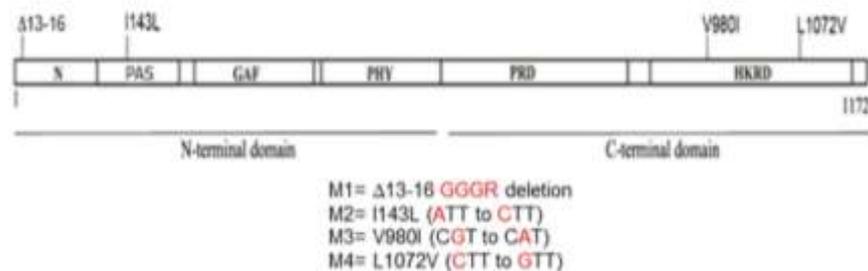


Figura 3.6: Polimorfismos de *PHYB* entre Col-0 y Pat. El diagrama muestra los cuatro polimorfismos en los dominios N y C terminal, de Ruiz et al., 2022.

Curiosamente, un QTL que mapea en el brazo inferior del cromosoma V colocaliza para la respuesta de desetiología y escape al sombreado. *Bc1* QTL y *SHADE* QTL colocalizan para los tratamientos Bc, RLC, Osc y sombra sugiriendo que ambas respuestas fotomorfogénicas pueden estar bajo control de un mismo *loci* y potencialmente reguladas por el mismo gen.

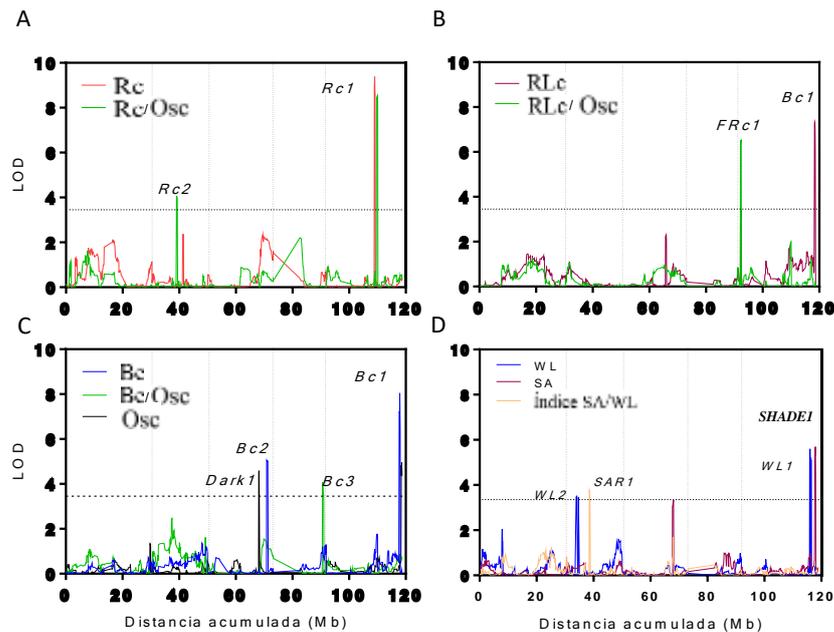


Figura 3.7: Mapeo de QTLs en plántulas. Se mapeo en los caracteres de (A) Rc y Rc/oscuridad, (B) RLC y RLC/oscuridad, (C) Bc, Bc/oscuridad y el control en oscuridad, (D) luz blanca (WL) y sombra simulada (SA) e índice de respuesta al sombreado (sombra/luz blanca).

3.3.3. Confirmación de *Rc1* QTL y *Bc1*/*SHADE* QTL en las HIFs en las respuestas de desetiología y escape al sombreado

Con el fin de validar los QTLs más relevantes se usaron familias de líneas heterogéneas y endocriadas (HIF), construyéndose dos familias de líneas HIF independientes por QTL, segregando en los intervalos de interés *Rc1* QTL y *Bc1* QTL. Usamos las RIL88 y RIL136 con heterocigosidad dentro del intervalo de confianza del *Rc1* QTL. Posteriormente seleccionamos líneas homocigóticas que segregaron cada una como uno de los dos parentales, usando marcadores CAPS específicos, y obteniéndose en la siguiente generación dos alelos homocigotos por parental y por familia de HIF

independientes. Cultivamos las plántulas de ambas HIF y evaluamos la longitud del hipocótilo en Rc y Rc/ Osc, para confirmar los efectos positivos de los alelos Pat en el *Rc1* QTL. La respuesta promedio de las plántulas de las HIF88 y HIF136 fue de $6,8 \pm 0,13$ mm y $7,4 \pm 0,1$ mm para las líneas con alelos Col-0, y $10,7 \pm 0,19$ mm y $10,1 \pm 0,22$ mm para las líneas con alelos Pat, respectivamente (Figura 3.8A). Los efectos aditivos de las dos familias de HIFs fueron confirmados para los tratamientos Rc/ Osc, que mapea en *Rc1* QTL (Figura 3.8A). Si bien *Rc1* QTL no fue mapeado en los tratamientos Bc y RLc, decidimos evaluar si los efectos aditivos de HIF88 y HIF136 eran confirmados en esas condiciones lumínicas. La condición lumínica de Bc no provocó un fenotipo diferencial consistente, mientras que RLc manifestó una respuesta consistente para el alelo Pat en ambos HIF, obteniendo una mayor longitud del hipocótilo (Figura S3.2 A). Estos resultados sugieren que *Rc1* QTL es confirmado como un *loci* relevante en la respuesta de desetiación mediada por los fitocromos pero no por los criptocromos, que perciben los fotones de luz azul.

Se llevó a cabo el mismo enfoque experimental para confirmar los efectos aditivos del alelo Pat en *Bc1* QTL con las familias de HIFs generadas a partir de las RIL20 y RIL71 que presentan heterocigosidad dentro de esta región cromosómica. Los fenotipos de las HIF20 y HIF71 que portan los alelos Pat para *Bc1* QTL aumentaron significativamente la longitud del hipocótilo de las plántulas en los tratamientos Osc, Bc, RLc, y SA en comparación con las líneas que portaban alelos Col-0 (Figura 3.8 B, Figura 3.9). Se analizó además en la condición lumínica Rc para completar el conjunto de experimentos, pero no proporcionó fenotipo informativo alguno (Figura S3.2 B). Estos resultados sugieren que *Bc1/SHADE* QTL es relevante en las respuestas de desetiación y escape al sombreado mediadas por los criptocromos y fitocromos probablemente a

través de cambios en la relación de R/FR.

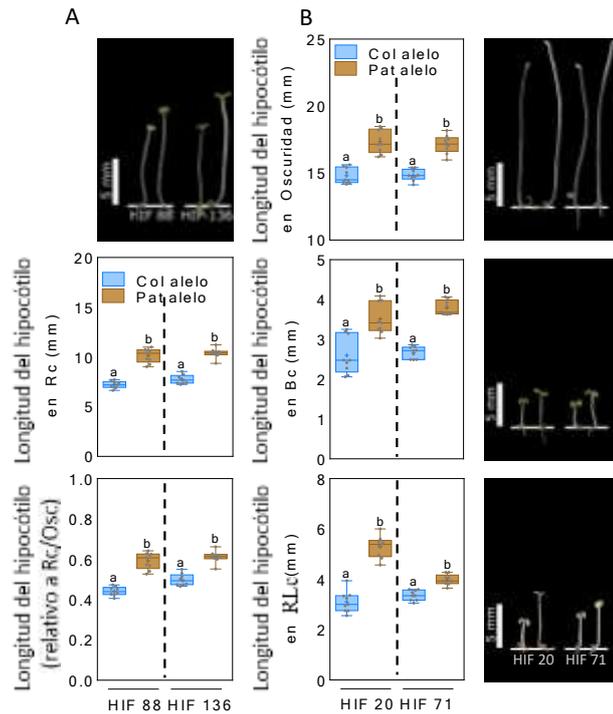


Figura 3.8: Confirmación de *Rc1* QTL y *Bc1* QTL por dos HIF independientes. (A) Longitud del hipocótilo para plántulas cultivadas en Rc y Rc/ Osc de dos HIF88 y HIF136 independientes que se segregan como alelos Col-0 y Pat en el QTL *Rc1*. (B) Longitud del hipocótilo para plántulas cultivadas en Osc, Bc y RLC en dos HIF20 y HIF71 independientes que se segregan como alelos Col-0 y Pat en el *Bc1* QTL. Los gráficos de caja y bigotes representan datos alrededor de la mediana, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas entre las medias analizadas por la prueba LSD (valor $p < 0,05$). Las fotografías muestran plántulas representativas en cada rasgo de luz para HIF que se segregan como Col-0 (izquierda) y Pat (derecha).

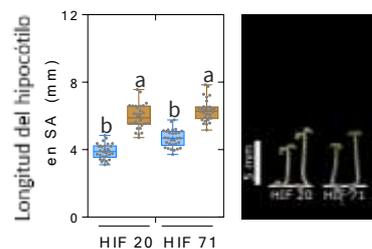


Figura 3.9: Confirmación del *Bc1* QTL por dos HIF independientes en sombra simulada. Longitud del hipocótilo para plántulas cultivadas en el tratamiento de sombra simulada (SA) en dos HIF20 y HIF71 independientes que se segregan como alelos Col-0 y Pat en el *Bc1* QTL. Los gráficos de caja y bigotes representan datos alrededor de la mediana, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas entre las medias analizadas por la prueba LSD (valor $p < 0,05$). Las fotografías muestran plántulas representativas en cada rasgo de luz para HIF que se segregan como Col-0 (izquierda) y Pat (derecha).

3.3.4. Exploración de genes candidatos en *Rc1* QTL y *Bc1/SHADE* QTL

La resecuenciación de la nueva población RIL permitió establecer una correcta posición física de los marcadores moleculares de ultra alta densidad, lo que resultó en intervalos asociados genéticamente más cortos que, en principio, contendrían un conjunto reducido de genes candidatos. Los intervalos de confianza de los QTL identificados en los experimentos de desetiación y escape al sombreado contienen un rango entre 131 y 458 genes Col-0 anotados (Cuadro S3.7 y S3.8). A partir de los genes identificados, se seleccionaron los genes asociados a luz previamente documentados en la bibliografía y/o la base de ontología génica de Arabidopsis GO (del inglés *Gene Ontology*). Se encontró más de un gen asociado a la desetiación para cada uno de los QTL bajo estudio (Cuadro S3.9), mientras que para los QTL de escape al sombreado sólo se encontraron genes documentados para *WLI* QTL y *SARI* QTL (Cuadro S3.10).

Para refinar la identificación de genes candidatos, se evaluaron los polimorfismos de los genes candidatos asociados a la luz en la región codificante. Con ese objetivo, se hizo el llamado de variantes SNPs del genoma Pat secuenciado, en comparación con el de referencia Col-0 (Kasulin et al., 2017) para identificar alelos Pat de interés. Se documentaron 1006 y 323 transcritos asociados a los tratamientos lumínicos de desetiación y respuesta de escape al sombreado, respectivamente. Para cada transcripto, se extrajeron los SNPs de Pat agrupándose en categorías de alto impacto funcional como *missense variant*, *splice donor variant*, *splice acceptor variant*, *start lost*, *stop gained* y *stop lost codon* (Cingolani et al., 2012). De estos análisis, se obtuvieron 12 genes de desetiación y 4 genes asociados a la respuesta de escape al sombreado que contienen SNP de Pat de alto impacto (Cuadro S3.11A y S3.11B).

A continuación, restringimos el análisis solo a los genes candidatos de los QTLs más significativos (*Rc1* QTL y *Bc1/SHADE* QTL), que fueron confirmados a través de

dos HIF independientes (Figura 3.7 y 3.8). En *Rc1 QTL*, los genes *ABCI21*, *FLS6*, *RPP8*, *TZP* y *YUC5* relacionados con la luz presentaban en Pat varios polimorfismos de impacto dentro del intervalo informativo (Cuadro S3.11A). La investigación se centró en *TZP*, ya que anteriormente fue asociado a la desetiología y con las respuestas fotoperiódicas (Loudet et al., 2008; Kaiserli et al., 2015; Zhang et al., 2018). *TZP*-Pat presenta 6 *missense variants* comparado con *TZP*-Col-0, y un codón de stop prematuro localizado en la porción final de la proteína (Cuadro S3.12). Primero se analizó el largo del hipocótilo de las plántulas de seis accesiones que comparten la mitad (Ting-1, Tamm-2, Tamm-27, Sq-1, Got-22 y Chat-1) y otra que comparte la totalidad (Ts-1) de los *missense variants* de *TZP*-Pat en los tratamientos de Rc y Rc/ Osc (Cuadro S3.13). La hipótesis subyacente es que las respuestas fenotípicas de estas accesiones deberían ser similares a Pat si el gen *TZP* fuese el agente causal del fenotipo contrastante. Las primeras accesiones mostraron una respuesta a la luz más similar a Col-0, probablemente por poseer pocos polimorfismos, pero Ts-1 fue hiposensible a la luz de la misma manera que Pat (Figura 3.10A). Para confirmar los resultados previos, se usaron dos líneas mutantes de *TZP-1* y *TZP-2* en el fondo Col-0, para poner a prueba la hipótesis que las mutantes de *TZP* tienen fenotipo similar a Pat que tendría una versión poco sensible de *TZP* debido a los 6 polimorfismos que lleva el gen bajo estudio. En efecto, las plántulas mutantes presentaron un hipocótilo más largo que Col-0 en los tratamientos lumínicos de Rc y Rc/ Osc que están asociadas a *Rc1 QTL*. En tratamiento de luz RLc, pero no en Bc, las mutantes de *TZP* mostraron tener un fenotipo superior al control Col-0 lo que confirma que *Rc1 QTL* está asociado con la percepción de la señal lumínica por los fitocromos pero no con los criptocromos (Figura 3.10A y Figura S3.3A). Los resultados de las accesiones y las líneas mutantes sugieren que *TZP*-Pat es un alelo débil con contribución conservada en la señalización mediada por los fitocromos. Esta observación concuerda con los resultados

obtenidos con las HIFs que confirman los efectos aditivos de Pat en luz roja pero no en luz azul

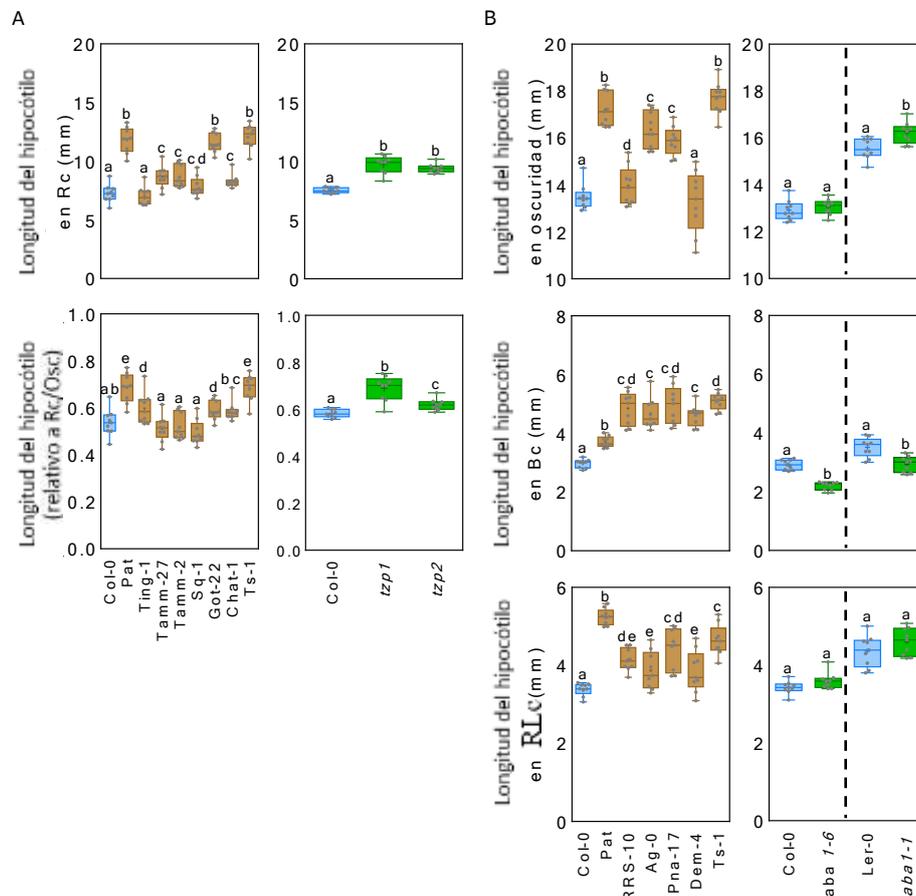


Figura 3.10: *TZP* y *ABA1* como genes candidatos para *Rc1* QTL y *Bc1* QTL, respectivamente. (A) La longitud del hipocótilo de las plántulas se midió en condiciones Rc y Rc/Osc para las accesiones Ting-1 (CS76612), Tamm-2 (CS76610), Tamm-27 (CS77341), Sq-1 (CS77266), Got-22 (CS76884), Chat-1 (CS76463) y Ts-1 (CS76615) que compartían algunos o todos los polimorfismos de *TZP*-Pat; y en paralelo *tzp-1* y *tzp-2* con Col-0 como control. (B) La longitud del hipocótilo de las plántulas se midió en las condiciones Bc, RLc y Osc para las accesiones RRS-10 (CS76592), Ag-0 (CS76430), Pna-17 (CS76575), Dem-4 (CS76794) y Ts-1 (CS76615) que compartía todos los polimorfismos de *ABA1*-Pat; y en paralelo *aba1-1* y *aba1-6* con los correspondientes controles Ler y Col-0, respectivamente. Los gráficos de caja de bigotes representan datos alrededor de la mediana, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas entre las medias analizadas por la prueba LSD (valor $p < 0,05$).

Por otro lado, se analizaron potenciales genes causales del *Bc1* QTL. Solo *RPT3*, *ABA1* y una proteína similar a la Kinetina (AT5G66250) presentaron en Pat polimorfismos informativos (Cuadro S3.11 B). Dado que *ABA1* se ha asociado previamente con la respuesta de las plántulas en oscuridad (escotomorfogénesis) (Barrero et al., 2008) y que además porta cinco *missens variants* en Pat (Cuadro S3.11A), se

procedió con la caracterización funcional de este candidato. Usando el mismo enfoque experimental anterior, analizamos cinco accesiones que comparten todos los polimorfismos *ABAI*-Pat (RRS-10, Ag-0, Pna-17, Dem-4 y Ts-1) (Cuadro S3.12 y S3.13); esperando un fenotipo similar a Pat en los tratamientos de luz Bc, luz RLc y Osc. Estos genotipos mostraron hipocótilos más largos que Col-0 bajo los tratamientos de Bc y RLc. En el tratamiento de oscuridad (Osc), tres accesiones mostraron respuesta similar a Pat, y solo la accesión Dem-4 tuvo una respuesta con una tendencia distinta a Pat (Figura 3.10 B). Incluimos en estos análisis, el estudio del fenotipo de los mutantes *abal-1* y *abal-6* en comparación con Ler y Col-0, respectivamente. A la luz de Bc, ambas plántulas mutantes *abal* fueron más cortas que las de tipo salvaje respectivas; mientras que no encontramos diferencias consistentes de hipocótilo entre los genotipos en los tratamientos RLc, oscuridad y Rc (Figura 3.10 B, Figura S3.3 B). La heterogeneidad de los resultados obtenidos no nos permite sacar una conclusión definitiva y se requieren más experimentos para identificar el gen responsable de *Bcl* QTL.

3.4. Discusión

El presente capítulo aporta evidencias experimentales sobre la variación genética natural en los procesos de desetiología y respuesta de escape al sombreado a partir del mapeo de QTL en una nueva población 163 RIL entre Col-0 y Pat. Se encontraron siete QTLs para la respuesta de desetiología asociados con la luz Rc, Bc y RLc y oscuridad. Por otra parte, en los tratamientos lumínicos asociados a la respuesta de escape al sombreado, se detectaron cuatro QTLs. Se confirmaron los efectos aditivos de *Rc1* QTL y *Bc1/SHADE* QTL mediante el uso de HIF independientes y se exploró genes causativos, identificando seis y tres genes asociados a luz dentro los intervalos de *Rc1* QTL y *Bc1/SHADE* QTL, respectivamente, con polimorfismos potencialmente informativos entre Col-0 y Pat. Se realizaron estudios fisiológicos con líneas mutantes y accesiones que comparten polimorfismos de Pat, y los resultados obtenidos sugieren a *TZP* como un gen candidato para *Rc1* QTL. Además, se identificó a *SARI* QTL para el índice SA siendo el *PHYB* posible gen causal. Esta hipótesis de trabajo fue confirmada por nuestro laboratorio en otros experimentos *ad-hoc* (Ruiz et al., 2022). En ese trabajo recientemente publicado se demostró que *PHYB*-Pat contiene 4 polimorfismos en la región codificante que contribuyen a las respuestas de hiposensibilidad a la luz.

Rc1 QTL se mapeo para el largo del hipocótilo en Rc y Rc/Osc explicando 20% de la variación fenotípica y los alelos Pat aumentaron la longitud del hipocótilo. (Cuadro S3.5). Se confirmó *Rc1* QTL por medio de dos HIFs independientes en un intervalo de 45,9 y 51 cM, donde se mapearon 458 genes (Cuadro S3.7). El gen candidato más relevante para *Rc1* QTL es *TZP* (AT5G43630) donde encontramos seis SNP no sinónimos y un SNP C786T adicional que produjo un codón de *stop* prematuro para el alelo de Pat (Cuadro S3.11A). Las evidencias experimentales recolectadas en esta tesis que permiten sugerir que *TZP* es el gen candidato de *Rc1* QTL son (i) las accesiones que comparten al

menos de tres de los seis SNPs de *TZP* con Pat mostraron el mismo fenotipo hiposensible a la luz que Pat (Got-22 y Ts-1 en Rc y Ts 1 en Rc/Osc); (ii) Las plántulas de las mutantes nulas *tzp-1* y *tzp-2* mostraron hipocótilos largos y una baja respuesta a la inhibición a la luz comparado con el control Col-0 bajo nuestras condiciones experimentales y esos resultados son similares al fenotipo de Pat; (iii) *TZP*-Pat tiene un codón stop prematuro comparable, aunque no idéntico, al alelo Bay reportado. Los resultados de esta tesis también sugieren que *TZP* puede desempeñar alguna función en las vías de señalización de luz, como lo demuestran los fenotipos contrastantes de HIF 88 y HIF 136 y las plántulas mutantes de *tzp-1* y *tzp-2* en Bc, Rc y RLc (Figuras 3.8 A, 3.10 A y Figuras S3.2 A, S3.3 A). En otro estudio previo, se identificó a *LIGHT5* QTL que mapea en la misma posición de *Rc1* QTL para el crecimiento de hipocótilo en luz blanca en la población RIL de Bay x Sha (Loudet et al., 2008). El alelo *TZP* en la accesión Bay muestra un hipocótilo más corto en los tratamientos de luz azul y blanca (Coluccio et al., 2011; Loudet et al., 2008). Curiosamente, las vías de los criptocromos y fitocromos puede actuar antagónicamente en la fotomorfogénesis (Casal, 2000; Su et al., 2015). *TZP* no solo actuaría como un regulador positivo de las respuestas mediadas por fitocromo, sino también como un regulador negativo de la luz azul en la fotomorfogénesis de las plántulas (Zhang et al., 2018). A nivel molecular, y luego de la exposición de las plántulas a la luz, Kaiserli et al.(2015) demostraron que *TZP* es reclutado rápidamente por el fitocromo B y actúa como enlace para marcar sitios de transcripción activa. *TZP* también puede interactuar físicamente con phyA y phyB para regular la degradación del *FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYLI (FHYI)*, a través de la interacción proteína-proteína (Zhang et al., 2018). En síntesis y a la luz de las evidencias previas, se requerirá más experimentación empírica introgresando *TZP*-Pat en un fondo isogénico contrastante, o generando plantas transgénicas con alelos de Pat y Col-0 en un fondo genético nulo para

confirmar la causalidad propuesta.

Bcl QTL se mapeó para la desetiolación de plántulas en RLc, Bc, oscuridad y en el experimento de escape al sombreado en el tratamiento de sombra. *Bcl* QTL mapea en el brazo inferior del cromosoma V, y los alelos Pat aumentaron el crecimiento de hipocótilos (Figura 3.10 B). *Bcl* QTL ejemplifica la dificultad de distinguir entre el efecto de un solo gen pleiotrópico para diferentes ambientes o múltiples genes en estrecha vinculación que contribuyen en entornos específicos, como se sugiere para el intervalo parcial de superposición entre RLc (26,200–26,700 kb), Bc (25,700–26,200 kb), SA (25,700–26,200 kb) y Osc (26,300–26,800 kb). *Bcl* QTL colocaliza con *FR5* QTL mapeado por Wolyn et al. (2004) para la longitud del hipocótilo en RLc en la población RIL entre Col-gl1 x Kas-1. En nuestro caso, solo tres genes previamente relacionados con la luz presentaron alelos de Pat de alto impacto dentro del intervalo *Bcl* QTL. En esta tesis, exploramos a *ABA1* (AT5G67030) como el gen candidato. *ABA1* codifica una sola copia del gen zeaxantina epoxidasa implicado en el primer paso de la biosíntesis del ácido abscísico (ABA), y las plantas mutantes de *aba1* muestran un crecimiento reducido que puede ser revertido cuando las plántulas son cultivadas con sustrato adicionado con una solución de ABA (Koornneef et al., 1982, 1998; Leung & Giraudat, 1998). Encontramos que las cuatro de las cinco accesiones que comparten polimorfismos *ABA1*-Pat mostraron hipocótilos más largos que Col-0 en las condiciones de Bc, RLc y oscuridad; mientras que las plántulas *aba1-1* y *aba1-6* fueron significativamente más cortas que los controles Col-0 y Ler en Bc (Figura 3.10 B). La mutante *aba1* mostro una respuesta fenotípica parcialmente desetiolada con hipocótilos reducidos, expansión del cotiledón y el desarrollo de hojas verdaderas durante el crecimiento escotomorfogénico (Barrero et al., 2008). Según esta evidencia, los resultados sugieren que el alelo *ABA1*-Pat podría ser más funcional que el alelo *ABA1*-Col-0. Sin embargo, las plántulas mutadas no fueron

significativamente más cortas que las accesiones Col-0 y Ler en los tratamientos de RLc y oscuridad, inconsistentes con los efectos aditivos esperados de *Bcl* QTL. Con los resultados de esta tesis no podemos descartar que *ABA1*-Pat pueda ejercer un rol regulador de la fotomorfogénico en el fondo genético de Pat asociado a posibles interacciones epistáticas. Por lo tanto, se necesitarán experimentos adicionales para aclarar el papel de *ABA1* durante la desetiología y la causalidad en las respuestas de luz en Pat.

Previamente, ya se encontraron QTLs en intervalos que contienen a *PHYB* asociados a desetiología en plántulas expuestas a luz R (Borevitz et al., 2002). El gen *PHYB*-Pat ha sido estudiado en respuesta de sombra, mostrando que la expresión de los niveles de genes *PHYB*, *HFR1*, *PILI* y *ATHB2* es significativamente menor en Pat que en Col-0 en condiciones de simulación de sombra dando un pulso de luz roja lejana al final del día (Kasulin et al., 2017). A nivel genético sabemos que *PHYB* de Pat contiene una delección de cuatro aminoácidos y tres SNP no sinónimos en la región codificante (Cuadro suplementario 4, Kasulin et al., 2017). Por lo tanto, *PHYB* probablemente pueda ser el causante del *SARI* QTL (Cuadro S3.10B). Resultados obtenidos con líneas transgénicas de los 4 polimorfismos de *PHYB*-Pat en fondo mutante de *phyb-9* demuestran claramente que las versiones polimórficas de *PHYB*-Pat son causales de la hiposensibilidad en las respuestas de luz en la germinación de semillas, desetiología en luz R y respuesta de escape al sombreado (Ruiz et al., 2022).

CAPÍTULO 4: Identificación y validación de QTL asociados al fotoperiodo y a la vernalización en floración en la población de mapeo de Col-0 x Pat.

4.1. Introducción

Las plantas emplean diversos mecanismos para detectar e integrar múltiples señales estacionales, ajustando las etapas de transición del desarrollo con las mejores épocas del año para el crecimiento y la reproducción. Existen varias vías de señalización conocidas asociadas al tiempo de floración, como son las señales endógenas (vía autónoma, giberelinas, y edad) y las ambientales (vernalización, temperatura ambiental y fotoperiodo) (Amasino & Michaels, 2010; Kim, 2020). Por lo tanto, la transición de la fase vegetativa a la floración es un momento crítico; alinear esta transición con condiciones ambientales favorables es fundamental para la reproducción. Una fase crítica de la transición de la fase vegetativa a la reproductiva es la exposición a largos periodos de frío que promueven la floración (vernalización), algo propio de algunos genotipos pero no otros (Gazzani et al., 2003; Michaels et al., 2003). En *A. thaliana*, el frío invernal induce el silenciamiento del principal represor floral *FLC* por las proteínas del grupo Polycomb (PcG) (Michaels & Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999). La variabilidad natural asociada con la vernalización ha sido ampliamente investigada mediante uso de mapeos genéticos, habiéndose encontrado variados QTLs explicativos que contienen genes candidatos relacionados con la respuesta de vernalización en *Arabidopsis* (Cuadro 4.1) (Alonso-Blanco et al., 1998; Loudet et al., 2002; El-Lithy et al., 2004; Simon et al., 2008; Grillo et al., 2013).

Cuadro 4.1: QTLs asociados a genes relevantes de floración. La tabla muestra la población de mapeo, los tratamientos evaluados y los genes candidatos asociados a los QTL significativos.

Referencia	Población	Tratamientos		Genes Candidatos de vernalización			MAF 2- MAF 5
		Fotoperiodo	Vernalización	FLM	FRI	FLC	
(Alonso-Blanco et al., 1998)	Ler x Cvi	Día largo y Día corto	Si			Si	Si
(Loudet et al., 2002)	Bay x Sha	Día largo y Día corto	No		Si	Si	
(El-Lithy et al., 2004)	Ler x Sha	Día largo y Día corto	No	Si	Si	Si	Si
(Simon et al., 2008)	Blh-1 x Col-0	Día largo	No		Si		Si
(Simon et al., 2008)	Bur-0 x Col	Día largo		Si	Si		
(Simon et al., 2008)	Ct-1 x Col-0	Día largo	No	Si			Si
(Simon et al., 2008)	Cvi x Col	Día largo	No			Si	Si
(Simon et al., 2008)	Sha x Col	Día largo	No			Si	Si
(Grillo et al., 2013)	Suecia x Italia	Día largo	Si	Si			Si

Accesiones de arabidopsis: Bulhary (Blh-1, CS1030), Burren (Bur-0, CS1028), Catania (Ct-1, CS1094), Islas del Cabo Verde (Cvi-0) y Shahdara (Sha), Italia (42°07'N, 12°29'E) y Suecia (62°48'N, 18°12'E).

Pat, el genotipo recolectado en la Patagonia Argentina, tiene una respuesta de vernalización extrema, floreciendo con más de 100 hojas sin vernalización y con menos de 25 hojas con vernalización; mientras que el genotipo de referencia Col-0 no tiene

respuesta de vernalización y florece solo con 10/12 hojas con o sin vernalización (Kasulin et al 2017). El propósito de este capítulo en la tesis fue identificar y caracterizar *loci* que pueden contener genes con polimorfismos naturales causantes de la respuesta de vernalización en la población de 163 RILs generada a partir de las accesiones Col-0 y Pat con fenotipos contrastantes. Para ello, el estudio se enfocó en mapear QTLs de floración bajo condiciones de vernalización en fotoperiodos de día largo y corto usando la población de mapeo Col x Pat anteriormente descrita en el capítulo 2. Los QTLs más relevantes para vernalización identificados fueron confirmados por HIF y *near isogenic lines* (NILs), y se añadieron estudios de mutantes pertinentes. Los resultados obtenidos se discuten en detalle al final del capítulo.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Material Vegetal

Usamos la población RIL Col x Pat de 163 líneas y los dos genotipos parentales Col-0 y Pat. Además se evaluó el fenotipo de líneas mutantes *hen4-2* (Ortuño-Miquel et al., 2019), *flc-3* (Michaels & Amasino, 1999), *flm-3* (Balasubramanian et al., 2006) y *maf3* (Ortuño-Miquel et al., 2019) donadas por el Dr. Antonio Vera (Área de Genética, Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández). Las líneas *maf2-71* (N719271), *maf2-64* (N641778), *eip9* (N521078) y *ham1* (N656054), fueron obtenidas del *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC). Todos los alelos mutados están en fondo genético Col-0. También se usaron las HIF 20 y 71 construidas en el capítulo 3. Además, se construyeron *near isogenic lines* (NILs) para enriquecer en un fondo genético Col-0, a través del retrocruzamiento repetido por 3 generaciones con este parental. Para ello, se partió de las líneas RIL 218 y 236, escogidas porque cumplen con dos criterios: i) su fondo genético esta enriquecido en alelos Col-0 (~60 %), y ii) son homocigotas del alelo Pat en el intervalo del QTL correspondiente.

4.2.2. Diseño y condiciones experimentales

Las semillas de la población de RIL, junto con Col-0 y Pat parentales, se sembraron *in vitro* en agar al 0,8% con medio Murashige y Shook (MS/2), estratificándose en oscuridad a 4 °C durante 4 días, y luego fueron expuestas a un pulso rojo de 2 h. Después, las semillas se mantuvieron 22 h en la oscuridad para una germinación homogénea, y luego las plántulas se crecieron en placas dentro de una cámara de crecimiento a 22 °C con fotoperiodo de SD (8h/16h) y un PAR (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 7 días. El experimento consistió en cuatro condiciones experimentales: con vernalización a día corto (VERN/SD), con vernalización a día largo (VERN/LD), sin vernalización a día corto (No-VERN/SD) y sin vernalización a día largo (No-VERN/LD)

(Figura 4.1). Para la vernalización, las placas se sometieron a un tratamiento de frío durante 30 días, en una cámara con fotoperiodo de SD a 4 °C y un PAR ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Una vez finalizada la vernalización, las plántulas se trasplantaron a macetas de 300 cc con un sustrato de perlita, turba y vermiculita (3:1:1/2). Las macetas con plántulas se colocaron en cámara de fotoperiodos SD (8h/16h) (VERN/SD) y LD (16h/8h) (VERN/LD). Las cámaras fueron seteadas a $22 \pm 2 \text{ C}^\circ$ con un PAR de 100 y $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para LD y SD, respectivamente. Para la condición de no vernalización, las plántulas en placas directamente se trasplantaron a macetas y fueron crecidas con los fotoperiodos SD (No-VERN/SD) y LD (No-VERN/LD), según fuera previamente descrito. En todos los casos, se midieron caracteres fisiológicos relacionados a la transición floral y al desarrollo foliar. Los caracteres evaluados fueron días y número de hojas a floración, el largo del peciolo, largo de hoja y ancho de hojas. Las mediciones biométricas se hicieron con un calibre digital. El criterio de planta florecida fue establecido cuando el escapo floral presentaba al menos 2 cm de altura.

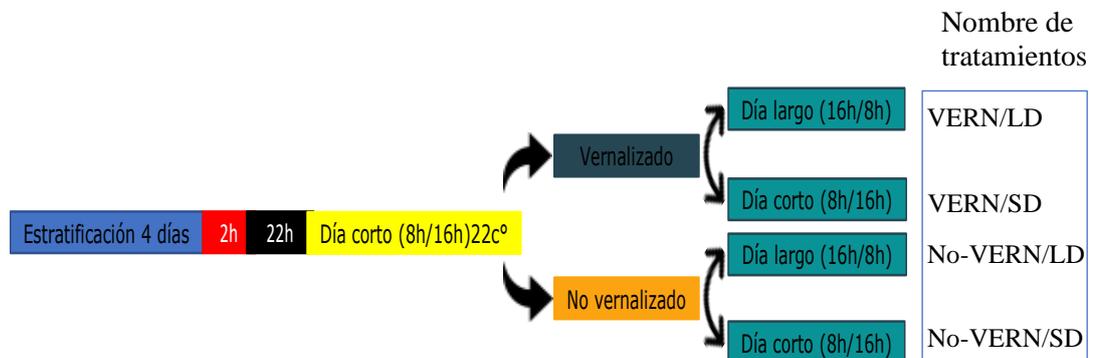


Figura 4.1: Esquema del diseño experimental para los cuatro tratamientos de día largo (LD) y corto (SD), tanto vernalizado (VERN) como no vernalizado (No-VERN).

4.2.3. Mapeo de QTLs

Los caracteres fueron medidos en las 163 RILs y las dos líneas parentales en los cuatro tratamientos. Se estimó el cuadrado medio (MS) de ANOVA, el cuadrado medio

del genotipo (MSG, entre el componente de varianza de línea RIL para cada tratamiento), el cuadrado medio residual (MSE, componente de varianza del error residual), la varianza genotípica (GV: MSG menos el cuadrado medio del residual que se divide por el número de repeticiones), la varianza fenotípica (PV: MSG dividido por el número de repeticiones) y la heredabilidad en sentido amplio (H^2 ; promedio de la varianza genética dividido por PV). Los análisis estadísticos de los datos fenotípicos se analizaron con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2001).

Siguiendo el mismo análisis realizado en el capítulo 3, los datos fueron transformados utilizando la biblioteca Box Cox de MASS que convierte los residuos fenotípicos a una distribución normal y con homocedasticidad (Venables y Ripley, 2002). Seguidamente, se usó la biblioteca lme4 (Bates et al., 2015) para extraer los valores ajustados BLUEs y BLUPs del mejor modelo calculado. Finalmente, a partir de estos datos, se llevó a cabo el análisis de QTL en los cuatro tratamientos. Se utilizó para el mapeo de QTL el paquete R/qtl perteneciente al software R (Arends et al., 2010), aplicándose intervalos compuestos (CIM) con el método "hk" (Knott & Halley, 1992) para calcular las coordenadas del intervalo genético y la puntuación LOD. El LOD se consideró significativo con un $\alpha < 0,1$ después de 10.000 permutaciones realizadas con la función n.perm, mientras que el % de variabilidad explicada (Var) se obtuvo ajustando un modelo de múltiples-QTL utilizando la función fitqtl (Arends et al., 2010) .

4.2.4. Construcción de NILs y confirmación de QTL en HIF y NILs

Para la confirmar los QTL seleccionados y sus efectos alélicos, utilizamos las mismas líneas HIF usadas en el capítulo 3. Los cebadores utilizados para el genotipado fueron los mismos que usamos para seleccionar las HIFs asociadas al QTL *Bc1* (Capítulo3, Cuadro S3.1), más un cebador polimórfico ubicado en la posición 26045888

del cromosoma V (Cuadro S4.12). Las HIF se evaluaron en experimentos de floración junto con Col-0 y Pat como controles, siguiendo el diseño y protocolos experimentales descritos anteriormente en los tratamientos VERN/LD, VERN/SD, No-VERN/LD y No-VERN/SD.

Después de la evaluación de HIFs, se procedió a la obtención de líneas isogénicas cercanas (del inglés, *near isogenic lines* NILs) mediante retrocruzas con el parental Col-0 por tres generaciones. Las NILs se caracterizan por ser homocigotas en el intervalo de confianza del QTL de interés, con un fondo genético homogéneo al retrocruzar con Col-0 con la finalidad de tener mayor fondo genético de este parental. Para lograrlo, genotipamos con marcadores moleculares (CAPS) dentro y fuera del intervalo QTL, recuperando la cuarta o quinta generación homocigota informativa. Las condiciones de PCR fueron las mismas utilizadas en la selección de las HIF. La finalidad de obtener NILs no solo es la de proveer evidencias genéticas independientes, sino también potencialmente acotar el QTL en la forma de pequeños segmentos, que eventualmente resultan en líneas representando un mosaico alélico a lo largo del intervalo, con genética Pat o Col-0. Esta estrategia permitiría asociar al carácter fenotípico a coordenadas genéticas menores que las HIFs, descartando genes no causativos que también se encuentran dentro de la misma región del QTL.

4.2.5. Exploración de genes candidatos en los QTL de interés

Para seleccionar genes candidatos en los QTL mapeados, primero reconocimos genes relacionados con la floración dentro de los intervalos, recuperando información del *Gene Ontology Annotations3* y una lista de 306 genes de floración (Bouche, 2015). Posteriormente, los genes de floración encontrados se compararon con la base de datos de polimorfismos en Pat, obteniéndose un grupo acotado de genes con SNPs de alto

impacto dentro de los QTLs de mayor interés. El impacto de los SNPs se analizó con el *software* SnpEff (<https://pcingola.github.io/SnpEff/>), que agrupa los polimorfismos en categorías de alto impacto funcional como variantes con cambio de sentido: *missense variant*, *splice donor variant*, *splice acceptor variant*, *start lost*, *stop gained* y *stop lost codon* (Cingolani et al., 2012).

Para evaluar funcionalmente los genes candidatos, se realizaron experimentos con las líneas mutadas nulas *maf2-64*, *maf2-71*, *hen4-2*, *eip9* y *ham1*, agregándose como controles *flm-3* (mutante de *MAF1/FLM* con fenotipo de floración temprana) y los parentales Col-0 y Pat. Además, se incluyó la mutante *maf3*, cuyo gen también se encuentra dentro del intervalo de *VERNI* QTL pero sin variantes polimórficas entre Col-0 y Pat. Estas líneas fueron sometidas a los tratamientos fisiológicos anteriormente descritos (Figura 4.1), y en experimentos adicionales de desetiación. Los experimentos de desetiación se hicieron siguiendo los protocolos experimentales descritos en el capítulo 3.

4.3. Resultados

4.3.1. Variación natural para caracteres vegetativos y floración entre Col-0 y Pat.

Col-0 y Pat muestran fenotipos contrastantes para los caracteres vegetativos y de floración evaluados en este capítulo, tanto para los tratamientos de fotoperiodo como para los de vernalización. Se analizaron caracteres de floración (días y número de hojas a floración) y caracteres de desarrollo foliar a floración (largo del peciolo, y ancho y largo de la hoja) en dos fotoperiodos con y sin frío: vernalización y día largo (VERN/LD), vernalización y día corto (VERN/SD), sin vernalización y día largo (No-VERN/LD), y sin vernalización y día corto (No-VERN/SD) (Figura 4.1).

Pat presentó fenotipos más acentuados para los caracteres de días a floración, número de hojas, longitud del peciolo, longitud y ancho de la hoja en el tratamiento VERN/LD. Se observaron diferencias significativas para días a floración (Col-0 = 23,3 días \pm 0,42 y Pat = 34,1 días \pm 0,62), número de hojas a floración (Col-0 = 10,7 \pm 0,55 y Pat = 47,8 \pm 1,1 mm), longitud del peciolo (Col-0 = 12,5 \pm 0,51 y Pat = 18,01 \pm 0,43 mm), longitud de la hoja (Col-0 = 23,9 \pm 0,73 y Pat = 34,9 \pm 0,78 mm) y ancho de la hoja (Col-0 = 12,2 \pm 0,45 y Pat = 21,4 \pm 0,68 mm) (Figura 4.2 y Cuadro S4.5). En el tratamiento VERN/SD, los caracteres de días a floración (Col-0 = 29,6 \pm 0,76 y Pat = 88,5 \pm 0,99 mm), número de hojas a floración (Col-0 = 12,2 \pm 0,53 y Pat = 113,1 \pm 2,1 mm) y longitud del peciolo (Col-0 = 14,2 \pm 0,8 y Pat = 28,1 \pm 0,71 mm) también mostraron un fenotipo más acentuado en Pat; sin embargo, la longitud de la hoja (Col-0 = 28,1 \pm 0,71 y Pat = 35,8 \pm 0,8 mm) y ancho de la hoja (Col-0 = 13,6 \pm 0,25 y Pat = 22,1 \pm 0,56 mm) no mostraron diferencias significativas (Figura 4.2 y Cuadro S4.6).

En los tratamientos No-VERN/LD y No-VERN/SD, Pat nuevamente mostró fenotipos más acentuados en días a floración, número de hojas a floración, longitud del peciolo y longitud de la hoja (Figura 4.2 y Cuadro S4.7); mientras que el ancho de la hoja

fue superior en Pat para el tratamiento No-VERN/LD, pero inferior en No-VERN/SD con respecto a Col-0 (Figura 4.2, Cuadro S4.7 y Cuadro S4.8). Estos resultados confirman que la accesión Pat tiene requerimientos de vernalización, que no sólo afectan el número de hojas sino también otros caracteres foliares evaluados.

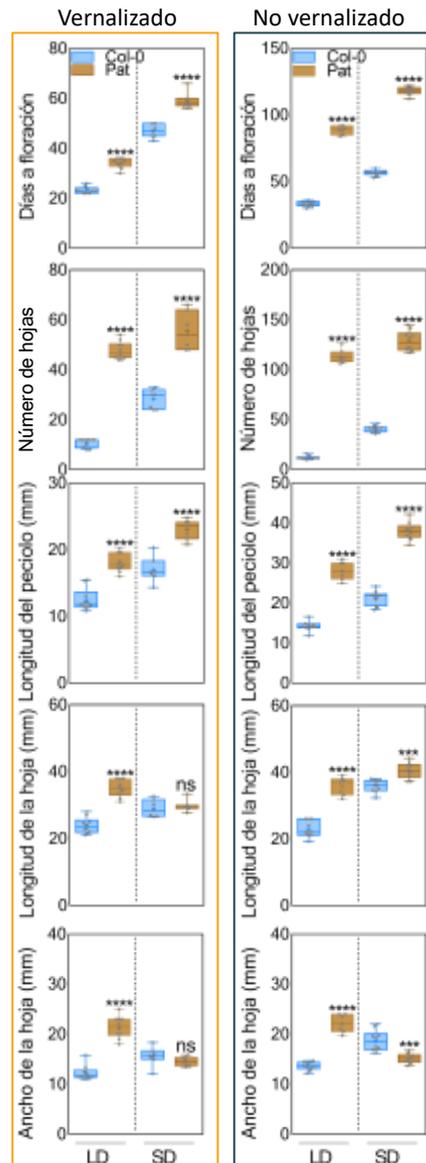


Figura 4.2: Caracterización fenotípica de Col-0 y Pat. Los gráficos muestran la baja de bigotes entre Col-0 y Pat vernalizados y sin vernalización para los fotoperiodos de día largo (LD) y corto (SD). Los asteriscos indican diferencias entre las medias analizadas por la prueba *t* - *Student* (p-valor <0,0001).

4.3.2. Variación natural para caracteres vegetativos y floración en la población de mapeo de 163 RILs

A partir de los datos contrastantes obtenidos entre los parentales Col-0 y Pat, se decidió utilizar la población de mapeo generada (ver capítulo 2) para mapear QTL asociados a los caracteres florales y vegetativos bajo estudio. Previo a los análisis de mapeo, se estudió detalladamente la variabilidad fenotípica de los caracteres de interés. Para todos los tratamientos, la media poblacional para días a floración, la longitud del peciolo, la longitud de la hoja y el ancho de la hoja muestran que, en general, hay RILs transgresoras que tienen una respuesta fenotípica mayor a Pat y otras que tienen una menor respuesta que Col-0 (Figura 4.3, Figura 4.4, Cuadro S4.1, S4.2, S4.3, S4.4).

En el tratamiento VERN/LD, la media para los caracteres de floración fueron $21,91 \pm 0,49$ para días a floración, $17,86 \pm 0,76$ para el número de hojas a floración; mientras que para los caracteres foliares, las medias de respuesta fueron $13,16 \pm 0,29$ (mm) para la longitud del peciolo, $23,51 \pm 0,5$ (mm) para la longitud de la hoja (mm) y $15,45 \pm 0,32$ (mm) para el ancho de la hoja (Figura 4.3 A, Figura 4.4 A, Cuadro S4.1 y S4.5). En el tratamiento VERN/SD, la media poblacional de las RIL fue de $42,7 \pm 0,8$ para los días a floración y $35,21 \pm 1,5$ para el número de hojas a floración, Por otra parte, la media poblacional de las RIL fue de $18,13 \pm 0,35$ (mm), $27,13 \pm 0,48$ (mm) y $13,98 \pm 0,21$ (mm) para los caracteres de longitud del peciolo, longitud de la hoja y ancho de la hoja, respectivamente (Figura 4.3 B, Figura 4.4 B, Cuadro S4.2 y S4.6).

En el tratamiento No-VERN/LD, las medias obtenidas de las RILs para los días a floración, número de hojas a floración, longitud del peciolo, longitud de la hoja y ancho de la hoja fueron $46,75 \pm 1,76$, $40,69 \pm 3,48$, $16,16 \pm 0,44$ mm, $28,54 \pm 0,63$ mm, $14,06 \pm 0,33$ mm, respectivamente. (Figura 4.3 A, Figura 4.4 A, Cuadro S4.3 y S4.7). En el tratamiento No-VERN/SD, la respuesta media de la población de RIL fue $84,93 \pm 2,59$ para número de hojas a floración, $70,93 \pm 3,53$ para días a floración, mientras que en los

caracteres florales de longitud del peciolo, longitud y ancho de la hoja fue de $19,26 \pm 0,4$ mm, $31,98 \pm 0,61$ mm y $16,87 \pm 0,28$ mm, respectivamente (Figura 4.3 B, Figura 4.4 B, Cuadro S4.4 y S4.8)

A partir de los valores fenotípicos obtenidos previamente se estimó la heredabilidad, que indica la proporción de fenotipo que es explicada por la variabilidad genética para el carácter bajo estudio en nuestras condiciones experimentales. En el tratamiento VERN/LD, la heredabilidad fue mayor y alrededor de 90% para los caracteres de hojas y días a floración, y para longitud de hoja. Por otro lado, en el tratamiento de VERN/SD, la heredabilidad fue también elevada para días a floración y número de hojas a floración, pero disminuyó a 70% para los caracteres foliares (Cuadro S4.5 y S4.6). En los tratamientos No-VERN/LD y No-VERN/SD, el número de hojas a floración tuvo la heredabilidad más alta, por encima de 93%, mientras que para los caracteres foliares de ambos tratamientos la heredabilidad fue entre el 72% y 90% (Cuadro S4.7 y S4.8). Estos resultados sugieren que una proporción importante de la variación fenotípica de la población se explica por el componente genético, que puede ser estudiado a través de los mapeos genéticos.

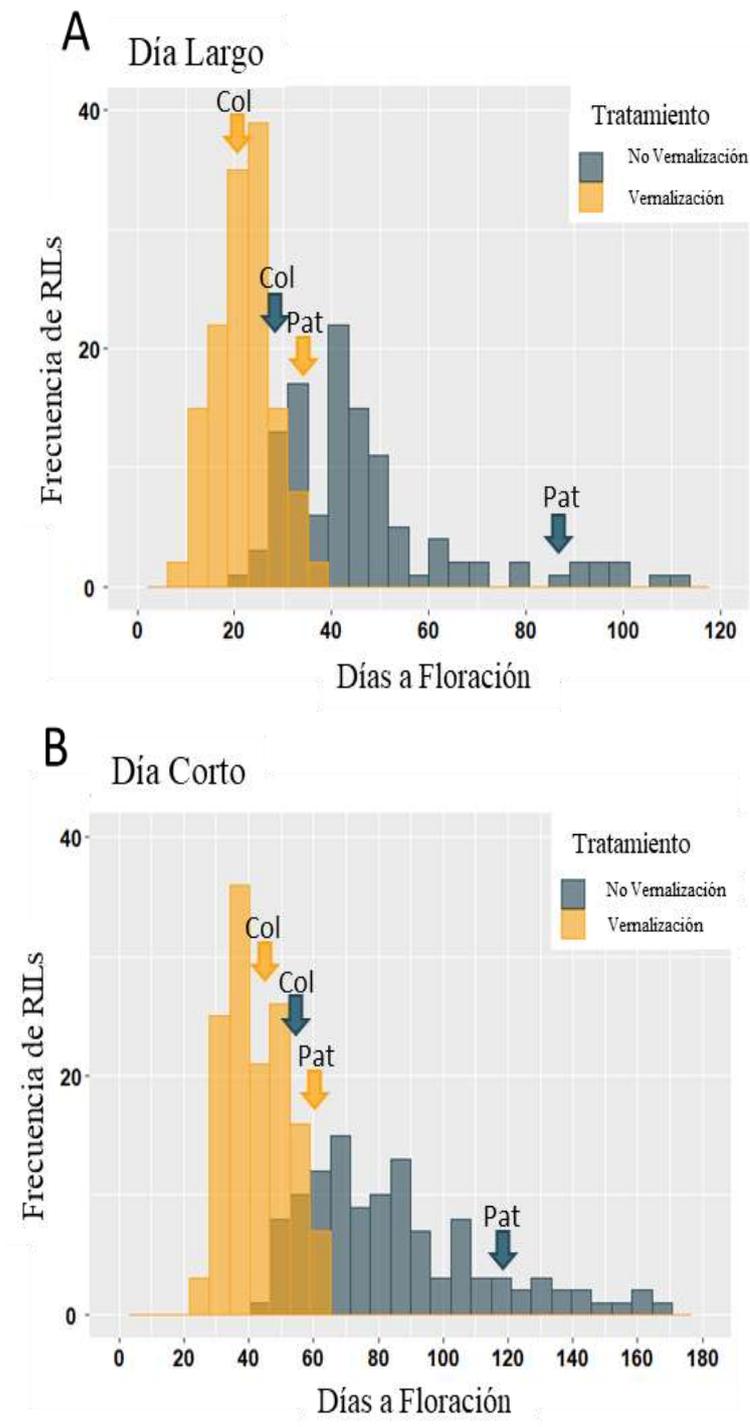


Figura 4.3: Histograma de la población de mapeo Col-0 x Pat para los días a floración en un fotoperiodo de (A) día largo y (B) día corto.

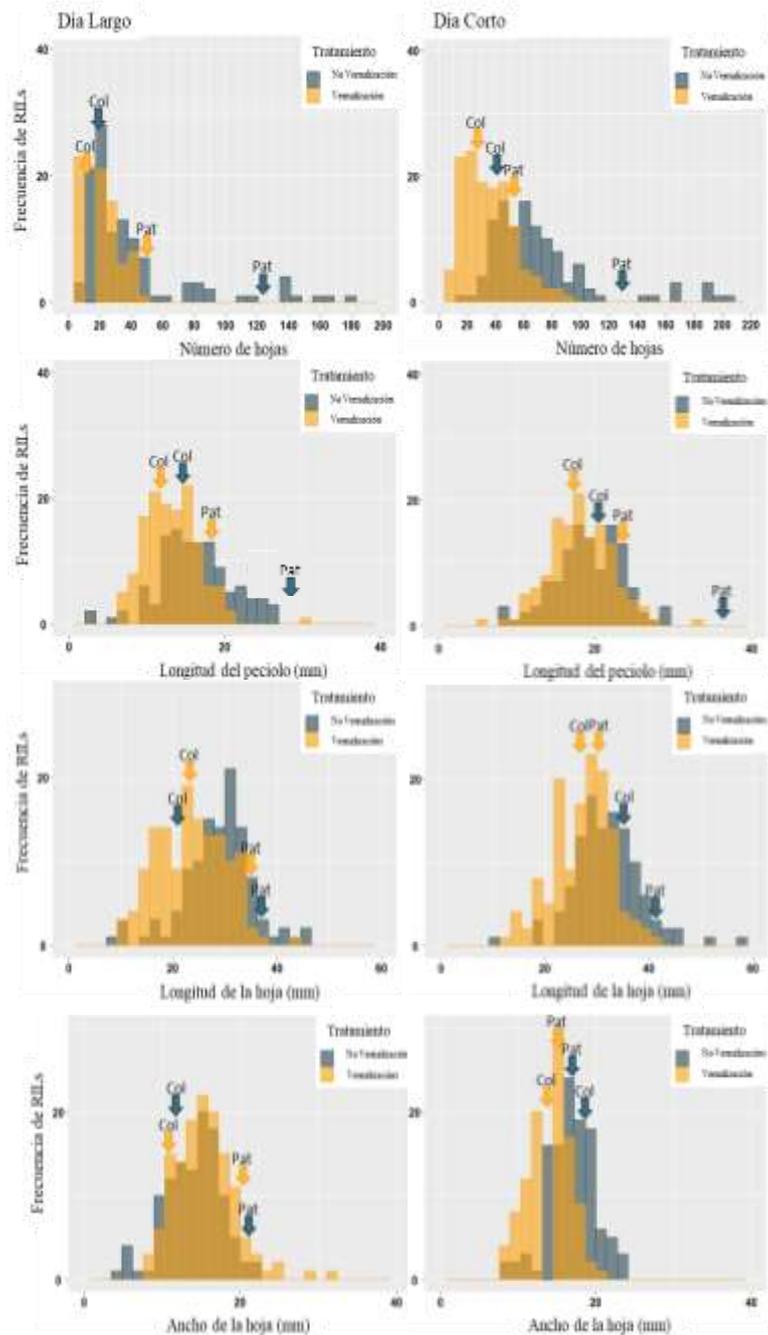


Figura 4.4: Histograma de la población de mapeo Col-0 x Pat para el número de hojas, longitud del peciolo, longitud de la hoja y ancho de la hoja en un fotoperiodo de (A) día largo y (B) día corto.

Posteriormente, se evaluó la correlación genética entre los caracteres estudiados de la población de RILs. Se estimó la correlación de Pearson para cada tratamiento resultante de la combinatoria de fotoperiodo y vernalización. El tratamiento de vernalización mostro la correlación positiva más alta en ambos fotoperiodos, entre la longitud de la hoja y la longitud del peciolo, con coeficientes de correlación de Pearson

de 0,94 y 0,8 en LD y SD, respectivamente. En condiciones de crecimiento sin vernalización, la correlación positiva más alta fue asociada a los caracteres de días a floración y número de hojas con coeficientes de correlación de 0,95 y 0,82 en LD y SD, respectivamente (Figura 4.5).

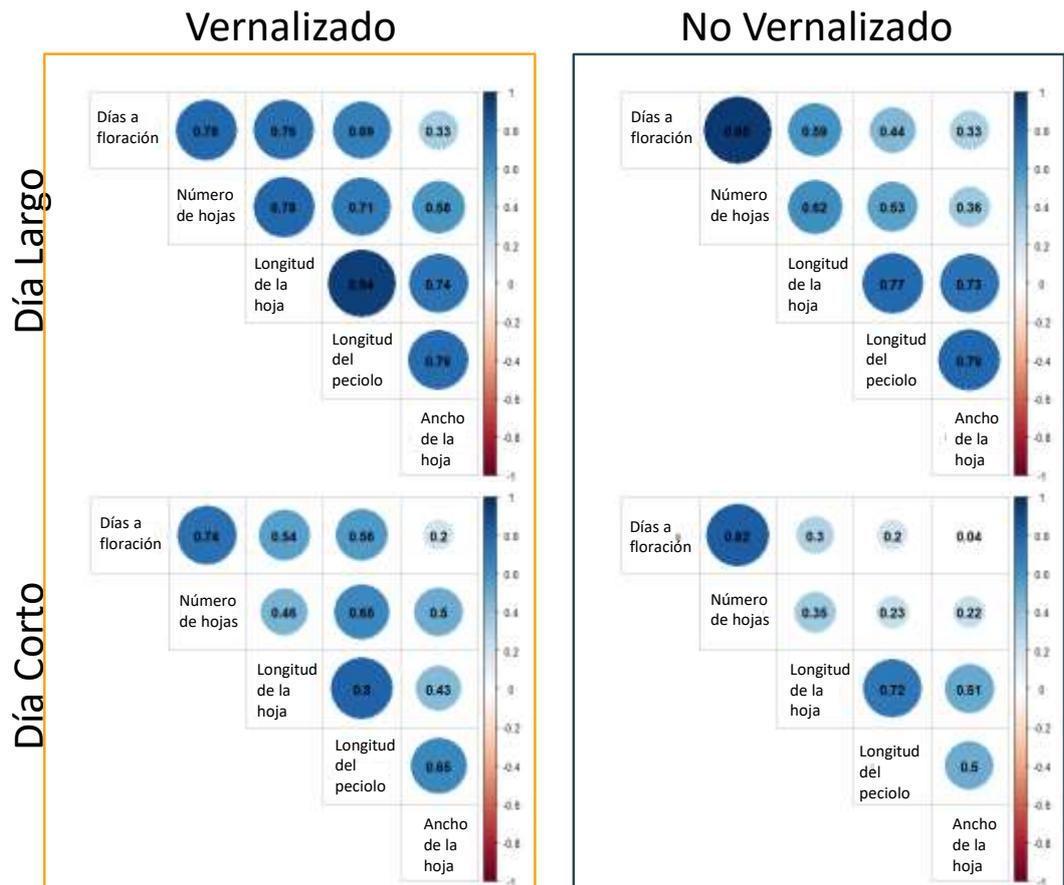


Figura 4.5: Correlación entre caracteres evaluados en la población RIL Col-0 x Pat. Los gráficos para cada tratamiento muestran el coeficiente de correlación de Pearson (positivo: azul, negativo: rojo).

Por otro lado, el coeficiente de variación porcentual (CV%), usado como un estimador de la heterogeneidad poblacional en cada carácter, fue más elevado para la variable número de hojas a floración en el tratamiento No-VERN/LD con 91,1%; y menor para los tratamientos No-VERN/SD, VERN/LD y VERN/SD con 53,4%, 50,3% y 49,4%, respectivamente (Figura 4.6). Por lo tanto, los tratamientos sin vernalización muestran un

mayor rango de respuesta en la distribución en el número de hojas de las RILs. Por un lado, en el tratamiento de No-VERN/SD muestra un rango de distribución de respuesta de RIL min-max = 16-204 hojas, mientras que el tratamiento de No-VERN/LD tiene un rango de respuestas de RIL min-max = 7,5-181 hojas; resultando en un mayor CV% y asimetría positiva con mayor cantidad de RILs distribuidas hacia la derecha (Figura 4.4). Tanto los caracteres foliares como la variable días a floración muestran un CV% por debajo del 53,4%, demostrando ser variables con menor dispersión en los datos con excepción de No-VERN/LD.

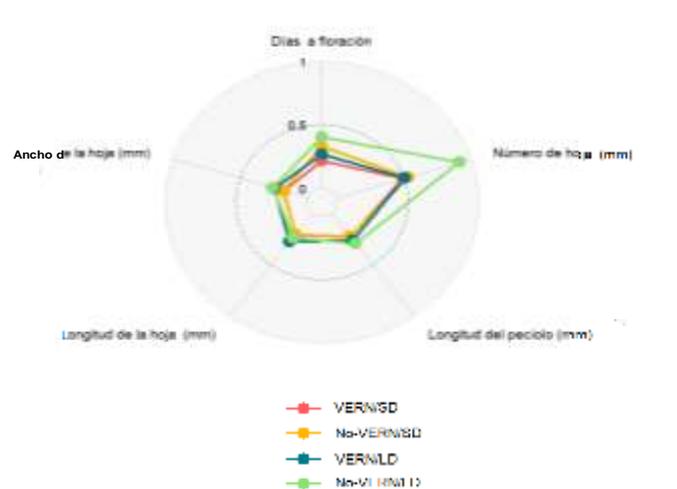


Figura 4.6: Plasticidad fenotípica en respuesta al ambiente de la población RIL. Gráfico de Estrella muestra el coeficiente de variación en cada tratamiento.

4.3.3. Mapeo de QTL asociados al fotoperiodo y vernalización en floración

Para identificar los QTL asociados a los caracteres descritos previamente en distintas condiciones de fotoperiodo y vernalización, realizamos un análisis de mapeo genotipo-fenotipo con la población de mapeo Col-0 x Pat. Se encontraron QTLs significativos para No-VERN/SD y No-VERN/LD en las variables fenotípicas de días a floración, número de hojas, longitud del peciolo y longitud de hoja; mientras que se encontraron QTLs significativos para días a floración, longitud de la hoja y ancho de la hoja en los tratamientos VERN/LD y VERN/SD (Cuadro S4.9 y Cuadro S4.10).

Por un lado, en las condiciones de No-VERN/SD y No-VERN/LD, encontramos

NoVern1 y *NoVern3* QTLs mapeados en el cromosoma I y *NoVern2* QTL en el cromosoma III. Tanto *NoVern1* y *NoVern2* QTL están asociados a días a floración, número de hojas a floración, longitud del peciolo y largo de hoja. *NoVern1* QTL mapeó para todos los caracteres significativos en los fotoperiodos LD y SD, excepto para el largo de la hoja que solo se encontró en el fotoperiodo LD. Por otro lado, *NoVern2* QTL se mapeo solo para el fotoperiodo SD (Figura 4.7). Sin embargo, la significancia de las asociaciones estadísticas, relacionadas al valor de LOD, fueron solo levemente superiores a la línea de corte en todos estos casos, por lo que no fueron seleccionados para una posterior caracterización. Por otro lado, en condiciones de vernalización, encontramos tres QTLs, con un LOD de mayor significancia estadística que la observada en condición de no vernalización. Los QTL más reveladores fueron: *VERNI* QTL que se encuentra en el cromosoma V, y *VERN2* QTL y *VERN3* QTL ubicados en el cromosoma 3 (Figura 4.8). El *VERNI* QTL resulto ser el más significativo, mapeándose en VERN/LD y VERN/SD para días a floración, y en VERN/LD también para la longitud de hoja (Cuadro S4.10). El efecto aditivo de *VERNI* QTL indica que el alelo de Col-0 retrasa la floración (Figura 4.9). Es interesante notar que en estas condiciones Col-0 presenta una floración acelerada con respecto a Pat, sugiriendo que el alelo causativo de Col-0 en *VERNI* QTL presenta polimorfismos o un control transcripcional que median una ganancia de función en un regulador negativo de la floración, o una pérdida de función en un regulador positivo, con respecto al alelo de Pat. Además, también sugiere que genes adicionales en coordenadas diferentes a *VERNI* deben ser los determinantes para definir la regulación diferencial en el tiempo de floración entre estas accesiones. Por último, cabe mencionar que entre los seis QTLs encontrados, se suman un total de 1114 genes anotados (Cuadro S4.11).

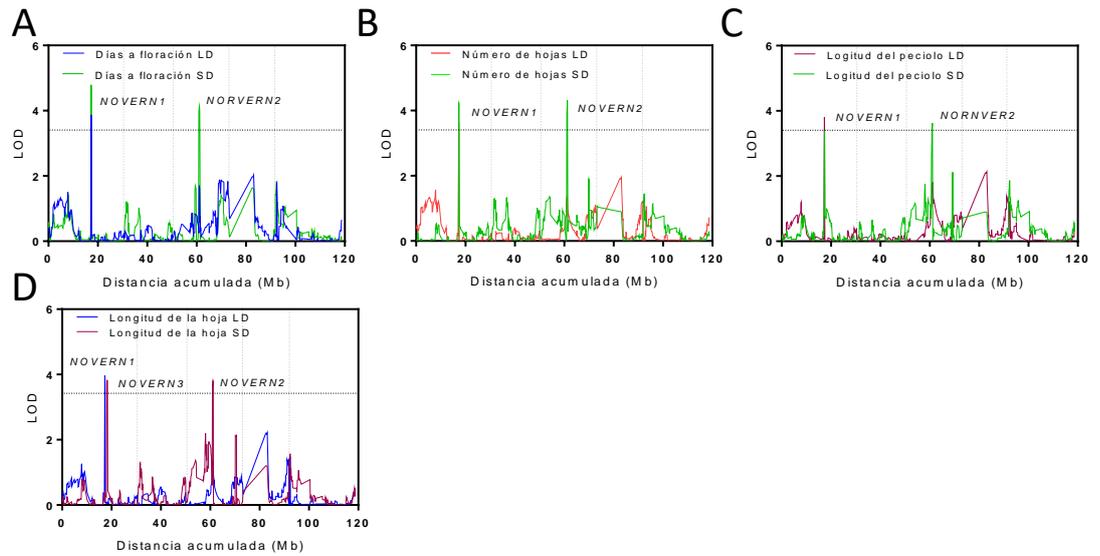


Figura 4.7: Mapeo de QTLs en condiciones de No-VERN/LD y No-VERN/SD. Mapeo QTL para (A) Floración, (B) Número de hojas (C) Longitud del peciolo, (D) Longitud de la hoja. La puntuación LOD se muestra para la distancia acumulada de los cinco cromosomas separados por líneas discontinuas verticales. La línea discontinua horizontal indica el valor del umbral de significación.

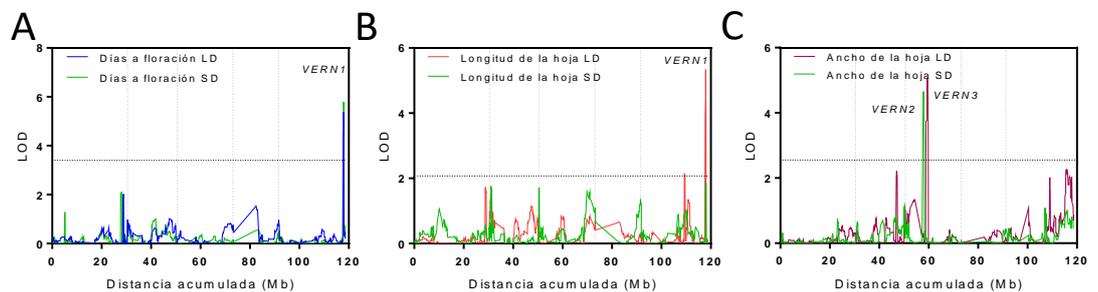


Figura 4.8: Mapeo de QTLs en condiciones de VERN/LD y VERN/SD. Mapeo QTL para (A) Floración, (B) Número de hojas (C) Ancho de la hoja. La puntuación LOD se muestra para la distancia acumulada de los cinco cromosomas separados por líneas discontinuas verticales. La línea discontinua horizontal indica el valor del umbral de significación.

4.3.4. Confirmación de *VERN1* QTL HIFs

El intervalo de confianza de *VERN1* QTL contiene 174 genes. Curiosamente, el QTL *VERN1* no solo representa el QTL de más significancia relacionado a floración bajo nuestras condiciones experimentales (LOD: 5.7 en la condición VERN/LD), sino que además se encuentra en coordenadas físicas incluídas en un QTL previamente analizado

para desetiación (ver capítulo 3). En síntesis, en el cromosoma V las coordenadas de *VERNI* QTL se encuentran entre 25.700-26.200 Kb para floración, mientras que *Bc1* QTL mapea entre las coordenadas 25.700-26.800 Kb para desetiación. Para validar la posición y los efectos aditivos de *VERNI* QTL, se utilizaron las líneas HIF 20 y HIF 71 (ver capítulo 3). Se estudiaron los efectos aditivos de los alelos Col-0 y Pat en *VERNI* QTL para aquellos tratamientos que se observaron asociaciones significativas; es decir, VERN/LD para los caracteres de días a floración y longitud de la hoja, y VERN/SD para el carácter de días a floración. Se validaron los efectos aditivos en las HIF 20 y 71 para días a floración, mas no se observó un fenotipo con diferencias significativas en la HIF 20 para la longitud de la hoja en VERN/LD (Figura 4.9 A y Cuadro 4.2). Por otro lado, en el tratamiento de VERN/SD, el alelo Col-0 mostró un mayor número de días a floración que el alelo Pat, confirmando los efectos aditivos en ambas HIFs (Figura 4.9 B y Cuadro 4.2). Los días a floración y el número de hojas estuvieron positivamente correlacionados en vernalización en ambos fotoperiodos (Figura 4.5). Por lo tanto, se evaluó si los efectos aditivos en la vernalización también son significativos para el número de hojas en ambos fotoperiodos. La respuesta fue significativa en SD para ambas HIFs; sin embargo, sólo fue significativo para la HIF 71 en LD (Figura 4.9 A y B). Concluimos que los efectos aditivos a favor del alelo Col-0 asociados a *VERNI* QTL (Cuadro S4.10) son más sensibles para días a floración y menos sensibles para el número de hojas a floración. En resumen, a pesar de no mapearse en el QTL *VERNI* el número de hojas, se midió este carácter al estar altamente correlacionado con los días a floración, y mostró tener diferencias significativas en la HIF 71 pero no en la HIF 20 en el tratamiento VERN/LD.

Como control de tratamiento de vernalización, se evaluaron No-VERN/LD y No-VERN/SD. Los resultados muestran que no se observa un efecto aditivo del alelo Col-0 en los días a floración para días a floración, número de hojas y longitud de la hoja en la HIF20, mientras que hay diferencias significativas para cada uno de los caracteres anteriormente mencionados en la HIF71, mientras que para el carácter de número de hojas las HIF 20 y 71 muestran tener diferencia significativa entre los alelos evaluados (Figura S4.1. A y B).

Cuadro 4.2: Medias del fenotipo de las HIF 20 y 71 condiciones de vernalización. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los alelos Col-0 y Pat para cada tratamiento analizadas por la prueba de *t-Student* (p-valor < 0.05).

Tratamiento	Fenotipo	Alelo Col-0		Alelo Pat	
		HIF 20	HIF 71	HIF 20	HIF 71
VERN/LD	Días a floración	27,4±0,3	25,4 ± 0,2	24,5 ± 0,2 ****	19,8 ± 0,27 ****
	Longitud de la hoja	27,7 ±0,4	29,9 ± 0,6	26,2 ± 0,5 ns	16,2 ± 0,4 ****
VERN/SD	Días a floración	52,5±0,5	45,6 ± 0,6	45,3 ± 0,3 ****	34,4 ± 0,4 ****

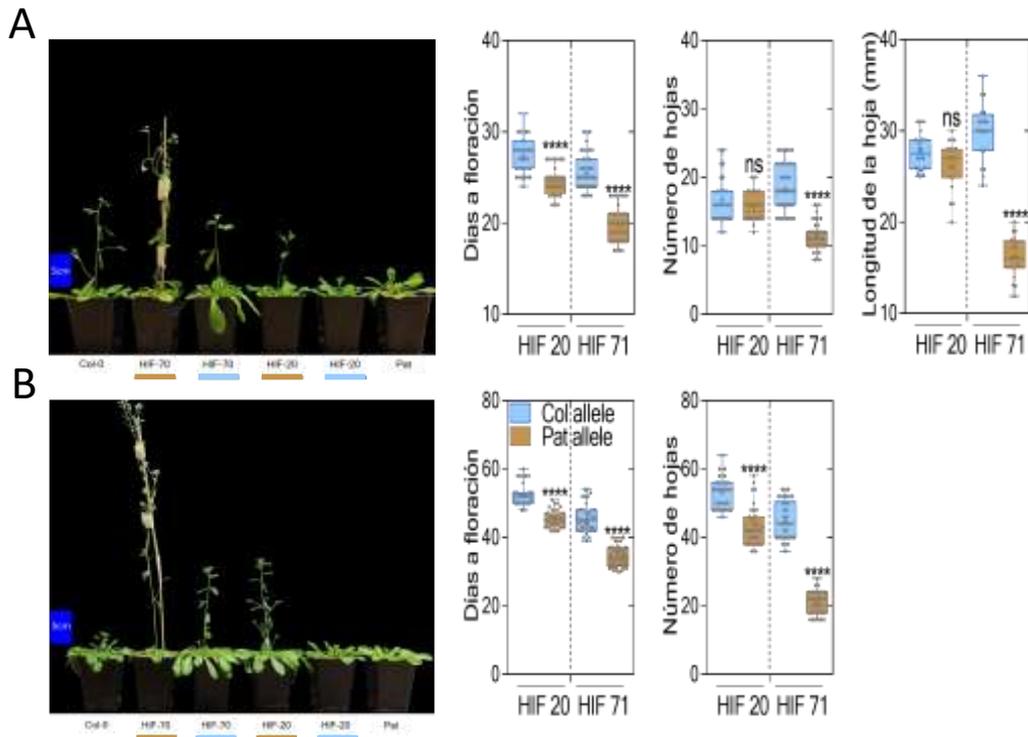


Figura 4.9: Confirmación de *VERN1* QTL por dos HIF independientes 20 y 71. Las fotos muestran plantas representativas en el momento de la floración para condiciones de *VERN*/LD (A) y *VERN*/SD (B). Dos líneas independientes HIF20 y HIF71 segregaron con los alelos Col-0 (izquierda) y Pat (derecha) en las coordenadas de *VERN1* QTL. Los diagramas de caja y bigotes representan los días de floración y el número de hojas para tres repeticiones (febrero-abril-mayo) y cada punto representa el valor de una planta medida, mientras que los distintos asteriscos indican diferencias significativas entre las medias ($n = 35-45$) analizadas por la prueba de *t-Student* (p -valor $< 0,05$).

4.3.5. Confirmación de *VERN1* QTL en NILs

Para confirmar los resultados obtenidos previamente, se desarrollaron NILs que se caracterizan por llevar alelos Pat en el QTL bajo estudio en un fondo genético mayormente enriquecido por alelos Col-0. Se seleccionaron las NIL 218 y NIL 236 a partir de las RILs correspondientes retrocruzadas con Col-0 por 3 generaciones. La selección se hizo con marcadores polimórficos entre Col-0 y Pat a través de genotipado por PCR. Las RILs elegidas fueron distintas a las utilizadas para generar las HIFs por dos razones. Primero, porque las RIL seleccionadas presentan un enriquecimiento mayor de alelos Col-0 (alrededor del 65%, estimado de los experimentos de resecuenciación), lo

que permite reducir el número de generaciones para lograr alta homocigosidad fuera del QTL. Por otra parte, porque las RIL 218 y la RIL 236 poseen homocigosis del alelo Pat dentro de las coordenadas de *VERNI*. Esta estrategia permite obtener alelos de *VERNI* pertenecientes a cada uno de los parentales con un fondo genético homogéneo siendo una robusta evidencia experimental para validar *VERNI* QTL. Adicionalmente, se facilita el posterior minado de recombinaciones previas para un futuro mapeo fino del gen responsable.

Los efectos aditivos de *VERNI* QTL fueron confirmados con las NIL 218 y NIL 236, usándose el mismo protocolo experimental previamente descrito para las HIFs. Las NILs 218 y 236 que tienen los alelos Pat para *VERNI* QTL consistentemente redujeron los días a floración (Figura 4.10 y Cuadro 4.3). En VERN/LD, los alelos Pat de las NIL218 y NIL236 aceleraron la floración 4 días para ambas líneas NIL, comparado al control Col-0 (Figura 4.10 A). La longitud de la hoja para ambas NILs también mostró diferencias significativas entre los alelos Col-0 y Pat, con los efectos esperados según el mapeo de *VERNI* QTL (Figura 4.10 A). Por otro lado, en VERN/SD, la respuesta a días a floración entre los alelos Pat y Col muestra una diferencia entre 11 y 8 días para las NILs 218 y 236, respectivamente (Figura 4.10 B y Cuadro 4.3). Se evaluó el número de hojas en los tratamientos VERN/LD y VERN/SD, y en ambos fotoperiodos las NILs que llevan el alelo Col-0 tuvieron significativamente mayor número de hojas (Figura 4.10 A y B). Estos datos confirman los efectos aditivos de los alelos recuperados del mapeo genético en *VERNI* QTL.

Al mismo tiempo, se evaluaron las NILs sin vernalización, en No-VERN/LD y No-VERN/SD. Ambas NILs muestran diferencias significativas donde el alelo Col-0 mantiene un mayor número de días a floración, número de hojas y longitud de la hoja en LD (Figura S4.2 A), y estos efectos son igualmente notorios para número hojas y de días

a floración en SD (Figura S4.2 B). Estos resultados confirman que los efectos de los alelos Col-0 y Pat en las NIL218 y NIL236 son robustos y estables para días a floración en ambos fotoperiodos.

Cuadro 4.3: Medias del fenotipo de las NILs 218 y 236 en condiciones de vernalización. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los alelos Col -0 y Pat para cada tratamiento analizadas por la prueba de *t-Student* (p-valor < 0,05).

Tratamiento	Fenotipo	Alelo Col-0		Alelo Pat	
		NIL 218	NIL 236	NIL 218	NIL 236
VERN/LD	Días a floración	27,5 ± 0,6	25,38 ± 0,38	19,1 ± 0,48	19,15 ± 0,31
				****	****
VERN/SD	Longitud de la hoja	23,53 ± 0,8	19,94 ± 0,43	16 ± 0,66	13,5 ± 0,61
				****	****
VERN/SD	Días a floración	68,5 ± 0,63	58,8 ± 0,95	57,3 ± 1,6	50,3 ± 1,24
				****	****

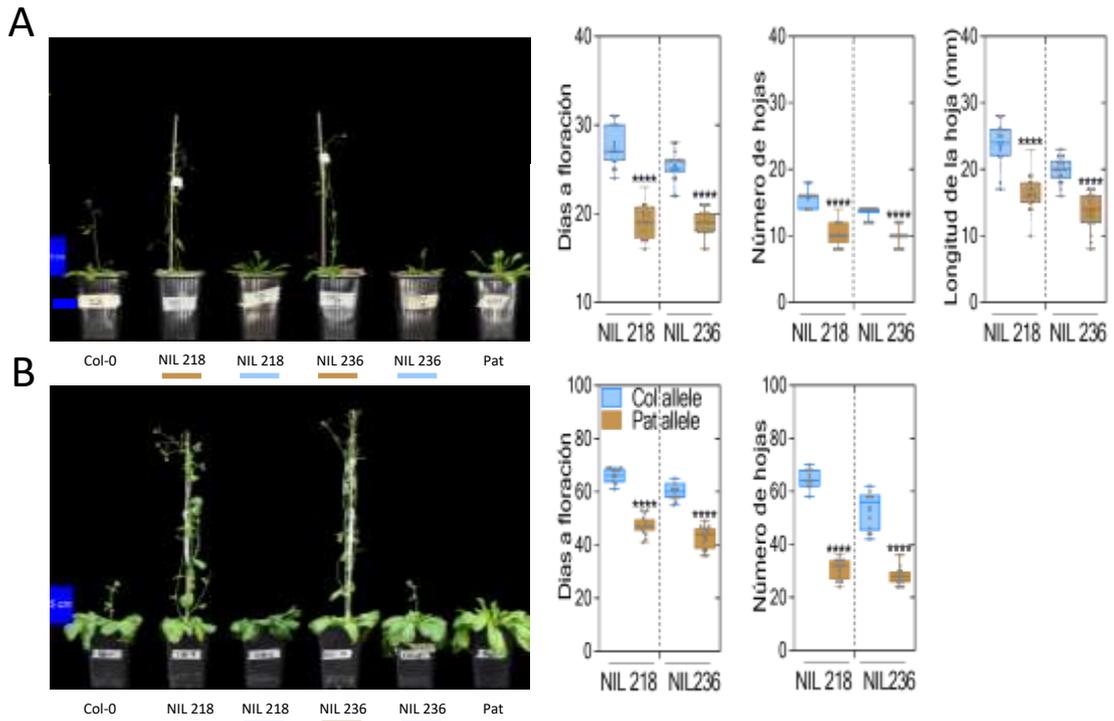


Figura 4.10: Confirmación de *VERNI* QTL por dos NILs independientes 218 y 236. Las fotos muestran plantas representativas en el momento de la floración para condiciones de vernalización en LD (A) y SD (B). NILs independientes 218 y NILs 236 segregando como alelos Col-0 (izquierda) y Pat (derecha) en el *VERNI* QTL. Las plantas se midieron cuando se mostró alcance floral (2 cm). Los diagramas de caja de bigotes representan los días de floración y el número de hojas para el día corto y largo, además la longitud de la hoja para el día largo y cada punto representa el valor de una planta medida, mientras que los distintos asteriscos indican diferencias significativas entre las medias (n = 16-20) analizadas por la prueba de *t-Student* (p-valor < 0,05).

4.3.6. Evaluación del fenotipo de las NILs para *VERNI/Bc* QTL en las respuestas de desetiología y a la luz de sombra

Dado que el intervalo de confianza de *VERNI* QTL se encuentra incluido en *Bc1* QTL mapeado en desetiología, evaluamos si las NILs generadas para confirmar *VERNI* QTL también presentan fenotipos fotomorfogénicos. Se llevaron a cabo tratamientos de desetiología como los descritos anteriormente (capítulo 3). En el tratamiento control de oscuridad (Osc), las NILs 218 y 236 con el alelo Col-0 presentaron una longitud del hipocótilo de $13,11 \text{ mm} \pm 0,39$ y $15,33 \text{ mm} \pm 0,25$, respectivamente. La respuesta en las NILs que segregaron con el alelo Pat mostró una longitud del hipocótilo de $15,01 \text{ mm} \pm 0,29$ y $14,56 \text{ mm} \pm 0,19$, respectivamente. Por lo tanto, se observan diferencias significativas entre los alelos Col-0 y Pat en la NIL218, pero no en la NIL 236 en el

tratamiento de oscuridad Osc (Figura 4.11). En el tratamiento de luz continua azul (Bc), las NILs 218 y 236 que segregaron con el alelo Col-0 tuvieron una respuesta de $3,00 \text{ mm} \pm 0,09$ y $3,10 \text{ mm} \pm 0,06$, mientras que las NIL que contiene el alelo Pat tuvieron una longitud del hipocótilo significativamente superior a $3,44 \text{ mm} \pm 0,08$ y $3,76 \text{ mm} \pm 0,08$, respectivamente (Figura 4.11). En luz rojo lejana (RLc), al igual que en Bc, ambas NILs mostraron diferencias alélicas significativas (Figura 4.11). Por último, en el tratamiento de sombra simulada (SA), solo se encontraron diferencias significativas solo para la NIL 218, al igual que en el caso del tratamiento de oscuridad (Osc) (Figura 4.11).

En conclusión, ambas NILs independientes validaron completamente dos de los cuatro tratamientos asociados a la desetiología relacionada al *Bcl* QTL, que incluye a *VERNI* QTL. Por lo tanto, los resultados fenotípicos obtenidos con HIF y NIL sugieren que la respuesta a la desetiología, en al menos los tratamientos Bc y RLc, estaría consistentemente asociada con la inducción floral en condiciones de vernalización (tanto en fotoperiodos LD como SD). En el caso de oscuridad (Osc) y sombra (SA), dado que no se observaron diferencias significativas en una de las NILs, esta asociación no estaría confirmada en esta instancia. Presumiblemente, interacciones epistáticas específicas a los tratamientos en oscuridad y sombra podrían explicar las diferencias entre NILs.

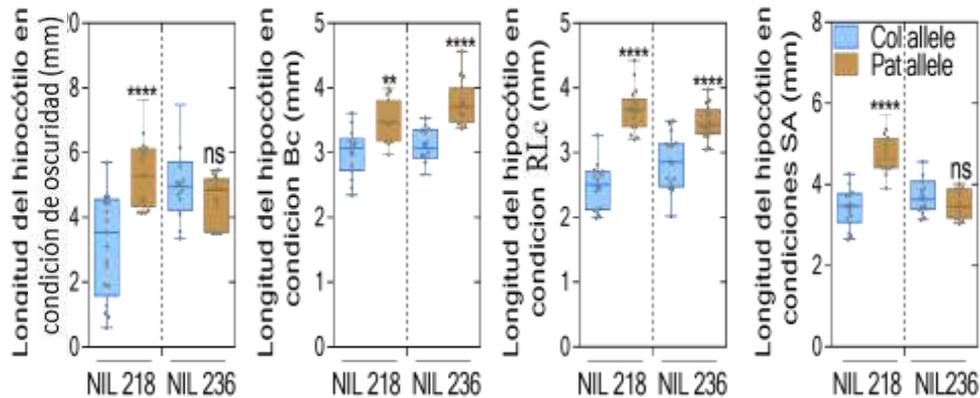


Figura 4.11: Fenotipo de las NILs 218 y 236 durante la desetiología en luz Bc, RLC y oscuridad y en sombra simulada (SA). Los puntos grises representan la media de 10 plántulas. Las plántulas fueron medidas al finalizar los cinco días de tratamiento, las estrellas indican las diferencias significativas entre las medias (n=9) analizado por la prueba de *t-Student* (p-valor < 0,05).

4.3.7. Selección de genes candidatos en *VERNI* QTL y caracterización de líneas mutantes en floración

Para evaluar potenciales genes responsables de *VERNI* QTL, se obtuvieron líneas de *A. thaliana* presentando mutaciones en genes informativos. La selección de las mutantes se llevó a cabo identificando genes asociados a floración o desetiología reconocidos en literatura, que tuviesen al menos un SNP de impacto en el alelo de Pat. No se encontró un candidato apropiado relacionado a las respuestas de luz, pero sí relacionados a vías de regulación floral. Los genes explorados fueron *MAF2*, *EIP9*, *HEN4* y *HAMI*. Se sabe que *MAF2* mantiene reprimida la floración cuando las plantas experimentan periodos transitorios de frío, al impactar negativamente sobre la funcionalidad de *FLC*, y además su expresión es regulada negativamente por frío al igual que *FLC*. Es decir, las mutantes de *MAF2* muestran un floración temprana en periodos prolongados de frío, mientras que las plantas sobreexpresantes de *MAF2* tienen floración tardía y no responden a la vernalización (Ratcliffe, et al., 2003; Airoidi et al., 2015). La mutante en el gen *EMF1-INTERACTING PROTEIN 9* (*EIP9*) presenta un fenotipo de floración temprano, mientras que la sobreexpresión de *EIP9* retrasa la floración (Park et al., 2011). La mutante en *HUA ENCANCER 4* (*HEN4*) tiene floración temprana entre 16

C° y 21 C° con respecto a Col-0, y su fenotipo es similar a la mutante *flm-3* (Ortuño-Miquel et al., 2019). La *HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE MYST FAMILY1* (*HAMI*) afecta el tiempo a floración mediado por *FLC* al modificar el estado de acetilación de la cromatina sobre la histona H4K5, generando un cambio a nivel transcripcional que retrasa la floración (Xiao et al., 2013). Las líneas mutantes de pérdida de función en estos genes (fondo genético Col-0), junto con los salvajes Col-0 y Pat, se evaluaron para los caracteres significativos de *VERNI* QTL en vernalización, VERN/LD y VERN/SD (Figure 4.1). Se estudió como control adicional la mutante *flm-3* que presenta floración temprana, *FLM/MAF1* es un factor de transcripción que pertenece a la familia *MAF* (Ortuño-Miquel et al., 2019). Al encontrarse dentro del intervalo físico del QTL *VERNI*, también se agregó como control negativo la mutante *maf3*, cuyo gen correspondiente no poseía polimorfismos de impacto en Pat.

En el tratamiento VERN/LD, como era esperable, Pat presentó un tiempo de floración mayor que Col-0 ($36,45 \pm 0,23$ días versus $24,39 \pm 0,23$ días respectivamente), mientras que la mutación *flm-3* aceleró la floración como era esperable por literatura ($18,41 \pm 0,23$ días). Solo las dos mutantes del gen candidato *MAF2* presentaron significativamente menos días a floración comparado con Col-0 (*maf 2-64* y *maf 2-71* con $20,59 \pm 0,33$ y $22,53 \pm 0,2$, respectivamente), mientras que *hen4-2* aumentó significativamente los días a floración ($28,9 \pm 0,4$ días). Según el efecto aditivo de *VERNI* QTL inferido de los mapeos genéticos y corroborado por los fenotipos de las HIFs y NILs, se espera que el alelo de Col-0 retrase la floración. Por lo tanto, una mutación en un gen causativo que copie el efecto fenotípico del alelo Pat debería acelerar la floración (disminuir el tiempo a floración). Siendo *MAF2* un represor cuya mutación acelera la floración, estos experimentos representarían la primera evidencia de que dicho gen podría estar involucrado en el fenotipo asociado a *VERNI* QTL. La floración estimada por el

número hojas constituyó un carácter mucho menos sensible que el número de días a floración. En nuestras condiciones experimentales, las plantas de *flm-3* tuvieron $14,89 \pm 0,98$ hojas y fue ligeramente menor que Col-0 con $15,16 \pm 0,80$ hojas (Figura 4.12 A). Tampoco las mutantes relacionadas a *MAF2* cambiaron significativamente el número hojas, mientras que otras líneas mutantes *maf3*, *eip9* *hen4* y *ham1* inclusive mostraron un leve incremento significativo respecto a Col-0. Finalmente, la longitud de la hoja se incrementó tanto en las mutantes de *MAF2*, como en *eip9* y *ham1* (Figura 4.12 A).

En condiciones de VERN/SD, las mutantes con menos días a floración respecto a Col-0 ($52,05 \pm 0,29$ días) fueron *flm-3*, *maf 2-64*, *maf 2-71* y *eip9*, con $43,3 \pm 1,57$, $38,28 \pm 0,98$, $47,31 \pm 0,87$ y $48,53 \pm 0,98$ días, respectivamente (Figura 4.12 B). En este caso, el número de hojas respecto a Col-0 fue significativo en *flm-3*, *maf2-64*, *maf 2-71* y *hen4-2* (Figura 4.12 B). En consecuencia, más allá del control negativo *flm-3*, sólo las mutantes relacionadas a *MAF2* presentaron fenotipos congruentes y en línea con lo esperado en vernalización independiente del fotoperiodo.

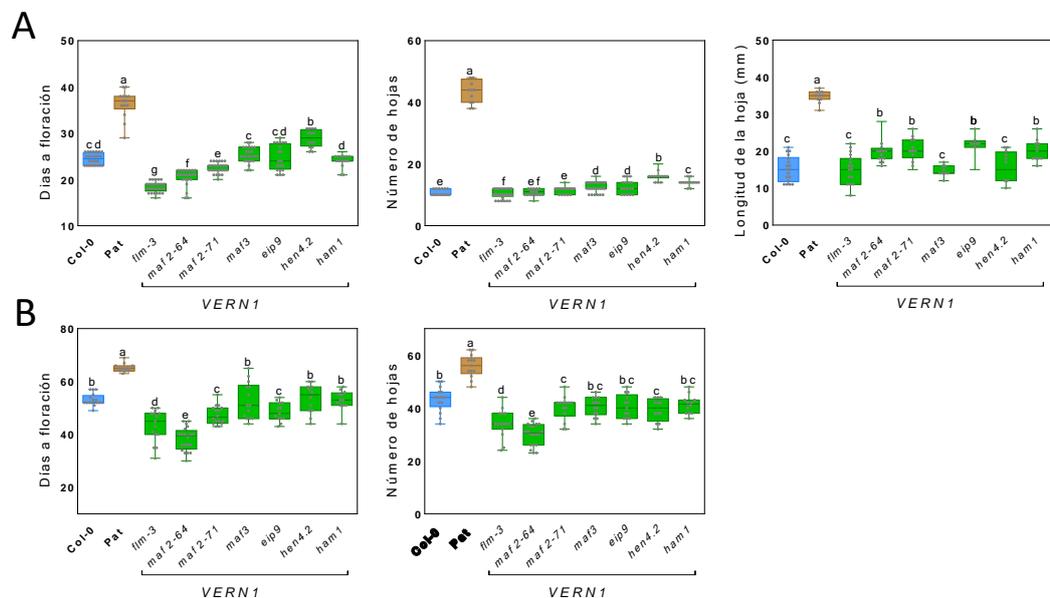


Figura 4.12: Fenotipo de floración de las mutantes *maf2* (*maf2-64* y *maf2-72*), *eip9*, *ham1* y *hen4-2* en los tratamientos de (A) VERN/LD: vernalización y día largo y (B) VERN/SD: vernalización y día corto. Las plantas fueron medidas cuando mostraron un escapo floral de 2cm de altura. El experimento cuenta con tres repeticiones donde fueron medidas entre 6 y 10 plantas. La caja y los bigotes muestran los datos alrededor de la mediana, mientras que las letras indican diferencias significativas entre Col-0 (control) analizado por ANOVA de un factor (test LSD, p-valor < 0,05).

4.3.8. Caracterización de las líneas mutantes asociadas a *VERNI* QTL en desetiación

Dado que *VERNI* QTL se encuentra incluido en las coordenadas físicas de *Bc1* QTL, se abre la interesante posibilidad de que el alelo causativo de ambos QTLs sea el mismo. Esta hipótesis de trabajo sugiere una intersección funcional entre las señalizaciones de floración y desetiación en la población de mapeo entre Col-0 y Pat. A partir de ello, se evaluó el fenotipo de las mutantes en genes candidatos de *VERNI* QTL usadas en esta sección, pero en las condiciones de desetiación descritas anteriormente (capítulo 3).

En oscuridad continua (Osc), tanto *flm-3* como las mutantes relacionadas a *MAF2* presentaron un largo de hipocótilo similar al de Pat, significativamente mayor al control salvaje Col-0. El resto de las mutantes presentaron una respuesta similar o menor a Col-0 (Figura 4.12 y Cuadro 4.4). En el tratamiento de luz azul continua (Bc), las observaciones fueron en general similares, pero con fenotipos mucho menos marcados; sin embargo, la línea mutante *ham1* presentó una respuesta notablemente superior a Col-0 y Pat (Figura 4.13 y Cuadro 4.4). En rojo lejano continuo (RLc), las mutantes *flm-3*, *maf 2-64* y *maf 2-71* presentaron hipocótilos significativamente mayores que Col-0, aunque en niveles mucho menos acentuados que Pat. En este caso, *hen4-2* y *ham1* mostraron respuestas diferenciales con fenotipos más robustos similares a los de Pat (Figura 4.13 y Cuadro 4.4). Finalmente, en mediciones de la longitud del hipocótilo al tratamiento de sombra, *flm-3*, *hen4-2* y *ham1* mostraron una respuesta significativamente mayor a Col-0, mientras que las otras mutantes *maf 2-64*, *maf 2-71*, *maf3* y *eip9* fueron similares o menores que Col-0 (Figura 4.12 y Cuadro 4.4). En conclusión, los resultados demuestran que el fenotipo de las mutantes relacionadas a *MAF2* presentan caracteres relativamente similares a los de Pat en las tres condiciones de desetiación y parcialmente en el tratamiento SA estudiadas en el capítulo 3 para *Bc* QTL (Figura 4.13).

MAF2 resulta ser el gen candidato por excelencia para explicar la variabilidad natural asociada a la desetiología y vernalización en Pat. Paralelamente, se evaluó el tratamiento control en luz blanca, donde prácticamente todas las mutantes obtuvieron valores significativos, pero apenas superiores a Col-0, y sólo *ham1* mostró tener una respuesta similar a Col-0 (Figura S4.4). Con el fin de evaluar el crecimiento relativo al control en oscuridad o luz blanca (WL), se obtuvieron los datos relativizados de Bc/Osc y RLc /Osc, así como el índice SA que es la relación de sombra/WL (ver capítulo 3). Las mutantes con un mayor cambio relativo que Col-0 en Bc/Osc y RLc /Osc fueron *hen4-2* y *ham1* (Figura S4.4). Finalmente, el índice (SA/WL) mostro que solo la mutante *ham1* tiene una mayor respuesta de crecimiento, pero las mutantes de *MAF2* presentaron una respuesta significativamente menor, de la misma manera que Pat (Figura S4.4). Por lo tanto, no se observa una mutante que predomine con la longitud del hipocótilo en las variables relativas evaluadas.

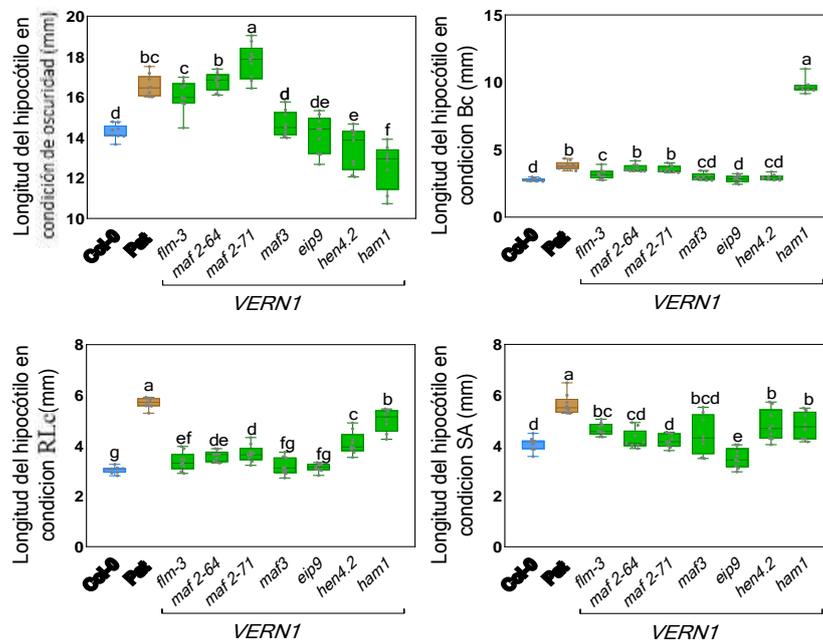


Figura 4.13. Fenotipo de las mutantes *maf2* (*maf2-64* y *maf2-72*), *eip9*, *ham1* y *hen4-2 flm3* y *maf3* en los tratamientos de oscuridad, Bc, RLc y sombra simulada (SA), así como el control en oscuridad (Osc). Las plántulas fueron medidas luego de 5 días de tratamiento, cada experimento conto con 3 réplicas (n=10 plántulas) y se repitió 3 veces. Los gráficos de caja de bigotes representan datos alrededor de la mediana, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas entre las medias analizadas por la prueba LSD (p-valor < 0,05).

Cuadro 4.4. Media de los fenotipos en tratamientos de luz para las mutantes en estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas entre Col-0 (control) analizado por ANOVA de un factor (test LSD, p-valor < 0.05), ver Figura (4.13)

	Tratamiento de luz			
	Osc	Bc	RLc	SA
Col-0	14,26 ± 0,1	2,77 ± 0,03	3,04 ± 0,00	4,06 ± 0,08
Pat	16,53 ± 0,1 *	3,82 ± 0,1 *	5,69 ± 0,06 *	5,61 ± 0,13 *
<i>maf2-64</i>	16,76 ± 0,1 *	3,62 ± 0,09 *	3,58 ± 0,07 *	4,24 ± 0,12 *
<i>maf2-71</i>	17,74 ± 0,2 *	3,55 ± 0,08 *	3,68 ± 0,11 *	4,19 ± 0,08
<i>maf3</i>	14,66 ± 0,2 *	3,0 ± 0,09	31,8 ± 0,1 *	4,44 ± 0,2
<i>eip9</i>	14,12 ± 0,3	2,85 ± 0,08 *	3,13 ± 0,05 *	3,49 ± 0,12
<i>hen4-2</i>	13,44 ± 0,3	2,96 ± 0,06	4,09 ± 0,14 *	4,78 ± 0,2 *
<i>ham1</i>	12,59 ± 0,3	9,7 ± 0,19 *	5,01 ± 0,13 *	4,78 ± 0,1 *

4.4. Discusión

El tiempo de floración es un proceso finamente regulado por el fotoperiodo y la vernalización. En *Arabidopsis* se han identificado múltiples vías que lo regulan en respuesta a señales ambientales y endógenas (Simpson & Dean, 2002; Amasino, 2010), así como genes involucrados en la integración de señales para inducir o reprimir la floración (Simpson & Dean, 2002; Amasino, 2010). Los clásicos estudios de variación natural en accesiones tardías en floración en *Arabidopsis* permitieron descifrar los QTL asociados a la vernalización. Posteriores análisis de genética cuantitativa, fortalecidos con análisis bioinformáticos, han facilitado la búsqueda de genes candidatos dentro de los intervalos genéticos causantes de los fenotipos asociados a la floración en poblaciones generadas a partir de accesiones naturales (Alonso-Blanco et al., 1998; Loudet et al., 2002; El-Lithy et al., 2004; Werner et al., 2005; El-Lithy et al., 2006; Simon et al., 2008). Los resultados de esta tesis contribuyeron a entender la arquitectura genética de la floración en la población de mapeo de Col-0 y Pat. En particular, los mapeos genéticos permitieron indagar y caracterizar QTLs de vernalización. Por otra parte, la superposición de los intervalos de QTL asociados a los procesos de desetiación y vernalización sugieren que genes comunes pueden ser responsables de ambas respuestas, las que ocurren en distintas fases del desarrollo.

El estudio de los caracteres vegetativos (longitud del peciolo, ancho y largo de la hoja) y de floración (días y número de hojas a floración) en la población de mapeo indican que existe variación fenotípica para poder explorar la arquitectura genética de estos caracteres en distintas condiciones fotoperiódicas y de vernalización. Anteriormente, Kasulin et al 2017 reportó que la accesión Patagonia (Pat) presenta floración tardía. El tiempo a floración estimado según el número de hojas de Pat fue mayor a 110 hojas en SD y LD, mientras que Col-0 florece con un promedio de 10 y 60 hojas en LD y SD respectivamente, mostrando diferencias altamente significativas entre Col-0 y Pat en

ambos fotoperiodos (Kasulin et al., 2017). Por otro lado, en condiciones de vernalización, Pat mostro una reducción del tiempo a floración a medida que la temperatura disminuye, mientras que Col-0 no mostró cambios en el número de hojas por vernalización. Por otra parte, los análisis genéticos a partir de la resecuenciación del genoma de Pat comparados con más de 1000 genotipos de Arabidopsis sugieren el haplogrupo de Pat está genéticamente asociados a las accesiones cuyo origen es Italia, los Balcanes y el Caucaso, muchas de las cuales tienen días a floración tardía (Ågren et al 2017; Grillo et al., 2013).

Bajo nuestras condiciones experimentales estudiamos el tiempo a floración utilizando una población de 163 RILs generada a partir de las accesiones Col-0 (sin requerimientos de vernalización) y Pat. Los tratamientos No-VERN/LD, No-VERN/SD, VERN/LD y VERN/SD evocaron amplias variaciones en los fenotipos estudiados, observándose una mayor respuesta en los días a floración y el número de hojas en los tratamientos no vernalizados. Al usar estas RILs, se obtuvieron distribuciones fenotípicas similares a las obtenidas por Grillo et al., 2013 y Ågren et al., 2017. Justamente, estos autores utilizaron RILs generadas a partir de una accesión de Italia que no tiene fuertes requerimientos de vernalización, y una accesión de Suecia la cual necesita largos periodos de frío para florecer. Otro aspecto importante es que todos los tratamientos y los fenotipos estudiados muestran líneas RILs trasgresoras de los fenotipos parentales, al igual que otras poblaciones estudiadas (Alonso-Blanco et al., 1998; El-Assal, et al., 2001; Loudet et al., 2002; El-Lithy et al., 2004; Werner et al., 2005; Simon et al., 2008) (Figura 4.3 A-B y 4.4 A-B).

Las variables de floración presentaron porcentajes de heredabilidad más elevadas en los cuatro tratamientos, mientras que las variables foliares pueden llegar a tener la menor heredabilidad, como es el caso del ancho de la hoja para el tratamiento VERN/SD.

Las correlaciones en las variables florares de días a floración y número de hojas

fueron entre el 95% y 82% en tratamientos sin vernalización y con vernalización entre 74% y 72%, respectivamente. Alonso-Blanco et al., 1998, muestra que la población Ler x Cvi tiene una alta correlación entre los días a floración y el número de hojas con valores superiores al 90% para los tratamientos de día largo, día largo vernalizado y día corto. Las correlaciones positivas entre los caracteres foliares y los días a floración en la población Col-0 x Pat son superiores a las publicadas por Simon et al., 2008, autores que hicieron uso de cinco poblaciones RILs en tratamientos de día largo sin vernalizar que mostraron correlaciones por de bajo de 50% para cinco poblaciones RIL.

El mapeo de QTL en la población RIL Col-0 x Pat detectó también un QTL de gran efecto asociado a la vernalización, que denominamos *VERNI* QTL, aunque también se detectaron QTLs de menor efecto, que posiblemente están limitados por el tamaño de la población de mapeo (Beavis, 1998). *VERNI* QTL mapea para días a floración en SD y LD, además de longitud de la hoja (mm) en LD en el tratamiento de vernalización. El alelo Col-0 en *VERNI* QTL incrementa los días a floración en 3.6 y 8.4 días en el tratamiento de VERN/LD y VERN/SD, respectivamente. Estos resultados fueron confirmados por dos HIFs y dos NILs independientes. En el carácter de longitud de la hoja, que también mapea en *VERNI* QTL, no se observaron diferencias alélicas significativas para la HIF20 pero si en la HIF71. Una posible explicación de esta aparente incongruencia es que podría estar asociada a las diferencias de los fondos genéticos de las RIL20 y RIL71.

A partir del intervalo de confianza físico del *VERNI* QTL, se seleccionaron genes asociados a floración y genes que tienen al menos un polimorfismo de alto impacto en Pat, llegándose a elegir cuatro genes potenciales que podrían explicar el fenotipo de días a floración y la longitud de la hoja bajo el tratamiento de vernalización. Se evaluaron las líneas *maf2-64*, *maf2-71*, *eip9*, *hen4-2* y *ham1* mutadas en genes candidatos de *VERNI*

QTL, en los tratamientos VERN/LD y VERN/SD. Solo *maf2-64* y *maf2-72* presentaron una aceleración de la floración. Los resultados con las mutantes de *MAF2* son congruentes con las respuestas reportadas por Ratcliffe et al., 2003, donde al evaluar plantas de mutantes en condiciones de vernalización a 4 C° por 3 semanas, obtuvieron resultados similares. Por otro lado, los experimentos realizados por Rosloski et al., 2013, en mutantes de *MAF2* con tratamiento de vernalización a 4 C° durante 16 días y que posteriormente fueron trasladadas a un fotoperiodo SD muestran menor número de hojas y días a floración respecto al control Col-0. Otro experimento realizado por Airoidi et al., 2015, demuestra que a bajas temperaturas, *MAF2* y *SVP* reprimen la floración en paralelo con *FLM*.

El intervalo del QTL *VERNI* (25,700 Kb -26,200 Kb) se encuentra físicamente dentro del QTL *Bc* (25,700 Kb - 26,700 Kb), asociado al crecimiento del hipocotilo de la plántulas en distintos ambientes lumínicos (Bc, RLc, oscuridad y sombra). Al evaluar las líneas independientes NILs, sólo se validaron los efectos aditivos en los tratamientos de Bc y RLc, a diferencia de las HIF donde el efecto aditivo del alelo Pat se confirmó en los tratamientos de Bc, RLc, sombra y oscuridad. Con la finalidad de demostrar si las respuestas de desetiación podrían estar ligadas a las redes que promueven la floración por vernalización, se evaluaron las mutantes de genes candidatos en floración durante la desetiación de las plántulas en distintas condiciones de luz. Las mutantes *maf2-64* y *maf2-71* mostraron tener respuestas de crecimiento de hipocótilos congruentes con la hipótesis de que el gen respectivo está involucrado en la variabilidad observada entre Col-0 y Pat. Los hallazgos de esta tesis sugieren que existe una interacción entre los estímulos de luz y temperatura en la promoción de la desetiación y floración, respectivamente. *VERNI* y *Bc1* son QTL pleiotrópicos que colocalizan para la regulación de los procesos de desetiación y floración. A partir de los resultados de este capítulo, sugerimos que

MAF2 podría ser el gen causal vinculado a este QTL pleiotrópico previamente identificado. Esta suposición es razonable, ya que los genes que intervienen las vías de señalización de floración podrían tener funciones más amplias de lo que se cree. Por ejemplo, consideremos varios casos descritos para otros genes que tienen funciones en distintos procesos: (i) *FLC* es un gen represor de la floración en la señalización por vernalización y también está implicado en la regulación de la germinación de semillas (Chiang et al., 2009), (ii) *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* puede promover la floración, así como la apertura de los estomas y la formación de flores (Kimura et al., 2015), (iii) *Tempranillo 1 (TEMI)* reprime la floración alargando la duración de la fase juvenil (Sgamma et al., 2014) y la participa en la formación de los tricomas (Matías-Hernández et al., 2016). En resumen, nuevos experimentos se necesitan para identificar el gen causal de VERN1 QTL y si éste participa en la integración de señales asociadas a los procesos de desetiología y vernalización.

Capítulo 5. Discusión General

En el presente capítulo: (i) se contrastan las hipótesis planteadas en el capítulo 1; (ii) se destacan los aportes de esta tesis al avance del conocimiento actual sobre la variabilidad natural en respuestas morfogénicas y del desarrollo asociadas a la luz y temperatura; y (iii) se presentan posibles líneas de investigación futuras que surgen de los resultados obtenidos.

5.1. Contraste de las hipótesis planteadas

En el presente trabajo de tesis se abordaron tópicos relacionados a la correcta construcción y validación de una población de mapeo genético a partir de genotipos contrastantes, la construcción de un mapa genético a partir de datos de resecuenciación poblacional, el análisis fisiológico de fenotipos vegetales con énfasis en desetiación y floración para llevar adelante asociaciones genotipo-fenotipo efectivas, la manipulación genética de porciones cromosómicas que dilucidan la arquitectura de dichos fenotipos, y el análisis específico de mutantes que aportan a reconocer los genes candidatos que pueden ser causativos del fenotipo observado. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos evaluar si las hipótesis planteadas en esta tesis de la siguiente manera:

Hipótesis 1: “QTL para la respuesta de desetiación de plántulas se mapean en la población de RILs entre Col-0 y Pat porque las líneas parentales de la población de mapeo tienen fenotipos contrastantes.” Esta hipótesis es verdadera. El mapeo de la población de RIL Col-0 x Pat demostró que existen siete QTLs para la desetiación (*Rc1*, *Bc1*, *RLc 1*, *Bc2*, *Dark1*, *Bc3* y *Rc2*) (Figura. 3.7). Los QTLs más relevantes obtenidos fueron *Rc1* QTL, que mapeo en Rc y Rc/Osc, mientras que *Bc1* QTL mapeo en Bc, RLc, Osc para el crecimiento de hipocótilo durante la desetiación y en sombra simulada (SA) en el experimento de escape al sombreado (Figura 3.7). Una vez mapeados los caracteres, se llevó a cabo la validación de los QTLs por medio de la generación de familias de líneas

introgresadas y heterocigotas (HIFs) para los QTL *Rc1* y *Bc1*. Los resultados validaron las conclusiones del mapeo, mostrando que el efecto del alelo Pat incrementa la longitud del hipocótilo en los tratamientos evaluados para los QTLs *Rc1* y *Bc1* (Figura 3.8 y 3.9). Los resultados de estas manipulaciones genéticas demuestran que las HIF son una herramienta adicional que corroboran los resultados obtenidos de la salida del mapeo y confirman que la población de mapeo obtenida es de buena calidad. En Loudet et al., 2008, las HIFs fueron una herramienta poderosa para identificar al gen causal *TZP* en *LIGHT5* QTL, responsable del crecimiento mayor del hipocótilo de la línea parental Sha con respecto a la línea parental Bay. En este caso la HIF350-Sha de la región *LIGHT5* QTL mostró hipocótilos más largos con respecto a la HIF350-Bay en luz azul. Por otra parte, Coluccio et al., 2011, mapearon *EODINDEX1* QTL para la respuesta de escape al sombreado en la población de RIL de Bay x Sha. Experimentos adicionales con HIFs en la región cromosómica del QTL confirmaron que los alelos Bay promueven una mayor respuesta de escape al sombreado. Adicionales experimentos de complementación cuantitativa con mutantes de genes candidatos permitieron identificar a *ELF3* como el gen candidato en la regulación del crecimiento del hipocótilo en condiciones de sombreado. Estos resultados confirman los resultados observados por Jiménez-Gómez et al., 2010. En conclusión, el uso de evidencias genéticas independientes como las HIF, para la confirmación de los efectos aditivos de un QTL, es una herramienta robusta necesaria para avanzar en la búsqueda del gen causal asociado al QTL.

Hipótesis 2: “La hiposensibilidad a la luz de Pat es explicada por polimorfismos de genes fotomorfogénicos que mapean en QTL identificados en las respuestas de desetiación y escape al sombreado”. Esta hipótesis es verdadera. Luego de realizados los mapeos y confirmados los QTL de desetiación con herramientas genéticas independientes (HIFs), realizamos la búsqueda de genes candidatos asociados con los QTLs de desetiación más

relevantes. Entre los genes que mapean en *Rc1* QTL, *TZP* es sugerido como el gen candidato involucrado en la elongación del hipocótilo en luz R (Cuadro S3.7). El análisis informático identificó genes documentados por estar asociados a la respuesta a la luz dentro del intervalo de *Rc1* QTL (Cuadro S3.11A). Luego seleccionamos los genes con SNP de alto impacto, identificando evidencias de que el alelo de Pat posee una proteína *TZP* mutada con un codón de stop prematuro que la hace hiposensible en el crecimiento del hipocótilo en luz R, lo que va en línea con los resultados observados en las mutantes de *tzp* en el fondo genético Col-0 (Figura 3.10). Por otra parte, en los experimentos de escape al sombreado, se identificó a *SARI* QTL en el cromosoma 2 que contiene al gen *PHYB* para la respuesta de escape al sombreado que proviene de relativizar la respuesta de crecimiento entre los tratamientos de sombra y luz blanca (Figura 3.7). Los análisis indican que *PHYB*-Pat presenta cuatro polimorfismos en la región codificante potencialmente responsables de la menor respuesta de escape al sombreado de Pat con respecto a Col-0. Estudios fisiológicos con plantas transgénicas generadas con cada uno de los cuatro polimorfismos de *PHYB*-Pat sobre el cDNA de *PHYB*-Col en un fondo mutante nulo de *phyB-9* demostraron que los polimorfismos de Pat (una delección GGGR en la región amino terminal y dos polimorfismos no sinónimos en la región carboxi-terminal) son responsables de la menor respuesta de escape al sombreado de Pat (Ruiz et al., 2022). Por otro lado, en *Bc1* QTL, el gen *ABAI* falló en demostrar consistencia en ciertas respuestas esperadas *a priori* al evaluar sus mutantes (Figura 3.10).

Hipótesis 3: “QTL de vernalización se mapean en la población de RILs entre Col-0 y Pat porque las líneas parentales de la población de mapeo son contrastes en la respuesta de floración”. Esta hipótesis es verdadera. Se mapearon seis QTLs para floración. Tres de los QTLs identificados se asociaron con el tratamiento de vernalización (Figura 4.8). *VERNI* QTL fue muy significativo y explica 15.5% de la variabilidad fenotípica

observada para los caracteres de días a floración y longitud de la hoja a floración (Cuadro S4.10). Es interesante destacar que *VERNI* QTL colocaliza con *Bcl* QTL asociado con la respuesta de desetiación (Figura 3.7). Las HIFs demostraron un incremento en el número de días a floración en las líneas que contenían el alelo Col-0, corroborando los resultados obtenidos en el análisis de QTL (Figura 4.9). Asimismo, se revalidó la presencia de *VERNI* QTL usando líneas genéticas independientes de NILs, las cuales verificaron que los alelos Col-0 contribuyen al efecto aditivo relacionado a la floración tardía (Figura 4.10). Es interesante destacar que los alelos de Pat en *VERNI* QTL promueven la floración temprana a pesar de que Pat florece tardíamente sin vernalización con respecto a Col-0 reforzando la idea que los caracteres cuantitativos como la floración son el resultado de efectos aditivos contrastantes de muchos QTLs. Los experimentos fisiológicos usando HIFs y NILs confirman el correcto mapeo de *VERNI* QTL por dos vías independientes.

Hipótesis 4: “Los requerimientos de vernalización de Pat son explicados por polimorfismos de genes de floración que mapean en los intervalos de confianza de los QTL identificados”. Esta hipótesis es verdadera. Se seleccionaron posibles genes candidatos que fueran responsables del fenotipo de floración en tratamientos de vernalización para *VERNI* QTL. Entre ellos se identificó a *MAF2* como posible gen candidato. El análisis informático de los polimorfismos de Pat-*MAF2* detectó dos SNPs de alto impacto, un *missense variant* y otro *splice acceptor variant*, que podrían ser los causantes de los efectos aditivos de floración temprana de *VERNI* QTL (Cuadro S4.13). En nuestras condiciones, las mutantes del gen *MAF2* florecieron antes que Col-0 (Figura 4.12). Esto era lo esperable de una mutación en un represor floral relacionado a la vernalización, debido a que una variante alélica de Pat mutada en un represor estaría relacionada a un fenotipo vernalizado de floración temprana. Sin embargo, no se pudo

observar una respuesta menor a Col-0 en el fenotipo de longitud de la hoja en las mutantes *MAF2* sugiriendo que es un gen candidato más fuertemente asociado al carácter de tiempo a floración bajo nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, es necesario aclarar que la salida del mapeo de *VERNI* QTL indica que el alelo que le confiere un incremento de días a floración que se heredó del alelo Col-0, el cual no es susceptible a la respuesta de vernalización asociada a Pat que es de floración tardía. Concluimos que los alelos de *VERNI*-Pat contribuye a una floración temprana bajo periodos de frío prolongados.

Hipótesis 5: “La colocalización de QTL para fotomorfogénesis y vernalización ocurre porque un mismo gen causal controla ambas respuestas fisiológicas”. Esta hipótesis es parcialmente verdadera. Al mapear los QTL para desetiación y vernalización, se observó que *VERNI* QTL colocaliza con *Bc1* QTL (Figura 3.7 y 4.8). Estos resultados que fueron corroborados por evidencias independientes de HIFs y NILs sugieren que un mismo gen podría ser responsable de menor respuesta a luz de los alelos Pat en *Bc1* QTL durante la desetiación y potencialmente contribuir causalmente a la aceleración de la floración como lo indican los efectos aditivos en *VERNI* QTL (Figura 4.9 y 4.10). Los resultados fisiológicos de crecimiento de hipocótilos en las NILs corroboran los efectos aditivos de hiposensibilidad a la luz los alelos Pat al menos en luz Bc y RLc. Por otra parte, la NIL218, pero no la NIL236, corroboró esperado para largo de hipocótilo en oscuridad y sombra simulada (Figura 4.11). Adicionalmente, las mutantes nulas del gen *MAF2* mostraron al igual que Pat que son hiposensibles a la luz sugiriendo que es un fuerte gen candidato de *Bc1*/*SHADE* QTL y *VERNI* QTLs (Figura 4.13).

5.2. Aportes e implicancias de las tesis

En la tesis se demuestra la correcta construcción de la población de mapeo RIL Col-0 x Pat. La tesis muestra la generación de una población de mapeo de 163 RILs, su genotipado y la correcta construcción del mapa genético que permitió mapear con calidad

y sensibilidad QTL para desetiología, respuesta de escape al sombreado y floración. Durante la construcción del mapa genético se observó una distorsión en la segregación del brazo superior del cromosoma IV. Estudios complementarios mediante el uso de marcadores CAPS en la generación de RILs F1, F2 y F7 se demostró que esa distorsión fue un sub-producto no deseado durante la construcción de la población de mapeo para llegar a la F6 cuando las líneas RILs generadas en la F1 alcanzaron un alto grado de homocigosis. Está documentado que algunas poblaciones RIL pueden presentar fuertes distorsiones de segregación en ciertas zonas cromosómicas, conduciendo a la pérdida de recombinaciones; lo que da lugar a distorsiones de la frecuencia alélica, y la disminución de la variación y potencia de detección de QTLs (Rifkin, 2012). Al igual que otros casos de literatura (Alonso-Blanco et al., 1998; Loudet et al., 2002 y Törjék et al., 2006), la población RIL Col-0 x Pat muestra problemas de segregación. A pesar de que la distorsión en el brazo superior del cromosoma IV es una desventaja para la identificación de QTL en esa región, esto no impidió reconocer zonas físicas del genoma de Arabidopsis, que explican con suficiente significancia la variabilidad fenotípica de la población de mapeo. Los QTLs identificados se analizaron con alto grado de discernimiento genético, en virtud de la capacidad de obtener marcadores moleculares relativamente pequeños gracias a la aplicación de tecnologías modernas de secuenciación. Podemos concluir entonces que la población RIL Col-0 x Pat es un excelente recurso genético que está disponible libremente para hacer mapeos de QTLs bajo distintas condiciones experimentales y para distintos caracteres de interés.

Otro aporte de la tesis es la validación de los efectos aditivos de los QTLs identificados en los mapeos con materiales genéticos independientes. En esta tesis se generaron HIFs y NILs para validar los efectos alélicos de Pat. Las HIF sugieren al alelo Pat-*TZP* como variante natural que explica las respuestas de la desetiología en

tratamientos de *Rc1* QTL. Por otro lado, las líneas HIFs y NILs de *VERNI* QTL nos permitieron validar el QTL por dos vías independientes dando robustez a los análisis para continuar con la caracterización de los genes candidatos asociados. Las NILs además nos permitieron corroborar los efectos aditivos de *Bc1* QTL para desetiología. Estos resultados demuestran que tanto para *Rc1* QTL y *VERNI/Bc1* QTL pudimos generar líneas independiente confiables para el estudio de la variabilidad natural en la población de RIL entre Col-0 y Pat.

Por último, es importante puntualizar que las mutantes del gen *MAF2* demostraron un fenotipo diferencial para la respuesta de desetiología y floración temprana en condiciones de vernalización en nuestras condiciones experimentales. Si bien se ha demostrado que las mutantes *maf2* tienen floración temprana en condiciones de vernalización (Ratcliffe et al., 2003; Airoidi et al., 2015), los resultados de esta tesis destacan la novedosa función de un represor floral en las vías de señalización lumínica durante los primeros días del establecimiento de la plántula. A la fecha, no hemos encontrado evidencias en la literatura de un gen que tenga una función dual en las respuestas de desetiología y vernalización. Se infiere que el alelo Pat-*MAF2* contribuiría no solo a la regulación de la floración, sino también al establecimiento de la plántula en las primeras fases del desarrollo. Esta asociación entre la desetiología en plántulas y el efecto de la vernalización prolongada implica una contribución a la comprensión de las redes de señalización en el desarrollo.

5.3. Investigaciones futuras

La población RIL, al ser prácticamente homocigota (es decir una población estable), puede utilizarse para el estudio de otros caracteres fenotípicos de importancia. Por ejemplo, se podría usar este recurso genético para mapear QTL en otras respuestas y procesos como la respuesta a la luz UVB, (tanto como respuesta fotomorfogénica o

respuesta al estrés), el crecimiento de la raíz, las respuestas en condiciones de sequía o inundación. En algunas de estas respuestas ya hemos evidenciado respuestas contrastantes entre los parentales Col-0 y Pat.

En relación a la distorsión de segregación observada en el brazo superior del cromosoma IV se proponen distintas líneas de trabajo. Por un lado, se debería estudiar de forma aislada la primera porción del cromosoma IV para su correcta evaluación con diferentes umbrales que penalicen la distorsión de segregación permitiendo que ambos alelos tengan la misma valoración durante el análisis para observar si existe algún QTL de relevancia en esa región. Por otra parte, el brazo superior del cromosoma IV tiene una relevancia particular en la respuesta de vernalización porque está documentado la presencia de genes de floración con SNPs de alto impacto en la región del cromosoma IV donde se encuentra la inversión paracéntrica. En esta región se encuentra *FRI* que es un regulador negativo de la floración, esta inversión incluye al alelo *FRI-Pat*. El gen *FRI-Pat* tiene dos polimorfismos que podrían contribuir al requerimiento de vernalización de Pat.

Otra posible línea de investigación es el mapeo fino de los QTLs más promisorios identificados en esta tesis. Para avanzar en el mapeo fino del QTL se pueden generar marcadores más pequeños a partir de la secuenciación de las RIL permitiendo obtener intervalos más pequeños causales del fenotipo siendo Rc1, Bc1/SHADE y *VERNI* QTL los QTL más promisorios para el mapeo fino. Otros QTLs, como *NoVern1* y *NoVern2*, muestran tener una alta variabilidad y efecto aditivo y estar asociados a múltiples variables de floración y vegetativas también pueden ser de interés para futuros estudios.

Los resultados presentados en la tesis muestran un avance significativo en la comprensión cuantitativa de las respuestas de las plantas a la luz y a la temperatura. Los mapeos genéticos de las respuestas fotomorfogénicas, como desetiación y escape al sombreado, y la respuesta de vernalización permitieron identificar QTL asociados a la

percepción de señales ambientales que regulan el crecimiento de *Arabidopsis*. El poder asociar los diferentes tratamientos de luz en plántulas con la respuesta de floración en condiciones de vernalización levantan nuevos interrogantes, que se deberían evaluar en detalle y que pueden ser el punto de partida para investigaciones futuras. Una nueva línea de investigación podría iniciarse con la corroboración molecular de la asociación entre desetiología y vernalización por *MAF2*. Para demostrar la causalidad de *MAF2* en *VERNI* QTL requiere la generación de plantas transgénicas con las variantes alélicas del gen *MAF2*-Pat o *MAF2*-Col-0 en el fondo del mutante nulo de *maf2*. Una vez obtenida la T3 se pueden llevar a cabo los experimentos de desetiología y floración para documentar sus fenotipos. En paralelo se podría demostrar la causalidad de los dos polimorfismos puntuales de alto impacto propuestos que documentamos en *MAF2* generando las construcciones alélicas específicas.

En resumen, los resultados de esta tesis son un aporte al estudio de la variación genética natural en las respuestas de las plantas a la luz y la temperatura. Los resultados de esta tesis contribuyen a tener una mirada más amplia y completa de las bases genéticas en la variabilidad fenotípica en las respuestas de desetiología, escape al sombreado y vernalización. Este conocimiento puede contribuir a largo plazo para la obtención de genotipos superiores que aumenten los rendimientos de los cultivos. Se sabe que muchos procesos como la implantación exitosa de un cultivo, las relaciones de competencia entre individuos por los recursos y el ajuste en el tiempo de la floración por bajas temperaturas son determinantes del rendimiento de los cultivos (Pierik et al., 2013; Huber et al., 2021; Staniak et al., 2021). Por lo tanto, una mejor comprensión de estos procesos en especies modelos son el primer paso necesario para futuros desarrollos de mejoramiento.

Bibliografía

- Adams, S., Manfield, I., Stockley, P., & Carré, I. A. (2015). Revised Morning Loops of the Arabidopsis Circadian Clock Based on Analyses of Direct Regulatory Interactions. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143943>.
- Ågren, J., Oakley, C. G., Lundemo, S., & Schemske, D. W. (2017). Adaptive divergence in flowering time among natural populations of *Arabidopsis thaliana*: Estimates of selection and QTL mapping. *Evolution*, *71*(3), 550–564. <https://doi.org/10.1111/evo.13126>.
- Airoldi, C. A., McKay, M., & Davies, B. (2015). MAF2 Is Regulated by Temperature-Dependent Splicing and Represses Flowering at Low Temperatures in Parallel with FLM. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126516>.
- Al-Shehbaz, I. A., & O’Kane, S. L. (2002). Taxonomy and Phylogeny of Arabidopsis (Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*, *1*(1821), e0001. <https://doi.org/10.1199/tab.0001>.
- Alonso-Blanco, C., Andrade, J., Becker, C., Bemm, F., Bergelson, J., Borgwardt, K. M., Zhou, X. (2016). 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, *166*(2), 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.063>.
- Alonso-Blanco, C., Aarts, M. G. M., Bentsink, L., Keurentjes, J. J. B., Reymond, M., Vreugdenhil, D., & Koornneef, M. (2009). What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? *Plant Cell*, *21*(7), 1877–1896. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068114>.
- Alonso-Blanco, C., Mendez-Vigo, B., & Koornneef, M. (2005). From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *International Journal of Developmental Biology*, *49*(5–6), 717–732. <https://doi.org/10.1387/ijdb.051994ca>.
- Alonso-Blanco, C., El-Assal, S. E. D., Coupland, G., & Koornneef, M. (1998). Analysis of natural allelic variation at flowering time loci in the Landsberg erecta and Cape Verde Islands ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *149*(2), 749–764. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.2.749>.
- Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J. M., Koornneef, M., Lister, C., Dean, C., Van Bosch, N. Den, ... Kuiper, M. T. R. (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*(2), 259–271. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00115.x>.
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant Journal*, *61*(6), 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x>.
- Amasino, R. M., & Michaels, S. D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology*, *154*(2), 516–520. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161653>.
- Amasino, R. M. (2005). Vernalization and flowering time. *Current Opinion in Biotechnology*, *16*(2), 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.004>.
- Amasino, R. (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell*, *16*(10), 2553–2559. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.161070>.
- Andrés, F., & Coupland, G. (2012, September). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*. *Nat Rev Genet*. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>.

- Arends, D., Prins, P., Jansen, R. C., & Broman, K. W. (2010). R/qtl: High-throughput multiple QTL mapping. *Bioinformatics*, *26*(23), 2990–2992. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq565>.
- Bae, G., & Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 281–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859>.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., & Weigel, D. (2006). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genetics*, *2*(7), 0980–0989. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020106>.
- Barrero, J. M., Rodríguez, P. L., Quesada, V., Alabadí, D., Blázquez, M. A., Boutin, J. P., Marion-Poll, A., Ponce, M. R., Micol, J. L. (2008). The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, *31*(2), 227–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01759.x>.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M., & Walker, S. C. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Baudry, A., Ito, S., Song, Y. H., Strait, A. A., Kiba, T., Lu, S., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N., Tobin, E. M., Kay, S. A., Imaizumi, T. (2010). F-Box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control *Arabidopsis* clock progression. *Plant Cell*, *22*(3), 606–622. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072843>.
- Benfey, P.N., & Mitchell-Olds, T. (2008). From genotype to phenotype: systems biology meets natural variation. *Science*, *25*;320(5875):495-7. doi: 10.1126/science.1153716.
- Bevan, M., & Walsh, S. (2004). Positioning arabidopsis in plant biology. A key step toward unification of plant research. *Plant Physiology*, *135*(2), 602–606. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043216>.
- Blackman, B. K. (2017). Changing responses to changing seasons: Natural variation in the plasticity of flowering time. *Plant Physiology*, *173*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01683>.
- Blázquez, M., Koornneef, M., & Putterill, J. (2001). Flowering on time: Genes that regulate the floral transition: Workshop on the molecular basis of flowering time control. *EMBO Reports*, *2*(12), 1078–1082. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve254>.
- Borevitz, J. O., & Chory, J. (2004). Genomics tools for QTL analysis and gene discovery. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(2), 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.011>.
- Borevitz, J. O., Maloof, J. N., Lutes, J., Dabi, T., Redfern, J. L., Trainer, G. T., ... Chory, J. (2002). Quantitative trait loci controlling light and hormone response in two accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *160*(2), 683–696.
- Botto, J. F., Alonso-Blanco, C., Garzarón, I., Sánchez, R. A., & Casal, J. J. (2003). The Cape Verde Islands Allele of Cryptochrome 2 Enhances Cotyledon Unfolding in the Absence of Blue Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *133*(4), 1547–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029546>.
- Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P., & Périlleux, C. (2016). FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research*, *44*(D1), D1167–D1171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1054>

- Capovilla, G., Schmid, M., & Posé, D. (2015). Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*, *66*(1), 59–69. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru416>.
- Casal, J. J. (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(January), 403–427. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>.
- Casal, J. J. (2012). Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book*, *10*, e0157. <https://doi.org/10.1199/tab.0157>.
- Casal, J. J. (2000). Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants. *Photochemistry and Photobiology*, *71*(1), 1. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)).
- Castle, L. A., & Meinke, D. W. (1994). A FUSCA gene of arabidopsis encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell*, *6*(1), 25–41. <https://doi.org/10.2307/3869672>.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L., Van der Horst, G. T., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: Blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 335–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103759>.
- Chen, M., & Chory, J. (2011). Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*, *21*(11), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.002>.
- Chen, M., Chory, J., & Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, *38*, 87–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092259>.
- Chiang, G. C. K., Barua, D., Kramer, E. M., Amasino, R. M., & Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. 20111024. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 14;106(28):11661-6. doi: 10.1073/pnas.0901367106.
- Chory, Joanne, & Cerdán, P. D. (2003). Regulation of owering time by light quality ´. *Nature*, *689*(1972), 881–885.
- Chory, J. (1992). A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Development*, *115*(1), 337–354.
- Chory, Joanne, 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*(5), 991–999. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90950-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90950-1).
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., & Sullivan, S. (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, *56*(3), 401–413. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu196>.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., ... Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, *6*(2), 80–92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- Clerkx, E. J. M., El-Lithy, M. E., Vierling, E., Ruys, G. J., Blankestijn-De Vries, H., Groot, S. P. C., ... Koornneef, M. (2004). Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg erecta and Shakdara, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiology*, *135*(1), 432–443. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036814>.

- Coluccio, M. P., Sanchez, S. E., Kasulin, L., Yanovsky, M. J., & Botto, J. F. (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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq253>.
- Csorba, T., Questa, J. I., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(45), 16160–16165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419030111>.
- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A. M. E., Greb, T., & Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(44), 16831–16836. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808687105>.
- Demkura, P. V., & Ballaré, C. L. (2012). UVR8 mediates UV-B-induced arabidopsis defense responses against botrytis cinerea by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant*, *5*(3), 642–652. <https://doi.org/10.1093/mp/sss025>.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. A., Taylor, J. M., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(16), 6680–6685. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103175108>.
- Deng, X. W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A. M., Feldmann, K. A., & Quail, P. H. (1992). COP1, an arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G β homologous domain. *Cell*, *71*(5), 791–801. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90555-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90555-Q).
- Deng, X. W., Caspar, T., & Quail, P. H. (1991). cop1: A regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. *Genes and Development*, *5*(7), 1172–1182. <https://doi.org/10.1101/gad.5.7.1172>.
- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, J., Arlat, M., & Marco, Y. (1998). Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in Arabidopsis thaliana that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen Ralstonia solanacearum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(7), 659–667. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.7.659>.
- Devlin, P. F., Patel, S. R., & Whitelam, G. C. (1998). Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in arabidopsis. *Plant Cell*, *10*(9), 1479–1487. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1479>.
- De Wit, M., Keuskamp, D. H., Bongers, F. J., Hornitschek, P., Gommers, C. M. M., Reinen, E., ... Pierik, R. (2016). Integration of Phytochrome and Cryptochrome Signals Determines Plant Growth during Competition for Light. *Current Biology*, *26*(24), 3320–3326. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.031>.
- Dixon, L. E., Knox, K., Kozma-Bognar, L., Southern, M. M., Pokhilko, A., & Millar, A. J. (2011). Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis. *Current Biology*, *21*(2), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.013>.
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Casanoves, F., Gonzalez, L., Margot, T., & Carlos, W. R. (2001). *InfoStat: Software Estadístico*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.

- Doyle, J. J. J. L., and Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J. M., Raz, V., & Koornneef, M. (2001). A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of *CRY2*. *Nature Genetics*, 29(4), 435–440. <https://doi.org/10.1038/ng767>.
- El-Lithy, M. E., Bentsink, L., Hanhart, C. J., Ruys, G. J., Rovito, D., Broekhof, J. L. M., Van der Poel, H. J., Van Eijk, M. J., Vreugdenhil, D., & Koornneef, M. (2006). New *Arabidopsis* recombinant inbred line populations genotyped using SNPWave and their use for mapping flowering-time quantitative trait loci. *Genetics*, 172(3), 1867–1876. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.050617>.
- El-Lithy, M. E., Clercx, E. J. M., Ruys, G. J., Koornneef, M., & Vreugdenhil, D. (2004). Quantitative trait locus analysis of growth-related traits in a new *Arabidopsis* recombinant inbred population. *Plant Physiology*, 135(1), 444–458. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036822>.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to Quantitative Genetics, Ed 4. Addison Wesley Longman, Harlow, Essex, UK - Retrieved.
- Fang, Z., Pyhäjärvi, T., Weber, A. L., Dawe, R. K., Glaubitz, J. C., Sánchez González, J. de J., Ross-Ibarra, C., Doebley, J., Morrell, P.L., & Ross-Ibarra, J. (2012). Megabase-scale inversion polymorphism in the wild ancestor of maize. *Genetics*, 191(3), 883–894. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.138578>.
- Favory, J. J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravecz, A., Funk, M., ... Ulm, R. (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 28(5), 591–601. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.4>.
- Finnegan, E. J., & Dennis, E. S. (2007). Vernalization-Induced Trimethylation of Histone H3 Lysine 27 at FLC Is Not Maintained in Mitotically Quiescent Cells. *Current Biology*, 17(22), 1978–1983. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.026>
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., & Putterill, J. (1999). GIGANTEA: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO Journal*, 18(17), 4679–4688. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4679>.
- Fransz, P., Linc, G., Lee, C. R., Aflitos, S. A., Lasky, J. R., Toomajian, C., ... Schranz, M. E. (2016a). Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 88(2), 159–178. <https://doi.org/10.1111/tpj.13262>.
- Gangappa, S. N., & Botto, J. F. (2016). The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Molecular Plant*, 9(10), 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>.
- Gazzani, S., Gendall, A. R., Lister, C., & Dean, C. (2003). Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiology*, 132(2), 1107–1114. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021212>.
- Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E., & Kay, S. A. (2012). *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3167–3172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200355109>.

- Grillo, M. A., Li, C., Hammond, M., Wang, L., & Schemske, D. W. (2013). Genetic architecture of flowering time differentiation between locally adapted populations of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *197*(4), 1321–1331. <https://doi.org/10.1111/nph.12109>.
- Gu, X., Le, C., Wang, Y., Li, Z., Jiang, D., Wang, Y., & He, Y. (2013a). Arabidopsis FLC clade members form flowering-repressor complexes coordinating responses to endogenous and environmental cues. *Nature Communications*, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms2947>.
- Guerriero, M. L., Akman, O. E., & van Ooijen, G. (2014). Stochastic models of cellular circadian rhythms in plants help to understand the impact of noise on robustness and clock structure. *Frontiers in Plant Science*, *5*(OCT), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00564>.
- Halliday, K. J., Salter, M. G., Thingnaes, E., & Whitelam, G. C. (2003). <2003_The Plant journal for cell and molecular biology_Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT._Halliday et al.pdf>, *2*, 875–885.
- Hayes, S., Velanis, C. N., Jenkins, G. I., & Franklin, K. A. (2014). UV-B detected by the UVR8 photoreceptor antagonizes auxin signaling and plant shade avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(32), 11894–11899. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403052111>.
- He, Y., & Li, Z. (2018). Epigenetic Environmental Memories in Plants: Establishment, Maintenance, and Reprogramming. *Trends in Genetics*, *34*(11), 856–866. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.07.006>.
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W., & Dennis, E. S. (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant Journal*, *46*(2), 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02686.x>.
- Henderson, I. R., Shindo, C., & Dean, C. (2003). The Need for Winter in the Switch to Flowering. *Annual Review of Genetics*, *37*, 371–392. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142640>.
- Himmelman, L. (2015). Package “HMM” Title HMM -Hidden Markov Models. *Proceedings of the IEEE*, *77*(2), 257–286.
- Hoffmann, M. H. (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography*, *29*(1), 125–134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00647.x>.
- Hoffmann, M. H., Tomiuk, J., Schmutz, H., Koch, C., & Bachmann, K. (2005). Phenological and morphological responses to different temperature treatments differ among a world-wide sample of accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Oecologica*, *28*(2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2005.03.010>.
- Holm, M., Ma, L. G., Qu, L. J., & Deng, X. W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, *16*(10), 1247–1259. <https://doi.org/10.1101/gad.969702>.
- Hornitschek, P., Kohnen, M. V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant Journal*, *71*(5), 699–711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05033.x>.

- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., & Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO Journal*, *28*(24), 3893–3902. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.306>.
- Hou, X., Wang, D., Cheng, Z., Wang, Y., & Jiao, Y. (2022). A near-complete assembly of an *Arabidopsis thaliana* genome. *Molecular Plant*, *15*(8), 1247–1250. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.05.014>.
- Hsu, P. Y., & Harmer, S. L. (2014). Wheels within wheels: The plant circadian system. *Trends in Plant Science*, *19*(4), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.007>.
- Huber, M., Nieuwendijk, N. M., Pantazopoulou, C. K., & Pierik, R. (2021). Light signalling shapes plant–plant interactions in dense canopies. *Plant Cell and Environment*, *44*(4), 1014–1029. <https://doi.org/10.1111/pce.13912>
- Imaizumi, T. (2010). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.007>.
- Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R., & Kay, S. A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, *426*(6964), 302–306. <https://doi.org/10.1038/nature02090>.
- Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, *8*(3), 217–230. <https://doi.org/10.1038/nrg2049>.
- Jiménez-Gómez, J. M. (2014). Network types and their application in natural variation studies in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *18*(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.02.010>
- Jiménez-Gómez, J. M., Wallace, A. D., & Maloof, J. N. (2010). Network analysis identifies ELF3 as a QTL for the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001100>
- Kaiserli, E., Páldi, K., O'Donnell, L., Batalov, O., Pedmale, U. V., Nusinow, D. A., ... Chory, J. (2015). Integration of Light and Photoperiodic Signaling in Transcriptional Nuclear Foci. *Developmental Cell*, *35*(3), 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.008>.
- Kamioka, M., Takao, S., Suzuki, T., Taki, K., Higashiyama, T., Kinoshita, T., & Nakamichi, N. (2016). Direct repression of evening genes by CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, *28*(3), 696–711. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00737>.
- Kasulin, L., Rowan, B. A., León, R. J. C., Schuenemann, V. J., Weigel, D., & Botto, J. F. (2017). A single haplotype hyposensitive to light and requiring strong vernalization dominates *Arabidopsis thaliana* populations in Patagonia, Argentina. *Molecular Ecology*, *26*(13), 3389–3404. <https://doi.org/10.1111/mec.14107>.
- Kasulin, L., Agrofoglio, Y., & Botto, J. F. (2013). The receptor-like kinase ERECTA contributes to the shade-avoidance syndrome in a background-dependent manner. *Annals of Botany*, *111*(5), 811–819. <https://doi.org/10.1093/aob/mct038>.
- Kawecki, T. J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, *7*(12), 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>.
- Keuskamp, D. H., Pollmann, S., Voeselek, L. A. C. J., Peeters, A. J. M., & Pierik, R. (2010). controls shade avoidance and fitness during competition, 3.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1013457108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1013457108>.

- Kim, D. H. (2020). Current understanding of flowering pathways in plants: focusing on the vernalization pathway in Arabidopsis and several vegetable crop plants. *Horticulture Environment and Biotechnology*, *61*(2), 209–227. <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00218-5>.
- Kim, D. H., & Sung, S. (2017). Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by Long Noncoding RNAs. *Developmental Cell*, *40*(3), 302–312.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.021>.
- Kim, D. H., Xi, Y., & Sung, S. (2017). Modular function of long noncoding RNA, COLDAIR, in the vernalization response. *PLoS Genetics*, *13*(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006939>.
- Kim, D. H., & Sung, S. (2013). Coordination of the vernalization response through a VIN3 and FLC gene family regulatory network in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*(2), 454–469. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104760>.
- Kim, D. H., Doyle, M. R., Sung, S., & Amasino, R. M. (2009). Vernalization: Winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *25*, 277–299. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113411>.
- Kimura, Y., Aoki, S., Ando, E., Kitatsuji, A., Watanabe, A., Ohnishi, M., ... Kinoshita, T. (2015). A flowering integrator, SOC1, Affects stomatal opening in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *56*(4), 640–649. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu214>.
- Kirkpatrick, M. (2010). How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biology*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000501>.
- Knott, S. A., & Haley, C. S. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, *69*(4), 315–324. Retrieved from <http://www.nature.com/hdy/journal/v69/n4/abs/hdy1992131a.html>.
- Kong, S. G., Suzuki, T., Tamura, K., Mochizuki, N., Hara-Nishimura, I., & Nagatani, A. (2006). Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant Journal*, *45*(6), 994–1005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02667.x>.
- Konieczny, A., & Ausubel, F. M. (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal*, *4*(2), 403–410. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020403.x>.
- Koornneef, Maarten, & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant Journal*, *61*(6), 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>.
- Koornneef, Maarten, Alonso-Blanco, C., & Vreugdenhil, D. (2004). Naturally Occurring Genetic Variation in Arabidopsis Thaliana. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 141–172. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141605>.
- Koornneef, Maarten, Léon-Kloosterziel, K. M., Schwartz, S. H., & Zeevaart, J. A. D. (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *36*(1–2), 83–89. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80093-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80093-4).

- Koornneef, M., Jorna, M. L., Brinkhorst-van der Swan, D. L. C., & Karssen, C. M. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics*, *61*(4), 385–393. <https://doi.org/10.1007/BF00272861>.
- Kowalski, S. P., Lan, T. H., Feldmann, K. A., & Paterson, A. H. (1994). QTL mapping of naturally-occurring variation in flowering time of *Arabidopsis thaliana*. *MGG Molecular & General Genetics*, *245*(5), 548–555. <https://doi.org/10.1007/BF00282217>.
- Kroymann, J., & Mitchell-Olds, T. (2005). Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature*, *435*(7038), 95–98. <https://doi.org/10.1038/nature03480>.
- Kwok, S. F., Piekos, B., Mišera, S., & Deng, X. W. (1996). A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis* COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiology*, *110*(3), 731–742. <https://doi.org/10.1104/pp.110.3.731>.
- Laserna, M. P., Sánchez, R. A., & Botto, J. F. (2008). Light-related loci controlling seed germination in *ler* x *Cvi* and *bay-0* x *sha* recombinant inbred-line populations of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, *102*(4), 631–642. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn138>.
- Legris, M., Ince, Y. Ç., & Fankhauser, C. (2019). Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13045-0>.
- Leimu, R., & Fischer, M. (2008). A meta-analysis of local adaptation in plants. *PLoS ONE*, *3*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004010>.
- Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *49*, 199–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.199>.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., & Cashmore, A. R. (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(5), 2686–2690. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2686>.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E., & Yu, H. (2008). A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, *15*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.002>.
- Li, H. (2013). *Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM*. Retrieved from <http://github.com/lh3/bwa>.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, *25*(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
- Linhart, Y. B., & Grant, M. C. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *27*, 237–277. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.237>.
- Liu, B., Yang, Z., Gomez, A., Liu, B., Lin, C., & Oka, Y. (2016). Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant research*, *129*(2), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0782-z>

- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., & Lin, C. (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*, *16*(12), 684–691. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.09.002>.
- Liu, L. J., Zhang, Y. C., Li, Q. H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H. L., ... Yang, H. Q. (2008). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*, *20*(2), 292–306. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057281>.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C., & Fankhauser, C. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant Journal*, *53*(2), 312–323. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03341.x>.
- Loudet, Olivier, Michael, T. P., Burger, B. T., Le Metté, C., Mockler, T. C., 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 of the United States of America*, *105*(44), 17193–17198. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807264105>.
- Loudet, O., Chaillou, S., Camilleri, C., Bouchez, D., & Daniel-Vedele, F. (2002). Bay-0 x Shahdara recombinant inbred line population: A powerful tool for the genetic dissection of complex traits in Arabidopsis. *Theoretical and Applied Genetics*, *104*(6–7), 1173–1184. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0825-9>.
- Lowry, D. B., & Willis, J. H. (2010). A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS Biology*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000500>.
- Lutz, U., Nussbaumer, T., Spannagl, M., Diener, J., Mayer, K. F. X., & Schwechheimer, C. (2017). Natural haplotypes of FLM non-coding sequences fine-tune flowering time in ambient spring temperatures in arabidopsis. *ELife*, *6*, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.22114>.
- Lynch, M., & Walsh, B. (1998). Genetics and analysis of quantitative traits. Retrieved from http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/RinconLiterario/2011/febrero/AG_8.pdf.
- Magliano, T. M. A., Botto, J. F., Godoy, A. V., Symonds, V. V., Lloyd, A. M., & Casal, J. J. (2005). New Arabidopsis recombinant inbred lines (Landsberg erecta x Nossen) reveal natural variation in phytochrome-mediated responses. *Plant Physiology*, *138*(2), 1126–1135. <https://doi.org/10.1104/pp.104.059071>.
- Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, A. E., Osnato, M., Weinstain, R., Shani, E., Suárez-López, P., & Pelaz, S. (2016). TEMPRANILLO reveals the mesophyll as crucial for epidermal trichome formation. *Plant Physiology*, *170*(3), 1624–1639. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01309>.
- Mazza, C. A., & Ballaré, C. L. (2015). Photoreceptors UVR8 and phytochrome B cooperate to optimize plant growth and defense in patchy canopies. *New Phytologist*, *207*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1111/nph.13332>.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., ... DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, *20*(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
- Michaels, S. D., He, Y., Scortecci, K. C., & Amasino, R. M. (2003). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-

- annual flowering behavior in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 10102–10107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1531467100>.
- Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11(5), 949–956. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.949>.
- Mitchell-Olds, T., Willis, J. H., & Goldstein, D. B. (2007). Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nature Reviews Genetics*, 8(11), 845–856. <https://doi.org/10.1038/nrg2207>.
- Mitchell-Olds, T. (1996). Genetic constraints on life-history. *Evolution*, 50(flat 1), 140–145.
- Mouchel, C. F., Briggs, G. C., & Hardtke, C. S. (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes and Development*, 18(6), 700–714. <https://doi.org/10.1101/gad.1187704>.
- Nakamichi, N. (2011). Molecular mechanisms underlying the arabidopsis circadian clock. *Plant and Cell Physiology*, 52(10), 1709–1718. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr118>.
- Nordborg, M., Borevitz, J. O., Bergelson, J., Berry, C. C., Chory, J., Hagenblad, J., Kreitman, M., Maloof, J. N., Noyes, T., Oefner, P. J., Stahl, E. A., Weigel, D. (2002). The extent of linkage disequilibrium in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, 30(2), 190–193. <https://doi.org/10.1038/ng813>.
- Oka, Y., & Yamamoto, K. (2018). Photoreceptor-Mediated Plant Development. *Plant Factory Using Artificial Light*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813973-8.00011-7>.
- Ortuño-Miquel, S., Rodríguez-Cazorla, E., Zavala-Gonzalez, E. A., Martínez-Laborda, A., & Vera, A. (2019). Arabidopsis HUA ENHANCER 4 delays flowering by upregulating the MADS-box repressor genes FLC and MAF4. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38327-3>.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Ning, W., & Deng, X. W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 405(6785), 462–466.
- Osterlund, M. T., Ang, L. H., & Deng, X. W. (1999). The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends in Cell Biology*, 9(3), 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(99\)01499-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(99)01499-3).
- Osterlund, M. T., & Deng, X. W. (1998). Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei. *Plant Journal*, 16(2), 201–208. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00290.x>. <https://doi.org/10.1038/35013076>.
- Pacín, M., Semmoloni, M., Legris, M., Finlayson, S. A., & Casal, J. J. (2016). Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytologist*, 211(3), 967–979. <https://doi.org/10.1111/nph.13965>.
- Pacín, M., Legris, M., & Casal, J. J. (2013). COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. *Plant Journal*, 75(4), 631–641. <https://doi.org/10.1111/tpj.12226>.
- Park, H. Y., Lee, S. Y., Seok, H. Y., Kim, S. H., Sung, Z. R., & Moon, Y. H. (2011). EMF1 interacts with EIP1, EIP6 or EIP9 involved in the regulation of flowering

- time in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 52(8), 1376–1388.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcr084>.
- Pierik, R., Mommer, L., & Voesenek, L. A. (2013). Molecular mechanisms of plant competition: Neighbour detection and response strategies. *Functional Ecology*, 27(4), 841–853. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12010>.
- Pisupati, R., Reichardt, I., Seren, Ü., Korte, P., Nizhynska, V., Kerdaffrec, E., ... Nordborg, M. (2017). Verification of Arabidopsis stock collections using SNPmatch, a tool for genotyping high-plexed samples. *Scientific Data*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.184>.
- Provart, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., ... McCourt, P. (2016). 50 years of Arabidopsis research: Highlights and future directions. *New Phytologist*, 209(3), 921–944. <https://doi.org/10.1111/nph.13687>.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., & Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6), 847–857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90288-0).
- Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2), 85–93. <https://doi.org/10.1038/nrm728>.
- Ratcliffe, O. J., Kumimoto, R. W., Wong, B. J., & Riechmann, J. L. (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell*, 15(5), 1159–1169. <https://doi.org/10.1105/tpc.009506>.
- Reznikoff, W. S. (2008). Transposon Tn 5. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 269–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091656>.
- Rieseberg, L. H., Widmer, A., Arntz, A. M., & Burke, J. M. (2002). Directional selection is the primary cause of phenotypic diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12242–12245. <https://doi.org/10.1073/pnas.192360899>.
- Rifkin, S. (2012). *Quantitative trait loci (QTL): methods and protocols*. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-785-9>.
- Rizzini, L., Favory, J., Cloix, C., Faggionato, D., Hara, A. O., Kaiserli, E., E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I., & Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025), 103–106. <https://doi.org/10.1126/science.1200660>
- Romera-Branchat, M., Andrés, F., & Coupland, G. (2014). Flowering responses to seasonal cues: What's new? *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.006>.
- Rosloski, S. M., Singh, A., Jali, S. S., Balasubramanian, S., Weigel, D., & Grbic, V. (2013). Functional analysis of splice variant expression of MADS AFFECTING FLOWERING 2 of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 81(1–2), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9982-2>.
- Ruiz-Diaz, J., Matsusaka, D., Cascales, J., Sánchez, D. H., Sánchez, M., Cerdán, P. D., & Botto, J. F. (2022). Functional analysis of PHYB polymorphisms in Arabidopsis thaliana collected in Patagonia, 8(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.952214>.
- Saijo, Y., Sullivan, J. A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., ... Deng, X. W. (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-

- mediated regulation of HY5 activity. *Genes and Development*, 17(21), 2642–2647. <https://doi.org/10.1101/gad.1122903>.
- Sakamoto, K., & Briggs, W. R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*, 14(8), 1723–1735. <https://doi.org/10.1105/tpc.003293>.
- Sanchez, S. E., Rugnone, M. L., & Kay, S. A. (2020). Light Perception: A Matter of Time. *Molecular Plant*, 13(3), 363–385. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.006>.
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulte, P. M., Glémet, H. C., Fiebig, A. A., & Powers, D. A. (2000). Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress-responsive regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6597–6602. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6597>.
- Searle, I., & Coupland, G. (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO Journal*, 23(6), 1217–1222. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600117>.
- Serin, E. A. R., Snoek, L. B., Nijveen, H., Willems, L. A. J., Jiménez-Gómez, J. M., Hilhorst, H. W. M., & Ligterink, W. (2017). Construction of a high-density genetic map from RNA-Seq data for an Arabidopsis bay-0 × shahdara ril population. *Frontiers in Genetics*, 8(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00201>.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., ... Ruberti, I. (2005). A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes and Development*, 19(23), 2811–2815. <https://doi.org/10.1101/gad.364005>.
- Sgamma, T., Jackson, A., Muleo, R., Thomas, B., & Massiah, A. (2014). TEMPRANILLO is a regulator of juvenility in plants. *Scientific Reports*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep03704>.
- Sheldon, C. C., Burn, J. E., Perez, P. P., Metzger, J., Edwards, J. A., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (1999). The FLF MADS box gene: A repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*, 11(3), 445–458. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.3.445>.
- Shim, J. S., & Imaizumi, T. (2015). Circadian clock and photoperiodic response in arabidopsis: From seasonal flowering to redox homeostasis. *Biochemistry*, 54(2), 157–170. <https://doi.org/10.1021/bi500922q>.
- Shindo, C., Aranzana, M. J., Lister, C., Baxter, C., Nicholls, C., Nordborg, M., & Dean, C. (2005). Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 1163–1173. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061309>.
- Simon, M., Loudet, O., Durand, S., Bérard, A., Brunel, D., Sennesal, F. X., Durand-Tardif, M., Pelletier, G., & Camilleri, C. (2008). Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of Arabidopsis thaliana genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics*, 178(4), 2253–2264. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.083899>.
- Simpson, G. G., & Dean, C. (2002). The Flowering Clock. *Science's STKE*, 2002(149), 285–289. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.149.tw334>
- Smith, H. (1982). Light quality, photoperception and plant strategy. *Ann. Rev. Pl*

- Physiol. 33, 481-518.
- Song, Y. H., Ito, S., & Imaizumi, T. (2013). Flowering time regulation: Photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science*, 18(10), 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.003>.
- Stamm, P., & Kumar, P. P. (2010). The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 2889–2903. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq147>.
- Staniak, M., Czopek, K., Stępień-Warda, A., Kocira, A., & Przybyś, M. (2021). Cold stress during flowering alters plant structure, yield and seed quality of different soybean genotypes. *Agronomy*, 11(10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102059>.
- Sung, S., Schmitz, R. J., & Amasino, R. M. (2006). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis. *Genes and Development*, 20(23), 3244–3248. <https://doi.org/10.1101/gad.1493306>.
- Sung, S., & Amasino, R. M. (2004). Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*, 427(6970), 159–164. <https://doi.org/10.1038/nature02195>.
- Takuno, S., Terauchi, R., & Innan, H. (2012). The Power of QTL Mapping with RILs. *PLoS ONE*, 7(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046545>.
- Taylor, J., & Butler, D. (2017). R package ASMap: Efficient genetic linkage map construction and diagnosis. *Journal of Statistical Software*, 79(Stam 1993). <https://doi.org/10.18637/jss.v079.i06>.
- Tian, D., Traw, M. B., Chen, J. Q., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in Arabidopsis thaliana. *Nature*, 423(6935), 74–77. <https://doi.org/10.1038/nature01588>.
- Tian, Dacheng, Araki, H., Stahl, E., Bergelson, J., & Kreitman, M. (2002). Signature of balancing selection in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11525–11530. <https://doi.org/10.1073/pnas.172203599>.
- Tishkoff, S. A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N., Abbes, S., Argyropoulos, G., Destro-Bisol, G., G., Drousiotou, A., Dangerfield, B., Lefranc, G., Loiselet, J., Piro, A., Stoneking, M., Tagarelli, A., Tagarelli, G., Touma, E. H., Williams, S. M., & Clark, A. G. (2001). Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: Recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science*, 293(5529), 455–462. <https://doi.org/10.1126/science.1061573>.
- Törjék, O., Witucka-Wall, H., Meyer, R. C., Von Korff, M., Kusterer, B., Rautengarten, C., & Altmann, T. (2006). Segregation distortion in Arabidopsis C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(8), 1551–1561. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0402-3>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.024>.
- Tuinstra, M. R., Ejeta, G., & Goldsbrough, P. B. (1997). Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: A method for developing near-isogenic lines that differ at

- quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5–6), 1005–1011.
<https://doi.org/10.1007/s001220050654>.
- Turck, F., Fornara, F., & Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: Flowering Locus T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 573–594.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755>.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, 303(5660), 1003–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1091761>.
- Venables, W. N., & Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*, 4th Edn. New York: Springer. Available online at: <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.ftp://192.218.129.11/pub/CRAN/web/packages/MASS/MASS.pdf
- Wang, X., Gao, X., Liu, Y., Fan, S., & Ma, Q. (2020). Progress of Research on the Regulatory Pathway of the Plant Shade-Avoidance Syndrome. *Frontiers in Plant Science*, 11(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00439>.
- Wei, N., & Deng, X. W. (1992). COP9: A new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 4(12), 1507–1518.
<https://doi.org/10.1105/tpc.4.12.1507>.
- Werner, J. D., Borevitz, J. O., Warthmann, N., Trainer, G. T., Ecker, J. R., Chory, J., & Weigel, D. (2005). Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2460–2465. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409474102>.
- Wolyn, D. J., Borevitz, J. O., Loudet, O., Schwartz, C., Maloof, J., Ecker, J. R., ... Chory, J. (2004). Light-response quantitative trait loci identified with composite interval and eXtreme array mapping in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, 167(2), 907–917. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.024810>.
- Wood, C. C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W. J., Dennis, E. S., & Helliwell, C. A. (2006). The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14631–14636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606385103>.
- Wu, Y., Bhat, P. R., Close, T. J., & Lonardi, S. (2008). Efficient and accurate construction of genetic linkage maps from the minimum spanning tree of a graph. *PLoS Genetics*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000212>.
- Xiao, J., Zhang, H., Xing, L., Xu, S., Liu, H., Chong, K., & Xu, Y. (2013). Requirement of histone acetyltransferases HAM1 and HAM2 for epigenetic modification of FLC in regulating flowering in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, 170(4), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.11.007>.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., & Huq, E. (2015). Illuminating Progress in Phytochrome-Mediated Light Signaling Pathways. *Trends in Plant Science*, 20(10), 641–650.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.010>.
- Yang, C., & Li, L. (2017). Hormonal regulation in shade avoidance. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01527>.
- Yang, Hongchun, Berry, S., Olsson, T. S. G., Hartley, M., Howard, M., & Dean, C. (2017). Distinct phases of Polycomb silencing to hold epigenetic memory of cold in Arabidopsis. *Science*, 357(6356), 1142–1145.

<https://doi.org/10.1126/science.aan1121>.

- Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, *419*(6904), 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature00996>.
- Yin, R., & Ulm, R. (2017). How plants cope with UV-B: from perception to response. *Current Opinion in Plant Biology*, *37*, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.013>.
- Yuan, W., Luo, X., Li, Z., Yang, W., Wang, Y., Liu, R., Du, J., & He, Y. (2016). A cis cold memory element and a trans epigenome reader mediate Polycomb silencing of FLC by vernalization in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, *48*(12), 1527–1534. <https://doi.org/10.1038/ng.3712>.
- Zapata, L., Ding, J., Willing, E. M., Hartwig, B., Bezdan, D., Jiao, W. B., ... Schneeberger, K. (2016). Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* Ler reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(28), E4052–E4060. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607532113>.
- Zhang, S., Li, C., Zhou, Y., Wang, X., Li, H., Feng, Z., Chen H, Qin G, Jin D, Terzaghi W, Gu H, Qu LJ, Kang D, Deng XWLi, J. (2018). TANDEM ZINC-FINGER/PLUS3 is a key component of phytochrome a signaling. *Plant Cell*, *30*(4), 835–852. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00677>.

Cuadros Suplementarios de los capítulos 2, 3 y 4.

Cuadro S2.1: Resumen de los marcadores usados para construir el mapa genético para cada cromosoma.

Chr	Marcador	Longitud total(cM)	Distancia promedio (cM)	Distancia máxima entre Marcadores (cM)
chr 1	260	102,82	2,53	4,02
chr 2	180	94,19	1,91	2,99
chr 3	184	83,85	2,19	5,47
chr 4	77	34,26	2,25	3,27
chr 5	219	85,71	2,55	7,64
Total	920	400,84	2,29	4,67

Cuadro S2.2: Resumen estadístico para ensayos control, NaCl y KNO₃.

	Control (mm)	KNO ₃ (mm)	NaCl (mm)
Pat	3,88±0,19	4,88±0,65	2,89±0,14
Col-0	2,48±0,08	3,03±0,23	2,16±0,15
RIL mean	5,97 ±0,08	4,7±0,10	2,99±0,04
RIL max–min	7,7-2,4	8,6-2,1	5,8-1,6
CMG	1,84	2,96	0,64
CME	0,04	0,1	0,09
VG	0,6	0,95	0,18
VF	0,61	0,98	0,21
H	0,96	0,96	0,85

Cuadro S3.1: Cebadores CAPS usados para la segregación de RILs en los QTLs *Rc1* y *Bc1*.

QTL	Punto de localización en el cromosoma V	Enzimas de restricción	Cebador (5' a 3')	Cebador (5' a 3' opuesto a la cadena)
<i>Rc1</i>	16060029 bp	EcoRI	TCAATCTCGCCGAA ATCTCA	TGGTTGCTTTGAGTGGT GC
	16989903 bp	EcoRI	GGGCTTTCCGGTCT GATCT	TGACAACGACACTTACA TGGC
	17922604 bp	EcoRI	TCGGAGAATGCTTT TGACGC	GAACAGAACCAAACCA AACC
	18989512 bp	EcoRI	GGGACTTCACGGG CGAAT	CCAACCGACTCCAGCAC C
			25089966 bp	EcoRI
<i>Bc1</i>	25801157 bp	EcoRI	TCACTCTTTCTCTC TGCCGC	GCCCTATATATACACCG AGGCG
	26382803 bp	EcoRI	CGGATGAAGAGTA CACACGGT	TGAAGAGGGCTATCAGT GGC
	26796982 bp	XhoI	ACCGTCGAGAAAC CATCCAC	CGATCCGAATACCCACA AAGAG

Cuadro S3.2. Medias de cada RIL para los tratamientos de desetiología y sombra.

RIL	Bc	Bc/Osc	Rc	Rc/Osc	RLc	RLc/Osc	Osc	WL	SA	Índice SA
2	2,71	0,17	6,22	0,40	4,23	0,27	15,64	2,19	4,47	2,08
3	2,32	0,19	6,92	0,56	4,19	0,34	12,40	2,18	4,22	1,93
4	2,81	0,20	6,38	0,45	3,54	0,25	14,03	2,46	5,19	2,18
5	2,71	0,22	9,75	0,79	4,35	0,35	12,41	2,42	4,50	1,90
6	2,70	0,18	7,30	0,47	5,38	0,35	15,37	2,27	5,80	2,62
7	3,31	0,21	7,79	0,49	4,44	0,28	15,95	2,30	5,25	2,35
8	2,78	0,21	9,01	0,67	3,22	0,24	13,45	2,22	5,33	2,45
9	2,47	0,15	7,82	0,46	5,17	0,31	16,72	2,04	5,51	2,76
10	2,93	0,20	7,20	0,49	4,06	0,28	14,60	2,01	4,65	2,34
11	3,45	0,22	10,12	0,63	6,01	0,38	16,01	2,73	6,63	2,58
13	2,92	0,22	6,33	0,47	3,45	0,26	13,43	2,23	3,77	1,71
16	3,19	0,21	8,94	0,60	3,36	0,22	15,13	1,98	5,04	2,80
19	2,17	0,17	8,97	0,69	4,04	0,31	12,99	2,54	4,61	1,84
20	3,63	0,23	7,63	0,48	3,91	0,25	15,85	3,13	5,99	1,97
21	3,35	0,23	7,59	0,51	3,97	0,27	14,71	2,24	4,83	2,21
22	2,91	0,19	10,50	0,67	4,35	0,28	15,57	2,32	4,97	2,17
24	3,15	0,22	6,86	0,47	4,36	0,30	14,59	2,51	5,19	2,08
27	2,68	0,21	7,50	0,59	2,89	0,23	12,90	1,76	4,81	2,83
28	2,98	0,18	8,73	0,52	3,83	0,23	16,77	2,49	5,29	2,14
31	2,57	0,15	8,96	0,53	6,26	0,38	16,81	2,36	6,38	2,71
32	3,01	0,21	7,08	0,48	3,15	0,21	14,64	2,50	4,52	1,84
33	3,70	0,26	11,25	0,78	3,71	0,26	14,38	2,76	4,98	1,87
34	2,79	0,18	6,64	0,44	3,62	0,24	15,18	2,17	5,31	2,54
35	2,62	0,20	10,16	0,77	4,03	0,31	13,12	2,68	4,92	1,88

36	2,86	0,19	9,38	0,64	4,45	0,31	14,76	2,63	4,60	1,76
37	3,20	0,24	9,61	0,71	3,16	0,24	13,46	2,81	4,64	1,69
38	3,27	0,28	8,99	0,77	2,89	0,25	11,70	2,52	4,51	1,82
39	3,15	0,22	10,50	0,71	5,34	0,36	14,71	2,85	6,47	2,34
41	3,21	0,21	8,46	0,54	4,52	0,29	15,56	2,82	5,52	2,00
42	2,73	0,19	8,99	0,61	4,57	0,31	14,75	2,62	5,11	2,03
45	3,31	0,19	10,55	0,61	5,31	0,31	17,23	2,97	5,91	2,08
47	3,17	0,22	10,62	0,73	3,89	0,27	14,54	2,93	5,86	2,04
48	2,81	0,18	10,12	0,64	3,58	0,23	15,84	2,50	5,68	2,28
49	3,00	0,21	10,08	0,70	4,82	0,34	14,42	2,32	5,18	2,28
50	3,47	0,24	8,28	0,57	5,72	0,39	14,67	2,13	5,25	2,47
52	3,33	0,19	8,75	0,50	3,97	0,23	17,50	2,45	6,29	2,55
53	3,74	0,23	NA	NA	5,68	0,36	15,97	2,89	6,33	2,21
54	3,79	0,25	12,55	0,83	4,81	0,32	15,23	3,40	6,63	1,96
55	3,43	0,22	10,43	0,67	4,09	0,26	15,58	2,39	5,57	2,40
56	2,84	0,20	9,10	0,64	3,94	0,28	14,13	2,66	5,02	1,90
57	2,54	0,18	9,64	0,68	4,02	0,29	14,06	2,50	5,29	2,23
58	2,23	0,18	5,50	0,44	2,85	0,23	12,61	2,09	4,22	2,11
61	2,45	0,20	7,74	0,63	2,86	0,23	12,36	2,23	4,02	1,78
65	4,11	0,27	10,33	0,68	5,45	0,36	15,04	3,69	6,43	2,03
66	3,53	0,24	NA	NA	4,15	0,28	14,87	2,57	5,32	2,47
67	2,69	0,22	7,73	0,65	3,81	0,32	12,00	2,35	4,26	2,13
69	4,13	0,25	9,31	0,56	3,95	0,24	16,67	3,02	5,94	2,24
70	3,67	0,22	10,13	0,62	4,70	0,29	16,23	2,80	6,29	2,93
71	3,92	0,24	6,85	0,41	4,45	0,27	16,56	2,01	5,17	2,94
72	3,30	0,24	9,68	0,70	3,70	0,27	13,81	2,76	4,80	1,97
73	2,57	0,20	7,85	0,65	3,23	0,27	12,37	3,00	5,03	1,83
74	3,43	0,25	10,92	0,78	4,44	0,31	14,17	2,67	5,03	2,03

75	3,65	0,29	6,91	0,55	2,91	0,24	12,47	2,07	4,54	2,94
76	4,21	0,24	10,70	0,61	7,80	0,45	17,56	2,90	6,44	2,57
77	4,12	0,26	7,35	0,47	4,25	0,27	15,67	3,16	5,29	1,96
78	3,27	0,25	9,71	0,73	3,00	0,22	13,41	2,20	3,78	1,88
80	3,55	0,25	7,53	0,53	3,41	0,24	14,14	2,46	4,61	2,08
81	3,32	0,21	8,66	0,54	5,77	0,36	15,79	2,29	4,94	2,46
83	4,01	0,23	9,01	0,51	3,54	0,21	17,66	2,85	4,82	1,98
85	3,75	0,25	12,50	0,85	4,77	0,32	14,77	2,71	4,97	2,00
87	3,72	0,26	11,88	0,84	4,53	0,32	14,23	2,38	5,01	2,10
88	3,36	0,19	10,17	0,57	6,63	0,38	17,70	2,21	5,69	2,78
93	3,46	0,23	11,76	0,78	4,41	0,29	15,08	3,00	5,19	1,90
96	3,22	0,26	11,81	0,92	4,32	0,33	12,91	2,60	4,72	1,93
97	3,15	0,23	11,46	0,84	4,17	0,30	13,70	2,68	4,74	1,92
99	3,24	0,22	8,70	0,60	3,54	0,24	14,51	2,21	4,29	2,26
100	2,95	0,19	7,72	0,49	2,78	0,18	15,58	2,10	4,01	2,10
102	4,11	0,27	12,23	0,81	4,96	0,33	15,18	3,16	5,78	2,01
106	4,76	0,27	14,07	0,80	5,94	0,34	17,58	3,60	6,42	2,03
108	4,71	0,37	8,39	0,65	4,40	0,35	12,80	4,80	-	-
110	4,53	0,26	11,91	0,70	5,40	0,32	17,24	3,47	6,01	1,84
111	2,68	0,17	9,23	0,59	4,34	0,28	15,43	2,10	4,88	2,49
112	3,75	0,26	8,19	0,57	2,88	0,20	14,48	2,66	4,60	1,88
114	3,10	0,24	10,86	0,83	3,65	0,28	13,13	2,67	5,02	2,07
116	3,64	0,22	8,61	0,51	3,44	0,21	16,68	2,75	5,35	2,15
120	3,06	0,20	11,49	0,76	3,69	0,24	15,21	2,29	6,09	2,86
121	3,11	0,24	8,79	0,67	2,36	0,19	13,35	2,77	4,82	1,93
122	3,81	0,24	11,80	0,75	4,01	0,26	15,69	2,81	4,85	2,00
124	3,86	0,23	10,42	0,61	5,43	0,32	17,06	2,79	5,81	2,25
126	4,34	0,31	10,80	0,77	2,86	0,21	14,09	3,02	4,88	1,66

127	3,90	0,24	9,68	0,59	3,91	0,25	16,26	2,70	6,22	2,37
128	4,55	0,27	10,41	0,61	3,71	0,22	16,95	2,54	5,78	2,47
129	4,33	0,26	8,00	0,48	4,19	0,25	16,62	2,83	5,96	2,43
131	4,67	0,28	10,80	0,65	6,18	0,37	16,89	3,58	6,50	2,09
132	-	-	-	-	-	-	-	3,20	-	-
135	4,13	0,26	12,89	0,81	5,12	0,32	16,24	3,43	5,34	1,71
136	4,23	0,26	9,77	0,61	3,72	0,23	15,96	2,43	5,15	2,22
137	2,19	0,21	7,84	0,75	2,85	0,27	10,50	1,97	3,95	2,13
138	3,12	0,21	7,71	0,52	2,58	0,18	14,90	1,92	4,38	2,39
139	3,65	0,23	12,66	0,80	2,67	0,17	15,80	2,71	5,15	1,97
143	3,89	0,25	10,08	0,66	3,73	0,25	15,26	2,71	5,28	2,07
144	3,31	0,20	11,50	0,72	4,87	0,31	16,03	2,42	4,70	2,09
147	3,38	0,23	9,32	0,64	3,48	0,24	14,49	2,08	4,42	2,11
148	3,57	0,22	10,07	0,62	3,88	0,24	16,20	2,28	5,15	2,35
152	-	-	-	-	-	-	-	2,11	-	-
153	3,69	0,24	11,37	0,75	4,85	0,32	15,08	2,24	5,44	2,47
155	2,95	0,23	8,78	0,70	3,64	0,30	12,70	2,56	5,50	2,14
156	2,90	0,15	8,10	0,64	3,61	0,23	15,94	2,16	5,38	2,62
157	-	-	-	-	-	-	-	2,03	-	-
158	3,34	0,20	12,13	0,73	4,89	0,29	16,72	2,08	4,58	2,30
159	1,91	0,21	6,72	0,72	3,12	0,34	9,33	2,55	4,57	1,90
160	2,57	0,22	7,86	0,68	3,55	0,31	11,69	2,04	3,30	1,84
161	4,80	0,32	12,64	0,83	5,23	0,35	15,14	3,66	6,10	1,73
162	3,42	0,22	11,14	0,72	4,02	0,26	15,58	-	-	-
163	4,00	0,26	12,41	0,81	4,27	0,28	15,40	2,65	5,26	2,04
164	4,46	0,25	9,21	0,52	3,83	0,22	17,51	2,54	5,44	2,25
165	3,34	0,21	12,33	0,76	3,88	0,24	16,26	2,49	3,99	1,77
167	4,64	0,27	12,73	0,72	6,30	0,36	17,56	3,24	5,91	2,04

168	2,07	0,22	5,12	0,52	2,24	0,24	9,90	2,11	3,42	1,77
170	3,03	0,21	9,45	0,66	2,59	0,18	14,19	2,21	4,28	2,07
172	4,12	0,26	12,20	0,77	4,59	0,29	15,87	2,81	5,29	1,97
173	3,17	0,22	8,13	0,57	3,19	0,22	14,55	2,32	3,25	1,48
174	3,92	0,25	12,90	0,82	5,71	0,36	15,81	2,65	5,28	2,05
176	3,27	0,24	10,58	0,78	3,43	0,26	13,67	2,10	4,07	1,96
177	3,43	0,20	9,47	0,57	3,55	0,21	16,77	2,17	4,61	2,22
180	5,26	0,31	9,55	0,56	6,19	0,37	16,99	2,43	5,63	2,52
181	3,84	0,22	13,76	0,79	4,94	0,28	17,39	2,81	5,35	2,03
182	6,46	0,36	12,60	0,71	6,86	0,39	17,70	3,66	5,62	1,88
185	4,20	0,27	10,74	0,68	4,78	0,31	15,89	3,25	5,32	1,68
187	3,67	0,23	12,38	0,78	4,94	0,31	15,87	2,91	4,66	1,68
188	4,05	0,25	12,01	0,75	5,91	0,37	15,91	2,53	4,94	1,99
189	4,69	0,28	14,02	0,83	4,94	0,29	16,84	3,08	5,68	1,93
190	2,38	0,18	10,39	0,80	3,55	0,27	13,14	2,04	3,75	1,83
200	3,28	0,21	12,86	0,83	4,50	0,30	15,45	2,98	4,90	1,67
201	4,68	0,25	13,02	0,68	6,05	0,32	18,94	2,27	5,18	2,28
202	3,89	0,29	11,62	0,85	4,17	0,31	13,55	2,60	5,24	2,12
203	3,43	0,21	8,84	0,53	3,68	0,22	16,61	1,99	4,56	2,34
204	3,21	0,21	7,08	0,47	4,07	0,27	14,95	2,11	4,08	1,93
205	3,27	0,22	8,46	0,56	3,72	0,25	15,06	2,05	4,54	2,29
206	3,37	0,20	10,90	0,66	4,68	0,29	16,50	2,28	5,48	2,46
207	3,62	0,23	7,92	0,50	4,86	0,31	15,89	2,53	5,30	2,13
208	3,52	0,23	8,38	0,56	4,19	0,28	15,28	2,89	5,53	2,04
209	3,41	0,21	11,26	0,70	5,54	0,35	15,93	3,00	5,48	1,94
210	4,49	0,29	9,32	0,60	6,03	0,40	15,39	3,32	5,39	1,77
211	3,02	0,21	6,01	0,42	5,29	0,37	14,31	1,89	4,77	2,45
212	3,00	0,22	8,13	0,60	4,68	0,34	13,69	2,26	3,98	1,79

213	4,07	0,25	10,52	0,65	7,09	0,44	16,35	3,49	6,13	1,90
214	3,21	0,21	7,07	0,46	5,79	0,38	15,28	2,33	4,98	2,15
215	2,35	0,18	6,92	0,52	4,15	0,32	13,25	2,17	3,83	1,83
216	2,86	0,22	9,06	0,69	4,28	0,32	13,23	2,21	4,00	1,98
217	3,52	0,22	9,56	0,59	5,86	0,36	16,26	2,38	5,17	2,20
218	3,41	0,23	6,32	0,43	5,40	0,37	14,66	2,41	5,44	2,27
219	2,77	0,21	9,76	0,74	4,32	0,32	13,29	2,40	4,45	1,85
220	3,36	0,21	6,86	0,43	6,17	0,38	16,24	2,16	4,83	2,25
221	3,62	0,22	11,54	0,70	5,71	0,35	16,48	2,85	5,87	2,08
222	3,01	0,20	11,43	0,77	6,07	0,41	14,95	2,45	5,37	2,22
223	3,04	0,21	7,47	0,52	5,25	0,37	14,34	1,85	3,91	2,16
224	2,57	0,20	9,27	0,72	5,29	0,41	12,87	2,24	4,09	1,82
225	5,07	0,29	9,49	0,55	5,61	0,32	17,35	3,73	6,30	1,77
226	3,59	0,24	9,04	0,61	4,75	0,31	14,96	2,36	4,88	2,07
230	3,11	0,22	9,45	0,66	4,51	0,31	14,54	2,27	4,76	2,13
231	3,37	0,25	9,80	0,73	4,97	0,37	13,47	2,95	5,22	1,83
232	3,88	0,24	11,28	0,69	5,07	0,31	16,23	2,73	5,62	2,17
234	4,48	0,25	12,16	0,68	7,48	0,42	17,98	3,40	5,93	1,78
235	3,49	0,21	11,73	0,71	6,16	0,37	16,63	2,79	5,19	1,89
236	3,80	0,24	8,43	0,54	5,03	0,32	15,60	2,31	4,37	1,93
237	3,50	0,27	9,42	0,73	4,96	0,38	13,03	2,48	4,67	1,90
238	3,16	0,24	8,79	0,66	3,92	0,29	13,46	2,40	4,26	1,83

Cuadro S3.3: Resumen de los datos del largo del hipocótilo en la población RIL y parentales en tratamientos de desetiación y su control en oscuridad.

	Osc (mm)	Bc (mm)	Bc/Osc	Rc (mm)	Rc/Osc	RLc (mm)	RLc /Osc
Pat	16,22±0,13	3,98±0,06	0,24±0,01	11,75±0,38	0,72±0,02	5,85±0,19	0,36±0,01
Col-0	14,12±0,20	2,95±0,08	0,20±0,01	6,36±0,33	0,45±0,02	3,24±0,12	0,22±0,01
RIL mean	15,02±0,12	3,42±0,05	0,22±0,01	9,57±0,15	0,64±0,01	4,44±0,08	0,29±0,01
RIL max-min	18,94-9,32	6,45-1,91	0,37-0,14	14,07-5,11	0,92-0,41	7,8-2,23	0,44-0,16
CMG	7,99	1,38	0,0037	11,42	0,4	3,36	0,1
CME	1,58	0,21	0,00093	2,76	0,1	0,9	0,004
VG	2,136	0,39	0,00092	2,886	0,1	0,82	0,031
VF	2,663	0,46	0,00123	3,806	0,133	1,12	0,033
H ₂	0,802	0,847	0,748	0,758	0,75	0,73	0,953

Cuadro S3.4: Resumen de los datos del largo del hipocótilo en la población RIL y parentales en tratamientos de luz (WL) y escape a la sombra (SA).

	WL (mm)	SA (mm)	SA response (SA/WL)
Pat	3,45 ± 0,11	5,99 ± 0,09	1,73 ± 0,02
Col-0	2,19 ± 0,03	4,63 ± 0,14	2,11 ± 0,06
RIL mean	2,49 ± 0,04	5,08 ± 0,08	2,11 ± 0,03
RIL max–min	4,3 - 1,75	6,63 - 3,41	2,93 - 1,47
CMG	0,49	1,48	0,24
CME	0,14	0,25	0,12
VG	0,17	0,41	0,04
VF	0,16	0,49	0,08
H ₂	0,71	0,83	0,50

CMG es el componente de variancia para cada carácter en las líneas RIL.

CME es el componente de variancia residual (error) para cada tratamiento entre las líneas RIL.

VG es la variancia genotípica para cada tratamiento entre las líneas RIL.

VF es la variancia fenotípica para cada tratamiento entre las líneas RIL.

H₂ es definida como la heredabilidad que es el valor obtenido entre VG/VF.

Cuadro S3.5: Mapeo de QTL para desetiación en plántulas. EL mapeo de QTLs para la longitud del hipocotilo en los tratamientos de Rc, RLc, Bc, Osc, Rc/Osc, RLc /Osc and Bc/Osc. El cuadro muestra QTL significativos ($\alpha = 0.10$). Para cada QTL se indica el número de cromosoma, tratamiento, posición en el mapa (cM), distancia física (bp), LOD, % variabilidad explicada y efectos aditivos (signos positivos y negativos que indican que los alelos Col-0 y Pat aumentan la respuesta promedio de carácter, respectivamente) El número de QTL es arbitrario en orden del valor LOD.

Chr	QT L	Tratamiento	Posición en el mapa (cM)	Intervalo (cM)	Intervalo (Kb)	LOD	%Var	Aditivo
5	<i>Rc1</i>	Rc	48,3	45,9 – 50,4	16,800 - 17,700	9,4	22,3	2,05 mm (Pat)
		Rc/Osc	51,6	48,6 – 51,8	17,500 - 18,300	8,5	22,5	0,11 (Pat)
5	<i>Bc1</i>	Bc	82,4	80,7 -83,7	25,700 - 26,200	8	10,7	0,51 mm (Pat)
		RLc	83,9	83,7 – 85,7	26,200 - 26,700	7,3	16,3	1,01 mm (Pat)
		Osc	85,7	83,9 – 85,7	26,300 - 26,800	4,9	11,2	1,05 mm (Pat)
5	<i>RL c1</i>	RLc /Osc	2,6	1,95 – 2,8	200 - 600	6,5	15,7	0,05 (Col-0)
3	<i>Bc2</i>	Bc	76,7	75,7 – 78,4	21,000 - 21,600	5,1	8,7	0,5 mm (Pat)
3	<i>Da rk1</i>	Osc	54,1	53,9 – 55	18,000 - 18,400	4,5	10,4	1,03 mm (Pat)
4	<i>Bc3</i>	Bc/Osc	27,3	25,5 – 28,7	17,100 - 17,700	4	9,7	0,02 (Pat)
2	<i>Rc2</i>	Rc Osc	31,5	31,5 – 35,2	8,500 - 9,200	4	6,8	0,07 mm (Pat)

Cuadro S3.6: Mapeo de QTL para los tratamientos de luz blanca, sombra e índice SA como ratio entre la longitud del hipocótilo en sombra y luz blanca en plántulas. El cuadro muestra QTL significativos ($\alpha = 0.10$). Para cada QTL se indica el número de cromosoma, tratamiento, posición en el mapa (cM), distancia física Kilobases (Kb), LOD, % variabilidad explicada y efectos aditivos (signos positivos y negativos que indican que los alelos Col-0 y Pat aumentan la respuesta promedio de carácter, respectivamente) El número de QTL es arbitrario en orden del valor LOD.

Chr	QTL	Tratamiento	Map Pos (cM)	Intervalo (cM)	Intervalo (Kb)	LOD	% Var	Aditivo
5	<i>SHADE1(Bc1)</i>	Shade	82,4	81,2 – 83,7	25,700 - 26,200	6,3	14,6	0,56mm (Pat)
5	<i>WL1</i>	WL	78,1	77,3 – 78,3	23,700 - 24,400	5,9	11,5	0,35 mm (Pat)
2	<i>SARI</i>	Shade/WL	29,2	28,8 – 30,5	7,800 - 8,300	3,8	8,5	0,18 (Col-0)
2	<i>WL2</i>	WL	17,6	17,4- 18,1	3,500 - 5,300	3,5	7,2	0,30 mm (Pat)

Cuadro S3.7: Genes anotados dentro de cada QTL de acuerdo con Araport11 para las condiciones de desetiación y oscuridad.

QTL	# genes por QTL
<i>Rc1</i>	458
<i>Bc1</i>	403
<i>RLc1</i>	150
<i>Bc2</i>	220
<i>Dark1</i>	131
<i>Bc3</i>	192
<i>Rc2</i>	249
total	1803

Cuadro S3.8: Genes anotados dentro de cada QTL de acuerdo con Araport11 para las condiciones de luz blanca y sombra

QTL	# genes por QTL
<i>WL1</i>	218
<i>WL2</i>	399
<i>SHADE1 (Bc1)</i>	143
<i>SARI</i>	132
total	892

Cuadro S3.9: Genes relacionados con la luz encontrados dentro de los siete QTL.

Gen	Símbolo	QTL
AT5G42890	SCP2	Rc1
AT5G43630	TZP	Rc1
AT5G43760	KCS20	Rc1
AT5G43935	FLS6	Rc1
AT5G42900	COR27	Rc1
AT5G43470	RPP8	Rc1
AT5G44110	ABCI21	Rc1
AT5G44190	GLK2	Rc1
AT5G43890	YUC5	Rc1
AT5G64330	RPT3	Bc1
AT5G67030	ABA1	Bc1
AT5G64940	ATH13	Bc1
AT5G66570	PSBO1	Bc1
AT5G66250	AT5G66250	Bc1
AT5G02120	OHP	RLc1
AT5G01530	LHCB4.1	RLc1
AT5G02200	FHL	RLc1
AT3G57180	BPG2	Bc2
AT3G56710	SIB1	Bc2
AT3G49120	PRXCB	Dark1
AT3G49620	DIN11	Dark1
AT3G49110	PRXCA	Dark1
AT4G36880	CP1	Bc3
AT4G36240	GATA7	Bc3
AT4G36930	SPT	Bc3
AT4G37280	MRG1	Bc3
AT2G21320	BBX18	Rc2
AT2G20180	PIL5	Rc2
AT2G21150	XCT	Rc2
AT2G19690	PLA2- BETA	Rc2

Cuadro S3.10: Genes relacionados con la luz blanca, sombra e índice SA encontrados dentro de los dos de los cuatro QTL.

Gen	Símbolo	QTL
<i>AT5G55280</i>	<i>FTSZ1</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G61230</i>	<i>AT5G61230</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G61270</i>	<i>BHLH72</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G63190</i>	<i>AT5G63190</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G63420</i>	<i>emb2746</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G63570</i>	<i>GSA1</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G63590</i>	<i>FLS3</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G63600</i>	<i>FLS5</i>	<i>WL1</i>
<i>AT5G58290</i>	<i>RPT3</i>	<i>WL1</i>
<i>AT2G16280</i>	<i>KCS9</i>	<i>SAR1</i>
<i>AT2G17260</i>	<i>GLR2</i>	<i>SAR1</i>
<i>AT2G18010</i>	<i>AT2G18010</i>	<i>SAR1</i>
<i>AT2G18790</i>	<i>PHYB</i>	<i>SAR1</i>
<i>AT2G18915</i>	<i>ADO2</i>	<i>SAR1</i>
<i>AT2G19690</i>	<i>PLA2-BETA</i>	<i>SAR1</i>
<i>AT2G17730</i>	<i>NIP2</i>	<i>SAR1</i>

Cuadro S3.11A: Genes candidatos involucrados en la respuesta a la desetiología dentro de los QTLs. Los genes fueron seleccionados por los filtros de GO (Gene Ontology), el intervalo del QTL y los SNPs en el fondo Pat que son de alto impacto de acuerdo con SnpEff.

QTL	Gen	Nombre	<i>Missense variant</i>	<i>Splice acceptor variant</i>	<i>Splice donor variant</i>	<i>Start lost</i>	<i>Stop gained</i>	<i>Stop lost</i>
<i>Rc1</i>	<i>AT5G43890</i>	<i>YUC5</i>	1	0	0	0	0	0
	<i>AT5G43470</i>	<i>RPP8</i>	5	0	0	0	0	0
	<i>AT5G43630</i>	<i>TZP</i>	6	0	0	0	1	0
	<i>AT5G43935</i>	<i>FLS6</i>	9	0	0	0	0	0
	<i>AT5G44110</i>	<i>ABCI21</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Bc1</i>	<i>AT5G64330</i>	<i>RPT3</i>	1	0	0	0	0	0
	<i>AT5G67030</i>	<i>ABAI</i>	5	0	0	0	0	0
	<i>AT5G66250</i>	kinectin-like protein	3	0	0	0	0	0
<i>RLc1</i>	<i>AT5G02200</i>	<i>FHL</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Bc2</i>	<i>AT3G57180</i>	<i>BPG2</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Bc3</i>	<i>AT4G37280</i>	<i>MRG1</i>	1	0	0	0	0	0
	<i>AT4G36240</i>	<i>GATA7</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Rc2</i>	<i>AT2G19690</i>	<i>PLA2-BETA</i>	1	0	0	0	0	0

Cuadro S3.11 B: Genes candidatos que se encuentran dentro de los QTL *SARI* y *Bcl*.

QTL	Gen	Nombre	<i>Missense variant</i>	<i>Splice acceptor variant</i>	<i>Splice donor variant</i>	<i>Start lost</i>	<i>Stop gained</i>	<i>Stop lost</i>
<i>SARI</i>	AT2G18010	AT2G18010	1	0	0	0	0	0
	AT2G18790	PHYB	3	0	0	0	0	0
	AT2G18915	ADO2	3	0	0	0	0	0
<i>Bcl</i>	AT5G64330	RPT3	1	0	0	0	0	0

Cuadro S3.12: Ocurrencia de los polimorfismos de Pat en *TZP* y *ABA1*. *Missense variants* o *stop codon gained* son ubicados con las coordenadas, tomado a Col-0 como referencia (REF) o Pat como alternante (ALT) a los SNPs dentro de los genes de *TZP* y *ABA1*.

Gen	Posición	REF	ALT	Tipo de variante	Transcripto	Proteína
<i>TZP</i>	17528075	C	A	<i>missense_variant</i>	c.624C>A	p.Asp208Glu
<i>TZP</i>	17528089	G	A	<i>missense_variant</i>	c.638G>A	p.Gly213Asp
<i>TZP</i>	17528730	C	T	<i>missense_variant</i>	c.1279C>T	p.Pro427Ser
<i>TZP</i>	17529288	T	C	<i>missense_variant</i>	c.1837T>C	p.Cys613Arg
<i>TZP</i>	17529477	G	T	<i>missense_variant</i>	c.2026G>T	p.Ala676Ser
<i>TZP</i>	17530127	A	G	<i>missense_variant</i>	c.2416A>G	p.Arg806Gly
<i>TZP</i>	17529973	C	T	<i>Stop_gained</i>	c.2359C>T	p.Gln787*
<i>ABA1</i>	26754495	T	G	<i>missense_variant</i>	c.1638A>C	p.Glu546Asp
<i>ABA1</i>	26754515	C	T	<i>missense_variant</i>	c.1618G>A	p.Asp540Asn
<i>ABA1</i>	26756598	T	C	<i>missense_variant</i>	c.493A>G	p.Ile165Val
<i>ABA1</i>	26756665	T	A	<i>missense_variant</i>	c.426A>T	p.Glu142Asp
<i>ABA1</i>	26756964	G	A	<i>missense_variant</i>	c.127C>T	p.Pro43Ser

Cuadro S3.13: Accesiones con la misma información de SNPs en Pat para los genes *TZP* y *ABAI*. Presencia (1|1), ausencia (0|0) y sin dato (/./). Se llamó a cada coordenada informativa de Pat a través de accesiones usadas en los ensayos de luz.

Gen	POS	Accesiones						
		Ting-1	Tamm-2	Tamm-27	Sq-1	Got-22	Chat-1	Ts-1
<i>TZP</i>	17528075	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<i>TZP</i>	17528089	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<i>TZP</i>	17528730	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1
<i>TZP</i>	17529288	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1
<i>TZP</i>	17529477	0 0	0 0	0 0	/./	0 0	0 0	1 1
<i>TZP</i>	17530127	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1

Gen	POS	Accesiones				
		RRS-10	Ag-0	Pna-17	Dem-4	Ts-1
<i>ABAI</i>	26754495	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<i>ABAI</i>	26754515	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<i>ABAI</i>	26756598	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<i>ABAI</i>	26756665	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<i>ABAI</i>	26756964	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1

Cuadro S4.1. Medias de cada RIL para el tratamiento de vernalización en un fotoperiodo de LD.

RIL	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
2	23,00	20,00	14,67	28,00	19,33
3	-	-	-	-	-
4	17,25	11,50	9,75	13,24	10,27
5	25,00	12,66	10,51	17,44	15,66
6	18,66	11,83	11,09	20,72	12,82
7	28,4	15,60	13,60	22,44	11,63
8	20,75	12,75	14,66	23,50	15,00
9	10,00	6,80	8,04	11,36	9,38
10	-	-	-	-	-
11	24,80	23,20	15,92	28,06	19,06
13	25,00	10,33	10,32	17,74	9,65
16	-	-	-	-	-
19	18,20	11,40	11,56	21,92	18,85
20	21,66	14,33	11,02	13,83	8,19
21	25,16	27,33	16,51	30,48	17,16
22	-	-	-	-	-
24	24,33	17,66	14,30	29,41	15,06
27	19,00	16,00	13,13	24,67	18,00
28	17,16	11,50	9,91	17,89	10,78
31	16,16	9,00	9,28	14,94	16,82
32	24,50	12,75	12,66	23,00	12,58
33	-	-	-	-	-
34	15,00	9,40	10,50	17,13	11,31

35	-	-	-	-	-
36	24,25	19,00	12,12	23,24	17,49
37	25,66	25,33	15,16	29,05	16,97
38	26,33	38,66	15,98	30,33	17,59
39	24,00	19,16	19,25	32,49	22,39
41	29,20	28,60	17,43	33,10	17,91
42	19,33	22,33	13,66	25,66	16,00
45	19,50	14,00	13,40	23,94	15,94
47	-	-	-	-	-
48	16,00	9,33	10,16	16,02	14,04
49	17,50	11,50	10,91	19,28	11,96
50	23,00	10,40	10,86	17,41	10,87
52	13,00	9,66	9,77	16,54	11,13
53	12,25	10,50	13,04	16,63	17,61
54	25,60	21,80	16,10	29,13	17,40
55	22,40	14,40	12,56	20,24	13,12
56	22,40	16,80	14,88	23,60	14,43
57	20,33	14,33	14,75	26,33	16,60
58	28,50	15,00	16,16	27,80	14,54
61	27,16	19,66	14,97	28,10	17,75
65	19,25	15,75	12,47	23,42	17,17
66	17,66	17,00	11,285	17,62	12,17
67	23,66	15,66	13,87	25,15	15,65
69	14,33	7,50	10,49	19,04	13,07
70	15,83	8,66	7,49	16,85	11,29
71	20,80	13,40	12,63	22,752	15,11
72	24,33	18,33	15,02	26,28	14,83
73	-	-	-	-	-

74	17,33	12,50	9,47	15,22	16,19
75	25,50	16,33	14,83	30,83	16,00
76	13,20	9,20	10,02	15,32	14,85
77	20,80	13,80	12,07	18,79	16,10
78	18,40	8,40	8,97	15,48	8,86
80	17,80	10,80	10,39	18,07	12,06
81	18,66	10,50	8,46	14,25	9,78
83	14,66	9,16	7,545	14,20	10,54
85	19,16	13,33	11,24	20,04	15,48
87	22,00	12,83	11,98	20,55	15,39
88	14,16	8,00	7,84	12,98	11,35
93	13,00	9,00	7,35	15,81	12,50
96	23,83	12,16	11,98	19,84	13,80
97	23,16	12,66	13,39	22,53	16,88
99	22,16	11,83	11,60	21,30	11,583
100	21,66	12,50	13,23	24,82	13,12
102	19,20	16,40	14,05	27,01	18,69
106	17,33	9,833	10,51	19,33	14,94
108	-	-	-	-	-
110	20,33	24,16	12,90	26,93	19,59
111	25,20	18,40	16,32	30,12	18,85
112	21,00	13,75	10,57	19,25	11,66
114	-	-	-	-	-
116	22,80	14,20	15,28	26,63	17,76
120	19,66	17,00	12,99	23,81	15,24
121	25,75	29,25	17,51	30,23	19,56
122	22,50	20,66	15,19	24,75	16,83
124	10,66	9,16	8,68	17,33	9,81

126	24,00	22,33	14,99	28,75	16,21
127	19,75	13,5	13,02	24,18	19,15
128	22,33	15,40	14,46	25,06	17,15
129	16,60	9,80	10,16	20,09	12,44
131	16,00	11,80	10,07	19,25	16,49
132	17,75	10,50	10,09	21,92	17,94
135	17,00	11,66	13,45	22,14	18,63
136	21,83	13,66	15,16	30,89	18,28
137	14,00	9,00	8,54	16,07	9,80
138	24,83	15,40	13,27	23,28	10,38
139	28,75	28,75	14,98	27,36	15,93
143	24,00	15,50	11,35	22,46	13,75
144	22,75	8,00	11,86	20,75	12,52
147	23,80	12,80	12,04	21,01	12,64
148	35,25	29,25	15,30	29,73	13,96
152	-	-	-	-	-
153	34,5	34,00	15,84	30,90	17,81
155	22,00	12,33	10,42	17,73	11,24
156	-	-	-	-	-
157	-	-	-	-	-
158	25,00	26,33	15,99	28,30	15,15
159	29,20	41,50	16,26	29,80	17,33
160	-	-	-	-	-
161	27,00	33,66	30,10	44,47	31,80
162	32,25	34,50	14,04	26,56	15,87
163	38,25	41,5	12,69	28,18	12,71
164	26,40	16,6	14,83	26,947	12,57
165	34,00	40,8	15,16	33,16	14,70

167	26,00	21,8	19,08	32,89	17,75
168	-	-	-	-	-
170	26,66	15,16	13,34	23,10	11,50
172	31,20	32,40	16,11	29,87	14,55
173	-	-	-	-	-
174	22,33	21,33	15,69	29,93	17,47
176	33,50	46,75	18,24	34,91	21,86
177	30,33	21,33	18,33	33,57	16,43
180	12,00	8,80	7,70	9,99	11,89
181	21,00	26,00	20,07	33,91	24,44
182	-	-	-	-	-
185	21,33	18,00	14,05	25,75	20,91
187	27,50	38,75	19,11	34,13	28,40
188	26,50	40,00	16,09	32,08	21,75
189	-	-	-	-	-
190	27,50	41,00	19,14	36,44	24,94
200	28,75	39,50	17,31	33,58	24,03
201	7,33	6,66	7,40	12,93	13,69
202	24,00	10,50	11,28	21,79	13,56
203	17,00	9,00	10,46	15,86	13,93
204	23,25	16,50	16,11	27,41	14,65
205	19,00	14,80	13,06	23,16	15,52
206	13,33	9,50	7,45	11,21	13,27
207	26,00	15,80	14,71	25,51	13,94
208	15,00	9,50	10,44	17,108	11,56
209	13,25	12,0	10,03	16,00	14,47
210	28,50	24,5	12,52	23,65	14,81
211	-	-	-	-	-

212	24,25	18,50	13,61	24,62	12,89
213	23,66	18,33	13,18	23,86	16,41
214	-	-	-	-	-
215	-	-	-	-	-
216	31,25	29,50	11,32	22,33	11,64
217	24,00	15,33	15,73	26,62	14,81
218	19,75	11,00	9,38	18,73	8,96
219	29,00	24,83	18,44	32,72	19,52
220	15,83	12,16	11,50	17,77	13,83
221	20,75	17,75	12,47	24,42	13,85
222	18,75	14,75	13,76	24,11	17,43
223	32,50	33,00	15,72	27,54	16,33
224	-	-	-	-	-
225	28,66	26,00	11,74	23,27	13,26
226	25,33	25,00	19,85	31,89	20,35
230	23,75	18,50	15,93	30,48	20,18
231	31,40	32,00	18,63	30,09	16,90
232	11,33	11,33	7,98	16,42	14,40
234	20,25	22,25	14,93	27,90	20,95
235	12,50	11,33	9,01	14,90	15,84
236	15,50	13,83	10,20	17,93	13,76
237	29,16	26,66	20,44	35,13	21,10
238	-	-	-	-	-
239	-	-	-	-	-
242	24,50	26,00	16,26	32,37	19,49
243	13,00	11,20	9,02	12,09	14,01
244	-	-	-	-	-
246	13,80	11,60	8,90	15,01	14,80

Cuadro S4.2. Medias de cada RIL para el tratamiento de vernalización en un fotoperiodo de SD.

RIL	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
2	23,00	20,00	14,67	28,00	19,33
3	-	-	-	-	-
4	17,25	11,50	9,76	13,24	10,27
5	25,00	12,67	10,51	17,45	15,67
6	18,67	11,83	11,09	20,72	12,83
7	28,40	15,60	13,61	22,44	11,64
8	20,75	12,75	14,67	23,50	15,00
9	10,00	6,80	8,05	11,36	9,39
10	-	-	-	-	-
11	24,80	23,20	15,93	28,07	19,07
13	25,00	10,33	10,32	17,75	9,65
16	-	-	-	-	-
19	18,20	11,40	11,56	21,92	18,86
20	21,67	14,33	11,03	13,83	8,19
21	25,17	27,33	16,52	30,49	17,17
22	-	-	-	-	-
24	24,33	17,67	14,31	29,42	15,07
27	19,00	16,00	13,13	24,67	18,00
28	17,17	11,50	9,91	17,89	10,79
31	16,17	9,00	9,28	14,94	16,83
32	24,50	12,75	12,67	23,00	12,59
33	-	-	-	-	-
34	15,00	9,40	10,50	17,13	11,31

35	-	-	-	-	-
36	24,25	19,00	12,12	23,25	17,50
37	25,67	25,33	15,16	29,05	16,97
38	26,33	38,67	15,98	30,33	17,59
39	24,00	19,17	19,26	32,49	22,40
41	29,20	28,60	17,44	33,10	17,92
42	19,33	22,33	13,67	25,67	16,00
45	19,50	14,00	13,40	23,95	15,94
47	-	-	-	-	-
48	16,00	9,33	10,17	16,02	14,04
49	17,50	11,50	10,92	19,29	11,96
50	23,00	10,40	10,86	17,42	10,87
52	13,00	9,67	9,77	16,54	11,13
53	12,25	10,50	13,04	16,63	17,61
54	25,60	21,80	16,10	29,14	17,40
55	22,40	14,40	12,56	20,24	13,13
56	22,40	16,80	14,88	23,60	14,43
57	20,33	14,33	14,75	26,33	16,61
58	28,50	15,00	16,17	27,81	14,54
61	27,17	19,67	14,98	28,10	17,75
65	19,25	15,75	12,47	23,43	17,17
66	17,67	17,00	11,29	17,62	12,18
67	23,67	15,67	13,87	25,15	15,65
69	14,33	7,50	10,50	19,05	13,07
70	15,83	8,67	7,49	16,85	11,30
71	20,80	13,40	12,63	22,75	15,12
72	24,33	18,33	15,02	26,28	14,83
73	-	-	-	-	-

74	17,33	12,50	9,48	15,22	16,19
75	25,50	16,33	14,83	30,84	16,00
76	13,20	9,20	10,02	15,32	14,85
77	20,80	13,80	12,07	18,79	16,10
78	18,40	8,40	8,98	15,49	8,86
80	17,80	10,80	10,39	18,07	12,06
81	18,67	10,50	8,46	14,26	9,78
83	14,67	9,17	7,55	14,21	10,54
85	19,17	13,33	11,24	20,05	15,49
87	22,00	12,83	11,98	20,56	15,40
88	14,17	8,00	7,85	12,98	11,35
93	13,00	9,00	7,36	15,81	12,50
96	23,83	12,17	11,99	19,84	13,81
97	23,17	12,67	13,40	22,53	16,88
99	22,17	11,83	11,60	21,30	11,58
100	21,67	12,50	13,24	24,83	13,13
102	19,20	16,40	14,05	27,02	18,70
106	17,33	9,83	10,52	19,34	14,94
108	-	-	-	-	-
110	20,33	24,17	12,91	26,93	19,60
111	25,20	18,40	16,32	30,12	18,86
112	21,00	13,75	10,58	19,25	11,66
114	-	-	-	-	-
116	22,80	14,20	15,28	26,63	17,77
120	19,67	17,00	12,99	23,81	15,24
121	25,75	29,25	17,51	30,24	19,57
122	22,50	20,67	15,19	24,76	16,84
124	10,67	9,17	8,68	17,34	9,82

126	24,00	22,33	15,00	28,76	16,22
127	19,75	13,50	13,02	24,18	19,15
128	22,33	15,40	14,47	25,06	17,16
129	16,60	9,80	10,17	20,10	12,45
131	16,00	11,80	10,07	19,25	16,50
132	17,75	10,50	10,10	21,92	17,95
135	17,00	11,67	13,46	22,14	18,63
136	21,83	13,67	15,17	30,89	18,28
137	14,00	9,00	8,54	16,07	9,80
138	24,83	15,40	13,28	23,28	10,38
139	28,75	28,75	14,98	27,36	15,93
143	24,00	15,50	11,35	22,46	13,77
144	22,75	8,00	11,87	20,75	12,52
147	23,80	12,80	12,05	21,01	12,65
148	35,25	29,25	15,30	29,73	13,96
152	-	-	-	-	-
153	34,50	34,00	15,84	30,91	17,82
155	22,00	12,33	10,43	17,74	11,24
156	-	-	-	-	-
157	-	-	-	-	-
158	25,00	26,33	16,00	28,31	15,16
159	29,20	41,50	16,26	29,80	17,33
160	-	-	-	-	-
161	27,00	33,67	30,10	44,48	31,80
162	32,25	34,50	14,04	26,56	15,86
163	38,25	41,50	12,69	28,18	12,72
164	26,40	16,60	14,84	26,95	12,58
165	34,00	40,80	15,16	33,16	14,71

167	26,00	21,80	19,08	32,90	17,75
168	-	-	-	-	-
170	26,67	15,17	13,35	23,11	11,51
172	31,20	32,40	16,12	29,87	14,56
173	-	-	-	-	-
174	22,33	21,33	15,70	29,93	17,47
176	33,50	46,75	18,25	34,91	21,87
177	30,33	21,33	18,33	33,57	16,44
180	12,00	8,80	7,71	9,99	11,90
181	21,00	26,00	20,07	33,91	24,45
182	-	-	-	-	-
185	21,33	18,00	14,05	25,75	20,92
187	27,50	38,75	19,12	34,13	28,40
188	26,50	40,00	16,09	32,08	21,76
189	-	-	-	-	-
190	27,50	41,00	19,15	36,45	24,94
200	28,75	39,50	17,31	33,58	24,04
201	7,33	6,67	7,41	12,93	13,69
202	24,00	10,50	11,29	21,79	13,56
203	17,00	9,00	10,46	15,86	13,93
204	23,25	16,50	16,11	27,41	14,66
205	19,00	14,80	13,07	23,16	15,52
206	13,33	9,50	7,45	11,22	13,28
207	26,00	15,80	14,72	25,52	13,95
208	15,00	9,50	10,44	17,11	11,56
209	13,25	12,00	10,03	16,00	14,48
210	28,50	24,50	12,53	23,65	14,81
211	-	-	-	-	-

212	24,25	18,50	13,62	24,63	12,90
213	23,67	18,33	13,19	23,86	16,41
214	-	-	-	-	-
215	-	-	-	-	-
216	31,25	29,50	11,32	22,33	11,65
217	24,00	15,33	15,73	26,62	14,81
218	19,75	11,00	9,39	18,74	8,96
219	29,00	24,83	18,45	32,73	19,53
220	15,83	12,17	11,50	17,77	13,84
221	20,75	17,75	12,47	24,42	13,86
222	18,75	14,75	13,77	24,12	17,44
223	32,50	33,00	15,73	27,54	16,34
224	-	-	-	-	-
225	28,67	26,00	11,74	23,28	13,27
226	25,33	25,00	19,85	31,89	20,35
230	23,75	18,50	15,94	30,48	20,18
231	31,40	32,00	18,64	30,09	16,90
232	11,33	11,33	7,99	16,42	14,40
234	20,25	22,25	14,93	27,91	20,96
235	12,50	11,33	9,02	14,90	15,85
236	15,50	13,83	10,23	17,94	13,76
237	29,17	26,67	20,45	35,13	21,11
238	-	-	-	-	-
239	-	-	-	-	-
242	24,50	26,00	16,26	32,38	19,49
243	13,00	11,20	9,02	12,10	14,02
244	-	-	-	-	-
246	13,80	11,60	8,90	15,01	14,80

Cuadro S4.3. Medias de cada RIL para el tratamiento de no vernalización en un fotoperiodo de LD.

RIL	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
2	28,80	12,40	12,05	22,06	9,78
3	-	-	-	-	-
4	33,40	14,40	9,32	16,58	7,22
5	39,75	41,50	16,19	30,24	14,86
6	45,17	34,67	12,98	26,62	14,28
7	52,00	33,25	15,48	29,22	17,13
8	-	-	-	-	-
9	33,40	20,20	13,16	24,89	10,03
10	51,33	23,33	16,40	27,46	16,31
11	42,00	36,60	14,83	31,99	16,64
13	44,67	24,00	19,22	35,96	15,83
16	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	46,80	19,40	17,47	26,45	13,20
21	49,50	31,00	16,94	27,76	14,25
22	43,80	25,20	15,79	27,65	14,09
24	41,00	24,00	22,50	30,60	22,37
27	-	-	-	-	-
28	34,20	13,80	9,95	16,39	10,65
31	41,50	22,33	16,89	30,24	16,30
32	52,00	33,67	17,23	27,86	16,18
33	42,67	47,00	21,83	26,93	17,76
34	-	-	-	-	-

35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	78,00	91,50	12,40	28,67	14,74
38	-	-	-	-	-
39	46,80	39,40	18,13	31,30	12,95
41	49,00	47,00	17,62	26,27	16,34
42	46,75	40,50	13,72	25,64	14,58
45	39,50	20,00	14,97	31,58	13,68
47	37,00	20,00	19,00	31,67	15,00
48	30,50	13,33	14,66	33,00	13,51
49	-	-	-	-	-
50	27,67	14,50	12,72	20,66	11,11
52	28,50	12,33	10,17	19,30	9,78
53	32,17	14,83	12,60	20,52	11,03
54	43,60	40,00	15,92	28,81	10,45
55	29,80	19,40	14,24	25,67	12,29
56	45,00	19,33	16,93	29,27	19,26
57	69,75	79,50	12,23	24,80	10,68
58	-	-	-	-	-
61	44,75	42,00	25,95	39,80	17,31
65	33,00	21,00	13,90	30,57	16,13
66	31,80	19,40	7,45	13,67	9,61
67	29,33	12,67	6,39	10,77	5,52
69	24,50	10,00	5,03	7,93	5,14
70	34,00	14,67	13,35	22,20	9,18
71	33,75	22,50	14,17	26,21	11,96
72	29,67	21,00	12,08	23,57	9,41
73	33,25	19,25	16,88	25,78	12,21

74	34,20	21,80	11,20	22,02	9,45
75	53,75	47,00	17,86	29,04	14,47
76	32,50	16,33	12,78	22,46	11,05
77	-	-	-	-	-
78	30,40	12,00	12,38	24,28	12,50
80	33,80	20,80	13,69	31,49	10,79
81	35,00	15,40	9,69	24,44	10,19
83	34,00	18,00	13,74	22,84	9,91
85	-	-	-	-	-
87	31,33	17,50	18,18	23,78	9,77
88	27,50	13,67	15,28	26,31	11,58
93	39,00	24,00	18,84	35,84	15,67
96	28,00	11,80	12,38	26,41	11,61
97	38,00	24,00	18,00	31,67	12,34
99	40,67	33,33	13,94	32,28	15,86
100	-	-	-	-	-
102	43,00	37,00	13,05	29,41	14,57
106	-	-	-	-	-
108	70,00	77,00	26,69	36,91	21,58
110	48,20	35,80	17,47	30,68	12,82
111	-	-	-	-	-
112	40,83	22,83	15,56	29,01	11,42
114	46,67	30,83	16,32	33,03	14,71
116	43,50	27,67	18,11	27,21	14,23
120	26,50	11,25	11,77	20,35	7,88
121	52,33	52,67	15,31	33,54	17,52
122	39,00	14,00	16,73	31,06	12,73
124	31,50	15,67	13,82	24,32	12,20

126	48,75	48,25	15,49	25,32	12,23
127	42,67	25,00	13,89	32,52	15,76
128	44,00	18,50	20,38	31,55	17,43
129	41,40	20,80	16,80	28,65	15,13
131	50,75	31,75	19,21	34,97	16,98
132	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-
136	-	-	-	-	-
137	-	-	-	-	-
138	-	-	-	-	-
139	49,00	27,75	16,42	23,48	12,87
143	27,75	29,50	14,27	30,70	12,88
144	-	-	-	-	-
147	50,00	15,50	11,08	28,43	15,28
148	-	-	-	-	-
152	-	-	-	-	-
153	-	-	-	-	-
155	50,25	40,25	14,01	30,97	15,30
156	-	-	-	-	-
157	-	-	-	-	-
158	107,50	181,00	25,34	37,50	18,50
159	-	-	-	-	-
160	60,33	40,67	18,27	34,20	18,53
161	88,67	138,00	24,33	31,78	19,34
162	-	-	-	-	-
163	52,00	41,33	9,24	21,01	18,56
164	42,67	33,33	22,17	35,22	17,37
165	89,00	144,00	17,33	30,67	16,00

167	100,00	137,25	21,27	29,20	16,33
168	-	-	-	-	-
170	51,25	50,50	12,88	29,03	13,78
172	-	-	-	-	-
173	-	-	-	-	-
174	44,67	35,00	20,44	44,96	20,84
176	-	-	-	-	-
177	50,00	42,33	18,21	33,78	15,71
180	27,25	13,00	10,32	28,48	11,27
181	62,75	62,50	17,69	26,08	14,22
182	66,00	91,50	24,98	27,18	15,98
185	66,50	76,75	24,95	30,33	17,12
187	92,50	136,00	23,67	34,17	17,00
188	93,33	120,67	21,45	24,66	13,22
189	80,00	112,00	19,89	33,67	13,89
190	97,50	156,00	23,67	33,50	18,50
200	21,00	7,50	2,85	10,08	4,53
201	30,00	14,50	12,16	22,81	12,48
202	25,33	15,33	10,56	16,06	5,80
203	36,67	49,67	13,89	31,02	11,66
204	43,00	40,00	19,10	46,30	16,23
205	-	-	-	-	-
206	42,33	30,33	23,59	41,52	18,48
207	43,00	30,00	14,73	35,90	14,53
208	40,00	8,00	3,33	10,00	6,00
209	-	-	-	-	-
210	38,00	17,60	15,73	29,06	14,87
211	-	-	-	-	-

212	34,00	18,33	13,72	36,94	15,78
213	96,50	136,75	23,33	33,34	18,84
214	-	-	-	-	-
215	-	-	-	-	-
216	-	-	-	-	-
217	-	-	-	-	-
218	41,67	46,00	19,57	29,24	16,04
219	-	-	-	-	-
220	40,33	31,33	20,57	34,71	14,69
221	-	-	-	-	-
222	-	-	-	-	-
223	-	-	-	-	-
224	42,67	26,33	17,09	33,43	16,26
225	43,00	37,00	21,43	42,00	17,10
226					
230	41,75	20,25	15,07	32,13	15,12
231	111,50	163,50	25,84	34,00	18,83
232	-	-	-	-	-
234	62,67	82,33	17,99	30,33	14,07
235	41,50	20,75	14,57	25,94	12,45
236	60,50	83,00	19,31	32,13	15,37
237	60,00	75,00	21,00	33,10	16,13
238	46,00	37,33	19,51	43,14	21,36
239	-	-	-	-	-
242	-	-	-	-	-
243	-	-	-	-	-
244	-	-	-	-	-
246	46,00	27,67	22,24	30,37	18,74

Cuadro S4.4. Medias de cada RIL para el tratamiento de no vernalización en un fotoperiodo de SD.

RIL	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
2	57,33	46,00	18,43	24,16	15,44
3	-	-	-	-	-
4	49,33	51,33	24,36	38,74	20,99
5	61,67	67,50	23,95	35,83	18,96
6	62,67	67,17	23,94	30,03	16,76
7	80,00	67,00	19,18	30,98	15,55
8	67,75	62,75	22,97	37,03	18,41
9	59,67	67,17	22,03	30,81	16,87
10	80,20	57,60	23,01	39,04	19,77
11	74,00	61,00	19,07	28,35	16,85
13	95,00	69,00	23,46	27,20	19,38
16	92,20	67,20	22,11	30,57	18,57
19	84,00	81,50	25,32	39,23	19,02
20	65,60	60,00	18,07	28,61	17,61
21	85,75	72,75	22,53	29,32	14,84
22	43,67	39,33	27,39	33,08	14,11
24	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	68,60	52,40	19,52	29,41	16,11
31	78,60	49,60	19,06	51,86	20,68
32	64,00	46,80	19,24	22,37	14,17
33	62,50	44,17	20,97	27,83	14,61
34	52,00	43,83	21,25	31,15	18,08

35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
39	61,40	60,80	23,07	29,06	16,23
41	87,20	70,00	11,41	22,99	13,79
42	63,00	53,00	18,08	27,63	14,75
45	52,50	48,83	21,70	31,45	16,88
47	63,20	53,20	23,40	31,48	17,37
48	58,17	38,83	19,23	29,66	14,26
49	54,75	41,50	23,93	34,24	20,59
50	64,20	49,20	20,43	30,87	17,03
52	56,67	36,50	23,75	28,59	18,80
53	69,67	45,67	26,27	32,72	19,21
54	59,67	66,17	16,42	31,44	17,16
55	-	-	-	-	-
56	63,80	75,20	25,23	32,71	20,21
57	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-
61	83,75	34,00	15,65	27,45	18,15
65	66,20	58,20	16,55	24,96	18,47
66	84,00	66,40	13,71	24,81	17,06
67	126,00	86,00	21,89	33,78	19,11
69	51,75	39,25	14,29	27,14	14,42
70	-	-	-	-	-
71	51,00	43,00	17,80	27,34	16,05
72	85,33	59,67	20,72	34,67	20,80
73	69,33	56,33	16,07	37,42	17,12

74	87,00	39,00	22,73	40,57	15,90
75	90,67	78,67	17,82	38,21	15,33
76	82,00	55,00	21,42	36,87	15,42
77	84,00	95,00	17,83	39,13	19,07
78	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-
87	69,00	74,00	17,00	28,00	17,00
88	65,75	46,00	8,25	25,18	15,58
93	72,00	96,00	20,67	36,33	19,00
96	-	-	-	-	-
97	71,00	45,00	15,43	26,33	10,90
99	76,00	50,67	17,50	30,52	15,94
100	90,75	103,00	8,32	26,80	9,99
102	112,00	51,00	18,54	33,27	22,07
106	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-
110	64,67	40,00	14,28	22,44	14,06
111	128,75	111,00	22,60	34,76	19,21
112	-	-	-	-	-
114	77,75	66,25	15,51	30,56	16,94
116	108,17	71,83	22,92	45,24	22,32
120	119,00	104,00	14,87	33,48	19,45
121	146,50	186,00	20,00	32,50	18,50
122	-	-	-	-	-
124	52,00	16,00	11,83	18,97	10,60

126	91,33	64,00	14,43	27,81	17,09
127	79,00	43,50	15,70	38,05	21,43
128	81,00	42,75	17,59	34,56	22,21
129	68,50	42,50	19,02	36,98	16,92
131	53,60	41,20	28,97	34,28	17,79
132	-	-	-	-	-
135	72,00	90,20	25,47	29,32	15,72
136	-	-	-	-	-
137	-	-	-	-	-
138	67,00	60,00	19,50	29,60	15,25
139	-	-	-	-	-
143	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-
147	73,00	72,17	19,44	38,76	17,79
148	78,40	80,20	14,31	29,72	12,84
152	-	-	-	-	-
153	160,00	165,00	16,00	24,67	14,00
155	97,67	97,00	24,02	34,39	15,31
156	55,50	38,75	17,28	28,43	16,87
157	-	-	-	-	-
158	126,00	204,00	25,67	58,00	23,00
159	-	-	-	-	-
160	106,00	91,00	25,33	35,00	19,33
161	145,60	170,60	24,67	35,20	17,33
162	162,50	194,00	16,67	32,83	15,50
163	155,75	164,00	20,08	31,25	18,42
164	89,50	64,00	22,53	34,12	19,65
165	-	-	-	-	-

167	121,00	95,00	21,54	35,76	16,52
168	-	-	-	-	-
170	-	-	-	-	-
172	132,67	188,67	29,56	45,22	23,89
173	-	-	-	-	-
174	74,33	56,00	18,17	34,78	18,46
176	-	-	-	-	-
177	85,67	75,33	14,28	28,56	15,32
180	54,67	28,00	15,94	26,90	16,02
181	121,00	144,00	28,33	39,67	18,67
182	111,00	77,00	21,40	37,53	17,87
185	105,33	73,00	16,90	29,38	13,61
187	87,00	46,00	22,23	33,53	15,43
188	130,00	101,50	16,38	29,62	16,03
189	106,33	62,50	16,76	29,42	14,20
190	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-
201	94,00	63,00	17,50	26,50	14,40
202	57,00	40,75	21,78	29,91	15,56
203	-	-	-	-	-
204	80,00	49,50	11,57	24,22	8,07
205	49,50	28,50	21,45	26,17	15,82
206	52,33	40,33	20,29	19,32	11,08
207	135,50	63,00	18,23	33,47	17,37
208	54,50	23,00	11,95	22,20	13,25
209	76,50	44,50	21,90	40,82	18,45
210	-	-	-	-	-
211	100,00	80,00	20,50	32,33	13,67

212	95,33	83,00	19,99	35,92	19,99
213	-	-	-	-	-
214	134,00	148,00	21,00	32,00	16,00
215	111,00	58,00	12,90	41,93	23,87
216	-	-	-	-	-
217	84,50	56,00	15,23	37,92	17,45
218	76,50	61,00	21,59	34,12	17,40
219	108,00	83,50	19,88	42,48	16,50
220	57,75	39,00	22,93	35,72	20,58
221	73,50	59,25	17,93	31,98	17,14
222	-	-	-	-	-
223	-	-	-	-	-
224	103,67	97,50	18,42	32,26	14,31
225	105,33	86,33	14,09	43,70	19,67
226	87,00	76,00	14,97	24,03	17,62
230	167,00	-	-	-	-
231	-	-	-	-	-
232	-	-	-	-	-
234	108,50	85,00	9,90	18,08	9,17
235	66,00	33,00	8,67	10,67	7,73
236	71,00	72,50	19,26	35,68	19,24
237	140,00	187,00	23,00	38,00	22,00
238	87,00	70,00	16,43	27,93	14,00
239	-	-	-	-	-
242	100,25	92,75	18,96	32,83	13,80
243	65,50	36,25	17,29	26,41	13,58
244	-	-	-	-	-
246	66,67	48,00	16,98	32,71	18,97

Cuadro S4.5. Resumen estadístico para el tratamiento de vernalización en un fotoperiodo de LD.

	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
Pat	34,1 ± 0,62	47,8 ± 1,1	18,01 ± 0,43	34,9 ± 0,78	21,4 ± 0,68
Col-0	23,3 ± 0,42	10,7 ± 0,55	12,5 ± 0,51	23,9 ± 0,73	12,2 ± 0,45
RIL mean	21,91 ± 0,49	17,86 ± 0,76	13,16 ± 0,29	23,51 ± 0,5	15,45 ± 0,32
RIL min-max	7,3-38	6-46	7-30	9,9-44,4	8,1-31,8
CMG	155,07	335,95	52,95	191,63	60,76
CME	11,73	25,41	6,17	19,94	8,85
VG	23,89	51,75	7,79	28,61	8,65
VF	25,84	55,99	8,82	31,93	10,12
H	0,92	0,92	0,88	0,89	0,85

CMG es el componente de variancia para cada carácter en las líneas RIL.

CME es el componente de variancia residual (error) para cada tratamiento entre las líneas RIL.

VG es la variancia genotípica para cada tratamiento entre las líneas RIL.

VF es la variancia fenotípica para cada tratamiento entre las líneas RIL.

H_2 es definida como la heredabilidad que es el valor obtenido entre VG/VF.

Cuadro S4.6: Resumen estadístico para el tratamiento de vernalización en un fotoperiodo de SD.

	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
Pat	58,8 ± 1,28	55,4±2,8	23,06 ± 0,56	29,7 ± 0,65	15,2 ± 0,35
Col-0	46,8± 1,01	28,2± 1,45	16,9 ± 0,71	29,02 ± 0,95	14,3± 0,53
RIL mean	42,7 ± 0,8	35,21 ± 1,5	18,13 ± 0,35	27,13 ± 0,48	13,98 ± 0,21
RIL min-max	23,8-62	10,4-91	5,53-32,4	12-40,45	8,3-20,35
CMG	310,51	1034,15	52,95	112,23	21,48
CME	35,51	131,9	15,74	33,84	7,78
VG	45,83	150,37	6,20	13,06	2,28
VF	51,75	172,3	8,82	18,70	3,50
H	0,88	0,87	0,70	0,69	0,63

Cuadro S4.7: Resumen estadístico para el tratamiento de no vernalización en un fotoperiodo de LD.

	Días a floración	Nº hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
Pat	88,5±0,99	113,1±2,1	28,1±0,71	35,8±0,84	22,1±0,56
Col-0	29,6±0,76	12,2±0,53	14,2±0,38	22,9±0,76	13,6±0,25
RIL mean	46,75 ± 1,76	40,69 ± 3,48	16,16 ± 0,44	28,54 ± 0,63	14,06 ± 0,33
RIL min-max	21-111,5	7,5-181	2,85-26,6	7,9-46,3	4,5-22,3
CMG	1157,29	4027,6	76,22	148,45	43,99
CME	39,38	98,11	7,38	18,93	5,48
VG	186,32	654,92	11,47	21,59	6,42
VF	192,88	671,27	12,70	24,74	7,33
H	0,97	0,98	0,90	0,87	0,88

Cuadro S4.8: Resumen estadístico para el tratamiento de no vernalización en un fotoperiodo de SD.

	Días a floración	N° hojas	Longitud del peciolo (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)
Pat	118,3±0,96	128,7±3,2	37,9±0,69	40,5±0,73	15,1±0,3
Col-0	56,5±0,63	41±0,95	21,24±0,58	35,9±0,58	18,7±0,64
RIL mean	84,93 ± 2,59	70,93 ± 3,53	19,26 ±0,4	31,98 ± 0,61	16,87 ± 0,28
RIL min-max	43,66-167	16-204	8,25-29,5	10,6-58	7,3-23,8
CMG	2194,76	2889,62	61,1	118,9	26,31
CME	145,8	172,44	12,7	29,52	7,25
VG	341,49	452,86	8,07	14,90	3,18
VF	365,79	481,60	10,18	19,82	4,39
H	0,93	0,94	0,79	0,75	0,72

Cuadro S4.9: Mapeo de QTL para condiciones de no vernalización.

EL mapeo de QTLs para los caracteres de días a floración, número de hojas, longitud de la hoja, longitud del peciolo y ancho de la hoja. La tabla muestra QTL significativos ($\alpha = 0.10$). Para cada QTL se indica el número de cromosoma (Chr), tratamiento, posición en el mapa (cM), distancia física en Kilobases (Kb), LOD, % variabilidad explicada y efectos aditivos (signos positivos y negativos que indican que los alelos Col-0 y Pat aumentan la respuesta promedio de carácter, respectivamente) El número de QTL es arbitrario en orden del valor LOD.

Chr	QTL	Caracter	Posición en el mapa (cM)	Interva- lo (cM)	Interva- -lo (Kb)	LOD	% Var	aditivo		
1	<i>NoVern1</i>	Días a floración LD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	3,8	14,1	4,8 días (Col-0)		
		Número de hojas LD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	3,6	14	8,6 (Col-0)		
		Longitud del peciolo LD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	3,8	13,9	0,13 mm (Col-0)		
		Longitud de la hoja LD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	3,9	14	0,7 mm (Pat)		
		Días a floración SD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	4,7	16,2	11,4 días (Col-0)		
		Número de hojas SD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	4,2	15,8	1,4 (Col)		
		Longitud del peciolo SD	58,4	55,7- 60,2	17,100- 17,500	3,3	15,3	0,2 mm (Col-0)		
		3	<i>NoVern2</i>	Número de hojas SD	33,4	31,05- 33,9	11,000- 11,400	4,0	7,7	12,2 (Col-0)
				Días a floración	33,4	30,1- 33,9	10,800- 11,400	4,1	7,8	5 días (Col-0)

		SD						
		Longitud del peciolo	32,2	29,9-32,2	10,600-11,200	3,6	8	0,7 mm (Pat)
		SD						
		Longitud de la hoja	32,2	30,1-33,4	10,800-11,300	3,7	8,5	0,2 mm (Pat)
		SD						
1	<i>NoVern3</i>	Longitud de la hoja	61,7	61,3-62,2	18,000-18,600	3,8	14,2	0,8 mm (Col-0)
		SD						

Cuadro S4.10: Mapeo de QTL para condiciones de vernalización.

EL mapeo de QTLs para los caracteres de días a floración, número de hojas, longitud de la hoja, longitud del peciolo y ancho de la hoja. La tabla muestra QTL significativos ($\alpha = 0.10$). Para cada QTL se indica el número de cromosoma (Chr), tratamiento, posición en el mapa (cM), distancia física Kilobases (Kb), LOD, % variabilidad explicada y efectos aditivos (signos positivos y negativos que indican que los alelos Col-0 y Pat aumentan la respuesta promedio de carácter, respectivamente) El número de QTL es arbitrario en orden del valor LOD.

Chr	QTL	Caracter	Posición en el mapa (cM)	Intervalo (cM)	Intervalo (Kb)	LOD	% Var	Aditivo
5	<i>VERN1</i>	Días a floración LD	82,4	81,2-83,7	25,700- 26,200	4,5	15,5	3,6 días (Col-0)
		Longitud de la hoja LD	82,4	81,2-83,7	25,700- 26,200	5,3	8,7	2,6 mm (Col-0)
		Días a floración SD	82,4	81,2-83,7	25,700- 26,200	5,7	14,3	8,4 días (Col-0)
3	<i>VERN3</i>	Ancho de la hoja LD	26	24,4-26,7	9,200- 9,800	5	15,5	2,7 mm (Pat)
	<i>VERN2</i>	Ancho de la hoja SD	16,2	14,9-18,1	7,200- 8,300	4,6	22,3	+1,1 mm(Col-0)

Cuadro S4.11: Genes anotados dentro de cada intervalo de QTL de acuerdo con Araport11.

QTL	# genes por QTL
<i>VERN1</i>	174
<i>VERN2</i>	177
<i>VERN3</i>	361
<i>NoVern1</i>	104
<i>NoVern2</i>	112
<i>NoVern3</i>	186
total	1114

Cuadro S4.12: Cebadores CAPS usados para la segregación del QTL *VERN1*.

QTL	Localización en el cromosoma V	Enzimas de restricción	Cebador (5' a 3')	Cebador (5' to 3' opuesto a la cadena)
<i>VERN1</i>	25089966	EcoRI	TGCATACAGACCACAAGTG	CCAGTACTCACCACCGCC
	25801157	EcoRI	TCACTCTTTCTCTCTGCCGC	GCCCTATATATACACCGAGGCG
	26045888	HimIII	AGGTTTCAGCTTCTTCCCTCG	TGAGAGCACCAGGGAGAACT
	26382803	EcoRI	CGGATGAAGAGTACACACGGT	TGAAGAGGGCTATCAGTGGC
	26796982	XhoI	ACCGTCGAGAAACCATCCAC	CGATCCGAATACCCACAAAGAG

Cuadro S4.13: Genes candidatos involucrados en la respuesta a la floración dentro de los QTLs.

Los genes fueron seleccionados por los filtros de GO (gen ontology), el intervalo del QTL y los SNPs en el fondo Pat que son de alto impacto de acuerdo con SnpEff.

QTL	Gen	Nombre	<i>Missense variant</i>	<i>Splice acceptor variant</i>	<i>Splice donor variant</i>	<i>Start lost</i>	<i>Stop gained</i>	<i>Stop lost</i>
<i>VERN1</i>	<i>AT5G64360</i>	<i>AT5G64360</i>	3	0	0	0	0	0
	<i>AT5G64390</i>	<i>HEN4</i>	6	0	0	0	0	0
	<i>AT5G64610</i>	<i>HAM1</i>	1	0	0	0	0	0
	<i>AT5G64930</i>	<i>CPR5</i>	1	0	0	0	0	0
	<i>AT5G65050</i>	<i>MAF2</i>	1	1	0	0	0	0
<i>VERN2</i>	<i>AT3G26610</i>	<i>AT3G26610</i>	2	0	0	0	0	0
<i>VERN3</i>	<i>AT3G21150</i>	<i>BBX32</i>	3	0	0	0	0	0
	<i>AT3G22231</i>	<i>PCC1</i>	2	0	0	0	0	0
	<i>AT3G22420</i>	<i>WNK2</i>	6	0	0	0	0	0
	<i>AT3G22990</i>	<i>LFR</i>	2	0	0	0	0	0
	<i>AT3G23060</i>	<i>AT3G23060</i>	1	0	0	0	0	0

Figuras suplementarias de los capítulos 2,3 y 4.

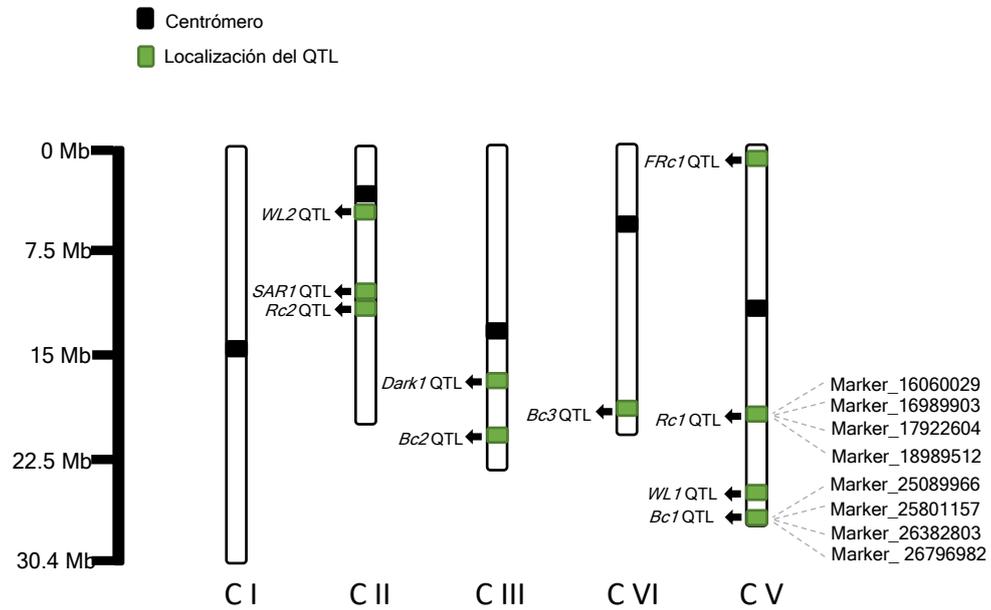


Figura S3.1: Localización de QTLs en los cinco cromosomas de *A. thaliana* para el carácter del largo del hipocótilo. La distancia genética se indica en megabases (Mb), centrómeros (negro) y la ubicación del QTL (verde). Además, se muestra la posición de los marcadores para la confirmación de los QTLs *Rc1* y *Bc1*.

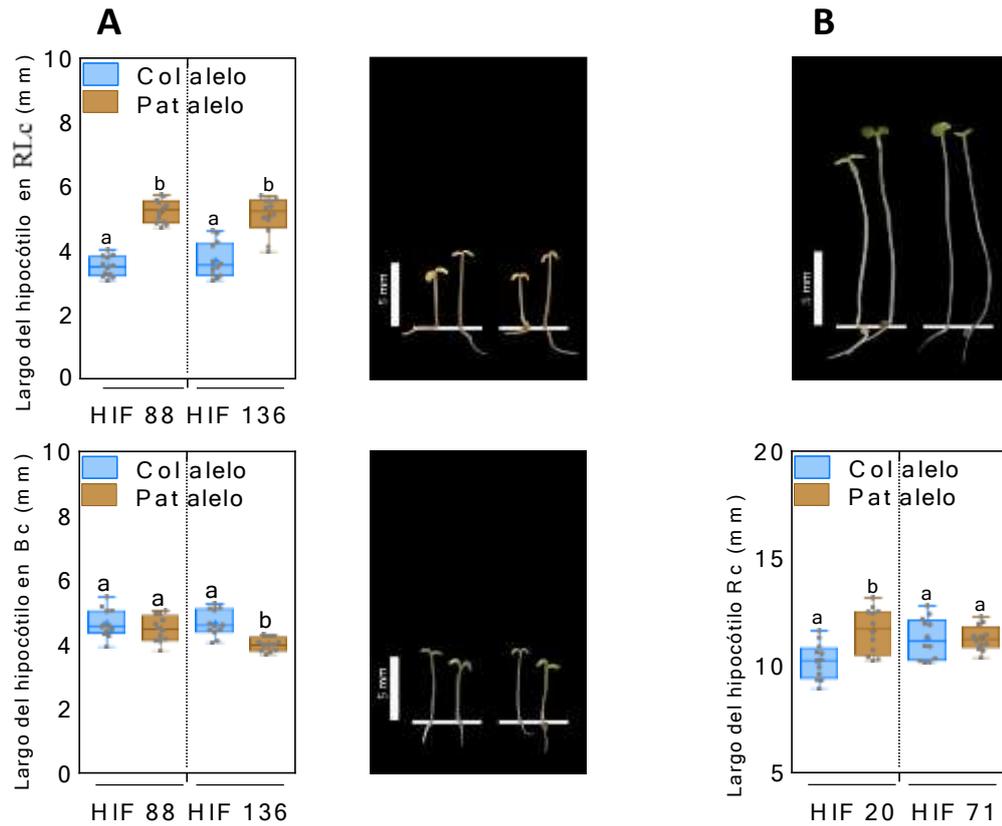


Figura S3.2: *Rcl* y *Bcl* QTLs HIF bajo tratamientos de luz. (A) Longitud del hipocótilo en Bc y RLC para HIF88 y HIF136 que se segregan como alelos Col-0 y Pat en el QTL *Rcl*. (B) Longitud del hipocótilo en Rc para HIF20 y HIF71 que se segregan como alelos Col-0 y Pat en el QTL *Bcl*. En todos los casos, en todas las figuras la caja de bigotes representa datos alrededor de la mediana, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas entre las medias analizadas por la prueba LSD (p -valor $<0,05$). Las fotografías muestran plántulas representativas en cada rasgo de luz para HIF que se segregan como Col-0 (izquierda) y Pat (derecha).

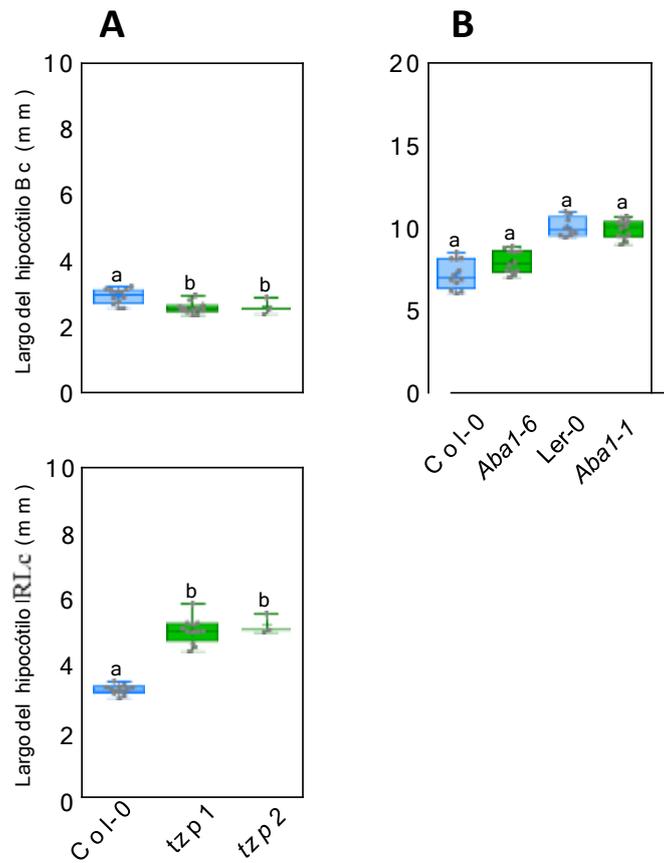


Figura S3.3: Longitud del hipocótilo de mutantes bajo tratamientos de luz. (A) mutantes *tzp-1* y *tzp-2* en Bc y RLC. (B) mutantes *abal-1* y *abal-6* en Rc. Los gráficos de caja de bigotes representan datos alrededor de la mediana, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas con el control. Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron mediante la prueba LSD (p-valor <0,05).

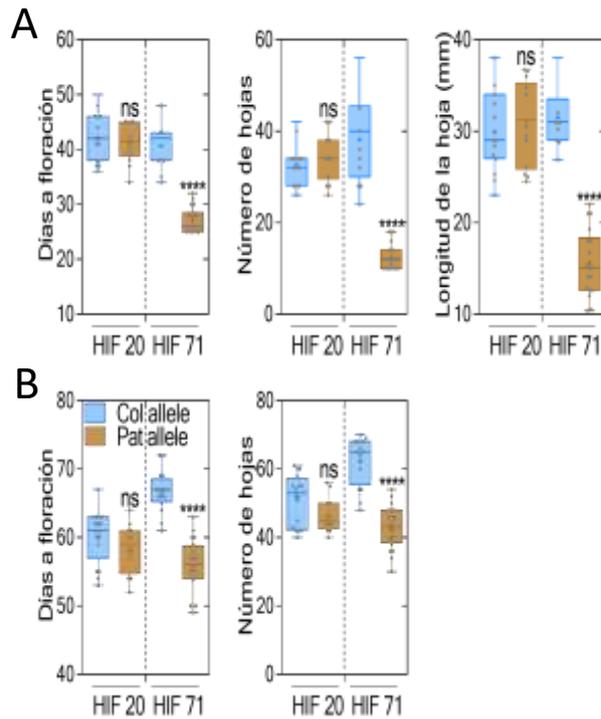


Figura S4.1: Tratamiento sin vernalización usando las HIFs independientes 20 y 70. El gráfico de caja de bigotes muestra los días a floración, el número de hojas y la longitud de la hoja en un fotoperiodo LD (A). En un fotoperiodo SD se evaluó os días a floración y el número de hojas (B). Los puntos grises indican el número de plantas medidas, Las plantas fueron medidas cuando el escapo floral tuvo 2 cm de altura, mientras que las estrellas indican las diferencias significativas entre las medias (n=12-18) analizado por la prueba de *t-Student* (p-valor < 0,05).

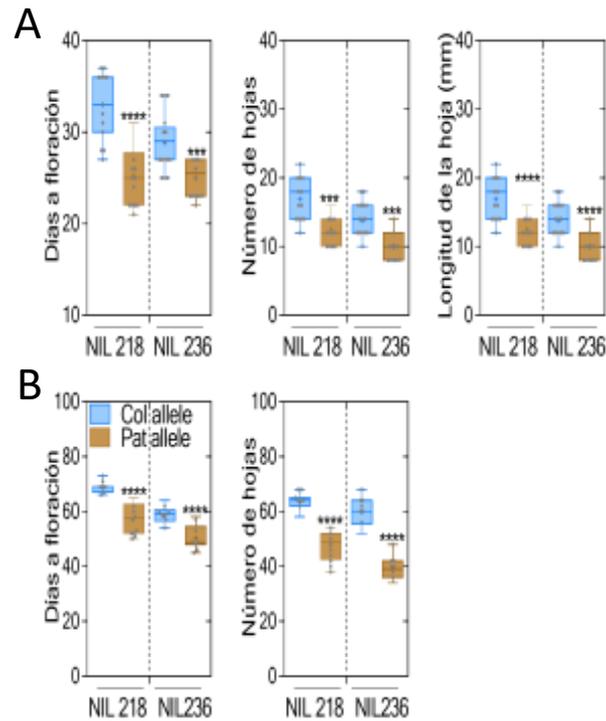


Figura S4.2: Tratamiento sin vernalización usando las NILs independientes 218 y 236. El gráfico de caja de bigotes muestra los días a floración, el número de hojas y la longitud de la hoja en un fotoperiodo LD (A). En un fotoperiodo SD se evaluó los días a floración y el número de hojas (B). Las plantas fueron medidas cuando el escapo floral tuvo 2 cm de altura, los puntos grises indican el número de plantas medidas, mientras que las estrellas indican las diferencias significativas entre las medias ($n=11-17$) analizado la prueba de *t-Student* ($p\text{-valor} < 0,05$).

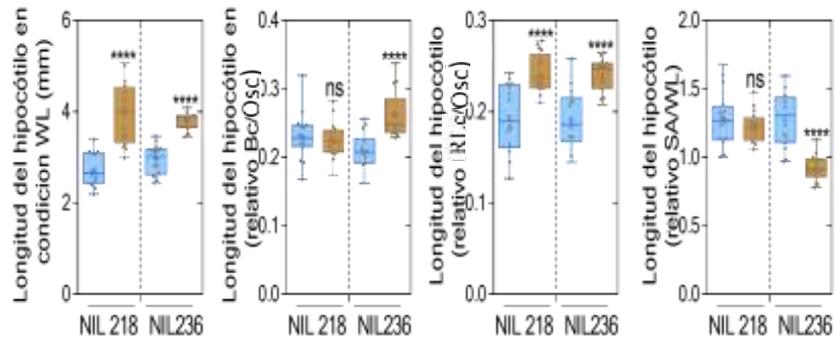


Figura S4.3: Las NILs 218 y 236 fueron medidas bajo tratamiento de luz blanca, longitud del hipocótilo (relativo a Bc/Osc), longitud del hipocótilo (relativo a RLC/Osc) y longitud del hipocótilo (relativo a SA/WL). Se realizaron tres repeticiones independientes, los puntos grises indican la media, cada experimento conto con 3 réplicas (n=10 plántulas) y se repitió 3 veces. Las estrellas indican las diferencias significativas entre las medias (n=12-18) analizado por la prueba de *t-Student* (p-valor < 0,05).

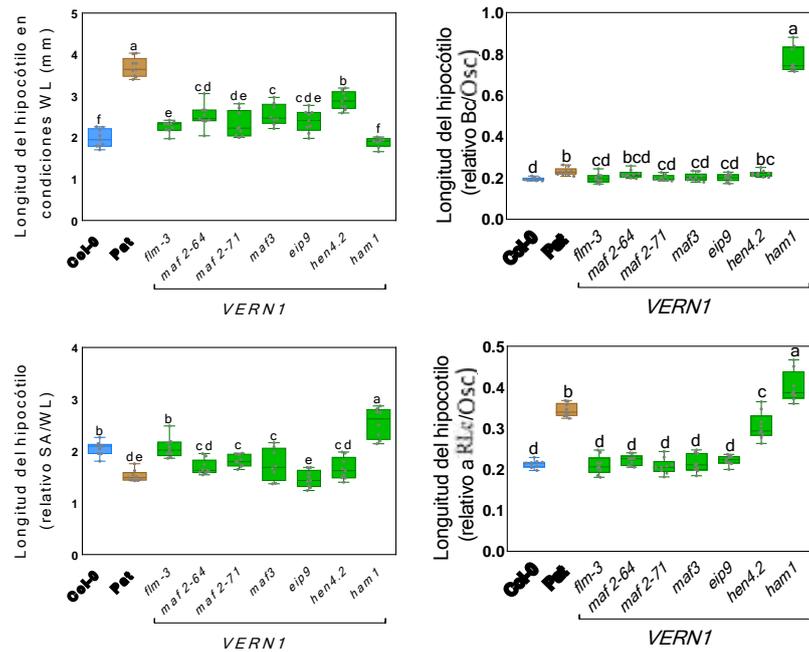


Figura S4.4: Longitud del hipocótilo de las mutantes bajo tratamientos de luz. Las mutantes. *maf2-64*, *maf2-71*, *eip9*, *ham1* y *hen4* como genes candidatos del QTL *VERN1* fueron medidas bajo tratamiento de luz blanca, longitud del hipocótilo (relativo a Bc/Osc), longitud del hipocótilo (relativo a RLa/Osc) y longitud del hipocótilo (relativo a SA/WL). Los gráficos de caja de bigotes representan datos alrededor de la mediana, cada experimento conto con 3 réplicas (n=10 plántulas) y se repitió 3 veces, mientras que las letras distintas indican diferencias significativas con el control Col-0. Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron mediante la prueba LSD (p-valor < 0,05).