

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

VARIACIÓN GENÉTICA EN LA RESPUESTA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ARABIDOPSIS THALIANA

Deguer, Tomas – LU:1065892

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Auge, Gabriela, Fundación Instituto Leloir / iB3, FCEN-UBA

Co-Tutor:

Hernando, Carlos Esteban, Fundación UADE

22/02/2022



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

Primero que nada, agradecerle a mi familia que siempre estuvo apoyándome, que desde un lugar u otro siempre están.

Un especial agradecimiento a la Dra. Gabriela Auge, una gran persona que me acompañó y enseñó mucho a lo largo del proyecto, y fue un placer tenerla como tutora. Al Dr. Esteban Hernando, por siempre mostrarse dispuesto a darme una mano y aceptar ser parte del proyecto como mi co-tutor. Al Dr. Pablo Cerdán, por su buena onda y por brindarme la posibilidad de trabajar en la Fundación Instituto Leloir. A todos y cada uno de los integrantes de la FIL. A los del laboratorio 208, Andrés, Belén, Christian, Emilia, Laura, Mariana, Mauro, Micaela, Pedro, Santiago y Virginia, a los integrantes de PEM lab, Ailen, Aldana, Clara, Cruz, Isabella y Pablo.

Finalmente, agradecer a mis amigos por bancarme, y a todas y cada una de las personas que de algún modo u otro colaboraron para que esto sea posible.

Muchísimas gracias.

A los que hoy no están.

Resumen

La especie *Arabidopsis thaliana* es un modelo de estudio ampliamente utilizado para estudiar la fisiología, genética y biología molecular de las plantas. Es así, que la gran cantidad de investigaciones y avances han llevado a generar individuos mutantes, y con ellos la posibilidad de estudiar nuevos procesos. En esta tesina se trabaja sobre plantas de *Arabidopsis* mutantes de fitocromos, fotorreceptores involucrados en numerosos procesos de la vida de las plantas, en dos fondos genéticos distintos (también llamados ecotipos), Columbia (Col) y Landsberg *erecta* (*Ler*).

El momento en el cual una semilla logra germinar es una etapa clave en la vida de la planta, y para que esto ocurra intervienen gran cantidad de factores, tanto externos como propios de la semilla. En los ecotipos Col y *Ler*, mutantes para los fitocromos presentan respuestas de germinación drásticamente disminuidas. Sin embargo podemos observar diferencias en los mutantes entre ambos fondos: semillas de Col no pueden germinar, mientras que las de *Ler* retienen cierto potencial germinativo. En ambos casos, ambos ecotipos recuperan gran parte de su potencial con el agregado de giberelinas (GAs), hormonas vegetales inductoras de la germinación. Esta diferencia entre ecotipos podría deberse a la función de elementos que actúan independiente de la acción de los fitocromos para regular la germinación, por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo explorar el origen de la variación entre ecotipos e identificar regiones del genoma involucradas en la regulación de la germinación independiente de la señalización mediada por los fitocromos.

Se realizaron cruces de mutantes múltiples de fitocromos en los dos fondos genéticos (Col y *Ler*) para alcanzar una población de mapeo (F2). Esta población se utilizó para estudiar la respuesta de germinación dependiente o independiente del agregado de GAs y la asociación de marcadores moleculares específicos para los ecotipos Col y *Ler*. De esta forma buscamos regiones del genoma que podamos relacionar con la respuesta fenotípica contrastante que tienen ambos ecotipos en la germinación. A partir del ensayo de germinación y el posterior mapeo se logró identificar varios marcadores posiblemente asociados a la variación en respuesta de germinación. Los resultados de este estudio otorgan información sobre posibles blancos de importancia para el mejoramiento y desarrollo de variedades con caracteres adaptativos para escenarios de producción, mayoritariamente de agricultura intensiva.

Abstract

Genetic variation in the germination response of Arabidopsis thaliana seeds

Arabidopsis thaliana is a species widely used as a model to study the physiology, genetics and molecular biology of plants. Thus, the large body of research has led to the generation of multiple genetic tools, including knockout mutants, to study many physiological, ecological and evolutionary processes. In this thesis, we used Arabidopsis phytochrome mutant plants, photoreceptors involved in numerous processes along the plant life cycle, in two different genetic backgrounds (also called ecotypes), Columbia (Col) and Landsberg *erecta* (*Ler*).

The moment seeds germinate is a key trait in the life cycle of the plant, and for this to happen, many factors are involved, both external and inherent to the seed. In Col and *Ler* ecotypes, mutants for the phytochromes show drastically decreased germination responses. However, we can observe differences in the mutants between both backgrounds: Col seeds cannot germinate, while *Ler* seeds retain a certain germination potential. In both cases, the mutants in both ecotype backgrounds recover much of their potential with the addition of gibberellins (GA), plant hormones that induce germination. This difference between ecotypes could be due to the function of elements that act independently of the action of phytochromes to regulate germination, therefore, this study aimed to explore the origin of the variation between ecotypes and identify regions of the genome involved in the regulation of germination independently of the signaling mediated by phytochromes.

Higher level phytochrome mutants were used to carry out crosses between the two genetic backgrounds (Col and *Ler*) to develop a mapping population (F2). This population was used to study the GA-dependent or independent germination response and the association of specific molecular markers for the Col and *Ler* ecotype responses. In this way, we would find regions of the genome that we can relate to the contrasting phenotypic response that both ecotypes showed at germination. From the germination test and subsequent mapping we were able to identify several markers as potentially associated with the variation in the germination response. The results of this study provide information on possible targets of importance for the improvement and development of varieties with adaptive characters for productive scenarios, mostly intensive agriculture.

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Col: Columbia.

Cr: Cromosoma.

GA: Giberelina.

Hetero: Heterocigosis.

Ler: Landsberg erecta.

MS: Murashige-Skoog.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pfr: Fitocromo en conformación activa.

phy: Fitocromo.

phyA: Fitocromo A.

phyB: Fitocromo B.

phyC: Fitocromo C.

phyD: Fitocromo D.

phyE: Fitocromo E.

PIF1: PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1, también llamado PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3-LIKE5 (PIL5).

Pr: Fitocromo en conformación inactiva.

R: Luz Roja.

R:RL: Proporción de luz R respecto a la RL.

RL: Luz Roja Lejana.

Ta: Temperatura de annealing.

WT: Wild type, salvaje.

Contenido

Agradecimientos	3
Resumen	5
Abreviaturas	8
Contenido	10
Introducción	11
1. Planta modelo	13
2. Ecotipos	16
3. Germinación	17
Hipótesis	23
Objetivos	23
Metodología	24
1. Material vegetal	24
2. Condiciones de crecimiento	24
2.1. Diseño experimental	24
2.2. Crecimiento de plantas F0	24
3. Genotipado mediante el uso de la técnica de PCR	25
4. Fenotipado de la F0	27
5. Ensayo de germinación F0	28
6. Generación de la población de mapeo	29
6.1. Cruzas Col x Ler para la obtención de F1	30
6.2. Crecimiento de cruzas (F1)	31
6.3 Genotipado de cruzas (F1)	32
7. Crecimiento y fenotipado de F2	33
8. Mapeo	35

8.1 Extracción de ADN	35
8.2. PCRs	37
8.3. Marcadores utilizados y amplificación	38
8.4 Información de marcadores moleculares	41
9. Análisis estadístico	42
Resultados	42
1. Confirmación de los genotipos mutantes	43
2. Confirmación de fenotipo de la generación F0	45
3. Confirmación de heterocigosis de la F1	46
4. Respuesta de germinación de la población segregante F2	47
5. Asociación de la respuesta de la población segregante con marcadores moleculares	49
Discusión	51
Conclusión	53
1. Perspectivas a futuro	53
Bibliografía	54
Anexo	58
1. Anexo A	59
2. Anexo B	60

Introducción

Las plantas que producen flores dan inicio a sus ciclos de vida en las estaciones que resultan favorables para lograr una óptima adaptación al ambiente (Shu *et al*, 2016) y así desempeñarse de la mejor manera. Germinan, crecen, reproducen, mueren en el mismo lugar y para ello es importante que las transiciones del desarrollo se produzcan en el momento correcto del año. El inicio del ciclo de vida es entonces un proceso clave y está finamente regulado por diversos factores, incluidos factores intrínsecos de las semillas, ambientales y genéticos (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Un gran número de especies de plantas presentan un bloqueo a la germinación denominado “dormición” que les otorga la capacidad de ajustar con bastante precisión el momento ideal para que las semillas germinen dando así comienzo al ciclo de vida (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006, Yang *et al*, 2020). Por lo tanto, la regulación fina de la germinación se torna crucial para garantizar la supervivencia.

En la naturaleza encontramos que la mayoría de las plantas pueden tener ciclos de vida perennes, bienales o anuales. *Arabidopsis thaliana* (**Fig. 1.1**), la especie utilizada en este estudio es un claro ejemplo de las plantas anuales y de la importancia que tiene la sincronización de las distintas etapas de la planta con el periodo del año para lograr un correcto ajuste a los cambios estacionales.

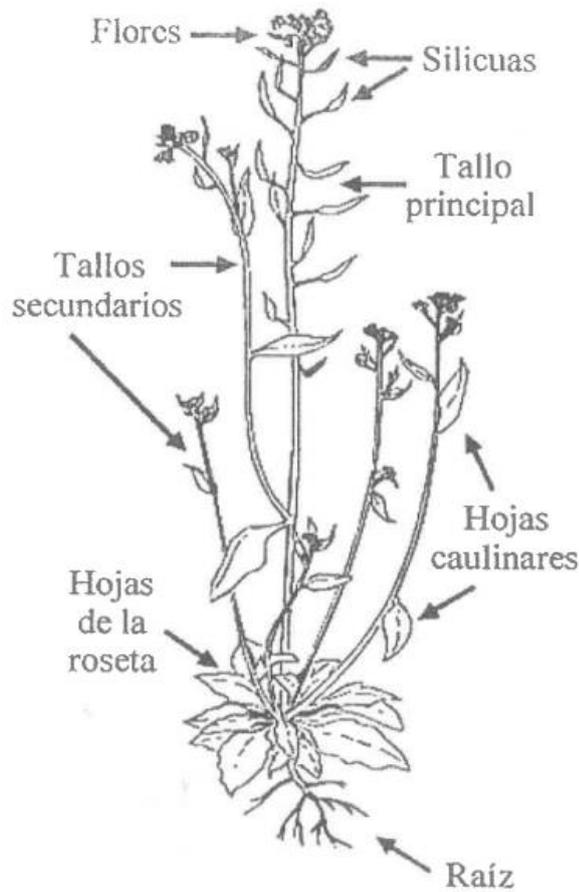


Figura 1.1: Representación de *Arabidopsis thaliana* (Álvarez Nogal y González Sierra, 2007).

1. Planta modelo

Perteneciente a la familia *Brassicaceae*, *Arabidopsis thaliana* presenta un ciclo de vida predominantemente de invierno en su rango nativo (área geográfica específica donde habitan las especies). Las semillas germinan en el otoño, las plantas pasan el invierno en estado vegetativo y florecen en la primavera. Las semillas se producen en esta estación y son dispersadas al comienzo del verano (**Fig. 1.2**).

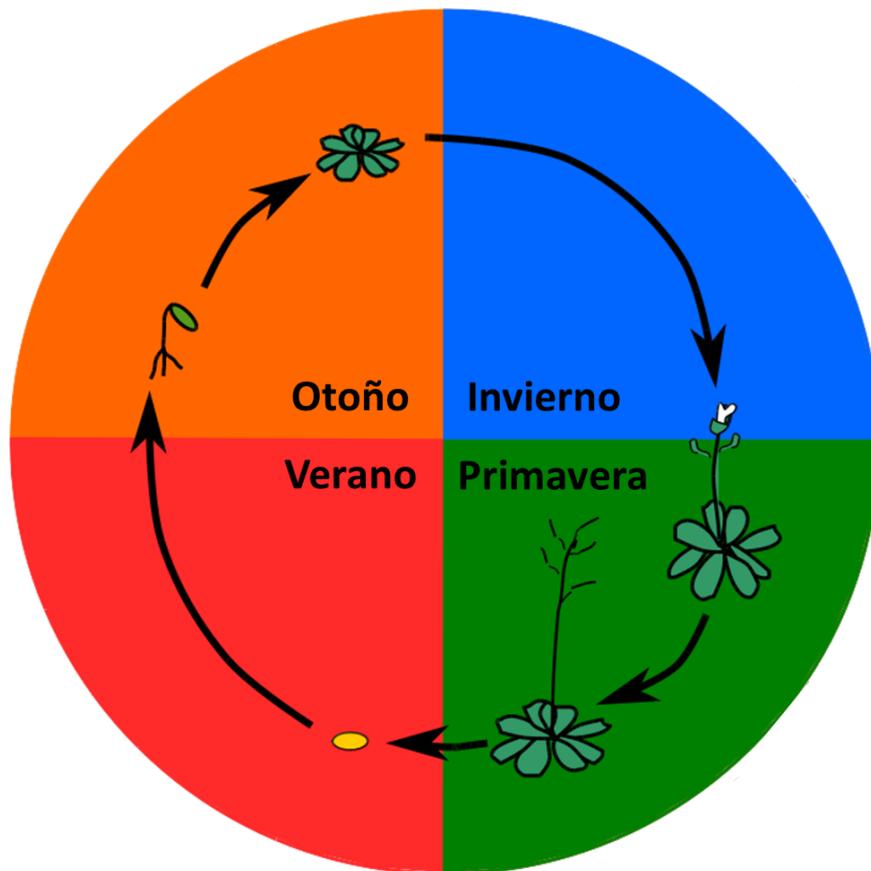


Figura 1.2: Comportamiento de *Arabidopsis thaliana* en las estaciones del año.

Las plantas de *Arabidopsis* experimentan diversas condiciones ambientales durante su ciclo de vida y el ajuste de las transiciones del desarrollo a las que son correctas para su crecimiento es clave para asegurar su supervivencia y favorecer el *fitness* (Donohue *et al*, 2010). Entender cómo el ambiente controla las transiciones del desarrollo y cuáles son las redes génicas involucradas es importante para construir un cuerpo de conocimiento que nos otorgue oportunidades para mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Arabidopsis thaliana es una especie predominantemente autofertilizante. Permite el desarrollo de experimentos de laboratorio ya que posee un tamaño pequeño y un ciclo de vida corto de aproximadamente 3 meses para las variedades usualmente utilizadas como modelo (Fig. 1.3). De esta manera podemos trabajar con varios ejemplares y poblaciones de las mismas en cámaras con condiciones controladas de luz y temperatura. Cabe destacar la gran capacidad de proliferación, cada planta tiene la capacidad de producir por autofecundación hasta 10.000 semillas (Meyerowitz, 1989). Además, esta especie ha sido modelo para el estudio de diferentes procesos a nivel molecular y genético gracias a que su genoma fue secuenciado completo hace

ya más de 20 años (Bevan y Walsh, 2005). *Arabidopsis* posee un genoma pequeño de 114.5 Mb/125 Mb total, estructurado en 5 cromosomas.

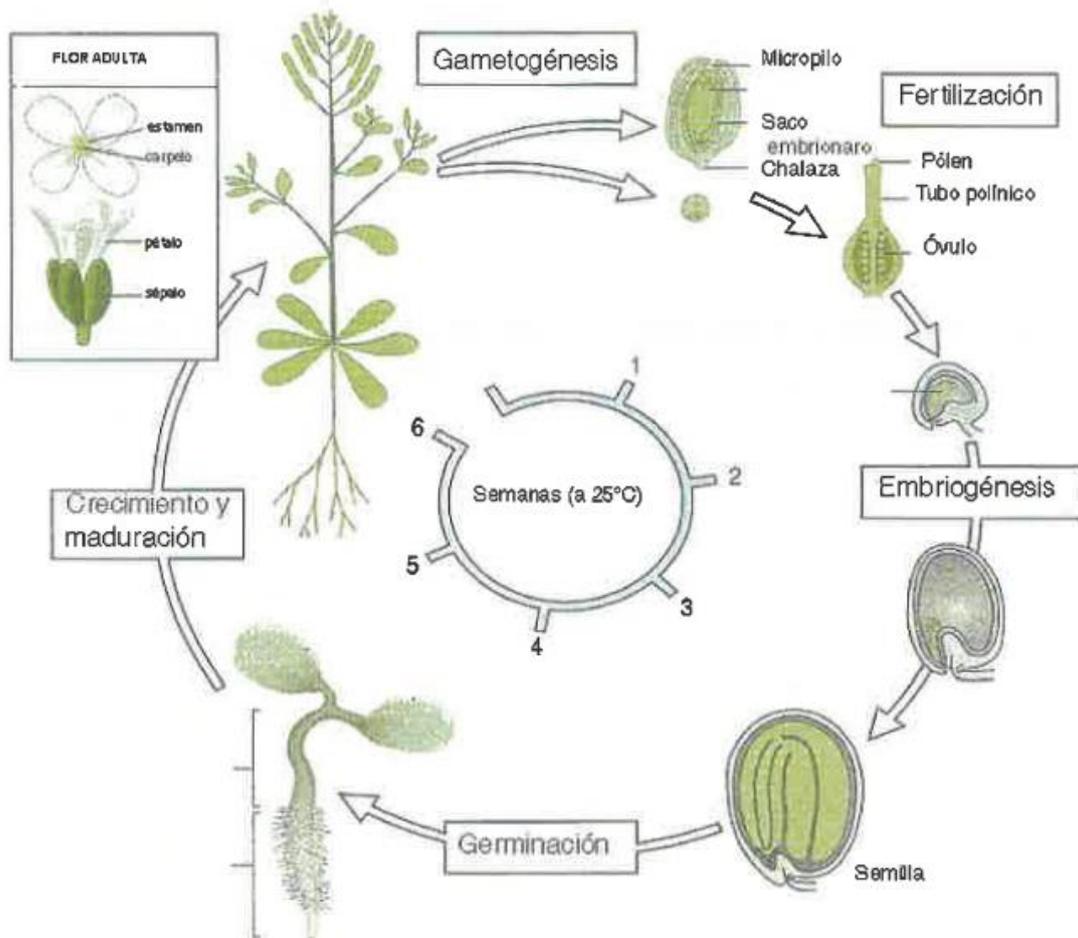


Figura 1.3: Imagen representativa del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* (Wolpert et al, 2002).

Esta planta tiene una particularidad de suma importancia que la diferencia de otros modelos biológicos como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*, se encuentra muy emparentada con las especies a las cuales modela. Esto se debe en gran medida a que todas las denominadas angiospermas comparten rasgos, que además de la teoría que dicta el origen monofilético de las angiospermas, hacen de *Arabidopsis thaliana* un excelente organismo modelo.

Por todas estas razones, se ha optado por elegir a *Arabidopsis thaliana* como sistema de estudio para esta tesis en particular y para investigaciones científicas pertinentes a los vegetales en general (Pruitt *et al*, 2003).

2. Ecotipos

Al día de hoy se han aislado más de 750 poblaciones salvajes (ecotipos) de *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp#world), dichos ecotipos presentan plasticidad en múltiples caracteres y varían mucho en cuanto a su morfología, desarrollo y fisiología. Estas diferencias en los ecotipos se traducen en la expresión de características particulares debido a la variación natural que permiten la adaptación a diferentes ambientes dentro del rango nativo de la especie (Fournier-Level *et al*, 2011; Horton *et al*, 2012; Lopez-Arboleda *et al*, 2021). En otras palabras, los ecotipos son variedades de una especie que se encuentran adaptadas genéticamente a un determinado hábitat (**Fig. 1.4**). Son poblaciones genéticamente diferenciadas debido al ambiente que las rodea: luz, temperatura, presión, humedad, etc.

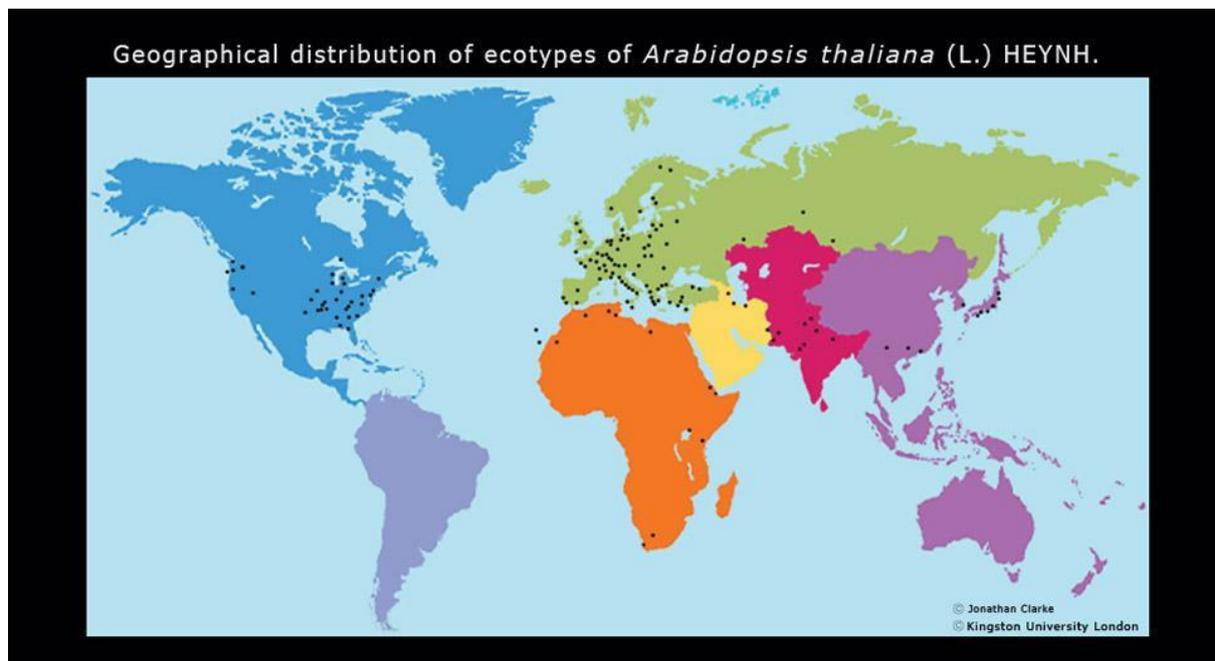


Figura 1.4: Planisferio que ilustra la distribución geográfica de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, los puntos negros indican locaciones donde se han identificado ecotipos. Imagen: Jonathan Clarke, John Innes Centre.

Dentro de la gran variedad de ecotipos, dos en particular son los más utilizados en ensayos de laboratorio: los ecotipos Landsberg *erecta* (*Ler*, recolectado originalmente en Alemania) y Columbia (*Col*, recolectado originalmente en EEUU). Si bien la razón por la que estos dos ecotipos son los predominantemente utilizados en laboratorio puede ser esquivada, difieren en múltiples respuestas que permiten el estudio de los orígenes de la variación natural en diversos rasgos adaptativos. Un caso es el del factor de transcripción SPATULA (*SPT*), involucrado en la regulación de la germinación de las semillas, que tiene roles opuestos en el periodo de dormición en los ecotipos *Ler* y *Col* (Vaistij *et al*, 2013).

3. Germinación

La germinación es un proceso crítico presente al inicio del ciclo de vida de todas las plantas ya que determina el ambiente que la planta en crecimiento experimentará durante su desarrollo. Se lo considera como el momento en el cual el embrión presente en la semilla comienza su crecimiento para desarrollar una nueva planta que alcanzará su etapa adulta. Sin embargo, para comenzar con el proceso de germinación, primero debe ocurrir una cierta interacción entre la semilla con su ambiente (**Fig. 1.5**). La germinación es un proceso finamente regulado, el momento en que ésta se produce influye fuertemente en la supervivencia de la planta que crecerá a partir de la semilla (Donohue *et al*, 2010; Ehrlén 2015).

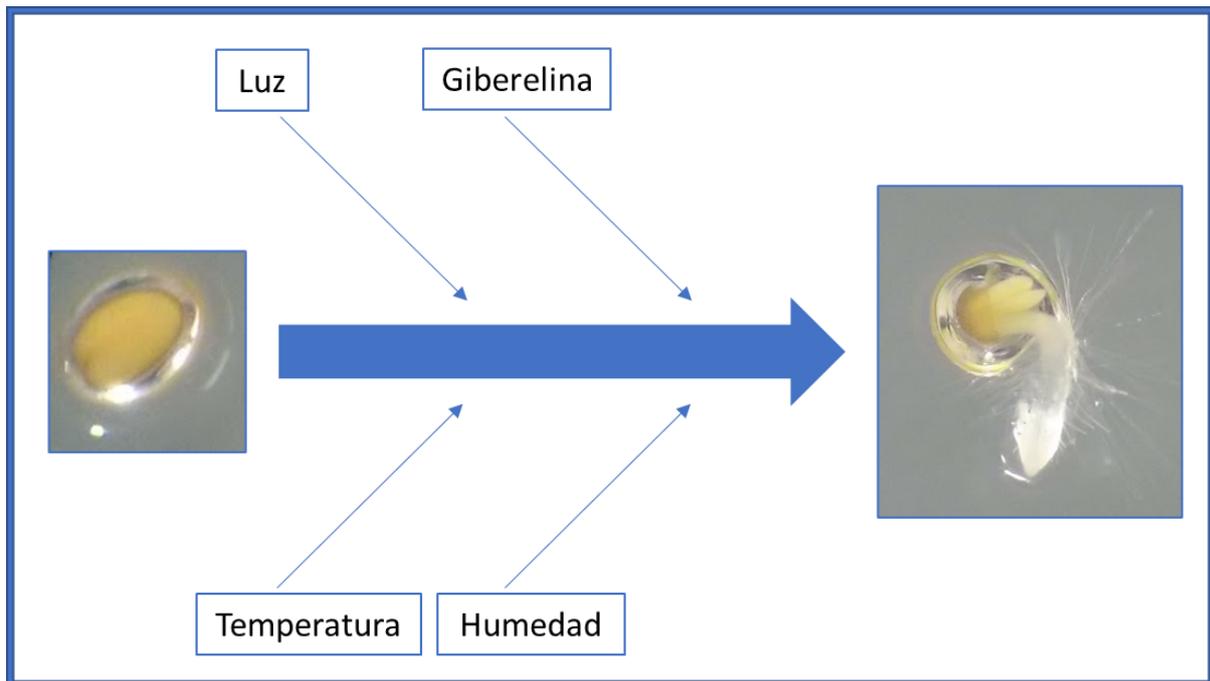


Figura 1.5: Sobre la izquierda vemos una semilla aun sin germinar, mientras que en la derecha vemos una semilla recientemente germinada.

La dormición, proceso regulatorio que puede bloquear la germinación aún en condiciones favorables, es una propiedad innata de la semilla que define las condiciones ambientales en las cuales es capaz de germinar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Gracias a la dormición, las semillas tienen la posibilidad de permanecer latentes a la espera de que el ambiente presente las condiciones óptimas para su crecimiento.

Las condiciones impuestas por el ambiente tienen un rol fundamental en la reproducción de las plantas y son elementos claves que controlan la dormición y germinación de las semillas (Klupczyńska y Pawłowski, 2021). Tanto la dormición como la germinación son reguladas por distintos factores como la temperatura, humedad y calidad de luz a la cual se exponen las semillas (Carrera-Castaño *et al*, 2020). La luz y las temperaturas son señales que promueven la salida de la dormición, y además la germinación también depende de cambios a niveles hormonales (Arana *et al*, 2017; Yang *et al*, 2020). La calidad de luz de un ambiente informa a las plantas sobre la presencia de actuales y futuros competidores por la luz como fuente de energía. La luz Roja (R) es absorbida por la clorofila mientras que la luz Roja Lejana (RL) es reflejada y transmitida, entonces en una comunidad vegetal densa la proporción de luz R respecto a la RL (R:RL) será menor que en una comunidad abierta (Casal, 2013). Los fotorreceptores llamados fitocromos (*phy*) son los encargados de percibir estos cambios en la

proporción de luz R:RL en el ambiente (Casal, 2013) y los principales reguladores de la germinación de las semillas de *Arabidopsis*.

La regulación de la germinación de semillas por medio de luz R y luz RL es de los primeros eventos en los cuales se ve la intervención de los fitocromos. La disponibilidad de mutantes de fitocromos en *Arabidopsis thaliana* ha dado la posibilidad de estudiar la función de estos fotorreceptores en el desarrollo. En dicha especie, la familia de genes de los fitocromos está formada por cinco miembros: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE* (Casal, 2013) (**Fig. 1.6**). La luz percibida a través del sistema de fitocromos aumenta el contenido de GA en la semilla (Oh *et al*, 2006; Seo *et al*, 2009) y estimula su sensibilidad durante la germinación (Oh *et al*, 2009; Yang *et al*, 1995) indicando que los fitocromos regulan positivamente la germinación, al menos en parte, a través de cambios en el metabolismo y la señalización de GA (Arana *et al*, 2014).

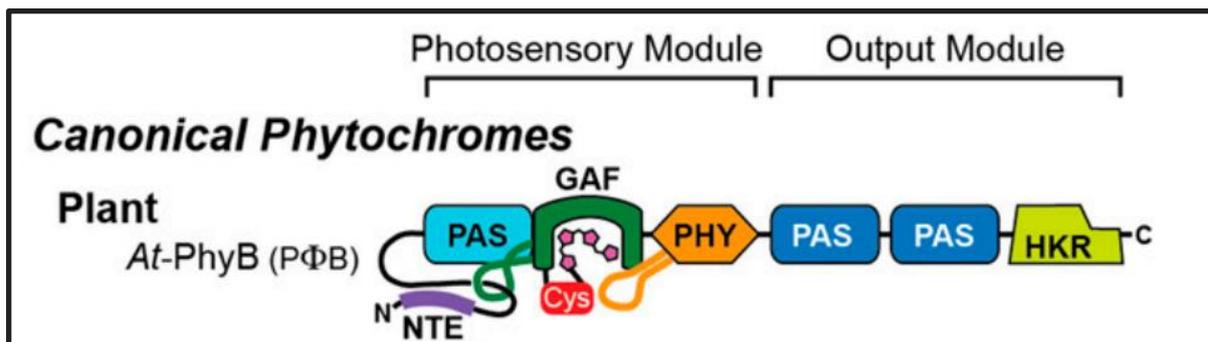


Figura 1.6: Representación de la estructura del fitocromo *PHYB* de *Arabidopsis thaliana* (Burgie y Viertra, 2014).

Además, estos fotorreceptores también serían los encargados de percibir los cambios de temperatura del ambiente (Legris *et al*, 2016; Jung *et al*, 2016). Utilizando semillas de la especie *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que las vías de germinación mediadas por fitocromos son sensibles tanto a la luz como a la temperatura (Heschel *et al*, 2007).

En respuesta a la luz los fitocromos se traslocan al núcleo, si bien este movimiento difiere en los distintos fitocromos, una vez en el núcleo los fitocromos disparan varias cascadas de transcripción que derivan en la regulación de distintos procesos fisiológicos, tal como la germinación (Oh *et al*, 2004) (**Fig. 1.7**).

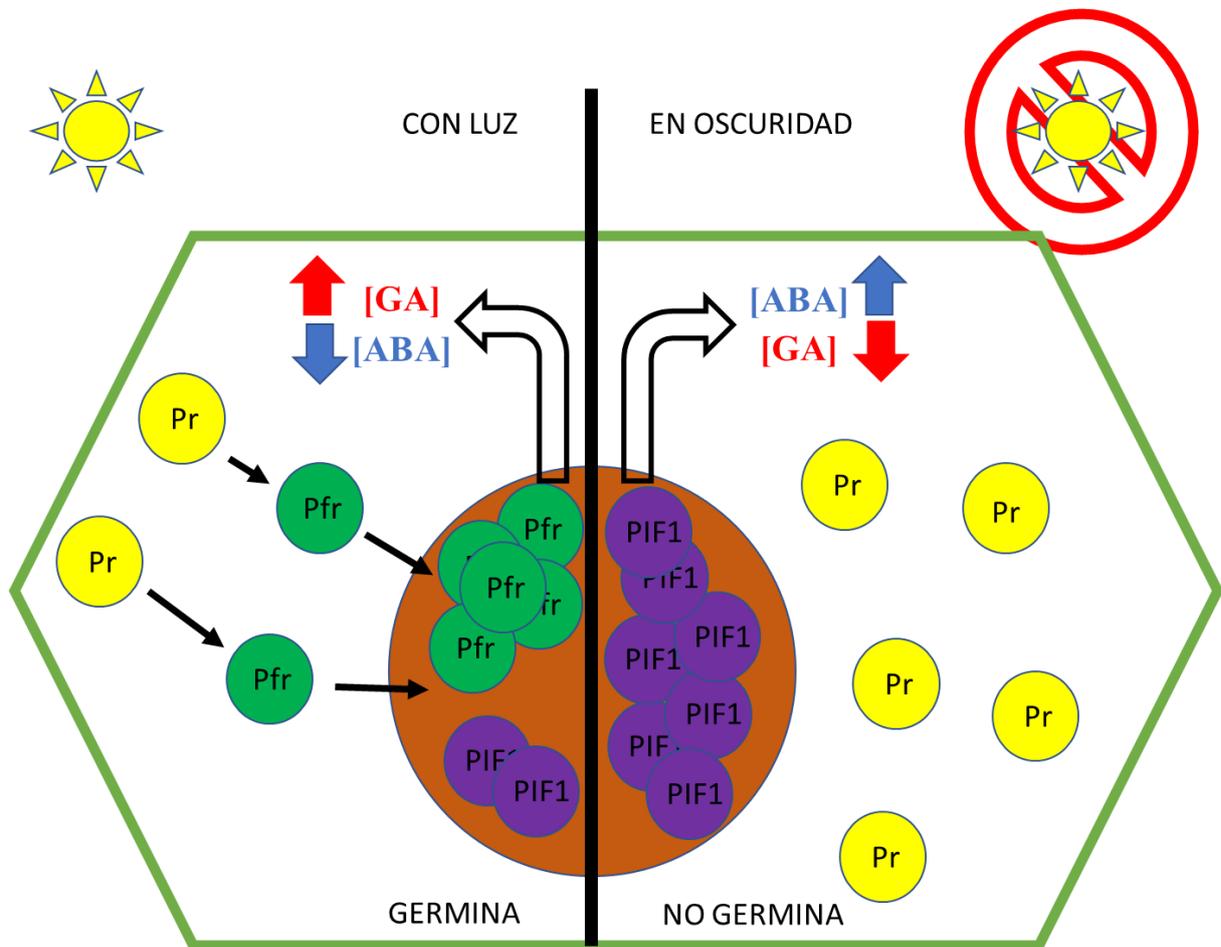


Figura 1.7: Representación del mecanismo de germinación mediado por fitocromos en *Arabidopsis thaliana*.

Una alta concentración de ácido abscísico (ABA) está asociada a la dormición y una alta concentración de giberelinas (GA) con la germinación, mientras que la transición entre los estadios se controla con el cambio de concentración para ambas hormonas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El correcto balance entre estas hormonas es clave para que semillas como las de *Arabidopsis thaliana* puedan germinar, y los fitocromos son factores claves en la regulación de este balance. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 (PIF1/ PIL5/ bHLH015) es una proteína que interactúa con los fitocromos y uno de los principales componentes intermediarios entre los fitocromos y el metabolismo de GA. PIF1, en ausencia de fitocromo activo (oscuridad o ausencia de luz Roja), inhibe la germinación al reprimir la transcripción de dos genes *GA3OX* involucrados en la síntesis de giberelinas (*GA3OX1* y

GA3OX2) y aumentando la expresión del gen catabólico *GA2OX2*, así bajando los niveles de GA activa (Oh *et al.*, 2004, 2006).

Por otro lado, la luz percibida por los fitocromos es conocida por estimular la germinación al aumentar los niveles de síntesis de GA (Yamaguchi y Kamiya, 2002; Oh *et al.*, 2007). Los fitocromos activos (Pfr) se traslocan al núcleo, donde promueven la degradación del factor PIF1 en el proteasoma 26S, y en consecuencia se promueve la transcripción de los genes *GA3OX1* y *GA3OX2*, y se reprime la de *GA2OX2*, aumentando los niveles de GA activa (Yamaguchi *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2006, 2007). Las GA activas promueven a su vez la germinación de la semilla al activar la degradación de proteínas DELLA (Tyler *et al.*, 2004). De esta manera, los fitocromos tienen un rol importante en la síntesis de GA y la regulación de la germinación mediante la regulación del factor PIF1 y el metabolismo de GA y ABA (Oh *et al.*, 2007).

En el fondo genético Columbia, semillas del mutante múltiple de fitocromos son incapaces de germinar sin el agregado exógeno de GA (Strasser *et al.*, 2010, Sánchez-Lamas *et al.*, 2016). Sin embargo, a diferencia del fondo genético Col, semillas del mutante múltiple de fitocromos en el fondo *Ler* conservan cierta capacidad germinativa (Strasser *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013; Sánchez-Lamas *et al.*, 2016). Esta diferencia entre ecotipos sugiere que existe variación genética que otorga rasgos adaptativos a las diferentes poblaciones de *Arabidopsis* en rasgos relacionados a la germinación regulada por fitocromos. Además, muestra que existe una vía de regulación independiente a la de los fitocromos y PIF1 descrita más arriba.

En el presente proyecto de investigación se evaluaron las causas a nivel genético que determinan la germinación de semillas de *Arabidopsis* deficientes en fitocromos. Para dicho estudio se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Columbia (Col) y *Landsberg erecta* (*Ler*) mutantes en los fitocromos. Las mutantes en estos dos fondos genéticos tienen respuestas de germinación contrastantes: mientras que las semillas mutantes en fondo *Ler* germinan, las semillas en fondo Col requieren de los fitocromos y el agregado exógeno de GA para poder germinar (las mutantes no germinan) (Strasser *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013; Sánchez-Lamas *et al.*, 2016). Esta variación en la respuesta nos puede ayudar a encontrar vías alternativas a los fitocromos por las cuales se puede inducir la germinación, lo que nos llevará a obtener información sobre las vías de señalización involucradas en la adaptación de diferentes poblaciones a distintos ambientes.

A medida que la población mundial aumenta se vuelve indispensable lograr avances que colaboren a cumplir con la demanda alimentaria de la humanidad en el presente y el futuro. Es por ello, que más allá de la voluntad por desentrañar los misterios de la naturaleza, muchas personas vuelcan sus recursos y tiempo en investigaciones con perspectivas de colaborar con dicha demanda. Con esto en vista, y teniendo en cuenta las virtudes del uso de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio, el uso de dicha especie nos da la posibilidad de trasladar los descubrimientos en la misma, con los debidos resguardos, a cultivos extensivos (trigo, maíz, soja, etc).

Hipótesis

Dada que semillas mutantes de fitocromos *phyA*, *phyB*, *phyD* y *phyE* en el ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*) conservan cierta capacidad germinativa en comparación con las semillas cuádruples mutantes de fitocromos (*phyA*, *phyB*, *phyD* y *phyE*) en el fondo genético Columbia (*Col*), podemos evaluar diferencias en la respuesta de las semillas para ayudar al entendimiento del proceso de germinación. La **hipótesis** que se plantea en el presente proyecto radica en que existe variación genética en genes involucrados en el proceso de germinación de *Arabidopsis thaliana* que permiten la germinación independiente de los fitocromos y otorgan rasgos adaptativos a diferentes poblaciones de esta especie.

Objetivos

El *objetivo general* de este trabajo es el de explorar el origen de la variación genética de la cuádruple mutante de fitocromos A, B, D y E en dos fondos genéticos (ecotipos) diferentes, Landsberg *erecta* (*Ler*) y Columbia (*Col*) de la especie *Arabidopsis thaliana*, con respuestas contrastantes de germinación: las semillas cuádruples mutantes pertenecientes al ecotipo *Col* no germinan mientras que las que poseen ecotipo *Ler* sí lo hacen.

Objetivo específico 1. Confirmar el genotipo de las cuádruples mutantes *phyA phyB phyD phyE* en ambos fondos genéticos (*Col* y *Ler*).

Objetivo específico 2. Generar una población de mapeo al realizar las cruzas entre los mutantes en fondos *Ler* x *Col* y realizar el fenotipado de la descendencia.

Objetivo específico 3. Usar marcadores moleculares e identificar aquellos que se asocien y segreguen con la respuesta de germinación diferencial, identificando posibles regiones del genoma involucradas en la variación natural entre estas dos poblaciones.

Metodología

1. Material vegetal

Para analizar la variación en la etapa de germinación, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipos Columbia-0 (Col) y Landsberg *erecta* (*Ler*) de genotipos salvajes (WT) y cuádruple mutante de fitocromos A, B, D, E (*abde*). Los ejemplares vegetales utilizados para el estudio fueron donados por el Dr. Pablo Cerdán.

2. Condiciones de crecimiento

2.1. Diseño experimental

Se puso en marcha un experimento piloto en el cual se crecieron plantas de la generación F0 con el fin de generar un stock de semillas disponibles para confirmar el genotipo de las líneas mutantes y el futuro desarrollo de los ensayos. Esto permitió homogeneizar el origen de la población de semillas provenientes de un ambiente común y cosechadas al mismo tiempo. Esto es importante ya que se conoce que el ambiente en el cual crecieron las plantas madre puede alterar la respuesta de germinación de las semillas (Auge *et al*, 2017). De esta manera podemos concentrar los esfuerzos en evaluar la variación genética.

2.2. Crecimiento de plantas F0

El estado de dormición de las semillas puede ser regulado por diversos factores ambientales, entre ellos temperaturas altas o bajas, sin embargo, condiciones ambientales adicionales pueden tener efectos dependiendo de la especie (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Dado que *A. thaliana* necesita frío (estratificación) para disminuir la dormición e inducir

la germinación, se colocaron las semillas en tubos de microcentrífuga (uno para cada genotipo) con una solución de giberelinas (100 μM GAs, hormonas promotoras de la germinación, GA₃, Sigma-Aldrich) y se incubaron en cámara de frío a 4°C durante 4 días en oscuridad. Luego de este periodo, se realizaron 3 lavados con agua destilada para así eliminar el exceso de hormonas y proceder con la siembra. Las semillas se sembraron en placas de Petri con medio 1X Murashige-Skoog (MS, medio nutritivo, Duchefa Biochemie) donde se dejaron germinar a 24°C en día largo (16h luz/8h oscuridad, luces policromáticas LED, radiación fotosintéticamente activa, PAR: 100-120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plántulas de aproximadamente 7 días se trasplantaron a macetas individuales preparadas a partir de un vaso plástico de 180 cc con una mezcla de tierra fértil (Grow Mix Multiprop, Agroquímica Larroca S.R.L) y perlita gruesa (Agroquímica Larroca S.R.L) en proporción 2:1, y con vermiculita mediana (Agroquímica Larroca S.R.L) sobre la superficie. Para asegurarnos el crecimiento de al menos una planta por maceta, se trasplantaron 4-5 plántulas por maceta. Al cabo de un corto periodo de tiempo (aproximadamente una semana) se realizó el raleo, una técnica que consiste en elegir y conservar en la maceta una única planta, removiendo el resto para dejar una única planta focal. Las macetas deben prepararse con antelación para que al momento de trasplantar se encuentren húmedas y facilite la viabilidad de las plántulas, así como también debe lavarse la vermiculita antes de colocarla en las macetas para eliminar sales y componentes que pueden inhibir el desarrollo de las mismas. Las macetas, debidamente rotuladas, se colocaron en cámara a 24°C con un fotoperiodo de 16h de luz. Estas plantas F0, fueron controladas y regadas periódicamente para asegurar la supervivencia del material vegetal.

3. Genotipado mediante el uso de la técnica de PCR

Las plantas F0 se utilizaron para recolectar muestras de tejido de todos los genotipos (WT y mutantes) con el fin de confirmar su identidad. Para ello realizamos el genotipado mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos que nos permitieron discernir entre los alelos mutantes de los salvajes. Dado que los ejemplares para el ecotipo Columbia ya eran especímenes confirmados como mutantes (*phyA*, *phyB*, *phyD* y *phyE*) en proyectos previos realizados en el laboratorio de Fundación Instituto Leloir, nos centramos en la confirmación de las plantas en el fondo Landsberg *erecta*. Cortamos hojas de cada

individuo y realizamos la extracción del ADN mediante una técnica de lisis celular que se detalla a continuación. Se coloca la hoja en un tubo Eppendorf que es sumergido en nitrógeno líquido. Trituramos las hojas congeladas con la ayuda de un émbolo plástico hasta lograr un polvo fino, de esta forma se rompen las paredes celulares. Para el método de *Sucrose Prep*, la ruptura de las membranas celulares la logramos con la adición de una solución que posee cloruro de sodio 300 mM, sacarosa 300 mM y buffer Tris 50 mM (200 µl de solución por tubo) y luego llevando a incubar a un bloque térmico durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 9.000 rpm por 3 minutos. Se tomó la fase acuosa de cada tubo y se colocó en un tubo nuevo (correctamente rotulados) luego de la separación por centrifugación. Una vez finalizado el procedimiento, podemos utilizar la muestra (ADN en fase acuosa) o conservar en frío para futuros usos. Para realizar la PCR para confirmar los mutantes, se utilizaron los *primers* indicados en Hu *et al*, 2013 (**Tabla I**). Los amplicones obtenidos fueron separados en un gel de electroforesis (agarosa 1.5% p/v). Al leer el gel en el cual corrimos nuestros productos de PCR, pudimos evaluar las mutaciones según Hu *et al*, 2013. Luego de realizar la PCR, una por cada fitocromo (C, D y E), analizamos los productos de amplificación obtenidos para nuestras muestras en comparación con una muestra WT y la mutante cuádruple homocigota. De esta forma pudimos confirmar en las PCR para *PHYD* y *PHYE* la presencia de amplificaciones mutantes con peso diferencial a la muestra salvaje. Solo en la PCR para *PHYC* se esperaba ver que la amplificación WT coincidiera con el resto de las muestras.

TABLA I: *Primers* utilizados para el genotipado de las cuádruples mutantes en el fondo Ler.

Mutante	Primer	Tamaño amplicón WT (pb)	Tamaño amplicón mutante (pb)
<i>phyC-1</i>	CCCAAACCTTCCCTTGATGTTC	207	290
	ACTATTAAGCAGCATAACGCTTCACGCCT G		
	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTA C		
<i>phyD-1</i>	GGCCATCGCCGAAGTCGTC	78	64
	GATTCTGTGACCTTAGGGC		

<i>phyE-1</i>	GTCACCTGCCGATGAGATTG	252 + 127 + 80 + 55 + 29 luego de la digestión con HinfI	252 + 134 + 127 + 29 luego de la digestión con HinfI
	CTCCAAAGACTTCACCGGG		

Fuente: Hu *et al*, 2013.

4. Fenotipado de la F0

Una vez analizada la condición de mutante para *phyD*, *phyE*, y la condición salvaje para *phyC*, quedaba analizar a los *phy* restantes. En el caso de los fitocromos A y B, la evaluación se realizó de forma fenotípica. Se utilizaron semillas de Col WT, *Ler* WT y de las obtenidas a partir de los individuos antes evaluados y que no hayan sido descartados.

Para el análisis se procedió a incubar las semillas del mismo modo que se procedió con el crecimiento de F0 pero en dos condiciones de luz, R y RL. Y luego de los 7 días de crecimiento en placa, en lugar de pasarlas a maceta se cuantificó la elongación de los hipocotilos para poder completar la selección de los individuos. Se tomaron con una pinza de disección quirúrgica de punta fina individuos de Col WT, *Ler* WT y Col *abde* a los cuales se los iba comparando con distintos individuos de supuestas cuádruples mutantes del fondo *Ler*. De esta forma, podemos ver variaciones en el largo de hipocotilo, una apertura a diferentes tiempos de los cotiledones e incluso una coloración visiblemente distinta. Con rasgos marcados dado por las mutaciones de *PHYA* y *PHYB*, individuos con características de etiolación, como hipocotilos largos, una apertura de los cotiledones retrasada y una coloración más amarillenta. Esto nos permite retener aquellos con un fenotipo bien marcado, y afirmar que son mutantes para los fitocromos A y B.

Con esto finalmente confirmamos que los individuos que utilizamos como progenitores fueran mutantes para fitocromos *abde* de los ecotipos Col y *Ler*, al retener sólo aquellos que pasaron las pruebas de PCR y la de fenotipo.

5. Ensayo de germinación F0

Luego, se realizó un ensayo con el fin de confirmar el fenotipo de los mutantes y evaluar el efecto de la hormona giberelina (GAs) en la germinación. Se colocaron dos cuadrados de papel de filtro de 2,5 cm x 2,5 cm en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se embebieron con 400 µl de una solución de 100 µM de GA₃ o agua destilada (32 placas en total, **Fig. 2.1**). Se sembraron 20 semillas por genotipo (Col WT, *Ler* WT, y los cuádruple mutantes en cada fondo) y tratamiento por placa.

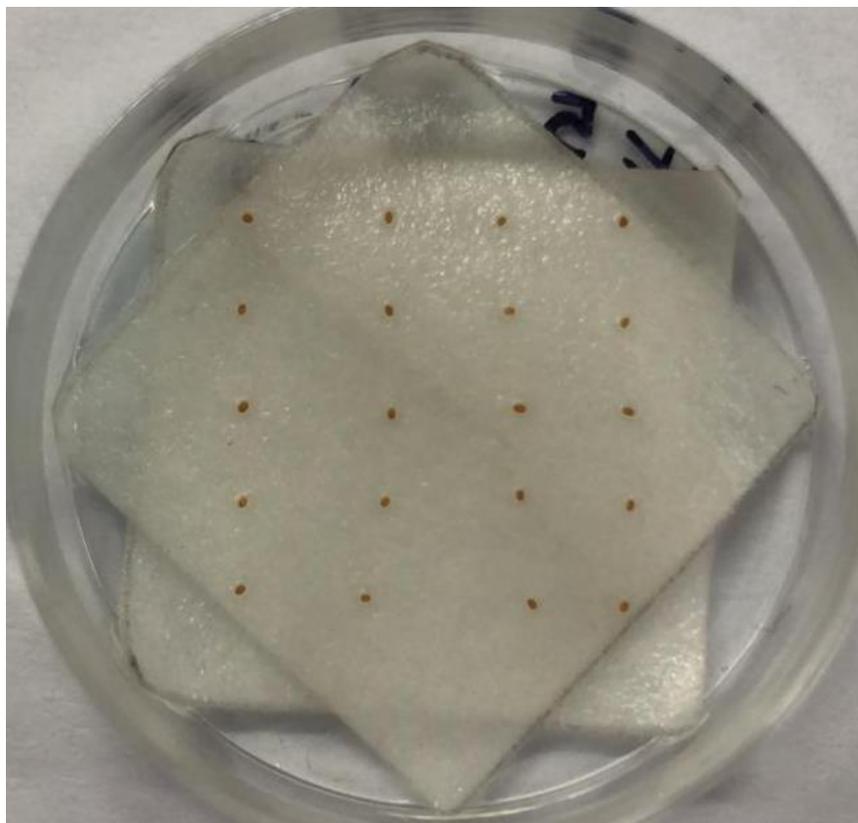


Figura 2.1: Siembra de 20 semillas en una placa de 35 mm con dos cuadrados de papel de filtro y agua destilada o GAs.

Una vez sembradas, cerramos las placas con Parafilm y estratificamos en heladera por 4 días. Luego las placas fueron incubadas a 24°C en día largo (16h luz/8h oscuridad) donde recibieron entre 100 y 150 µmoles de fotones (medidos con Quantum Meter, modelo QMSW-SS de Apogee Instruments). A los 7 días se evaluó la proporción final de germinación (número de semillas germinadas / número total de semillas sembradas) realizando el conteo de las

semillas germinadas bajo lupa estereoscópica. Las semillas que se consideraron germinadas fueron aquellas que mostraron protrusión de la radícula de las cubiertas (en la **Fig. 2.2** se puede observar el estadio de las plántulas en el momento del conteo).

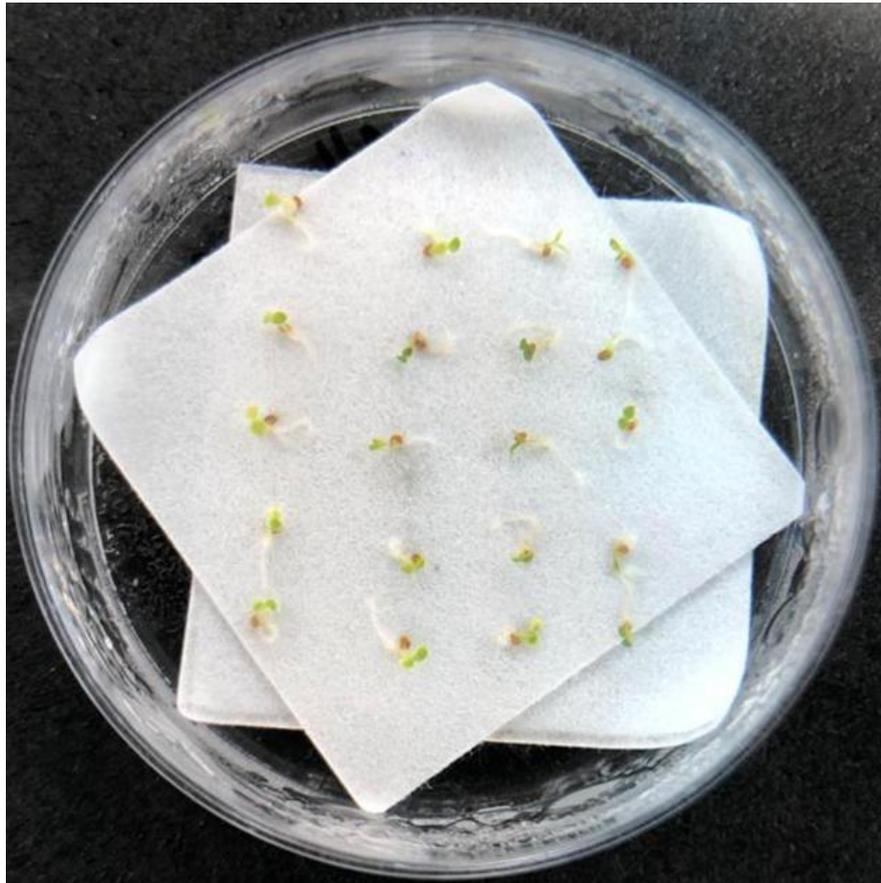


Figura 2.2: Luego de aproximadamente 10 días desde la siembra, vemos la germinación de las semillas (estadio posterior a la protrusión) en una placa de 35 mm con dos cuadrados de papel de filtro y agua destilada o GAs.

6. Generación de la población de mapeo

6.1. Cruzas Col x Ler para la obtención de F1

Para obtener nuestras semillas para el análisis final de la germinación, se cruzaron las plantas Col *abde* con Ler *abde*, y viceversa. Una vez las plantas florecieron, las inflorescencias se sujetaron a un soporte tutor para así evitar que las mismas vuelquen y minimizar la posibilidad de cruzamiento no deseado entre plantas. En la etapa de floración, y estando tanto las plantas Col *abde* y Ler *abde* en dicha etapa, se realizaron las cruzas. Para esto, se tomó polen de las anteras de una planta mutante de uno de los ecotipos y se lo colocó sobre el estigma de la flor receptora del otro ecotipo que fue previamente emasculada (remoción de sépalos, pétalos y estambres) (**Fig. 2.3**).



Figura 2.3: Representación de las etapas del proceso de emasculación.

El procedimiento se lleva a cabo bajo un microscopio estereoscópico (**Fig. 2.4**) para poder identificar de forma precisa las partes de la flor y a su vez, se emplea una pinza de disección quirúrgica de punta fina que nos permite realizar de forma correcta el cruzamiento.

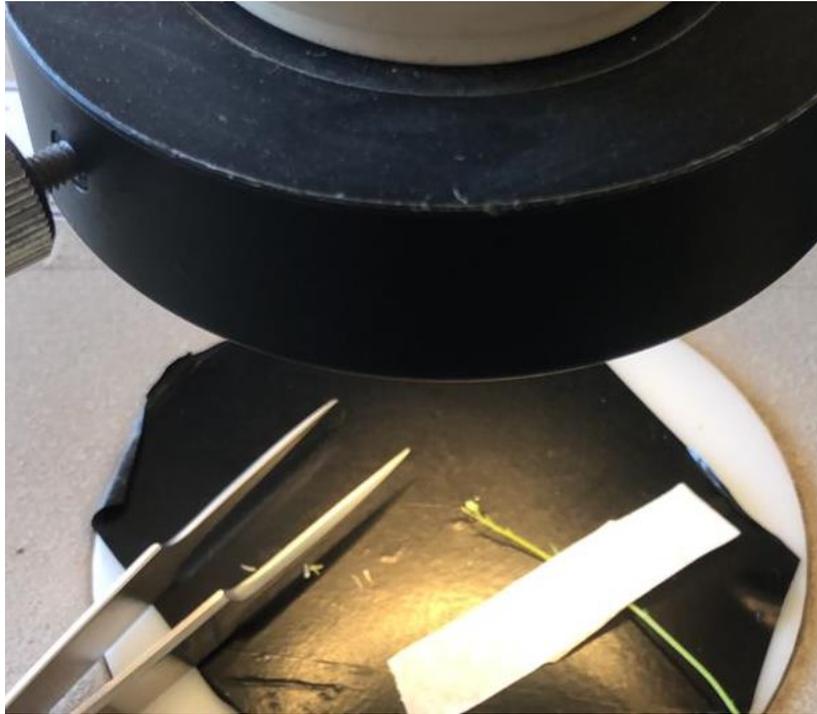


Figura 2.4: Foto ilustrativa sobre la realización de los cruzamientos, con la ramificación de *Arabidopsis thaliana* bajo un microscopio estereoscópico sostenida con cinta y la pinza de disección quirúrgica de punta fina que se utiliza para el procedimiento.

Para poder tener un correcto seguimiento del procedimiento, se marcan las flores que son polinizadas y se remueven las no polinizadas de forma manual para asegurarnos que la planta use sus recursos en la producción de las semillas resultado de la cruce realizada. Una vez alcanzada la madurez de las plantas, las semillas se cosechan y almacenan en tubos de 1,5 ml en un lugar fresco y seco hasta el momento en que sean usadas para los ensayos de germinación.

6.2. Crecimiento de cruza (F1)

Las plantas F1 fueron crecidas bajo las mismas condiciones que la F0. Por lo tanto, se esterilizaron las semillas con cloro gaseoso (lavandina comercial:ácido clorhídrico fumante 37%, en una proporción 27:1), y se estratificaron con GAs. Luego de 4 días en frío (4°C), las semillas se sembraron en placas de MS y se incubaron en una cámara de 24°C en día largo (16h luz/8h oscuridad). Las plántulas de aproximadamente 7 días se trasplantaron a macetas y fueron regadas periódicamente hasta el momento de la cosecha.

6.3 Genotipado de cruzas (F1)

Para comprobar que las cruzas realizadas funcionaron, evaluamos si las plantas F1 se encontraban en heterocigosis. De esta manera se descartó la posibilidad de autopolinización o polinización cruzada no deseada y así afirmamos que nuestra F1 fuera descendiente de la crusa manual entre los mutantes en fondos Col *abde* y Ler *abde*.

Para esto, se extrajo el ADN por el método de *Sucrose Prep* de hojas recolectadas de plantas en crecimiento (de 3-4 semanas) y posteriormente se realizó una PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó de la misma forma que se utilizó para evaluar la identidad de las plantas F0. Se utilizaron primers de los indicados en Hu, *et al* (2013) para el gen *phyD* (**Tabla II**). Los *primers* amplifican un producto de 78 pb para el alelo mutante de Col, Col WT y Ler WT, mientras que amplifican un producto de 64 pb del alelo mutante de Ler. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 3% p/v (Agarosa, Duchefa Biochemie). Si el cruzamiento fue exitoso y las plantas son heterocigotas para el alelo mutante (el cruzamiento funcionó) esperábamos ver dos productos de amplificación en el gel. Nos quedamos con las plantas F1 para las cuales pudimos confirmar heterocigosis viendo la doble amplificación en el gel. De esta forma, continuamos con la caracterización y fenotipado de la F2 con las plantas F1 confirmadas.

TABLA II: Información específica del set de *primers* utilizados para evaluar heterocigosis.

Mutante	Primer	Secuencia	Tamaño amplicón WT (pb)	Tamaño amplicón mutante (pb)	Tamaño amplicón heterocigota (pb)	Ta (°C)
<i>phyD-1</i>	Fwd	GGCCATCGCCGAAGTCGTC	78	64	64 + 78	55
	Rev	GATTCTGTGACCTTAGGGC				

7. Crecimiento y fenotipado de F2

Una vez seleccionados los individuos F1 heterocigotas, dejamos que las plantas se autopolinicen dando lugar a una nueva generación segregante (F2) provenientes de parentales heterocigotas. Se cosecharon cada una de las plantas de forma individual, rotulando debidamente cada tubo en el cual se guardaron las semillas. Con la obtención de la F2, se procedió a realizar un ensayo para evaluar el fenotipo de las mismas al momento de la germinación. Una de las tantas diferencias que podemos observar entre los mutantes Col *abde* y Ler *abde* es su comportamiento en el momento de la germinación: las semillas del mutante Col *abde* no germinan sin la adición externa de GAs, y por el otro lado, Ler *abde* no tiene requerimiento estricto de GAs exógenas para promover la germinación.

El ensayo de fenotipado se planteó en 2 etapas: en primera instancia se evaluaron aquellas semillas que no requirieron de GAs para germinar y luego vimos la germinación de aquellas que sí la necesitaron. Para esto, se esterilizaron como se explicó anteriormente semillas de la progenie de una de las plantas F1 que se identificaron como heterocigotas (id: Z5437) , Col WT, Ler WT, Col *abde* y Ler *abde*. Estas semillas se sembraron en flujo laminar en placas con medio 1X MS (3 réplicas), dividiendo la placa en 5 espacios correctamente rotulados para poner 100 (cien) semillas de Z5437 y las semillas de los controles. Cerramos las placas con Parafilm, y se estratificaron por 4 días en oscuridad y frío (4°C). Las placas luego se incubaron a 18°C en día largo (16h luz/8h oscuridad) por 7 días cuando se realizó el primer conteo de germinación bajo flujo laminar (**Fig. 2.5**). Las plántulas de semillas que no requirieron GAs para germinar se transplantaron a macetas.

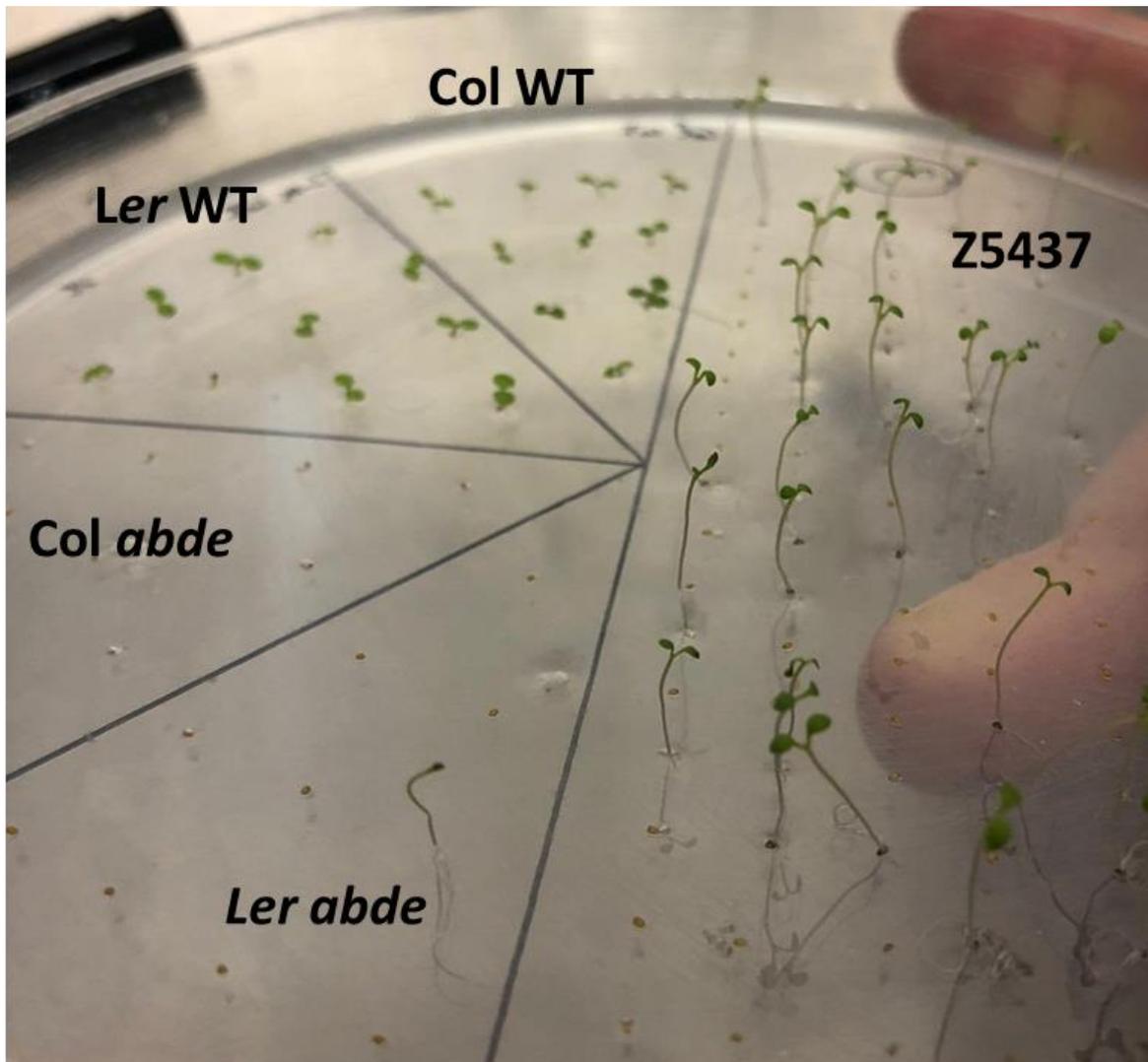


Figura 2.5: Muestra de cómo se realizó la siembra de la placa con los distintos genotipos (Z5437, Col WT, Ler WT, Col *abde* y Ler *abde*).

En la segunda etapa del ensayo, las semillas restantes remanentes en las placas (aquellas que no germinaron en primera instancia) se las levantó utilizando agua esterilizada, y se las colocó en tubos Eppendorf con una solución de GAs (100 uM GA₃). Las semillas se estratifican en oscuridad y frío (4°C) por 4 días y luego fueron sembradas en 3 placas con 1X MS, del mismo modo que en la primera etapa. Las placas se llevaron a 18°C en día largo (16h luz/8h oscuridad) y a los 7 días se realizó un conteo de las semillas que germinaron y a aquellas germinadas se las transfirió a macetas.

Las plántulas de semillas que germinaron sin o con la adición de GAs se llevaron a una cámara de crecimiento a 24°C con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad hasta el momento de la cosecha.

Todas las plantas que fueron aisladas fueron identificadas y luego de 3-4 semanas de crecimiento se les realizó la recolección de una muestra de tejido de hoja (**Fig. 2.6**) para proceder con una extracción de ADN siguiendo el protocolo de extracción por CTAB (ver abajo). El ADN extraído se usó en PCRs con marcadores moleculares que nos permitieron mapear la ubicación en el genoma de potenciales loci causales de la variación natural en la respuesta de germinación.



Figura 2.6: Demostración de cómo se hace la toma de muestra, a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

8. Mapeo

8.1 Extracción de ADN

En todos los casos en los que queramos tomar muestras, se cortaron hojas de cada planta y se colocaron en tubos Eppendorf. Para simplificar la molienda, los tubos fueron sumergidos

en nitrógeno líquido y las hojas congeladas trituradas con la ayuda de un émbolo plástico hasta lograr un polvo fino.

En este caso para el mapeo de F2 utilizamos el método de extracción por CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Inicialmente se le agrega al polvo fino 200 μ l de Buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH:8; 20 mM Na-EDTA pH: 8; 1,4 M NaCl; 2% CTAB; agua MiliQ) y se incuba a 65°C por 15 minutos. Luego se adiciona 200 μ l de Cloroformo (triclorometano), y se lleva a la centrífuga a máxima velocidad (12.000 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente (25°C). En este paso vemos cómo se forman dos fases, la fase acuosa contiene el ADN y en la fase orgánica, junto con el Cloroformo, quedan las proteínas y lípidos (**Fig. 2.7**).

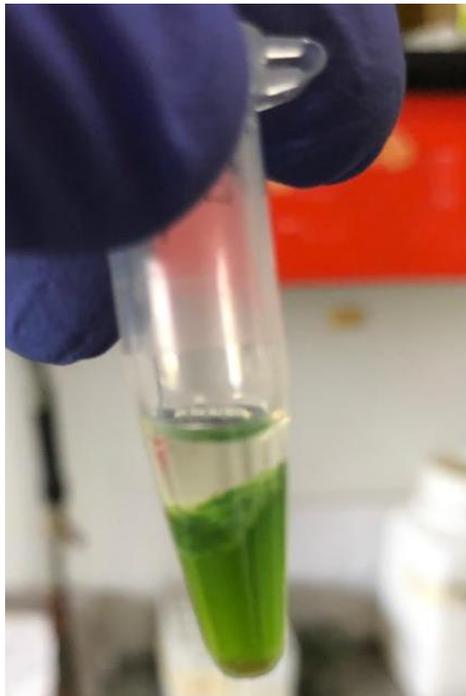


Figura 2.7: Posterior al paso de agregado de Cloroformo en el método de extracción por CTAB, se pueden apreciar las dos fases (acuosa y orgánica).

Luego transferimos la fase acuosa (fase superior) a un tubo con 200 μ l de Isopropanol y llevamos por 20 minutos a 4°C a la centrífuga a máxima velocidad. El Isopropanol permite que el ADN precipite y por eso vemos la formación de un pellet. Pasamos a descartar el sobrenadante utilizando una bomba de vacío, adicionamos alcohol 70% (Etanol 96%; agua destilada) y llevamos a la centrífuga por 2 minutos a 4°C a máxima velocidad, y repetimos para

alcanzar dos lavados con alcohol. Para finalizar, cuando tenemos únicamente el pellet, lo resuspendimos con 60 μ l de agua apirógena y homogeneizamos. Las muestras se guardaron en un freezer a -20°C . Este método permite purificar el ADN con mejor calidad gracias al uso de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

8.2. PCRs

Primero debemos poner a descongelar los reactivos y las muestras en hielo, mientras tanto y usando guantes sin polvo, limpiamos la mesada donde trabajaremos con alcohol. Utilizamos H_2O apirógena, buffer de polimerasa, MgCl_2 , dNTPs, primers (forward y reverse), enzima polimerasa TAQ y ADN según se describe en la **Tabla III**.

TABLA III: Reactivos empleados en las reacciones en cadena de polimerasa (PCR).

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción (μ l)
H_2O apirógena	-	18,2
Buffer	1X	2,5
MgCl_2	1,5 mM	1,5
dNTPs	0,2 mM	0,2
Primers forward	0,25 μ M	0,25
Primers reverse	0,25 μ M	0,25
DNA	-	2
TAQ polimerasa	-	0,1
TOTAL	-	25

Para la reacción se coloca hielo en un recipiente para encima colocar la placa termoresistente de PCR de 96 pocillos (ABgenes ® Thermo-Fast ®). Armamos la MIX (H_2O apirógena, buffer de polimerasa, MgCl_2 , dNtps, primers y enzima polimerasa TAQ) y alicuotamos 23 μ l de la misma en cada well, y luego dentro de cada pocillo se ponen 2 μ l de

ADN para lograr un volumen final de 25 µl en cada well. La placa se tapó con una almohadilla, y se llevó a un ciclador térmico con el programa de corrida seteado como se describe en la **Tabla IV**.

TABLA IV: Representación del programa utilizado para las reacciones en cadena de polimerasa (PCR).

1	Desnaturalización inicial: 5 minutos a 94°C	
2	Desnaturalización: 20 segundos a 94°C	Ciclos: 40
3	Hibridación: 20 segundos a la Ta (depende de los primers)	
4	Extensión: 20 segundos a 72°C (el tiempo depende del largo del fragmento a amplificar)	
5	Extensión final: 5 minutos a 72°C	

8.3. Marcadores utilizados y amplificación

En las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) se utilizaron 14 marcadores moleculares (**Tabla V**), los cuales se distribuyen a lo largo de todo el genoma de *Arabidopsis thaliana* (**Fig. 2.8**).

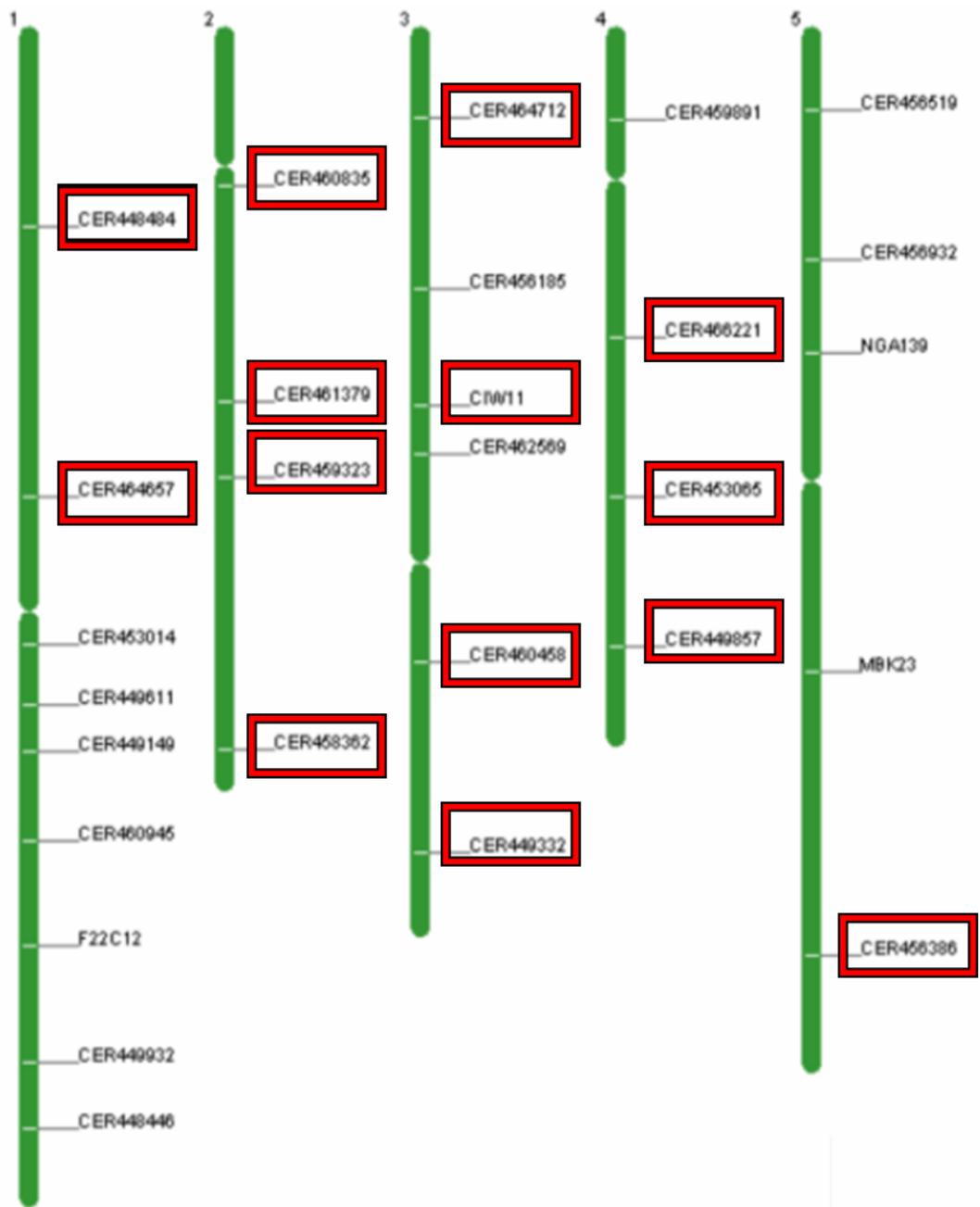


Figura 2.8: Mapa físico de la ubicación de los marcadores utilizados (recuadro rojo) en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (obtenido de Sánchez-Lamas, 2008)

TABLA V: Marcadores moleculares utilizados para el mapeo.

Marcador	Cr.	Coordenadas	pb Col	pb Ler	Primers
----------	-----	-------------	--------	--------	---------

CER448484	I	5151366	123	107	TGTGCATGGTATTATAGGTGGACCAGATT AT
		5151488			GGTGGACATTTGTATCTTTTCGGTTTCTT
CER464657		12202629	109	99	CCTTGAGGTGGGCCATAACAAGCTAT
		12202737			CACGACCCCTGTGTACCCATTCTTA
CER460835		4153260	154	140	CGCCGTCAATCTCTCCAAAATAAGAA
		4153413			CAAATACATAGCCCTAAAGCGTGTTCGAT
CER461379	II	9666401	254	239	ATGCAGTCGAGAGCTGTCTCAGGCT
		9666601			GTGCTTGACGGTTTGTTCGACGAA
CER459323		11602876	105	93	CGATTAAACTCAATCCAACGGCTTAGAGA TA
		11602981			CAAGACTTTGCAAACATTACTAATGAAC GA
CER458362		18611848	108	96	CGTGTTGGCCTAAATCAGAGAGAGCAT
		18611955			TGCCAGAGAAACCAAGAAATTGATACAA TTA
CER464712		2408173	140	123	CAATAAGAAGAAGGAAGCGTACTGCACA
		2408312			GTGAATGAACACATGGTGTGTTGTAACAT TA
ciw11	III	9775545	179	230	CCCCGAGTTGAGGTATT
		9775723			GAAGAAATTCCTAAAGCATTC
CER460458		16358966	407	365	GTTTGTGACGAATAGTGAAAGGAGAGAA GTAA
		16359372			GAGAACCAACATAAATCCGTTACAATGTC AA
CER449332		21332892			CCCCTGCTTGGACAGTGTACGAA

		21333010	119	108	GAATCCGATGGATAGAGGAAAAATGAAT GTA
CER466221	IV	8007990	218	193	ATCAAACGCCAACTGAATCAATCAATTAA
		8008207			GTGTGTGGACTCACCATTGGTCACAT
CER453065		12107892	153	135	GGAAGGCTATTTGTCTATATTGTTTCATGG AA
12108044		TCACGAATACAAAATCAAACCTCAGATAG AGAAA			
CER449857		16046936	331	293	CCTGGCGCTAATGTACACTCTTCGTT
		16047266			TGTAATCTATCTCTCACTCACGATGCCTCT T
CER456386	V	23900136	120	100	AGTAACTCAAAACCAAACAAGGAC
		23900256			TTTGATGCATCATAACAGAAAGTC

Fuente: obtenido de Sánchez-Lamas, 2008.

8.4 Información de marcadores moleculares

Los marcadores utilizados permiten la amplificación por PCR de secuencias con inserciones o deleciones que difieren entre *Col* y *Ler*. Los productos amplificados tienen un tamaño entre 93 y 407 pb, y una diferencia de no más del 10% en tamaño entre los diferentes alelos. Los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa al 3% en buffer TBE 0.5X (Tris Base 12,11% m/v, ácido bórico 5,5% m/v, EDTA 0,744% m/v, agua destilada, solución a pH 8). Luego de la corrida electroforética por 45-60 minutos a 100-120 v (puede variar de acuerdo a las amplificaciones esperadas), se revelaron en un transiluminador.

9. Análisis estadístico

El comportamiento observado en los ensayos de germinación, tanto para F0 como para F2, fueron analizados de forma estadística. Para todos los análisis estadísticos mencionados se utilizaron paquetes desarrollados dentro del lenguaje estadístico R (versión 4.1.2), además de la implementación de la herramienta RStudio para un mejor manejo del mismo.

Se emplearon gráficos de caja de bigote, o también llamados *boxplot*, para la representación de los resultados obtenidos. La significancia estadística se analizó para comprender los efectos de la adición de GAs y el genotipo (mutantes) sobre la respuesta dependiente de la variable germinación. Las proporciones finales de germinación fueron analizadas usando modelos lineales generalizados (glm) ajustados a una función de enlace *logit* usando ‘glm’ en el paquete ‘stats’ y la función ‘Anova’ del paquete ‘car’. Debido a que se realizaron múltiples comparaciones que afectan el poder estadístico, los *P* valores fueron corregidos con el método “Holm” usando la función ‘p.adjust’ del paquete ‘stats’.

Resultados

1. Confirmación de los genotipos mutantes

En primera instancia es importante confirmar la identidad de las plantas bajo estudio. Es por ello que se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o análisis del fenotipo para identificarlas.

Inicialmente, se tomaron muestras de plantas mutantes en el fondo *Ler* para luego proceder con la extracción de ADN y posterior PCR. Se realizaron las PCR correspondientes al análisis de *PHYC*, *PHYD* y *PHYE* (**Tabla I**). Para *PHYC* se vieron amplicones de aproximadamente 207 pb en todas las muestras, incluyendo el control WT confirmando la presencia del alelo salvaje para el gen *PHYC*. Por otro lado, al correr los productos de PCR para *PHYD* y *PHYE* se vieron productos de amplificación distintos con respecto a la muestra WT, como era esperado. En el caso de *PHYD* vimos que las muestras dieron amplicones de menor tamaño (64 pb) que para la referencia salvaje (78 pb) (**Fig. 3.1**). Al analizar la PCR para *PHYE*, se obtuvieron amplicones de 543 pb que luego fueron seleccionadas para realizar una restricción y la posterior selección de las que resultaron mutantes.

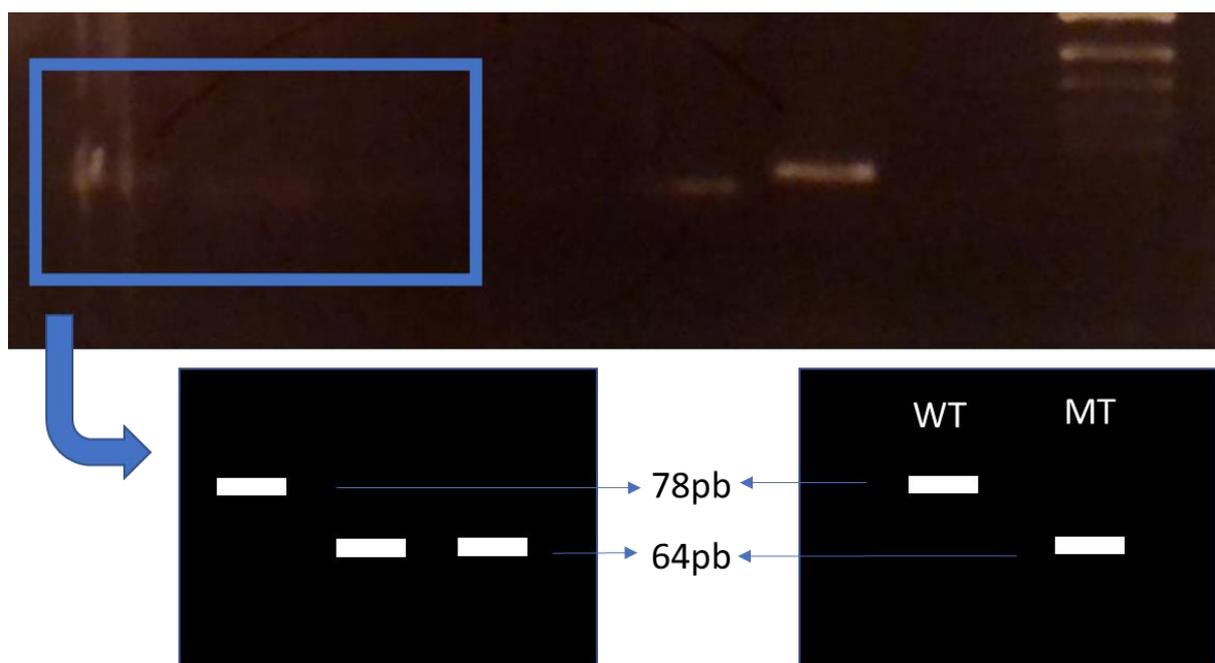


Figura 3.1: Representación de selección de plantas, en este caso por la técnica de PCR para identificar individuos mutantes para *PHYD*.

Para los fitocromos restantes, *PHYA* y *PHYB*, la evaluación de su genotipo se hizo a partir del análisis del fenotipo que presentaron las plantas. Se procedió a sembrar y crecer ejemplares de *Ler wt*, *Col wt*, *Ler abde* y *Col abde* en dos condiciones de luz, Roja (R) y Roja Lejana (RL). En ambos tratamientos esperamos ver que tanto *Ler wt* como *Col wt* tengan bien abiertos sus cotiledones y sean de un tamaño mayor a los ejemplares de *Ler abde* y *Col abde*. Las plántulas *abde* presentan en las dos condiciones de luz características de etiolación, hipocotilos largos, cotiledones con una emergencia más tardía y los mismos en coloración amarillenta (**Fig. 3.2**).

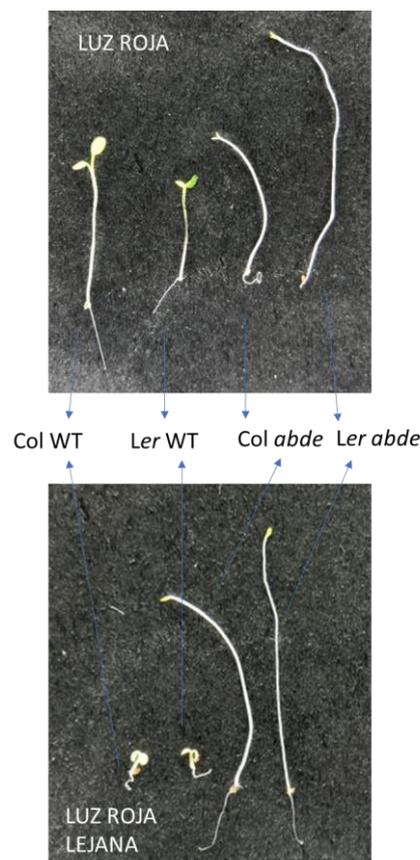


Figura 3.2: Selección de mutantes por fenotipo, condición de luz R y RL.

Los plantas de *Arabidopsis thaliana* que resultaron mutantes, sea por PCR o por fenotipo, para *PHYA*, *PHYB*, *PHYD* y *PHYE* y salvaje para *PHYC* fueron las seleccionadas para realizar las cruza (*Ler abde* x *Col abde*) y así continuar con el proyecto.

2. Confirmación de fenotipo de la generación F0

Una vez que identificamos individuos de *Arabidopsis thaliana* cuadruples mutantes de fitocromos (*PHYA*, *PHYB*, *PHYD* y *PHYE*), pasamos a poner a prueba la premisa, y con ello evaluar el comportamiento de *Col abde* y *Ler abde* en la etapa de germinación (**Anexo A**).

Luego de realizar el ensayo de germinación y recolectar los datos, con los mismos y utilizando el lenguaje de programación R pasamos a analizarlos de forma estadística (**Anexo B**) (**Fig. 3.4**).

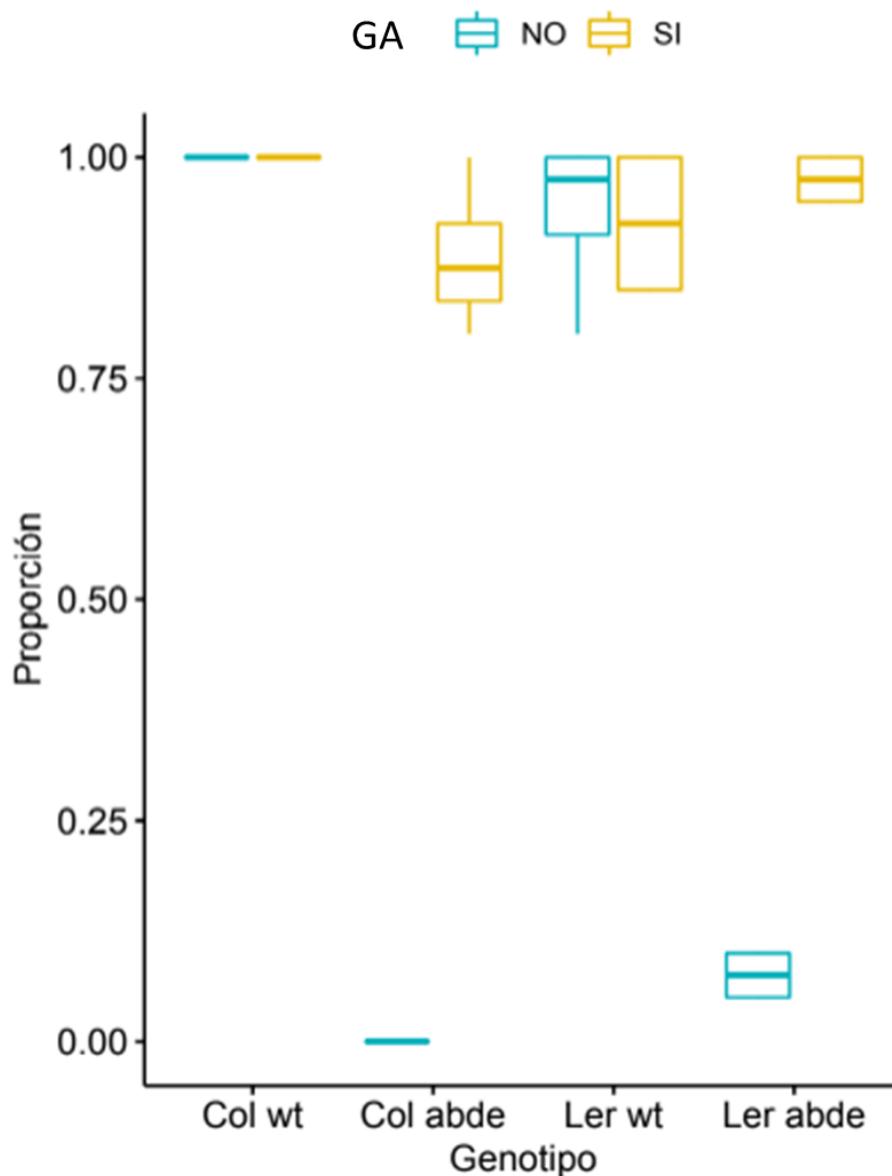


Figura 3.4: Resultados obtenidos del ensayo de germinación en F0. El gráfico muestra los valores de proporción de germinación (eje y) para cada genotipo (eje x) en respuesta a la incubación con (en amarillo) y sin el agregado exógeno de GAs (en azul).

En el gráfico se aprecia cómo los genotipos salvajes Col y *Ler* WT germinan en alta proporción en ambas condiciones con y sin el agregado de GAs. Se puede observar también que tanto Col *abde* y *Ler abde* germinan en gran proporción cuando son incubadas con GAs. Para las semillas mutantes en ambos fondos genéticos en ausencia de GAs la germinación es muy baja. Sin embargo vemos una diferencia ya que las semillas *Ler abde* germinan alrededor del 10% mientras que para las de Col *abde* la germinación es nula (0%).

3. Confirmación de heterocigosis de la F1

Luego de realizar las cruzas ($\text{♀ } \textit{Ler abde} \times \text{♂ } \textit{Col abde}$, y la recíproca), es fundamental confirmar que el cruzamiento funcionó. De esta manera, crecimos plantas F1 producto de nuestras cruzas, recolectamos muestras y procedimos a evaluar heterocigosis por medio de PCR.

Se extrajo el ADN y se realizó una PCR usando los *primers* de *PHYD* como control dado que *Ler abde* y *Col abde* mostrarían productos de amplificación a distintas alturas. Aquellas muestras que dieran una única amplificación de 64 pb serían homocigotas mutantes para el alelo *Ler* de *PHYD* (*Ler abde*), mientras que las que mostraran una única amplificación de 78 pb serían homocigotas salvajes para el alelo Col (*Col abde*). Nosotros buscábamos aquellas plantas que mostraron ambos productos de amplificación (64 pb y 78 pb) ya que serían las heterocigotas y serían los individuos con los que seguiríamos trabajando (**Fig. 3.5**).

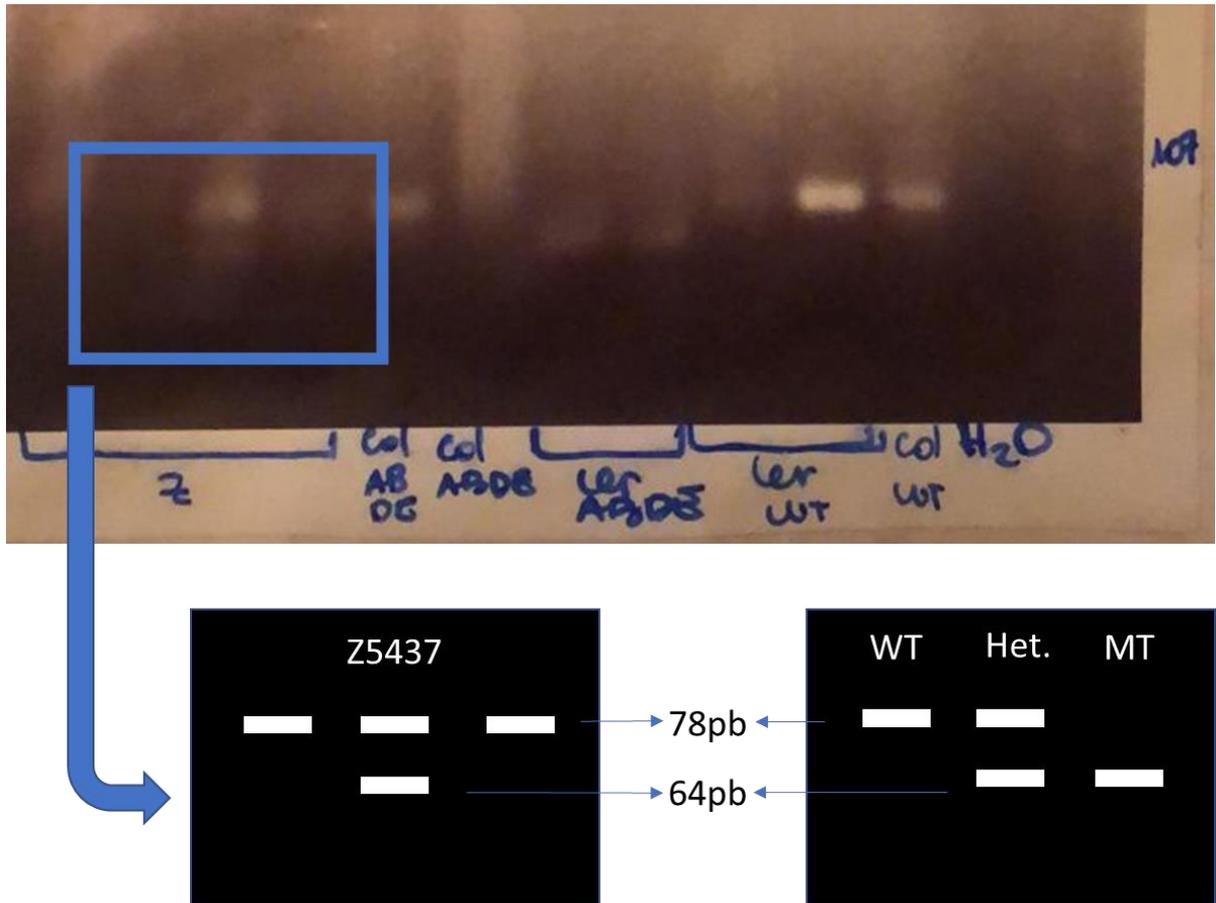


Figura 3.5: Representación de los amplicones obtenidos con marcadores correspondientes *PHYD*, y con ello la posterior selección del ejemplar Z5437 como heterocigota.

Finalmente, después de las PCRs, retuvimos a la craza identificada como Z5437 (**Fig. 3.5**). Este ejemplar fue el que nos dió el resultado más claro a la hora de ver los gels, y con ello asegurarnos al menos un individuo heterocigota.

4. Respuesta de germinación de la población segregante F2

Con la craza Z5437 confirmada como heterocigota, procedimos a cosechar las semillas F2. Con estas semillas diseñamos y llevamos a cabo un ensayo de germinación para fenotipar

la segregación de la respuesta diferencial entre Col y *Ler*, y las comparamos con los controles Col WT, *Ler* WT, Col *abde* y *Ler abde*.

En esta primera instancia, cuando las semillas fueron sembradas sin el agregado de giberelinas (GAs), germinaron en promedio el 40.67% de las semillas (**Fig. 3.6**), una proporción mayor que la esperada a partir de la respuesta de las líneas parentales (**Fig. 3.4**) (**Fig. 3.6**).

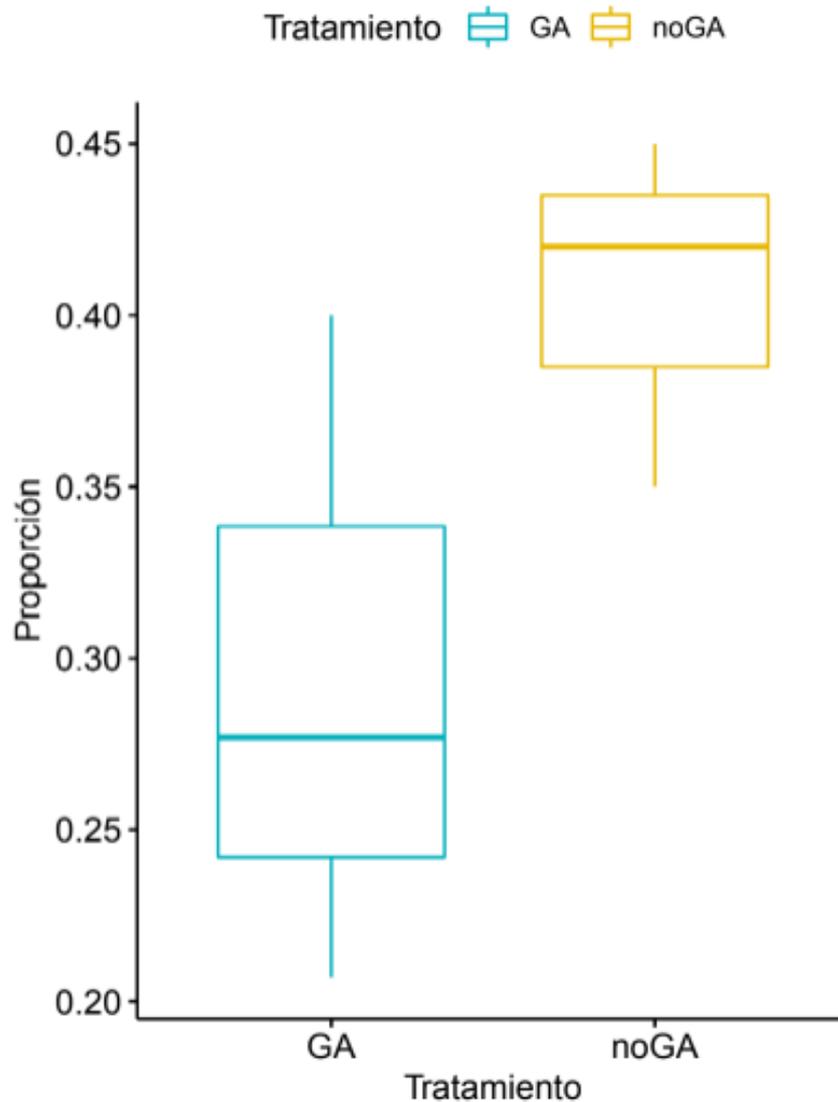


Figura 3.6: Proporción de germinación de las semillas F2 con (azul) y sin (amarillo) giberelinas (GAs).

Luego, cuando se les agregó GAs a las semillas restantes germinaron en promedio el 29.47% de las semillas remanentes (178 semillas en total entre las tres réplicas) (**Fig. 3.6**).

En ambos pasos del ensayo, la proporción final de germinación sin y con el agregado exógeno de giberelinas resultó mayor que el esperado por la respuesta de las líneas parentales *Col abde* y *Ler abde* (**Fig. 3.4**).

5. Asociación de la respuesta de la población segregante con marcadores moleculares

Los individuos F2 que recuperamos a partir del ensayo anterior fueron crecidos y usados para recolectar muestras y realizar PCRs con marcadores moleculares. Los marcadores utilizados nos permiten diferenciar entre regiones del genoma que contienen alelos *Ler* y aquellos con alelos *Col*, de esta manera se pueden asociar regiones del genoma con la respuesta observada en el ensayo de germinación de la población segregante F2. Utilizamos diferentes marcadores moleculares que nos permitieron analizar regiones de todos los cromosomas de *Arabidopsis thaliana* (**Tabla V**).

Analizando los resultados obtenidos en las muestras provenientes de las plantas que germinaron sin la necesidad del agregado GAs (**Fig. 3.6**), esperaríamos observar marcadores con presencia de alelos *Ler* o heterocigotas en caso de que fueran alelos dominantes. Observamos para los marcadores CER460835 (Cr2) y CER453065 (Cr4) se imponen los alelos de *Ler* entre los individuos testeados, y un alto nivel de heterocigosis para CER461379 (Cr2), ciw11 (Cr3) y CER460458 (Cr3). Además, para CER449857 (Cr4) se ven valores similares de heterocigosis y alelos de *Ler* (**Tabla VI**).

Luego del agregado de giberelinas (GAs), en la mayoría de los individuos seleccionados para mapear se observó que los alelos de *Col* se asocian principalmente con los marcadores CER448484 (Cr1), CER459323 (Cr2) y CER466221 (Cr4) (**Tabla VI**).

A pesar de observar un bajo nivel de heterocigosis, que puede resultar de la pequeña diferencia y falta de completa separación entre los productos de amplificación de diferentes alelos en los geles, los resultados sugieren que numerosas regiones genómicas podrían estar asociadas a la variación en respuesta de germinación en los ecotipos utilizados en este estudio, indicando que existe una compleja regulación independiente a los fitocromos.

TABLA VI: Resultados del mapeo con marcadores alélicos de Col y Ler. En color naranja los alelos Col, celestes los de Ler y en rosa aquellos que resultaron heterocigotas. Muestras 1 a 82 son de plantas provenientes de semillas que germinaron sin el agregado exógeno de GAs; y 88 a 107 de individuos provenientes de semillas que requirieron GAs para germinar. Los marcadores se ubican en el siguiente orden de acuerdo a la posición en los cromosomas: CER448484, CER464657, CER460835, CER461379, CER459323, CER458362, CER464712, ciw11, CER460458, CER449332, CER466221, CER453065, CER449857, CER456386.

Muestras	Cr 1		Cr 2				Cr 3			Cr 4			Cr 5	
	CER448484	CER464657	CER460835	CER461379	CER459323	CER458362	CER464712	ciw11	CER460458	CER449332	CER466221	CER453065	CER449857	CER456386
1	Col	Ler	Col	N/A	Ler	Col	Hetero	Ler	N/A	Ler	Col	Col	Hetero	Hetero
8	Col	Col	Ler	Hetero	Ler	Ler	Ler	Ler	Hetero	Col	Ler	Ler	Ler	Col
10	Col	Col	Ler	Hetero	Ler	Col	Col	Col	Hetero	Col	Col	Ler	Ler	Col
14	Col	Ler	Col	Col	Col	Ler	Hetero	Hetero	Hetero	Col	Col	Ler	Ler	Hetero
17	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Ler	Hetero	Ler	Ler	Ler	Ler	Hetero	N/A
21	Col	Ler	Ler	Ler	Ler	Col	Col	Ler	Ler	Col	Col	Col	Col	Ler
29	Col	Col	Col	Hetero	Col	Col	Hetero	Hetero	Hetero	Col	Col	Ler	Hetero	Hetero
39	Col	Col	Ler	Hetero	Col	Col	Col	Col	Hetero	Col	Col	Ler	Hetero	Hetero
43	Col	Ler	Ler	Hetero	Col	N/A	Col	Col	Col	Col	Ler	Ler	N/A	N/A
51	Col	Col	Col	Col	N/A	Col	Hetero	Hetero	Hetero	Col	Ler	Ler	Ler	Hetero
53	Col	Ler	Ler	Hetero	Col	Ler	Col	Hetero	Hetero	Ler	Col	Col	Hetero	Hetero
68	Col	Ler	Ler	Hetero	Col	Ler	Col	Col	Col	Ler	Col	Col	Col	Hetero
69	Col	Ler	Ler	Hetero	Col	Ler	Col	Hetero	Hetero	Ler	Col	Ler	Hetero	Hetero
74	Col	Col	Ler	Hetero	Col	Ler	Col	Hetero	Ler	Ler	Col	Ler	Col	Col
80	Hetero	Ler	Ler	Ler	Ler	Ler	Col	Ler	Ler	Ler	Col	Col	Col	Col
82	Col	Ler	Col	Col	Col	Ler	Col	Hetero	Hetero	Col	Col	Ler	Ler	N/A
Ler	0	9	10	2	5	8	2	4	4	7	4	11	6	1
Col	15	7	6	4	10	7	10	4	2	9	12	5	3	4
Hetero	1	0	0	9	0	0	4	8	9	0	0	0	6	8
88	N/A	Col	Col	Col	Col	Ler	Col	Col	Ler	Ler	Ler	Ler	Hetero	Col
89	Ler	Col	Col	Col	Col	N/A	Hetero	Hetero	Hetero	Col	Col	N/A	Hetero	Hetero
90	Ler	Ler	Col	Hetero	Ler	N/A	Hetero	Hetero	N/A	Col	Ler	Ler	N/A	Ler
91	N/A	Ler	Ler	Hetero	Col	Ler	Hetero	Col	Col	Col	Col	Col	N/A	N/A
93	Col	Col	Hetero	Col	Ler	Col	N/A	Ler						
94	N/A	Col	Col	Col	Col	Col	Ler	Hetero	Hetero	Ler	Col	Ler	N/A	Hetero
95	Col	Col	Ler	Hetero	Col	Col	Col	Hetero	Hetero	Ler	Ler	Ler	Ler	Col
97	Col	Ler	Col	Col	Col	Col	Hetero	Hetero	Ler	Ler	Col	Col	Hetero	Hetero
98	Col	Ler	Ler	Ler	Col	Col	Hetero	Ler	N/A	Ler	Col	Col	Col	Hetero
99	Col	Col	Col	Hetero	Col	Col	Col	Hetero	Hetero	Ler	Ler	Col	Hetero	Hetero
100	Col	Col	Col	Hetero	Col	Col	Col	Hetero	Hetero	Ler	Col	Col	Col	N/A
101	Col	Ler	Ler	Ler	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Ler	Ler	N/A	N/A
102	Col	Col	Ler	Hetero	Col	Col	Col	Hetero	Hetero	Ler	Col	Col	Hetero	Hetero
103	Col	Col	Ler	Ler	Col	Ler	Col	Col	Hetero	Ler	Ler	Ler	Ler	Hetero
104	Col	Col	Col	Col	Col	Ler	Col	Col	Col	Ler	Col	Col	N/A	Hetero
105	Col	Ler	Ler	Hetero	Col	Ler	Col	Col	Col	Ler	Col	Col	N/A	Ler
106	Col	Ler	Col	Hetero	Col	Col	Col	Col	Col	Ler	Ler	Ler	Ler	N/A
107	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Ler	Hetero	Col	Ler	Col	Col	Col	Ler
Ler	2	7	7	3	1	5	2	1	2	13	8	7	3	4
Col	13	11	11	7	17	11	11	8	5	5	10	10	3	2
Hetero	0	0	0	8	0	0	5	9	9	0	0	0	5	8

Discusión

La supervivencia de las plantas depende del correcto ajuste del crecimiento y desarrollo a los ambientes óptimos para que las diferentes etapas del ciclo de vida sucedan. En este sentido, el momento en que sucede el comienzo del ciclo de vida (germinación de las semillas) es clave en determinar el ambiente que la planta en crecimiento experimentará en el futuro (Donohue *et al*, 2010). La germinación está regulada por numerosos factores, incluida la calidad de luz, efecto mediado por los fitocromos (Casal y Sánchez, 1998). En este estudio analizamos la variación natural en la regulación de la germinación en ausencia de los fitocromos. Los resultados muestran que la variación fenotípica observada entre mutantes múltiples de fitocromos en los fondos genéticos Col y *Ler* estaría asociada con regiones genómicas en varios cromosomas. Además, nuestros resultados sugieren que la regulación de la germinación independiente de los fitocromos podría ser multigénica.

Los ecotipos utilizados en este estudio presentan un bajo nivel de dormición y por lo general no requieren del agregado exógeno de GAs. En el ensayo de germinación tanto Col WT como *Ler* WT germinaban ambas en un porcentaje muy alto, aun cuando fueron incubadas sin GAs. Las mutantes *Ler abde* y Col *abde* necesitaron del agregado de GAs para mostrar un alto nivel de germinación. Sin embargo, en ausencia de GAs las semillas mutantes en el fondo genético *Ler* retuvieron cierta capacidad de germinar, aunque en una proporción menor a la esperada según reportes anteriores (Hu *et al*, 2013). Por el contrario, semillas de Col *abde* tuvieron un requerimiento estricto de adición de GAs para germinar.

Para buscar el origen de esta diferencia, se construyó una población F2 segregante en la cual mapeamos la asociación entre el fenotipo de las semillas con marcadores moleculares. El ensayo de germinación realizado con las semillas F2 mostró una proporción mayor de germinación que el esperado a partir de los datos de las líneas parentales: sin la adición de GAs casi la mitad de las semillas germinaron, sugiriendo un posible efecto epistático o aditivo entre loci de diferente origen alélico. Este tipo de epistasis fue demostrado para otra transición clave del desarrollo, la floración, y fue asociada con variación en la respuesta y adaptación a diferentes ambientes (Caicedo *et al*, 2004; Juenger *et al*, 2005). En el caso de la germinación se han encontrado para *Arabidopsis* de dos a cuatro *quantitative trait locus* (QTL) y de cinco a ocho interacciones de epistasia (Malmberg *et al*, 2005). Además, en muchos casos se vió que

locus que interactúan epistáticamente en la germinación, también lo hacen en el *fitness* de la planta (Huang *et al.*, 2010).

En el mapeo realizado en este estudio se vió que las semillas que germinaron en primera instancia (aquellas sin GAs) presentaron marcadores con alelos para el genotipo *Ler* o en heterocigosis, sugiriendo que los alelos *Ler* serían dominantes en la regulación de la respuesta de germinación. Estos marcadores con predominancia de alelos *Ler* o heterocigotas mapean con los cromosomas 2, 3 y 4. En cambio, el grupo de semillas que germinó luego del agregado de giberelinas (GAs) presenta en sus marcadores un mayor número de alelos para *Col* en los cromosomas 1 y 2.

En particular, los marcadores CER461379, CER460458 y ciw11 podrían estar asociados a alguna región o secuencia del genoma que tenga relevancia con el fenotipo expresado en la germinación independiente de GAs y fitocromos. Esto se debe a que respondieron con gran cantidad de muestras heterocigotas en la condición sin GAs, y además, en presencia de GAs sus muestras arrojaron resultados mayoritariamente heterocigota o para alelos del ecotipo *Col*. Sin embargo y a pesar de la baja detección de individuos heterocigotas, el marcador CER453065 (Cr4) parece ser el más asociado con la respuesta ya que presenta mayoría de individuos con alelos *Ler* para las plantas de semillas que no requirieron agregado exógeno de GAs, y mayoría de alelos *Col* para las plantas de semillas que sí necesitaron del agregado exógeno de GAs. Si bien no se observan individuos en heterocigosis para este marcador, es probable que esto sea debido a problemas en la electroforesis del gel que impidieron la correcta separación entre los productos de amplificación de los dos alelos (20pb).

Lamentablemente, la baja resolución del mapeo no nos permite sacar conclusiones respecto a los potenciales genes involucrados en esta respuesta. Sin embargo, nuestros resultados ameritan la continuación de la exploración de estas regiones para determinar potenciales loci causales de la variación fenotípica entre los mutantes *Col abde* y *Ler abde*.

Conclusión

Si bien los resultados del proyecto no son conclusivos respecto a la identificación de loci causales, logramos identificar regiones del genoma que podrían estar asociadas a la variación fenotípica entre los mutantes en los fondos Col y Ler. Sería necesario analizar más marcadores para poder aumentar la resolución del mapeo e identificar genes relevantes para la germinación independiente de los fitocromos. Sin embargo, parece ser que el marcador CER453065 está asociado a la respuesta fenotípica que se presenta en la germinación. A pesar de esto, nuestros resultados también sugieren que la regulación de la germinación independiente de GAs y fitocromos tendría una base compleja con potencial de efectos epistáticos entre diferentes regiones del genoma.

1. Perspectivas a futuro

Los resultados que obtuvimos al realizar dicha tesina alientan a continuar con la identificación de potenciales loci causales. Principalmente, el aumento de resolución para la asociación en los cromosomas 2, 3 y 4. Nuestros resultados prometen ser un camino para explorar potenciales blancos genéticos que permitan una germinación más homogénea e independiente de la regulación de factores como la calidad de luz, carácter importante para el establecimiento homogéneo de cultivos y la disminución de costos de manejo de cultivos.

Bibliografía

Álvarez Nogal, R. y González Sierra, S. (2007). *Arabidopsis thaliana* a través del microscopio óptico de campo claro y del microscopio electrónico de transmisión. Universidad de León, Secretariado de publicaciones.

Arana, M. V.; Sánchez-Lamas, M.; Strasser, B.; Ibarra, S. E.; Cerdán, P. D.; Botto, J. F., y Sánchez, R. A. (2014). Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 37(9): 2014–2023. doi:10.1111/pce.12286.

Arana, M. V.; Tognacca, R. S.; Estravis-Barcalá, M.; Sánchez, R. A. y Botto, J. F. (2017). Physiological and molecular mechanisms underlying the integration of light and temperature cues in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant, Cell & Environment*, 40(12): 3113–3121. doi:10.1111/pce.13076.

Auge, G. A.; Leverett, L. D.; Edwards, B. R. y Donohue, K. (2017). Adjusting phenotypes via within- and across-generational plasticity. *New Phytologist*, 216(2): 343–349. doi:10.1111/nph.14495.

Baskin, J. y Baskin, C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1): 1-16. doi:10.1079/SSR2003150.

Bevan, M. y Walsh, S. (2005). The *Arabidopsis* genome: a foundation for plant research. *Genome Res*, 15(12) 1632-1642. doi: 10.1101/gr.3723405.

Burgie, E. S. y Vierstra, R. D. (2014). Phytochromes: An Atomic Perspective on Photoactivation and Signaling, *The Plant Cell*, 26(12): 4568–4583. doi:10.1105/tpc.114.131623.

Caicedo, A. L.; Stinchcombe, J. R.; Olsen, K. M.; Schmitt, J. y Purugganan, M. D. (2004). Epistatic interaction between *Arabidopsis* FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44): 15670–15675. doi:10.1073/pnas.0406232101.

Carrera-Castaño, G.; Calleja-Cabrera, J.; Pernas, M.; Gómez, L. y Oñate-Sánchez, L. (2020). An Updated Overview on the Regulation of Seed Germination. *Plants*, 9(6): 703. doi:10.3390/plants9060703.

Casal, J. y Sánchez, R. (1998). Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research*, 8(3): 317-329. doi: 10.1017/S0960258500004256.

Casal, J. (2013). Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1): 403-427. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120221.

Donohue, K.; Rubio de Casas, R.; Burghardt, L.; Kovach, K. y Willis, C. G. (2010). Germination, Postgermination Adaptation, and Species Ecological Ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1): 293–319. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102209-144715.

Ehrlén, J. (2015). Selection on flowering time in a life-cycle context. *Oikos*, 124(1): 92–101. doi:10.1111/oik.01473.

Finch-Savage, W. E. y Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3): 501-523. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.

Fournier-Level, A.; Korte, A.; Cooper, M. D.; Nordborg, M.; Schmitt, J. y Wilczek, A. M. (2011). A Map of Local Adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 334(6052): 86–89. doi:10.1126/science.1209271.

Heschel, M. S.; Selby, J.; Butler, C.; Whitelam, G. C.; Sharrock, R. A. y Donohue, K. (2007). A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytologist*, 174(4): 735–741. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02044.x

Horton, M. W.; Hancock, A. M.; Huang, Y. S.; Toomajian, C.; Atwell, S., Auton, A.; Mulyati, N. W.; Platt, A.; Speronel, F. G.; Vilhjálmsson, B. J.; Nordborg, M.; Borevitz, J. O. y Bergelson, J. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature Genetics*, 44(2): 212–216. doi:10.1038/ng.1042.

Hu, W.; Franklin, K. A.; Sharrock, R. A.; Jones, M. A.; Harmer, S. L. y Lagarias, J. C. (2013). Unanticipated regulatory roles of *Arabidopsis* phytochromes revealed by null mutant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4): 1542–1547. doi:10.1073/pnas.1221738110

Huang, X.; Schmitt, J.; Dorn, L.; Griffith, C.; Effgen, S.; Takao, S.; Koornneef, M. y Donohue, K. (2010). The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection

on QTLs for seed dormancy. *Molecular Ecology*, 19(7): 1335–1351. doi:10.1111/j.1365-294x.2010.04557.x.

Juenger, T. E.; Sen, S.; Stowe, K. A. y Simms, E. L. (2005). Epistasis and genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica*, 123(1-2): 87–105. doi:10.1007/s10709-003-2717-1.

Jung, J.-H.; Domijan, M.; Klose, C.; Biswas, S.; Ezer, D.; Gao, M.; Khattak, A. K.; Box, M. S.; Charoensawan, V.; Cortijo, S.; Kumar, M.; Grant, A.; Locke, J. C. W.; Schäfer, E.; Jaeger, K. E. y Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science*, 354(6314): 886–889. doi:10.1126/science.aaf6005.

Klupczyńska, E. A. y Pawłowski, T. A. (2021). Regulation of Seed Dormancy and Germination Mechanisms in a Changing Environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3):1357. doi: 10.3390/ijms22031357.

Legris, M.; Klose, C.; Burgie, E. S.; Costigliolo, C.; Neme, M.; Hiltbrunner, A.; Wigge, P. A.; Schäfer, E.; Vierstra, R. D. y Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science*, 354(6314): 897–900. doi:10.1126/science.aaf5656.

Lopez-Arboleda, W. A.; Reinert, S.; Nordborg, M. y Korte, A. (2021). Global Genetic Heterogeneity in Adaptive Traits. *Molecular Biology and Evolution*, 38(11): 4822–4831. doi:10.1093/molbev/msab208.

Malmberg, R. L.; Held, S.; Waits, A. y Rodney, M. (2005). Epistasis for fitness-related quantitative traits in *Arabidopsis thaliana* grown in the field and in the greenhouse. *Genetics*, 171(4): 2013–27. doi: 10.1534/genetics.105.046078.

Meinke, D. W.; Cherry, J. M.; Dean, C.; Rounsley, S. D. y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389): 662, 679–82. doi:10.1126/science.282.5389.662.

Moyers, B. T. y Kane, N. C. (2010). The genetics of adaptation to novel environments: selection on germination timing in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*, 19(7): 1270–1272. doi:10.1111/j.1365-294x.2010.04558.x.

Oh, E.; Yamaguchi, S.; Kamiya, Y.; Bae, G.; Chung, W.-I. y Choi, G. (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 47(1): 124–139. doi:10.1111/j.1365-313x.2006.02773.x.

Oh, E.; Yamaguchi, S.; Hu, J.; Yusuke, J.; Jung, B.; Paik, I.; Lee, H.-S.; Sun, T.-P.; Kamiya, Y. y Choi, G. (2007). PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in Arabidopsis Seeds. *The Plant Cell*, 19(4): 1192–1208. doi: 10.1105/tpc.107.050153.

Oh, E.; Kang, H.; Yamaguchi, S.; Park, J.; Lee, D.; Kamiya, Y.; Choi, G. (2009). Genome-Wide Analysis of Genes Targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during Seed Germination in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(2): 403–419. doi:10.1105/tpc.108.064691.

Sánchez-Lamas, M. (2008). Mapeo y caracterización de mutantes del gen Early Flowering in Short days en Arabidopsis thaliana. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, 2008.

Seo, E.; Lee, H.; Jeon, J.; Park, H.; Kim, J.; Noh, Y.-S. y Lee, I. (2009). Crosstalk between Cold Response and Flowering in Arabidopsis Is Mediated through the Flowering-Time Gene SOC1 and Its Upstream Negative Regulator FLC. *The Plant Cell*, 21(10): 3185–3197. doi:10.1105/tpc.108.063883.

Shu, K.; Liu, X.; Xie, Q. y He, Z. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant*, 9(1): 34–45. doi:10.1016/j.molp.2015.08.010.

Strasser, B.; Sanchez-Lamas, M.; Yanovsky, M. J.; Casal, J. J. y Cerdan, P. D. (2010). Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10): 4776–4781. doi:10.1073/pnas.0910446107.

Tognacca, R. S.; Servi, L.; Hernando, C. E.; Saura-Sanchez, M.; Yanovsky, M. J.; Petrillo, E. y Botto, J. F. (2019). Alternative Splicing Regulation During Light-Induced Germination of Arabidopsis thaliana Seeds. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1076. doi:10.3389/fpls.2019.01076.

Tyler, L.; Thomas, S. G.; Hu, J.; Dill, A.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R.; Sun, T.-P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 135(2):1008-19. doi: 10.1104/pp.104.039578.

Vaistij, F. E.; Gan, Y.; Penfield, S.; Gilday, A. D.; Dave, A.; He, Z.; Josseb, E.-M.; Choi, G.; Halliday, K. J. y Graham, I. A. (2013). Differential control of seed primary dormancy in Arabidopsis ecotypes by the transcription factor SPATULA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26): 10866–10871. doi:10.1073/pnas.1301647110.

Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. y Smith, J. (2002). Principles of Development. Oxford University Press.

Yamaguchi, S.; Smith, M. W.; Brown, R. G. S.; Kamiya, Y. y Sun, T.-P. (1998). Phytochrome Regulation and Differential Expression of Gibberellin 3 β -Hydroxylase Genes in Germinating Arabidopsis Seeds. *The Plant Cell*, 10(12): 2115–2126. doi:10.1105/tpc.10.12.2115.

Yamaguchi, S. y Kamiya, Y. (2002). Gibberellins and Light-Stimulated Seed Germination. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(4), 369–376. doi:10.1007/s003440010035.

Yang, Y.-Y.; Nagatani, A.; Zhao, Y.-J.; Kang, B.-J.; Kendrick, R. E. y Kamiya, Y. (1995). Effects of Gibberellins on Seed Germination of Phytochrome-Deficient Mutants of Arabidopsis thaliana, *Plant and Cell Physiology*, 36(7): 1205–1211. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078877.

Yang, L.; Liu, S. y Lin, R. (2020). The role of light in regulating seed dormancy and germination. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(9): 1310-1326. doi:10.1111/jipb.13001.

Anexo

1. Anexo A

Datos recolectados del ensayo de germinación con ejemplares de F0.

Genotipo	¿Placa con GAs?	Semillas germinadas	n
Col wt	SI	20	20
Col wt	SI	20	20
Col wt	SI	20	20
Col wt	SI	20	20
Col wt	NO	20	20
Col wt	NO	20	20
Col wt	NO	20	20
Col wt	NO	20	20
Ler wt	SI	20	20
Ler wt	SI	20	20
Ler wt	SI	17	20
Ler wt	SI	17	20
Ler wt	NO	20	20
Ler wt	NO	20	20
Ler wt	NO	19	20
Ler wt	NO	16	20
Col abde	SI	16	20
Col abde	SI	20	20
Col abde	SI	18	20
Col abde	SI	17	20
Col abde	NO	0	20
Col abde	NO	0	20
Col abde	NO	0	20
Col abde	NO	0	20
Ler abde	SI	20	20

Ler abde	SI	20	20
Ler abde	SI	19	20
Ler abde	SI	19	20
Ler abde	NO	2	20
Ler abde	NO	1	20
Ler abde	NO	1	20
Ler abde	NO	2	20

2. Anexo B

A. Efecto de la mutante múltiple de fitocromos sobre la respuesta de germinación.

Genotipo	<i>LR Chi-sq</i>	<i>df</i>	<i>p value</i>
Col WT	0	1	1
Col <i>abde</i>	163.5	1	7.8×10^{-37}
Ler WT	0.098	1	1
Ler <i>abde</i>	160.1	1	3.3×10^{-36}

B. Efecto de la adición de giberelinas sobre la respuesta de los genotipos utilizados en este estudio.

Efecto GAs	<i>LR Chi-sq</i>	<i>df</i>	<i>p value</i>
Col con GAs	13.013	1	0.0006
Col sin GASs	221.8	1	8.8×10^{-16}
Ler con GAs	2.2	1	0.14
Ler sin GAs	141.7	1	8.8×10^{-16}