



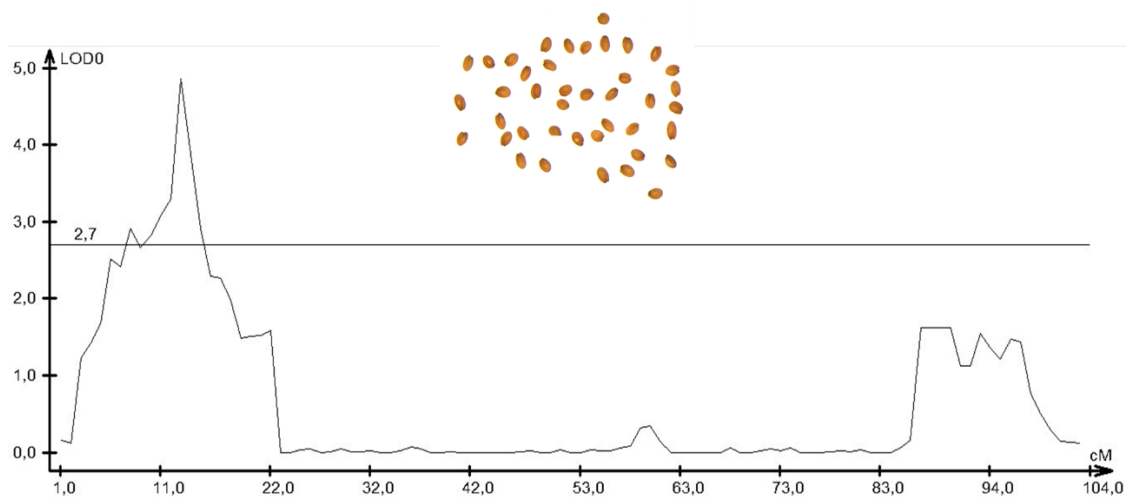
UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Tamaño de semilla en *Arabidopsis thaliana* en variación natural asociada a la respuesta a paclobutrazol

Trabajo Final de Máster – Máster en Biotecnología Molecular
y Celular de Plantas

Valencia, Enero de 2022



Directores:

Pablo Tornero Feliciano

Miguel Ángel Pérez Amador

Autora:

Mercedes Brenes Álvarez

Tutor UPV:

José Miguel Mulet Salort

Resumen

La planta *Arabidopsis thaliana* tiene diversos ecotipos donde Col-0 y Laer destacan como los más utilizados. El tamaño de semilla de ambos ecotipos presenta valores similares en condiciones normales. Sin embargo, se produce una diferencia de tamaño al tratar con Paclobutrazol. Este compuesto inhibe la síntesis de giberelinas, hormonas vegetales implicadas en múltiples procesos de desarrollo de las plantas. Las giberelinas median su acción a través de la degradación de las proteínas DELLA, que son reguladores negativos de estas hormonas. Los tratamientos con paclobutrazol disminuyen los niveles de giberelinas estabilizando a las proteínas DELLA. Estudios previos muestran la implicación negativa de las giberelinas en el tamaño de las semillas, ya que mutantes deficientes DELLA exhiben un tamaño de semilla menor, mientras que el tratamiento con paclobutrazol o mutantes de ganancia de función DELLA provocan un aumento del tamaño de semilla. El objetivo del proyecto es la identificación del gen o genes responsables de la determinación del tamaño de semilla en presencia de PCB. La búsqueda de los genes se realiza aprovechando la variación natural existente entre los ecotipos Col-0 y Laer para el tamaño de semilla. Esto permite el uso de análisis de locus de caracteres cuantitativos (QTLs) para identificar regiones del genoma de *A. thaliana* responsables de la variación del tamaño y posteriormente reducirlas hasta un número limitado de genes.

El estudio de QTL permite identificar genes en el cromosoma uno y dos de *A. thaliana* como posibles responsables en la determinación del tamaño de semilla. Destacan genes relacionados con las giberelinas como *GAI* y *GA3OX1* o genes relacionados con el desarrollo de las semillas como *MFT*. El gen más interesante es *TWN2*, implicado en proliferación celular y desarrollo de embriones.

Palabras Claves: *Arabidopsis*; DELLA; giberelinas; paclobutrazol; variación natural; QTLs; RILs; semilla.

Índice

1.Introducción	4
1.1.Desarrollo de las semillas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.2.Giberelinas	5
1.3.Variación natural.....	8
2.Antecedentes y objetivos	12
3.Materiales y métodos	13
3.1.Material Vegetal.....	13
3.2.Condiciones de crecimiento	13
3.3.Tratamientos químicos con paclobutrazol.....	14
3.4.Poblaciones cruzadas.....	14
3.5.Recolección de semillas	14
3.6.Determinación del tamaño de las semillas : área y perímetro	14
3.7.Determinación del volumen de las semillas	15
3.8.Análisis de QTLs.....	16
3.9.Extracción de ADN	16
3.10.Análisis genómico de las diferentes líneas.....	16
4.Resultados y Discusión	18
4.1.Resultados F1	18
4.2.Estudio del área de las semillas.....	19
4.3.Volumen de las semillas.....	20
4.4.Análisis primera repetición	21
4.4.1.Distribución.....	21
4.4.2.Análisis de QTLs.....	23
4.5.Análisis segunda repetición.....	25
4.5.1.Distribución.....	25
4.5.2.Análisis de QTL 2	26
4.6.Área de semilla en mutantes.....	28
4.7.Discusión.....	34
5.Conclusiones	39
6.Bibliografía	40
7.Anexo	46

1.Introducción

Las semillas son uno de los recursos más relevantes para la sociedad actual. Aproximadamente el 60% del aporte calórico mundial lo proporciona cereales como el arroz, trigo y maíz (FAO, 2021). El tamaño de semilla es uno de los factores que influye en el rendimiento final de la cosecha (Adamski y colbs., 2009). Por ello, el estudio de la determinación del tamaño presenta una gran importancia. Como indica Xia y colbs., (2013), las semillas han variado su tamaño a lo largo de la evolución para adaptarse a las condiciones ambientales adversas. En la actualidad, uno de los objetivos de la investigación científica se centra en conocer los mecanismos moleculares que determinan el tamaño y de esta forma, poder mejorar el rendimiento de los cultivos.

1.1.Desarrollo de las semillas en *Arabidopsis thaliana*

En *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) las semillas se generan a partir de una doble fecundación. Como consecuencia, las semillas maduras están formadas por tres componentes: embrión, endospermo y cubierta, y por lo tanto, el crecimiento de las semillas se encuentra controlado tanto por factores maternos como cigóticos (Orozco-Arroyo y Colbs, 2015; Li y colbs, 2019).

Se han descrito diversas rutas de señalización y factores moleculares que controlan el tamaño de las semillas. Por ejemplo, un citocromo P450 (*KLU*) actúa como regulador materno del tamaño de semilla. Es un factor necesario para el crecimiento de las semillas que funciona de forma independiente al resto de factores maternos. Una mayor expresión de este gen promueve el aumento del tamaño de semilla (Adamski y colbs., 2009). Genes como *ERECTA* (Kawamoto y colbs., 2020) o *MOTHER OF FT (MFT)* (Xi y colbs., 2010) han sido descritos en otros procesos relacionados con el desarrollo de la semilla. *ERECTA* puede actuar como regulador de la densidad de óvulos mientras que *MFT* ha sido descrito como regulador de la germinación de las semillas.

El tamaño de las semillas también se ve condicionado por la actuación de distintas fitohormonas. Los brasinoesteroides han sido descritos como factores implicados en la determinación del tamaño y crecimiento de la semilla en *A. thaliana*. La actividad del factor de transcripción *BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1)* implicado en la ruta de señalización de los brasinoesteroides afecta positivamente al tamaño de la semilla promoviendo la proliferación del embrión (Jiang y colbs., 2013). Por otro lado, componentes de la ruta de señalización de las auxinas, como el gen *AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2)*, también controlan el tamaño de la semilla. Como consecuencia de una pérdida de función completa de dicho gen se produce un aumento en el tamaño (Schruff y colbs., 2006).

Asimismo, otras fitohormonas como las citoquininas y ácido abscísico participan en la determinación del tamaño de la semilla (Orozco-Arroyo y colbs, 2015; Li y colbs., 2019). Recientemente, se ha descrito la implicación de las giberelinas (GA) en el desarrollo de óvulos y semillas (Gomez y colbs., 2016, 2018) (ver antecedentes).

1.2.Giberelinas

Las GAs son diterpenoides tetracíclicos implicados en múltiples procesos de desarrollo de las plantas (Gupta y Chakrabarty, 2013). Promueven la germinación de las semillas y el crecimiento vegetativo, y, también, participan en el control del desarrollo de flores, frutos y semillas. Estas fitohormonas fueron identificadas por primera vez en el año 1926 como sustancias que estimulaban el crecimiento de las plantas (Kurosawa, 1926). En el año 1935 fueron purificadas por primera vez y denominadas giberelinas (Yabuta, 1935). Existen varios tipos de giberelinas y en *A. thaliana*, siendo las más activas la GA1 y GA4 (Sun, 2011).

Los niveles de GAs se regulan mediante la expresión de enzimas biosintéticas y catabólicas. Las GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa son las enzimas limitantes de la biosíntesis de giberelinas activas. Por otro lado, las GA activas son inactivadas por enzimas GA 2-oxidasa (Gupta y Chakrabarty, 2013 ; Hedden y Sponsel, 2015).

Todas estas enzimas están reguladas por un bucle de retroalimentación negativa condicionado por el nivel de hormona (Yamaguchi, 2008; Sun, 2011).

La ruta de señalización de las GAs es otro punto de regulación de sus actuaciones en procesos celulares. En *A. thaliana*, las GAs son reconocidas por tres receptores solubles codificados por los genes: *GID1a*, *GID1b* y *GID1c*. Cuando se produce la unión de las GAs con su receptor se promueve la interacción del complejo GA-GID1 con las proteínas DELLA. Como consecuencia se produce la degradación de las DELLA mediada por el proteosoma 26S (Ueguchi-Tanaka y colbs., 2007; Sun, 2010). Las DELLA son reguladores negativos, por lo que su degradación mediada por GAs permite la respuesta de la hormona. La Figura 1 esquematiza dicho modelo de señalización.

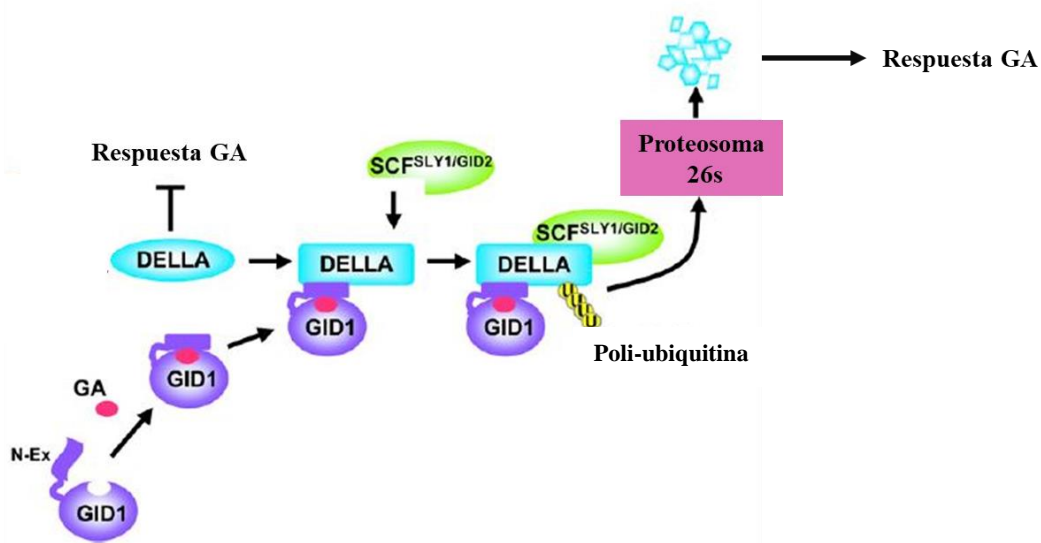


Figura 1. Modelo de señalización de GAs en *A. thaliana*. Las flechas continuas negras indican la continuación de un proceso. La flecha negra cortada indica la inhibición del proceso (Modificado de Sun, 2010).

Las proteínas DELLA pertenecen a la familia de factores de transcripción GRAS (Cenci y Rouard, 2017) y se caracterizan por la presencia del motivo DELLA (Asp-Glu-Leu-Leu-Ala) en su extremo N-terminal. Su extremo C-terminal está ocupado por el dominio GRAS. Estas proteínas no tienen un dominio de unión canónico al ADN, lo que les permite unirse a una amplia variedad de factores de transcripción y otras proteínas. (Vera-Sirera y colbs., 2016).

A. thaliana presenta cinco proteínas DELLA, codificadas por los genes: *GAI* (Peng y colbs., 1997), *RGA* (Silverstone y colbs., 1997; Silverstone y colbs., 1998), *RGL1*, *RGL2* y *RGL3* (Wen y Chang, 2002; Lee y colbs., 2002; Dill y Sun, 2001, respectivamente). Si se modifican las propiedades de las proteínas DELLA o se modifican sus niveles se produce un cambio en la respuesta a GA viéndose afectados todos los procesos celulares que regulan dentro de la planta. Cuando se genera un mutante de ganancia de función de *GAI*, como *gai-1*, se produce un aumento en el tamaño de la semilla. Este mutante no contiene el dominio DELLA, por ello, sus proteínas son estables y no pueden ser degradadas promoviendo el bloqueo de la respuesta a GA (Gomez y colbs., 2016). Este hecho queda ilustrado en la parte superior de la Figura 2 donde se presenta el genotipo control Col-0 (A) y el mutante *gai-1* (B).

Por otro lado, cuando se evita la actuación de las cinco proteínas DELLA en *A. thaliana* en un mutante quintuple DELLA (global) se produce una reducción en el tamaño de las semillas. La Figura 2 muestra en su parte inferior las diferencias en tamaño entre el genotipo control *Laer* (C) y dicho mutante (D).

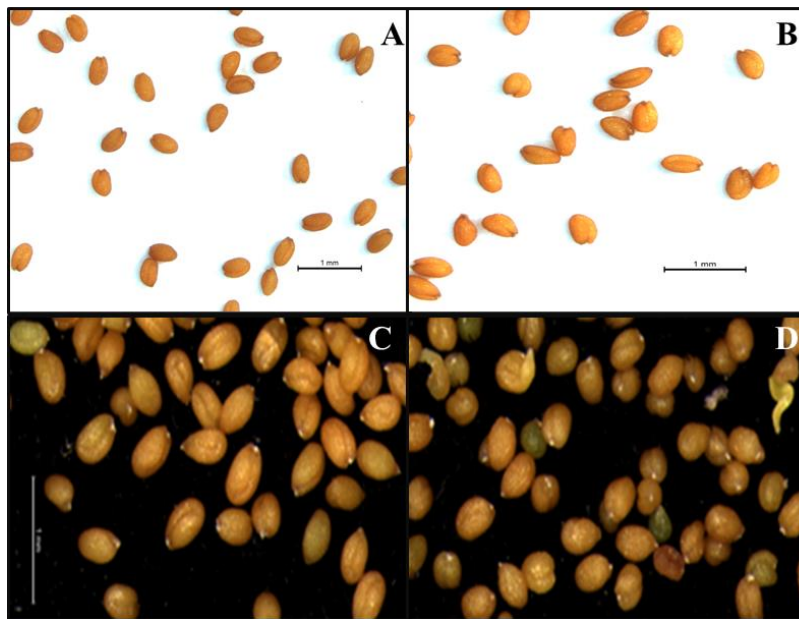


Figura 2. Fotografías de diversos ecotipos y mutantes de *A. thaliana*. La imagen A se corresponde con semillas de Col-0; B semillas del mutante *gai-1*; C semillas de *Laer*; D semillas del mutante quintuple de DELLAS. (Imágenes aportadas por nuestro laboratorio).

1.3.Variación natural

El análisis de caracteres complejos como el tamaño de semilla depende del desarrollo de mutantes con expresión fenotípica y relaciones de epistasia. Estos mutantes están limitados por su fondo genético de procedencia, letalidad y redundancia (Koornneef y colbs., 2004). Como alternativa a las limitaciones anteriores se presenta la variación natural. En el caso de *A. thaliana* se ha demostrado que existe una variación genotípica considerable que permite definir el concepto de ecotipo como líneas homocigóticas silvestres (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000).

Las diferencias entre ecotipos para un carácter determinado permite el estudio del mismo sin mutantes como por ejemplo en el tamaño de semilla (Alonso-Blanco y colbs., 1999). Una de las limitaciones del estudio de este tipo de caracteres era la ausencia de técnicas desarrolladas para el estudio de caracteres cuantitativos. El desarrollo de marcadores moleculares y métodos estadísticos ha permitido el estudio de locus de un carácter cuantitativo (QTL). De esta forma, se han podido estudiar caracteres como el tamaño de semilla (Alonso-Blanco y colbs., 1999) o el tiempo de floración (Weller y Macknight, 2019).

En la actualidad existe una amplia variedad de marcadores moleculares disponibles desarrollados en *A. thaliana* como son los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) (Nam y colbs., 1989) o secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPs) (Konieczny y Ausubel, 1993).

Otro factor necesario para el análisis de QTL es una población segregante derivada de los parentales. El tipo y tamaño de población son factores limitantes en el estudio de QTL, así como la cobertura del mapa genético. Un tipo de población de gran utilidad son las líneas endogámicas recombinantes (RILs) generadas a partir de una F2 de los ecotipos más informativos, en nuestro caso entre Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Laer), en los que se ha propagado eligiendo una única semilla por individuo hasta una F8 (Lister y Dean, 1993). La Figura 3 muestra una representación de este tipo de líneas genéticas. Son altamente homocigóticas y permiten un mejor estudio de las diferencias entre caracteres cuantitativos de estos dos ecotipos. Otra ventaja es que solo tienen que ser genotipadas una vez.

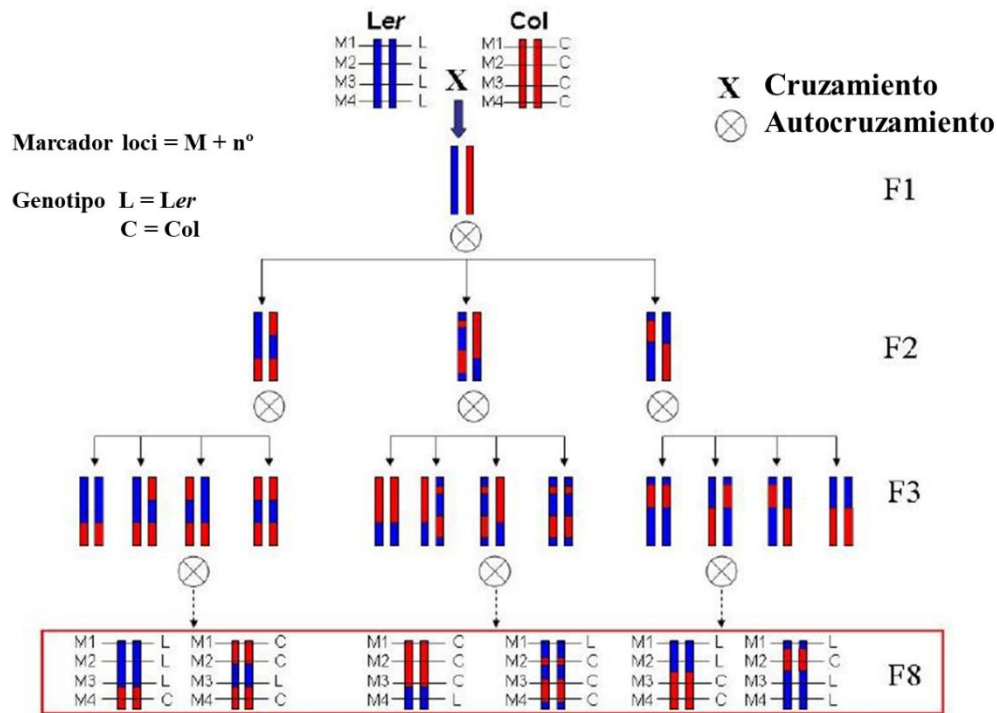


Figura 3. Modelo de formación de las líneas RILs según Lister y Dean, 1993. Los ecotipos Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Laer) actúan como parentales mediante un cruzamiento y autocruzamientos hasta la formación de una F8. Para mayor claridad se ha representado un solo cromosoma de los cinco que tiene *A. thaliana* (Modificado de Shihara, 2007).

Una vez establecido el carácter de interés, las poblaciones segregantes y los marcadores moleculares, se buscan las asociaciones entre ellos mediante métodos estadísticos. Éstos permiten estimar la posición y efecto de los QTL en la variable estudiada. Por ejemplo, el mapeo por intervalos compuestos (CIM) es uno de los métodos más usados (Zeng, 1994).

Los análisis estadísticos aportan como resultado un valor del logaritmo de la probabilidad (LOD), estadístico que indica la presencia de un QTL en una determinada posición. Es el resultado del logaritmo de la ratio entre la probabilidad de que haya un QTL y no lo haya para cada posición entre dos marcadores. Los valores de LOD se representan a lo largo del mapa genético y los que superan un nivel umbral de significancia sugieren la presencia de un QTL. El lugar donde se produce el pico de los valores de LOD es la posición más probable para el QTL. Además, se determina un intervalo de confianza de la posición del QTL debido a que este procedimiento es una estimación (Torres y cols., 2012).

Por ejemplo, la Figura 4 informa sobre la elongación del hipocótilo bajo luz roja de líneas RILs con entrecruzamiento avanzado de *A. thaliana*. La figura muestra la distribución de los valores de LOD a lo largo del genoma de *A. thaliana* y presenta un QTL en el cromosoma uno y otro QTL en el cromosoma dos. (Balasubramanian y colbs., 2009).

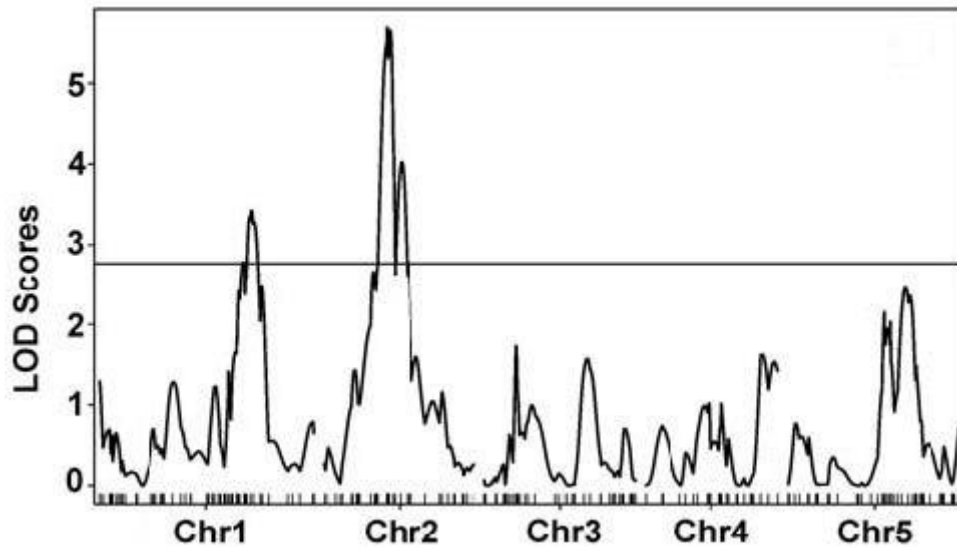


Figura 4. Análisis de QTL para la elongación de hipocótilo de *A. thaliana* en condiciones de luz roja. El eje X representa la distancia en cM de cada cromosoma, indicado con “Chr” y su número. El eje Y representa los valores de LOD como resultado del análisis estadístico. El valor de LOD de significancia está indicado con una línea horizontal continua (Balasubramanian y colbs., 2009).

Los estudios de variación natural (Larkin y colbs., 1996; Koornneef y colbs., 1998) permiten la identificación de locis de los que antes no se conocía la función. Incluso, se puede llegar a “mendelizar” un único QTL, que consiste en construir líneas isogénicas (NILs) cuya única diferencia es una pequeña región del genoma, englobando el QTL de interés. Estas líneas permiten realizar una comparación de genotipos y fenotipos de forma similar a un estudio de mutantes (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000).

El análisis de QTL se encuentra limitado por la diversidad alélica que segrega en los cruces de los parentales de la F2 y los eventos de recombinación en la creación de las líneas RILs. Estas limitaciones afectan a la resolución del mapeo y se han intentado superar con la creación de líneas MAGIC, donde el número de genotipos parentales iniciales es mayor (Beyer y cols., 2008).

Una herramienta alternativa y complementaria a los QTL para el estudio de variación natural son los análisis GWAS (*Genome Wide Association Study*) (Korte y Farlow, 2013).

GWAS permite identificar la correlación entre ecotipos, fenotipos y caracteres a través de SNP (*Single nucleotide polymorphisms*) explorando el genoma completo. Consiste en estudiar ecotipos y comprobar si alguno está relacionado con un carácter de interés. En definitiva es una técnica similar al uso de RILs pero a mayor escala, por ello, es una buena forma de complementar el análisis de QTLs (Challa y Neelapu, 2018). De hecho, mediante un análisis GWAS se ha identificado el gen *CYCB1;4* como factor implicado en el control del tamaño de la semilla en *A. thaliana* (Ren y cols., 2019).

2. Antecedentes y objetivos

Estudios previos en nuestro laboratorio ponen de manifiesto la implicación positiva de las proteínas DELLA en la determinación del tamaño de las semillas. Un mutante deficiente en las cinco proteínas DELLA de *A. thaliana* presenta un tamaño de semilla menor (Gomez y cols., 2016). Esto indica que la presencia de giberelinas afecta a las semillas reduciendo su tamaño.

Esta conclusión previa se refuerza con los resultados obtenidos para el mutante *gai-1* donde el tamaño de semilla es mayor respecto a la estirpe silvestre. Además se ha comprobado que el efecto de *gai-1* es de tipo materno. Por otro lado, el uso del inhibidor paclobutrazol (PCB), que entre otras cosas afecta a la síntesis de giberelinas, ha permitido fenocopiar *gai-1* ya que el tamaño de las semillas de las plantas tratadas aumenta significativamente. Esta variación en el tamaño de la semilla en respuesta al PCB ha sido observada en ecotipos Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Laer) de *A. thaliana*, como consecuencia de la variación natural.

Por todo ello, el objetivo principal de este proyecto es la identificación del gen o genes implicados en la diferencia de tamaño de semilla mediante el análisis de QTLs entre los ecotipos Col-0 y Laer en presencia de PCB.

3. Materiales y métodos

3.1. Material Vegetal

El material vegetal usado en este trabajo comprende los ecotipos Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Laer) del organismo modelo *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. así como, las líneas de inserción de T-ADN de dichos ecotipos descritas en la tabla del anexo 1a. Otra fuente de material vegetal son las líneas endogámicas recombinantes (RILs) descritas en Lister y Dean, (1993). Tanto las líneas de inserción como las RILs fueron adquiridas en Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASc, www.arabidopsis.info). El código de la RIL utilizada es N1899.

3.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas de las líneas RILs se prepararon para la siembra en tubos de 1,5 mL con agarosa al 0,1%. Estos tubos se agitaron brevemente hasta que las semillas se dispersaron por completo y se mantuvieron en frío (4°C) y oscuridad durante seis días. Posteriormente, se sembraron 250 µL de la suspensión de semillas en cada alveolo. Los alveolos estaban rellenos con sustrato (turba, vermiculita y perlita, 2:1:1). De cada línea se sembraron dos grupos de cuatro alveolos, un grupo para el tratamiento control y otro grupo para el tratamiento con paclobutrazol (PCB). Tras la germinación y el establecimiento de plántula, éstas se eliminaron hasta dejar solo una planta por alveolo. Las plantas se crecieron en invernadero suplementando con luces, 22 °C, 16 h, y un periodo de oscuridad a 19 °C, 8h. El riego fue con solución de Hoagland n°1 suplementada con oligoelementos.

Las líneas de T-ADN fueron procesadas de la misma forma.

3.3.Tratamientos químicos con paclobutrazol

Los tratamientos químicos exógenos se realizaron con un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas, PCB. Estos tratamientos se aplicaron de forma exógena cada dos días en las líneas RILs y genotipos mutantes mediante riego, consistente en un 1L de solución nutritiva con PCB a 0,1 μ M. La solución stock de PCB es 10 mM en acetona. Salvo en los casos indicados, todos los reactivos químicos y oligonucleótidos fueron comprados a Sigma (<https://www.sigmaldrich.com/>).

3.4.Poblaciones cruzadas

La obtención de las líneas 1912 x *Laer*, 1909 x *Laer*, *Laer* x 1925, *Laer* x 1909, *Laer* x 1952, *Laer* x 1932, *Laer* x 1912, *Laer* x 1944, *Laer* x 4686 y *Laer* x 1992 se llevó a cabo mediante polinizaciones cruzadas. Éstas se realizaron manualmente, con la ayuda de pinzas y lupa mediante emasculación y polinización con los genotipos correspondientes de forma controlada. Estas líneas, a su vez, se cruzaron con el genotipo *Laer* para la obtención de la segunda generación.

3.5.Recolección de semillas

Tras la fructificación, las plantas adultas fructificadas fueron embolsadas dos semanas antes de finalizar los riegos. Pasadas dos semanas sin riego se recolectaron las semillas y se mantuvieron en una cámara a 28°C durante siete días. Posteriormente, las semillas fueron tamizadas y recolectadas en tubos de 1,5 ml.

3.6.Determinación del tamaño de las semillas : área y perímetro

Mediante el uso de una lupa (Nikon SMZ1270, con referencia: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/es_AMS/products/stereomicroscopes-microscopes/sMZ1270-sMZ1270i), se tomaron fotografías de grupos de 50 semillas de cada genotipo. Las fotografías se procesan con el programa ImageJ (versión 1.53e, <https://imagej.nih.gov/ij/>) para determinar el área y perímetro de las semillas.

Para la obtención de las medidas, el programa ImageJ debe establecer una relación entre distancias y píxeles. Para ello, usamos como escala la proporcionada por el microscopio. De esta forma, el programa puede traducir los píxeles a distancias y cuantificar las medidas de las semillas de las diferentes imágenes adquiridas. Aplicando un umbral a las imágenes se consigue separar de forma más precisa las semillas del fondo y facilitar la obtención de los resultados. El valor umbral se estableció de forma manual observando las imágenes. La Figura del anexo 1a presenta dos imágenes de semillas donde se muestra el tratamiento que el programa realiza a las fotografías.

Se programó un *script* (Anexo, Figura 2a) para generar un macro aplicable en el programa ImageJ y realizar la medida de semillas de múltiples imágenes de forma simultánea. Este paquete de instrucciones permite cuantificar imágenes simultáneamente añadiendo los resultados a una nueva carpeta y mostrándolos directamente en pantalla. Además, permite el ajuste del umbral de cada imagen de forma manual.

3.7. Determinación del volumen de las semillas

El cálculo del volumen de las semillas se realizó según la aproximación indicada en Li y colbs., (2006). La forma de las semillas se considera como un elipsoide, pudiendo así determinar un valor de volumen. Otra aproximación aplicada es suponer que el eje menor (b) es igual a la altura máxima (c), por ello, en nuestro caso $b = c$. De esta forma calculamos el eje mayor (a) y el eje menor (b, c) con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen} = \frac{4}{3} \times \pi \times a \times b \times c$$

Para poder aplicar esta ecuación se usaron los valores de área y perímetro que aportaba ImageJ. Aproximando la semilla como una elipse, se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Perímetro} \approx 2\pi \times \sqrt{\frac{a^2 + b^2}{2}}$$

$$\text{Área} = a \times b \times \pi$$

3.8. Análisis de QTLs

El análisis de locus de un carácter cuantitativo (QTL) se realizó con la ayuda del programa informático WinQTLCart2.5 (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>). Los archivos necesarios para el análisis estadístico y mapeo contenían la información de los genotipos y marcadores moleculares descritos en Singer y cols., (2006). Los parámetros testeados fueron el área y perímetro de las semillas para tratamiento control y tratamiento con PCB, así como, la diferencia de cada carácter con los distintos tratamientos. El método estadístico seleccionado para el análisis de QTL fue el mapeo por intervalos compuestos (CIM) con un valor de significancia de 0.05 y 1000 permutaciones. Las representaciones gráficas de los resultados para cada cromosoma de *A. thaliana* y cada carácter según el tratamiento también fueron generadas utilizando WinQTLCart2.5.

3.9. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron en tubos de 1,5 mL con un volumen inicial de 100 µL de buffer EDM, (Tris-HCl pH 7.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Una única hoja joven fue congelada en cada tubo junto al buffer EDM a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente, fue calentada a 96°C durante 10 minutos y se añadieron 900 µL de buffer TE (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 10 mM). Finalmente, los tubos fueron sometidos a una centrifugación de 2 minutos. La suspensión final contiene el ADN susceptible de su uso en PCR.

3.10. Análisis genómico de las diferentes líneas

Se estudió las diferencias entre los ecotipos Col-0 y *Laer* mediante dos aproximaciones genéticas. En algunos casos, se amplificaron fragmentos genómicos por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con tamaños diferenciales para cada ecotipo (SSLPs, (Knapik y cols., 1998). En otros casos, los fragmentos genómicos amplificados por PCR presentaban un tamaño parecido. Sin embargo, la posterior incubación de estos fragmentos con enzimas de restricción específicas permitía la detección de variantes (dCAPs) (Konieczny y Ausubel, 1993). La tabla 2a del anexo presenta los detalles de cada tipo de amplificación o digestión, así como los oligonucleótidos asociados.

Todos los oligonucleótidos excepto los asociados a los tres marcadores ya descritos fueron diseñados en el laboratorio, detalles indicados en la tabla del anexo 2a. En primer lugar, se buscó en TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) los polimorfismos entre Col-0 y *Laer* asociados a cada gen candidato. Una vez identificado el polimorfismo se introdujo su secuencia en una página para buscar dCAPS (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>). Esta herramienta web permite seleccionar el número de desapareamientos y nos indica las enzimas de restricción necesarias en cada caso. Cuando se seleccionaba el dCAPS y la enzima se comprobaba otros posibles sitios de corte de la enzima en el gen de interés y que pudiera afectar al resultado. Para ello, se usaba la página web Webcutter 2.0 (<http://heimanlab.com/cut2.html>). Finalmente, la secuencia seleccionada se introducía en la herramienta de diseño de oligonucleótidos de NCBI ([Primer designing tool, \(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)).

Los oligonucleótidos diseñados para el gen *GA20OX4* (*At1g60980*) se diseñaron a partir de la secuencia de inserción con la herramienta web de SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) y la herramienta de NCBI del caso anterior, buscando un producto de amplificación de 500-1000 pares de bases alrededor de la inserción.

Las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos con un volumen final de 21 μ L, usando 1 μ L de ADN genómico extraído de una hoja joven (ver Extracción de ADN), los oligonucleótidos mostrados en el Anexo (Tabla 2a) a una concentración final de 0,2 μ M y la enzima polimerasa Taq con el buffer correspondiente. Se utilizaron 35 ciclos de amplificación, con 30 segundos de elongación y temperaturas de hibridación ajustadas a cada pareja de oligonucleótidos (ver Tabla 2a). En caso de necesitarse la incubación con enzimas de restricción específicas, tras la PCR se añadieron directamente a cada pocillo 4 μ L de mezcla de reacción que incluía el tampón específico para cada enzima y 0,5 U de enzima de restricción. Posteriormente, la reacción fue incubada en la propia placa multipocillo durante 1h a 37 °C.

Los fragmentos amplificados por PCR o resultado de la digestión de dichos fragmentos fueron analizados mediante electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa al 2% corriendo en TBE 0.5x (45 mM Tris, 45 mM H₃BO₄ y 1 mM EDTA). En el caso del gen *At1g60980* los geles de agarosa se usaron en una concentración al 1%.

4.Resultados y Discusión

4.1.Resultados F1

Como ya se ha comentado, la presencia de la variación natural en *A. thaliana* es debida a la aparición de diversos ecotipos. Estos ecotipos presentan variaciones en el tamaño de semilla, por ejemplo, Col-0 y *Laer* (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000). La diferencia de tamaño en situaciones control de estos ecotipos no es considerable, sin embargo, estudios previos en nuestro laboratorio han exhibido una respuesta diferencial de cada ecotipo al PCB. Este compuesto provoca una variación en el tamaño de la semilla siendo su respuesta más acentuada en Col-0, según se ha detallado en los antecedentes. Además, estos estudios han demostrado la influencia de efectos maternos de las DELLA en el tamaño de semillas al obtener las F1.

Se realizó un experimento con Col-0 y *Laer* como controles y sus respectivas F1 para confirmar estos estudios previos. Cuando las plantas comenzaron a florecer se regó un lote de semillas con PCB 1 μ M en solución nutritiva y otro lote control solo con solución nutritiva. Cuando las plantas fructificaron se embolsaron y se continuaron regando durante dos semanas. Posteriormente, pasadas dos semanas sin riego, las semillas fueron recolectadas. Parte de este trabajo lo realizó Doña Laura Roldán, técnico de laboratorio.

Transcurrido el tiempo de secado de las semillas, se tamizaron y recolectaron para facilitar el conteo a la lupa. De cada genotipo se fotografiaron 150 semillas en grupos de 50 semillas. Las imágenes obtenidas fueron procesadas por el programa Image J y el script del Anexo 2a.

La Figura 5 muestra los resultados para área de semilla de este experimento. Se puede observar una respuesta diferente entre los ecotipos control, Col-0 y *Laer*, reforzando los resultados previos de nuestro laboratorio. Cuando se analizan los resultados de la F1 se visualiza una variación en la respuesta a PCB cuando Col-0 actúa como parental femenino. De esta forma, se comprueba la influencia de factores maternos en la respuesta diferencial a PCB entre estos ecotipos de *A. thaliana*. La Tabla del Anexo 2a recoge los resultados del análisis estadístico aplicado. Estos resultados suponen el punto de partida para el futuro análisis de QTL y la búsqueda de genes implicados en la determinación del tamaño de semilla.

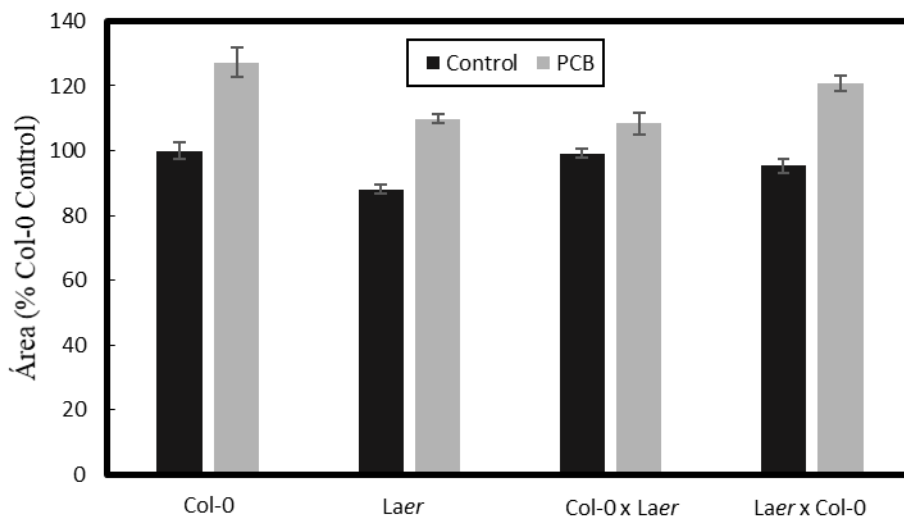


Figura 5. Representación de Col-0, Laer y sus respectivas F1 en función de Col-0 con valores de área. El grafico recoge en el eje X los distintos genotipos para el tratamiento control y PCB. El eje Y representa los valores de área de cada genotipo en función del valor de área en situación control de Col-0. En las F1, el primer parental es masculino, y el segundo femenino.

4.2. Estudio del área de las semillas

Cómo se menciona en materiales y métodos, cuatro plantas de cada RILs fueron crecidas en condiciones de invernadero. La recolección y procesamiento de las semillas se realizó de la misma forma en todos los casos.

Las variaciones en el tamaño de semilla entre ecotipos genera una pregunta acerca de las posibles deformaciones que pueden aparecer en las semillas. Para responder a esta pregunta se aproximó la semilla como una elipse y se aplicaron las fórmulas presentadas en materiales y métodos. Al aplicar estas fórmulas se pudo calcular el eje mayor y menor de cada semilla y comprobar si existían desviaciones en la forma de las semillas.

La comprobación de las desviaciones de la forma se realiza analizando la ratio entre el eje mayor y el eje menor de cada semilla y observando si al representar los datos siguen una distribución lineal. En nuestro caso, no se produce una desviación de la forma al presentar los datos una distribución lineal como se presenta en la Figuras 3a y 4a del Anexo. La Figura 6 presenta la media de la ratio de los ejes de cada condición y se comprueba que no existen diferencias significativas entre ellas. Los resultados estadísticos se presentan en la Tabla 4a del Anexo. Por tanto, no se produce una deformación en la forma de las semillas en todas las condiciones estudiadas.

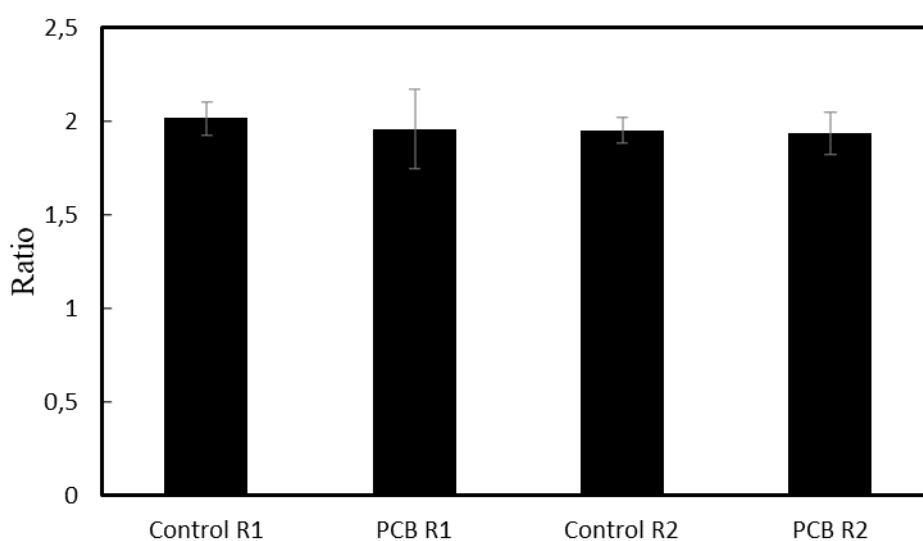


Figura 6. Representación valores medios de la ratio de los ejes de las semillas de *A. thaliana*. El eje Y representa los valores de ratio y el eje X las condiciones del experimento. R1 se corresponde con la primera repetición y R2 con la segunda repetición.

4.3.Volumen de las semillas

Las medidas de tamaño de semilla que obtenemos de forma directa tras el procesamiento de las imágenes son área y perímetro. Basándonos en el artículo de Li y cols., (2006) se aproximaron los valores de volumen para cada línea RILs. Asumiendo la forma elipsoide de las semillas.

Sin embargo, finalmente tras los cálculos realizados y una vez aplicado el análisis de QTL se desestimaron estos resultados por la gran variabilidad que presentaban. Por tanto, las dos medidas aportadas por el programa directamente, área y perímetro, fueron las

seleccionadas como de interés. Los análisis mostrados como principales y en los cuales basaremos la discusión del proyecto son los relativos al área. Nuestro objetivo final es conocer las variaciones en el tamaño de las semillas y el área es la variable más interesante en nuestro caso.

4.4. Análisis primera repetición

4.4.1. Distribución

La primera repetición del estudio de RILs estaba constituida por 89 líneas. La Figura 7 muestra líneas RILs en condiciones de invernadero así como sus semillas. Los datos obtenidos tras el procesamiento de las fotografías con el programa ImageJ muestran un mayor tamaño de semilla en el tratamiento con PCB. La Tabla 1 presenta los resultados obtenidos para las líneas 1909, 1992 y los controles (Col-0 y *Laer*). Al inhibir la síntesis de GA con el tratamiento con PCB simulamos un efecto causado por mutantes constitutivos DELLA, confirmando la implicación negativa de las GA en el tamaño de las semillas (Gomez, y cols., 2016).

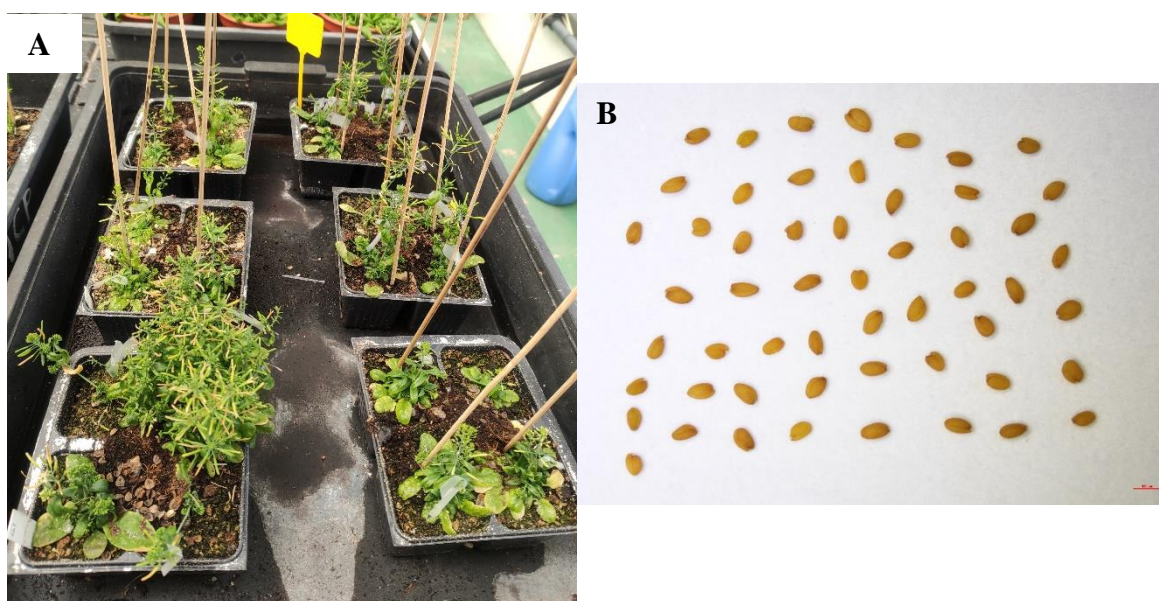


Figura 7. Fotografía de plantas RILs y sus semillas de la primera repetición. La imagen A presenta seis líneas RILs en condiciones de invernadero. La imagen B muestra las semillas de la línea 1992 tras el tratamiento con PCB.

Genotipo	Control	PCB
Col-0	117.078	146.006
Laer	112.384	125.183
1909	114.193	142.359
1992	106.860	120.470

Tabla 1. Valores de área en μm^2 en situaciones control y PCB.

Los valores de área tanto en condición control como con PCB se muestran en las distribuciones de frecuencia de la Figura 8. Se observa una mayor frecuencia de valores de área comprendidos entre los 120.000-130.0000 μm^2 en ambos tratamientos. Los valores de área para PCB aparecen en valores superiores alcanzando niveles como 180.000 μm^2 . Estos resultados nos vuelven a confirmar el efecto del PCB y la implicación negativa de las GA en la determinación del tamaño de la semilla.

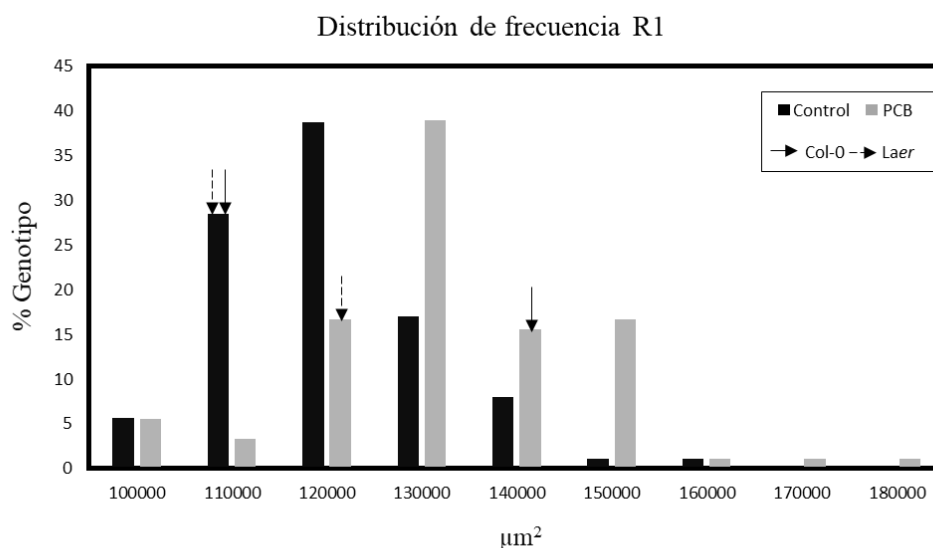


Figura 8. Distribución de frecuencia para el área de la primera repetición en tratamiento control y PCB. El eje X representa los μm^2 de área y el eje Y el porcentaje de genotipos. En negro se presentan los datos para el tratamiento control y en gris el tratamiento con PCB. Los controles Col-0 se indican con flechas continuas y en discontinua para Laer, para ambos tratamientos.

4.4.2. Análisis de QTLs

Los datos anteriores de área y perímetro para tratamiento control y tratamiento con PCB fueron procesados para el análisis de QTL. También, se usó la diferencia de cada carácter con los distintos tratamientos. El análisis se realizó con el programa WinQTLCart2.5 y el método estadístico de mapeo por intervalos compuestos (CIM). El valor de significancia seleccionado fue 0,05 y 1000 permutaciones.

Las Figuras 5a, 6a y 7a del Anexo muestran los resultados combinados de área y perímetro para el tratamiento control, PCB y la diferencia PCB-control. Destacamos el tratamiento con PCB donde se presentan el mismo número de QTL por cromosoma pero desplazados en área y perímetro. En el caso de la diferencia se presentan dos perfiles solapantes para el área y el perímetro. Ambos resultados nos permiten seleccionar el QTL del cromosoma uno como más interesante. La Figura 9 muestra el resultado del análisis de QTL para la diferencia entre tratamiento control y PCB del área en dicho cromosoma.

En el cromosoma uno de *A. thaliana* se observa un pico con un valor de LOD de 4,85 que indica la presencia de un QTL. Este pico se encuentra delimitado por marcadores moleculares en los genes *At1g13500* y *At1g18440*, lo que permite conocer su posición en el genoma. Seguidamente, se identificaron los genes presentes en dicha región del genoma.

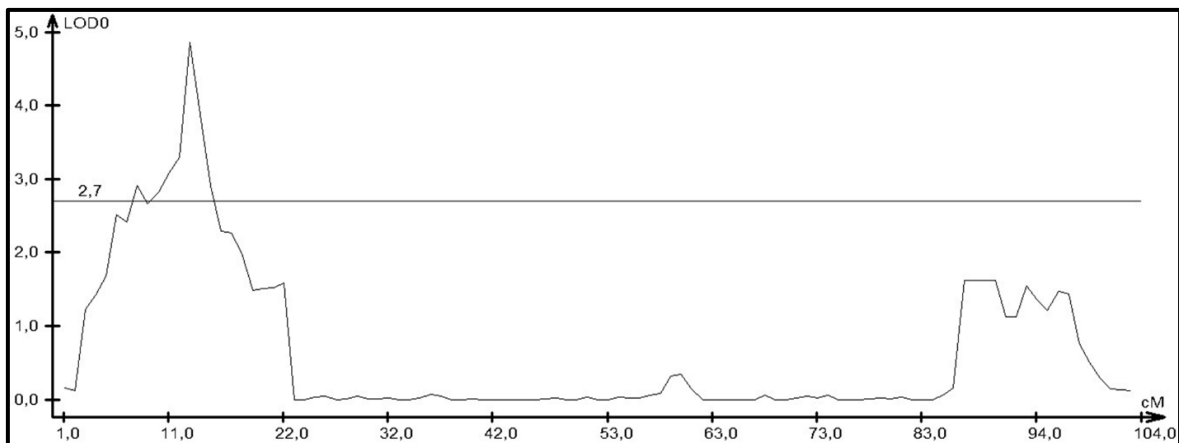


Figura 9. Resultado análisis de QTL para el área en la diferencia entre tratamiento control y PCB de la repetición 1, cromosoma uno. El eje X representa la distancia en cM y el eje Y representa los valores de LOD como resultado del análisis CIM. El valor de LOD de significancia está indicado con una línea horizontal continua. La flecha indica el posible QTL de interés con un valor de LOD = 4,85.

Este QTL delimita las posiciones 4.628.059-6.346.238 pb del genoma de *A. thaliana*. En este intervalo se buscaron genes relacionados con las GA y el desarrollo de semillas. Los genes implicados en la biosíntesis y señalización de GA, así como, en el desarrollo de óvulos o semillas pueden ser unos buenos candidatos para la determinación del tamaño de semilla. La selección de estos genes es una primera aproximación en la búsqueda de los responsables del tamaño de semilla. Los genes identificados se muestran en la Tabla 2.

Gen	Código AGI	Función
<i>GAI</i>	<i>At1g14920</i>	Señalización GA
<i>GA3OX1</i>	<i>At1g15550</i>	Biosíntesis GA
<i>HLL1</i>	<i>At1g17560</i>	Desarrollo del óvulo
<i>TWN2</i>	<i>At1g14610</i>	Proliferación celular
<i>KLU</i>	<i>At1g13710</i>	Megagametogenesis y control materno del tamaño de semilla
<i>MFT</i>	<i>At1g18100</i>	Control germinación de la semilla
<i>INP2</i>	<i>At1g15320</i>	Formación del polen

Tabla 2. Genes comprendidos en la región 4.628.059- 6.346.238 del genoma de *A. thaliana*. La tabla recoge el código AGI de cada gen, función y nombre común.

Los dos primeros genes presentes en la Tabla 2, *GAI* (Peng y cols., 1997) y *GA3OX1* (Matsushita y cols., 2007) están implicados de forma directa en la síntesis y señalización de GA. Como se indicó en antecedentes el mutante *gai-1* presenta un mayor tamaño de semilla, por ello, se postula al gen *GAI* como uno de los principales candidatos en la determinación del tamaño de semilla. *KLU* es otro de los genes descritos con implicación en el tamaño de semilla (Adamski y cols., 2009) y su aparición en el análisis de QTL sugiere su posible implicación como componente en el control del tamaño por GAs.

No tenemos certeza de que el carácter tamaño de semilla esté determinado por un único gen, y por tanto, es interesante comprobar la implicación de otros genes como *HLL1* (Schneitz y cols., 1998) o *MFT* (Xi y cols., 2010) que participan en otros procesos relacionados con el desarrollo de las semillas. *TWN2* es un gen implicado en proliferación celular y por ello, también lo consideramos de interés (Zhang y Somerville, 1997), al igual que *INP2* (Lee y cols., 2021).

4.5. Análisis segunda repetición

4.5.1. Distribución

Antes de realizar estudios específicos con estos genes de interés se analizó una segunda repetición de líneas de RILs. El mismo procedimiento de análisis se aplicó a las 91 líneas RILs disponibles en la segunda repetición debido a las condiciones de invernadero.

Las distribuciones de frecuencia para el área de esta repetición se muestran en la Figura 10. De nuevo se observa una evidente diferenciación entre el tratamiento control y PCB. En el primero los valores de área son cercanos a 110.000-130.000 μm^2 . Justo a partir de estos valores es cuando se observa la distribución de área para el tratamiento con PCB. Esta repetición muestra una diferenciación más acentuada entre ambos tratamientos.

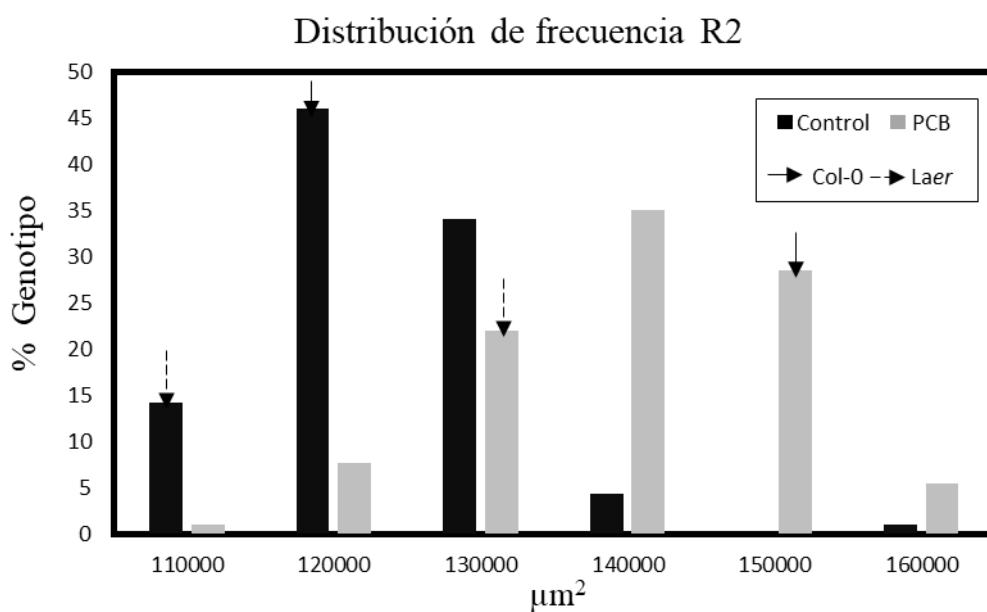


Figura 10. Distribución de frecuencia para el área de la segunda repetición en tratamiento control y PCB. El eje X representa los μm^2 de área y el eje Y el porcentaje de genotipos. En negro se presentan los datos para el tratamiento control y en gris el tratamiento con PCB. Los controles Col-0 se indican con flechas continuas y en discontinua para Laer, para ambos tratamientos.

4.5.2. Análisis de QTL 2

El análisis de QTLs para la segunda repetición se realizó bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente. Las Figuras 8a, 9a y 10a del Anexo muestran los resultados del análisis para tratamiento control, PCB y diferencia de área y perímetro. En el caso del tratamiento control se observa un perfil similar para área y perímetro, sobre todo en el cromosoma uno donde tenemos un QTL de interés. La única diferencia presente se encuentra en el cromosoma dos donde el perímetro presenta un QTL y el área no. El tratamiento con PCB no presenta grandes diferencias entre el perfil de área y perímetro. Por último, el resultado combinado de las diferencias muestra el mismo perfil tanto para área como para perímetro. Sin embargo, el QTL del cromosoma dos se encuentra más acentuado para el perímetro.

Al centrarnos en los resultados del análisis para el área obtenemos la Figura 11. Esta figura muestra el cromosoma uno en tratamiento control y PCB. Se observa la presencia de dos picos solapantes entre ellos en su totalidad. Los QTLs presentan un valor de LOD de 5,11 para el control y de 4,68 para PCB. Esto podría indicar que la presencia del QTL es independiente del tratamiento con PCB.

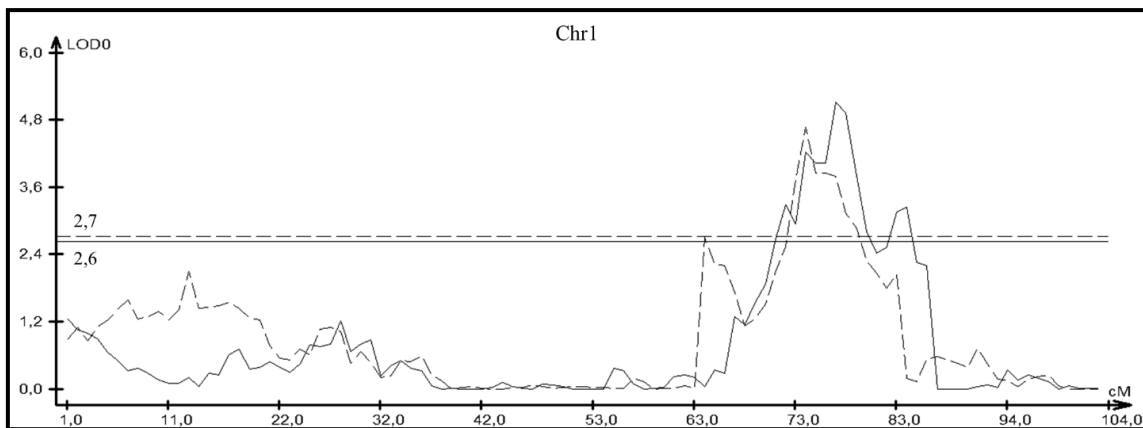


Figura 11. Resultado análisis de QTL para el área en el cromosoma uno en situación control y PCB de la segunda repetición. El eje X representa la distancia en cM en el cromosoma uno. El eje Y representa los valores de LOD como resultado del análisis CIM. La situación control se representa con línea continua y la situación con PCB en línea discontinua. Los niveles de significancia de LOD se presentan con líneas horizontales según la situación.

Esta región seleccionada como un posible QTL de interés se encuentra flanqueada por marcadores moleculares en los genes *At1g61230* y *At1g69840*. La región del genoma de *A. thaliana* abarca el intervalo comprendido entre las posiciones 22.231.127 y 25.946.124 pb. En este intervalo se consideraron como genes de interés los mostrados en la Tabla 3.

Gen	Código AGI	Función
<i>GA20OX4</i>	<i>At1g60980</i>	Biosíntesis GA
<i>RGL1</i>	<i>At1g66350</i>	Señalización GA
<i>PHE1</i>	<i>At1g65330</i>	Desarrollo de gametos y semilla

Tabla 3. Genes comprendidos en el intervalo delimitado por los marcadores *At1g61230* y *At1g69840*. La tabla recoge el código AGI de cada gen, función y nombre común.

Destacan genes implicados con las GAs de forma directa al igual que en los primeros resultados. *GA20OX4* (Lange y Ghassemian, 2003) está implicado en la biosíntesis de GA y *RGL1* (Wen y Chang, 2002) en su señalización. Por otro lado, *PHE1* es un gen participe del desarrollo de gametos y semillas, lo que podría facilitar su implicación en la determinación del tamaño de semilla (Köhler y cols., 2003). En resumen, tenemos posibles genes candidatos relacionados con GAs y un gen implicado en desarrollo de semilla. A pesar de no coincidir este intervalo con el primero presenta genes con funciones similares.

Esta segunda repetición ofrece otro QTL de interés en el cromosoma dos para la diferencia en el área como muestra la Figura 12. El pico de interés presenta un valor de LOD de 4,39 y está delimitado por marcadores moleculares en los genes *At2g25130* y *At2g30240*. Las posiciones en el genoma están comprendidas entre 10.644.335 y 12.850.160 pb.

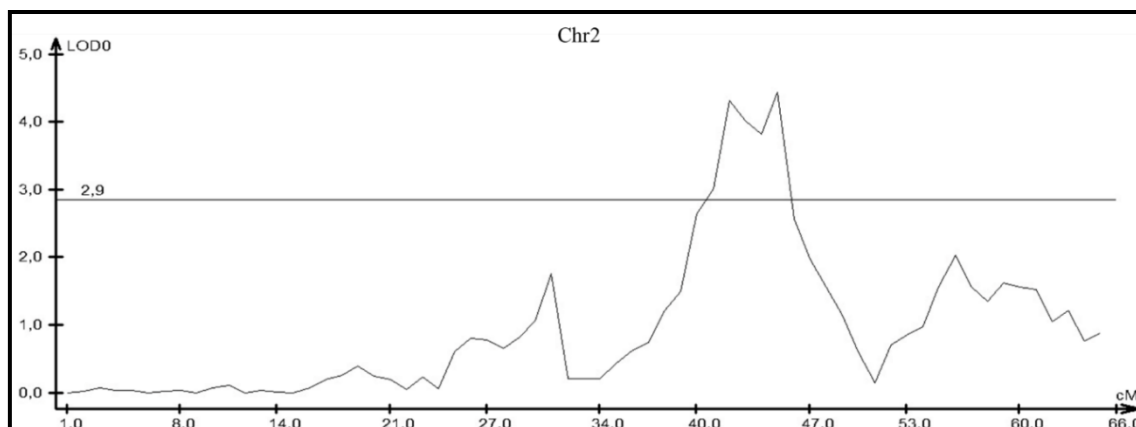


Figura 12. Resultado análisis de QTL para el área en la diferencia de la segunda repetición. El eje X representa la distancia en cM en el cromosoma 2. El eje Y representa los valores de LOD como resultado del análisis CIM. El valor de LOD de significancia está indicado con una línea horizontal continua, en esta ocasión 2,9.

Este intervalo presenta dos genes interesantes para el control del tamaño de semilla. *ERECTA* (*At2g26330*) está implicado en proliferación celular y morfogénesis, por ello, podría ser interesante su función en el desarrollo de la semilla (Kawamoto y cols., 2020). *SOD2* (*At2g28190*) codifica una superóxido dismutasa que participa en el control materno del desarrollo de óvulos y crecimiento de la semilla (Du y cols., 2014). Ambos genes, podrían resultar ser los responsables de la determinación del tamaño de la semilla.

4.6. Área de semilla en mutantes

Tras el análisis de QTLs y una vez seleccionados los genes de interés de cada intervalo, se procedió a la adquisición de mutantes de cada gen. Estos mutantes fueron tratados bajo las mismas condiciones de invernadero que las F1 y líneas RILs. Además, los tratamientos con PCB y el proceso de recogida y tratamiento de semillas fueron idénticos. Todos los resultados de los análisis estadísticos de los mutantes se muestran en la Tabla 5a del Anexo.

El primer QTL en el cromosoma uno encontrado en la primera repetición permitió destacar los siguientes genes de interés: *GAI*, *TWN2*, *GA3OX1*, *MFT*, *INP2*, *HLL1* y *KLU*. Las semillas de estos mutantes fueron procesadas por el programa ImageJ para obtener los valores de área y perímetro en situación control y tratamiento con PCB. Estos datos se usaron para obtener el valor de la diferencia entre ambos tratamientos para el área de

los mutantes. Las Figuras 13 y 14 presentan estos valores en función del fondo genético de cada mutante.

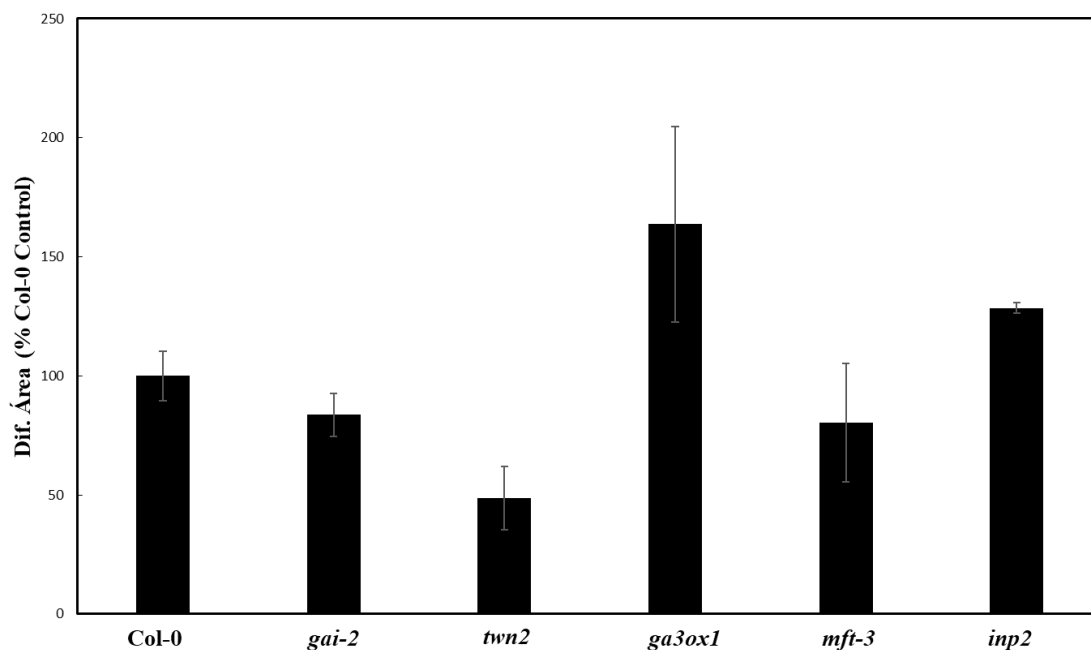


Figura 13. Representación del área de semilla como la diferencia entre PCB y control del QTL en el cromosoma uno de la primera repetición. Los valores de los mutantes están expresados en función de su fondo genético, en este caso Col-0. El eje X recoge los distintos genotipos y el eje Y el valor de área.

La Figura 13 muestra los resultados para los mutantes *gai-2*, *twn2*, *ga3ox1*, *inp2* y *mft-3*. Se puede observar una respuesta diferencial al PCB de los mutantes *gai-2*, *inp2* y *mft-3* respecto al control Col-0. Como indica la Tabla del Anexo 5a, las diferencias para los mutantes *gai-2* y *mft-3* no son estadísticamente significativas. Sin embargo, *inp2* si presenta una respuesta significativa. Estos resultados son producto de un único experimento.

Los dos mutantes que verdaderamente llaman la atención son *twn2* y *ga3ox1*. El primero de ellos, exhibe respuesta parcial a PCB, mucho menor que el control Col-0. Además, tras la aplicación del test estadístico t-Student se comprobó que esta respuesta era muy significativa. El segundo, *ga3ox1*, presenta un comportamiento totalmente contrario donde se produce una mayor respuesta al PCB.

Por otro lado, la Figura 14 presenta los resultados obtenidos para los mutantes *hll-1* y *klu-2* en función de su fondo genético, *Laer*. Ambos mutantes presentan una respuesta significativa respecto al control, destacando *klu-2*, con una reducción de respuesta de un 50% con respecto a *Laer*.

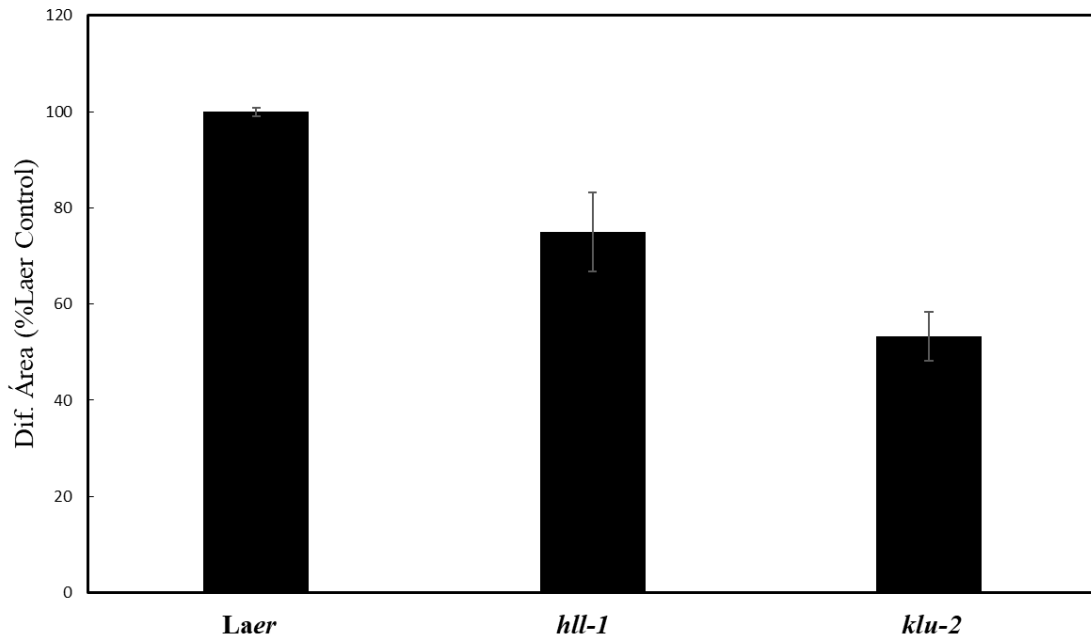


Figura 14. Representación del área de semilla como la diferencia entre PCB y control del primer QTL. Los valores de los mutantes están expresados en función de su fondo genético, en este caso *Laer*. El eje X recoge los distintos genotipos y el eje Y el valor de área.

En el segundo QTL de la repetición 2 seleccionamos como genes de interés a *RGL1*, *GA20OX4* y *PHE*. Únicamente se pudieron obtener semillas de los dos primeros genes. En el caso del gen *GA20OX4* solo se disponía de un mutante heterocigoto y se ha tenido que obtener el homocigoto, por ello, no disponemos de los resultados finales de área para este mutante.

El gen *RGL1* se obtuvo y procesó al igual que el resto de mutantes. La Figura 15 muestra los resultados para la diferencia entre los valores de área de PCB y control del mutante *rgll-2* en función de su fondo genético. El mutante *rgll-2* no exhibe una respuesta significativa respecto al control Col-0.

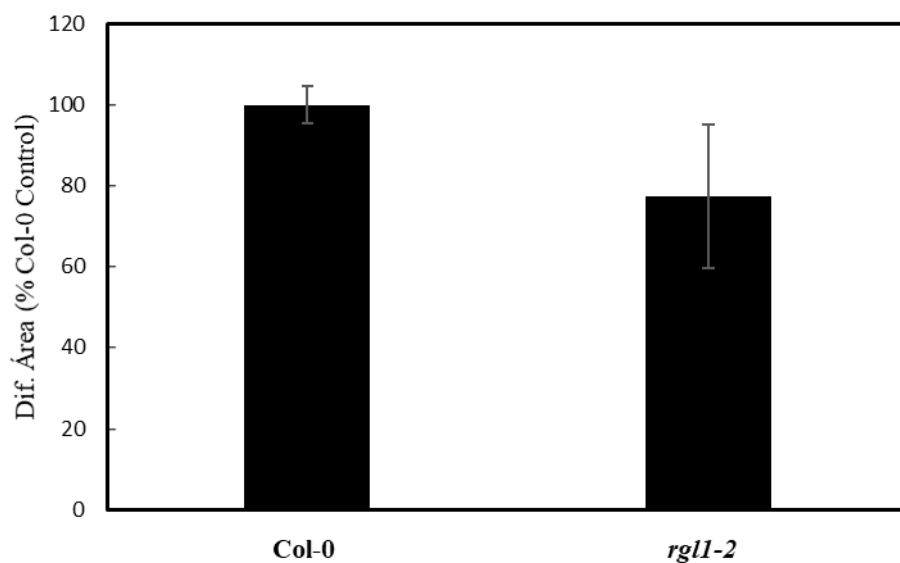


Figura 15. Representación del área de semilla como la diferencia entre PCB y control del segundo QTL. Los valores de los mutantes están expresados en función de su fondo genético, en este caso Col-0. El eje X recoge los distintos genotipos y el eje Y el valor de área.

El tercer QTL citado en este proyecto es el correspondiente al cromosoma dos de la segunda repetición. El intervalo seleccionado nos permitió destacar como genes de interés a *SOD2* y *ERECTA*. Los resultados del tratamiento de sus semillas se muestran en dos figuras distintas al haberse realizado los experimentos en distintos tiempos y cada uno con sus controles.

La Figura 16 presenta los resultados obtenidos para dos alelos mutantes del gen *SOD2*. La información completa de estas dos inserciones se puede adquirir en NASC a través de sus respectivos códigos: N665863 y N667261.

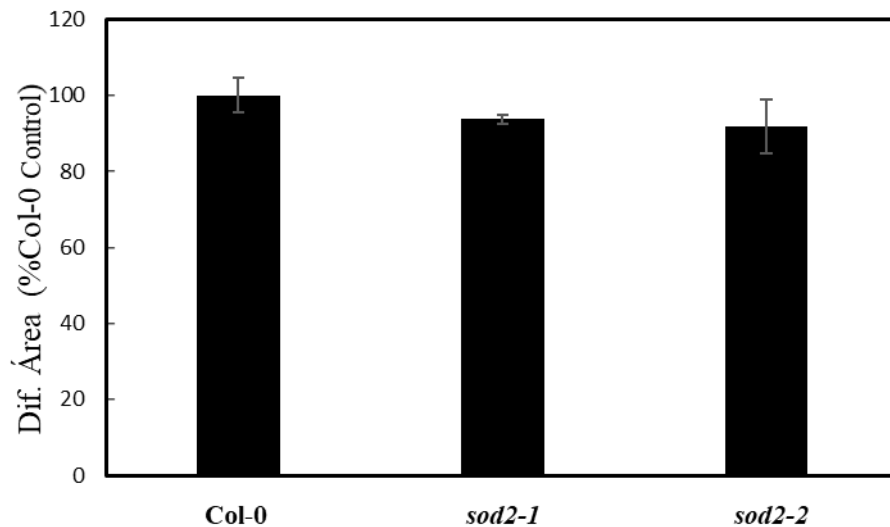


Figura 16. Representación del área de semilla como la diferencia entre PCB y control del tercer QTL (Col-0). Los valores de los mutantes están expresados en función de su fondo genético, en este caso Col-0. El eje X recoge los distintos genotipos y el eje Y el valor de área.

Los resultados para la diferencia del área en función de Col-0 control muestran una respuesta similar al PCB de ambos mutantes del gen *SOD2* (p-valor = 0,6796). Incluso, esta respuesta es prácticamente igual a la producida por el control Col-0. Esta representación se complementa con el t-Student que afirma estos resultados. Por ello, no se obtienen diferencias significativas para este gen.

A continuación, se muestra en la Figura 17 los resultados obtenidos para el gen *ERECTA*. Esta figura muestra la diferencia entre los valores de área de PCB y control en función del control Col-0. En este caso, se observa una diferencia significativa entre el valor control y el valor ofrecido por el mutante Col-*er*. Se puede afirmar que existe una respuesta diferencial a PCB del gen *ERECTA*.

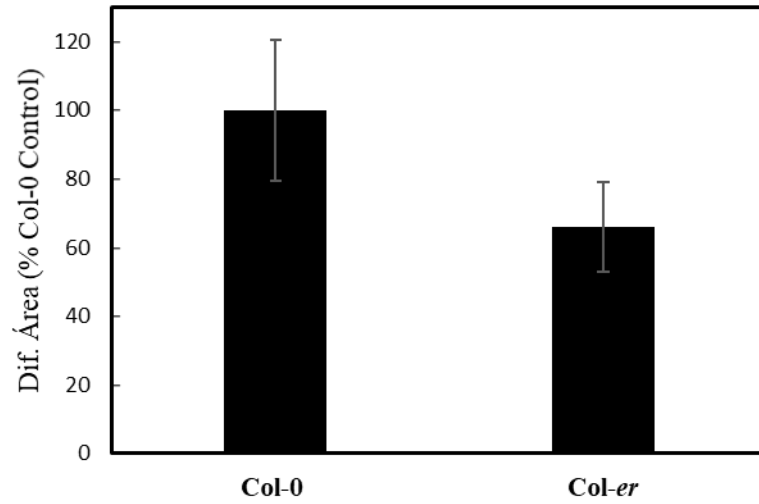


Figura 17. Representación del área de semilla como la diferencia entre PCB y control: Col-0 y Col-er. El valor del mutante Col-er está expresando en función de su fondo genético Col-0. El eje X recoge los distintos genotipos y el eje Y el valor de área.

4.7. Discusión

El análisis de QTL de las líneas RILs ha permitido identificar los posibles genes implicados en la determinación del tamaño de semilla. Un punto clave para determinar la importancia de un QTL o sus posibles candidatos es la elección del QTL de mayor interés. Por ejemplo, en la primera repetición únicamente se seleccionó el QTL presente en la primera parte del cromosoma uno debido a su aparición continua en varias condiciones. Sin embargo, el tratamiento con PCB en el área también presentó un QTL al final del cromosoma uno. Este pico es similar al presentado y destacado como de interés en la segunda repetición, que afecta al final del cromosoma uno.

La figura 18 muestra la combinación de los resultados de PCB de la primera repetición y control de la segunda repetición. Estas figuras son producto del tratamiento de los datos para debatir los resultados y las diferencias entre ambas repeticiones.

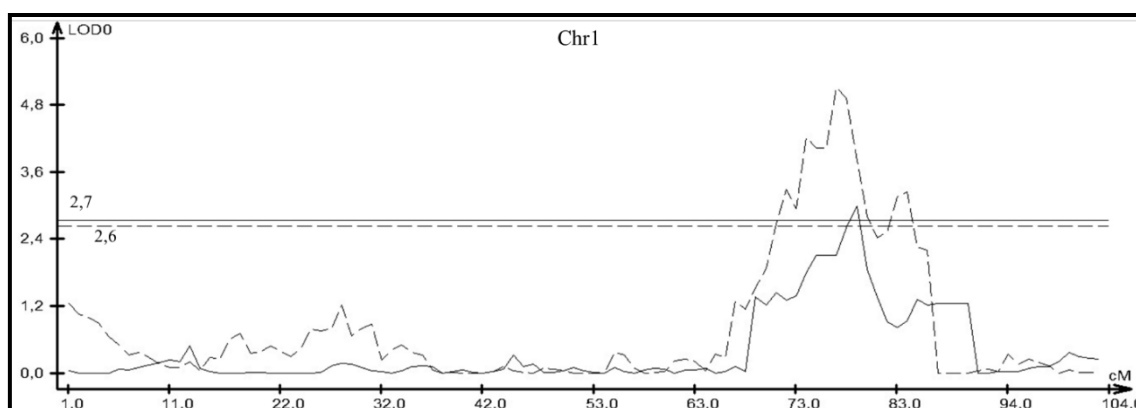


Figura 18. Resultado análisis de QTL para el área en el cromosoma 1 en PCB (1ª Repetición) y control (2ª Repetición). El eje X representa la distancia en cM en el cromosoma 1. El eje Y representa los valores de LOD como resultado del análisis CIM. La situación control se representa con línea discontinua y la situación con PCB en línea continua. Los niveles de significancia de LOD se presentan con líneas horizontales según la situación.

Se observa un ligero solapamiento entre ambos picos lo que podría indicar la mayor relevancia de este QTL en la determinación del tamaño de semilla al presentarse en las dos repeticiones. La ausencia de este QTL en un mayor número de condiciones de la primera repetición se puede deber a las condiciones adversas que tuvieron lugar en la primera repetición. Problemas en las instalaciones de invernadero provocaron la pérdida de algunas de las líneas RILs y falta de homogeneidad en la aplicación del tratamiento en algunos casos. Esto justifica la falta de respuesta de un número muy limitado de líneas RILs al PCB en la primera repetición, pudiendo afectar a la aparición de este QTL.

A pesar de estas condiciones el resultado del análisis de QTLs ha permitido centrar la atención en el cromosoma uno de *A. thaliana* como posible responsable de la determinación del tamaño de semilla. Una región del genoma hacia el final de dicho cromosoma es la más destacable con los resultados preliminares de los que se dispone hasta el momento.

A continuación, se debatirán los resultados de los mutantes para comprobar la implicación de los genes en la determinación del tamaño de semilla. Estos resultados son fruto de un único experimento y algunos mutantes presentan variabilidad afectando al análisis estadístico. La discusión de los resultados se realizará exclusivamente con estos resultados, aunque sea necesario repetir dos veces más el experimento.

Si nos centramos en la Figura 13 los mutantes que no presentan una diferencia significativa respecto al control son *gai-2* y *mft-3*. *MFT* es un gen implicado en el proceso de germinación de la semilla. Esto no significa que tenga que estar implicado en el resto de procesos de la semilla como en la determinación del tamaño. Por su parte, *GAI* es un regulador negativo de la señalización de GA, hormonas implicadas en múltiples procesos del desarrollo de la planta. Es cierto que otros alelos de *GAI* si ha exhibido una respuesta diferencial frente al control en otros experimentos, y este alelo *gai-2* es una pérdida de función, mientras que *gai-1* es una ganancia de función.

Por otro lado, el mutante *inp2* presenta una respuesta significativa frente al control. Este gen, *INP2*, ha sido descrito en el proceso de formación del polen. Sin embargo, no existe ninguna referencia de la implicación de este gen en procesos relacionados con semillas. Por ello, de alguna forma la modificación de este gen afecta levemente al tamaño de las semillas.

Los dos mutantes que verdaderamente destacan sobre el resto son *town2* y *ga3ox1*. Ambos presentan unos resultados muy interesantes y opuestos. El caso del mutante *ga3ox1* destaca por su elevada respuesta a PCB. Recordemos que el gen *GA3OX1* codifica una oxidasa necesaria para la biosíntesis de GA. Los resultados pueden ser consecuencia de la combinación del efecto del mutante y el tratamiento con PCB, afectando por partida doble a la biosíntesis de GA.

Una menor respuesta a PCB es lo que observamos en el mutante *town2*. El gen *TWN2* se considera un factor implicado en la proliferación celular. Aunque es cierto que no existen referencias de su implicación en la determinación del tamaño de semilla, si se conoce su participación en el desarrollo del embrión. Como indica Zhang y Somerville, (1997), mutaciones en este gen provoca la aparición de estructuras poliembriónicas afectando a la proliferación y desarrollo de las células embrionarias. Como consecuencia se producen errores en el proceso de germinación. Al afectar procesos claves de la semilla como la embriogénesis o la germinación donde están implicados múltiples hormonas se podría justificar la falta de respuesta a PCB y el menor tamaño de estas semillas. El gen no se ha descrito como factor que afecte de forma directa al tamaño de la semilla pero en definitiva, está afectando a procesos claves y se podrían estar destinando los recursos de crecimiento de la semilla para reparar estos procesos.

La figura 14 recoge los resultados del resto de mutantes destacados del QTL de la primera repetición. Tanto *hll-1* como *klu-2* presentan una diferencia significativa frente al control *Laer*. El primero de ellos no presenta tanta diferencia respecto al control. *HLL1* es conocido por su implicación en el desarrollo del óvulo. No se tiene constancia de la participación del gen *HLL1* en otros procesos relacionados con semilla. Los cambios en el desarrollo del óvulo pueden explicar la variación en el tamaño de las semillas del mutante. El caso del gen *KLU* es distinto, al observar una diferencia mayor respecto al control. Este gen ha sido descrito como un factor materno que afecta al tamaño de la semilla. Por ello, es lógico que la diferencia entre tamaños sea mayor. Sin embargo, estos cambios de tamaño no son tan acentuados como en el caso del mutante *town2*.

La segunda repetición de las líneas RILs permitió detectar un QTL en el cromosoma uno y otro QTL en el cromosoma dos.

El QTL del cromosoma uno nos presenta el mutante *rgll-2*. Este mutante no ha presentado una diferencia significativa respecto al control como se observa en la figura 15. *RGL1* es una proteína DELLA implicada en el proceso de señalización de las GA. Los resultados previos obtenidos para la implicación de las proteínas DELLA en la determinación del tamaño de semilla se han generado a partir de mutantes múltiples DELLA. Por tanto, el hecho de tener un mutante simple y una única repetición del experimento puede justificar esta ausencia de diferencia significativa.

Finalmente, tenemos los resultados de los mutantes del cromosoma dos de la segunda repetición. *SOD2* según los resultados presentados en la figura 16 no destacaría como un gen de interés en la determinación del tamaño de la semilla en respuesta a PCB. Este gen está implicado en el control materno del desarrollo de óvulos y crecimiento de la semilla pero no ha mostrado una respuesta diferencial. De hecho, para este gen disponíamos de dos mutantes diferentes y ambos han presentado una respuesta similar.

ERECTA, es el segundo gen destacado en el cromosoma dos. Estudios previos en nuestro laboratorio ya habían observado una diferencia significativa entre el control Col-0 y el mutante Col-*er*. Los resultados mostrados en la figura 17 confirman estos acontecimientos previos. *ERECTA* está implicado en múltiples procesos entre los que destacan la proliferación celular y la morfogénesis. Por ello, no sería extraño que participara en procesos de desarrollo de la semilla controlados por las GAs y como consecuencia se viera afectado el tamaño.

En resumen, los genes más interesantes en la determinación del tamaño de semilla serían *ERECTA*, *GA3OX1* y *TWN2*. Este último es el que presenta una diferencia más acentuada respecto al control y podría ser designado como el mejor candidato para comprender la determinación del tamaño de la semilla por GAs. Sin embargo, no debemos olvidar que este carácter puede estar determinado por varios genes y su actuación combinada.

Una vez identificados los genes de interés, el siguiente paso sería la creación de líneas NILs como se explicó en la Introducción. Estas líneas isogénicas únicamente se diferencian en una pequeña región del genoma que engloba el QTL de interés. La Tabla 2a del Anexo recoge los marcadores que delimitan cada QTL. La construcción de estas líneas se está realizando en estos momentos. Por otro lado, se buscarán marcadores para los genes candidatos y se determinará su importancia en el fenotipo.

5. Conclusiones

Las conclusiones de este Trabajo Final de Master son:

Primera. Existe una respuesta diferencial al PCB para el tamaño de semilla entre los ecotipos Col-0 y *Laer*, así como entre las líneas RILs Col-0 x *Laer*.

Segunda. Hemos encontrado tres QTLs en dos experimentos con las RILs. El cromosoma uno de *A. thaliana* presenta dos QTLs, y el cromosoma dos, un QTL.

Tercera. El mutante *ga3ox1* responde de forma aumentada a PCB.

Cuarta. El mutante *tn2* no responde a PCB y presenta los resultados más significativos respecto al control Col-0.

6. Bibliografía

Adamski, N. M., Anastasiou, E., Eriksson, S., O'Neill, C. M., y Lenhard, M. (2009). Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 20115–20120.

Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C. J., y Koornneef, M. (1999). Natural allelic variation at seed size loci in relation to other life history traits of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4710–4717.

Alonso-Blanco, C., y Koornneef, M. (2000). Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: An underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science*, 5(1), 22–29.

Balasubramanian, S., Schwartz, C., Singh, A., Warthmann, N., Kim, M. C., Maloof, J. N., y Weigel, D. (2009). QTL mapping in new *Arabidopsis thaliana* advanced intercross-recombinant inbred lines. *PLoS ONE*, 4(2), 1–8.

Berg, M., Rogers, R., Muralla, R., y Meinke, D. (2005). Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 44(5), 866–878.

Beyer, P., Morell, M., Mackay, I., y Powell, W. (2008). From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(2), 215–221.

Challa, S., y Neelapu, N. R. R. (2018). Genome-Wide Association Studies (GWAS) for Abiotic Stress Tolerance in Plants. En SH Wani (Ed.), *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress in Plants* (pp. 135-150).

Cenci, A., y Rouard, M. (2017). Evolutionary Analyses of GRAS Transcription Factors in Angiosperms. *Frontiers in plant science*, 8, 273.

Dill, A., y Sun, T. P. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159(2), 777–785.

FAO. Dimensions of need - Staple foods: What do people eat? (fao.org)

- Du, L., Li, N., Chen, L., Xu, Y., Li, Y., Zhang, Y., y Li, Y.** (2014). The ubiquitin receptor DA1 regulates seed and organ size by modulating the stability of the ubiquitin-specific protease UBP15/SOD2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26(2), 665–677.
- Gomez, M. D., Ventimilla, D., Sacristan, R., y Perez-Amador, M. A.** (2016). Gibberellins regulate ovule integument development by interfering with the transcription factor ATS. *Plant Physiology*, 172(4), 2403–2415.
- Gomez, M. D., Barro-Trastoy, D., Escoms, E., Saura-Sánchez, M., Sánchez, I., Briones-Moreno, A., y Perez-Amador, M. A.** (2018). Gibberellins negatively modulate ovule number in plants. *Development (Cambridge)*, 145(13), 1–11.
- Gupta, R., y Chakrabarty, S. K.** (2013). Gibberellic acid in plant. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25504.
- Hedden, P., y Sponsel, V.** (2015). A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 740–760.
- Ishihara H.** (2007). Analysis of Two Single Trait Loci Affecting Flavonol Glycoside Accumulations in. Doctor of natural sciences, Bielefeld University.
- Jiang, W. B., Huang, H. Y., Hu, Y. W., Zhu, S. W., Wang, Z. Y., y Lin, W. H.** (2013). Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 162(4), 1965–1977.
- Kawamoto, N., Del Carpio, D. P., Hofmann, A., Mizuta, Y., Kurihara, D., Higashiyama, T., y Simon, R.** (2020). A Peptide Pair Coordinates Regular Ovule Initiation Patterns with Seed Number and Fruit Size. *Current Biology*, 30(22), 4352-4361.e4.
- Knapik, E. W., Goodman, A., Ekker, M., Chevrette, M., Delgado, J., Neuhauss, S., Shimoda, N., Driever, W., Fishman, M. C., y Jacob, H. J.** (1998). A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature genetics*, 18(4), 338–343.
- Köhler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Gruissem, W., y Grossniklaus, U.** (2003). The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes and Development*, 17(12), 1540–1553.

- Konieczny, A. y Ausubel, F.M.** (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4: 403-410.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J. M., y Soppe, W.** (1998). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 345–370.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., y Vreugdenhil, D.** (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 141–172.
- Korte, A., y Farlow, A.** (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: A review. *Plant Methods*, 9(1), 1–9.
- Kurosawa, E.** (1926). Experimental studies on the nature of the substance excreted by the ‘bakanae’ fungus. *Trans Nat Hist Soc Formos*, 16, 213–227.
- Lange, B. M., y Ghassemian, M.** (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: A survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology*, 51(6), 925–948.
- Larkin, J. C., Young, N., Prigge, M., y Marks, M. D.** (1996). The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development*, 122(3), 997–1005.
- Lee, B. H., Wang, R., Moberg, I. M., Reeder, S. H., Amom, P., Tan, M. H., y Dobritsa, A. A.** (2021). A species-specific functional module controls formation of pollen apertures. *Nature Plants*, 7(7), 966–978.
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., y Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates. *Genes & Development*, 16(5), 646–658.
- Li, Y., Beisson, F., Pollard, M., y Ohlrogge, J.** (2006). Oil content of *Arabidopsis* seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry*, 67(9), 904–915.
- Li, N., Xu, R., y Li, Y.** (2019). Molecular Networks of Seed Size Control in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 435–463.
- Lister, C. and Dean, C.** (1993). Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 4: 745-750.

- Matsushita, A., Furumoto, T., Ishida, S., y Takahashi, Y.** (2007). AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase. *Plant Physiology*, 143(3), 1152–1162.
- Nam, H. G., Giraudat, J., Den Boer, B., Moonan, F., Loos, W., Hauge, B. M., y Goodman, H. M.** (1989). Restriction Fragment Length Polymorphism Linkage Map of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 1(July), 699–705.
- Orozco-Arroyo, G., Paolo, D., Ezquer, I., y Colombo, L.** (2015). Networks controlling seed size in *Arabidopsis*. *Plant Reproduction*, 28(1), 17–32.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., y Harberd, N. P.** (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes and Development*, 11(23), 3194–3205.
- Ren, D., Wang, X., Yang, M., Yang, L., He, G., y Deng, X. W.** (2019). A new regulator of seed size control in *Arabidopsis* identified by a genome-wide association study. *New Phytologist*, 222(2), 895–906.
- Schneitz, K., Baker, S. C., Gasser, C. S., y Redweik, A.** (1998). Pattern formation and growth during floral organogenesis: HUELLENLOS and AINTEGUMENTA are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125(14), 2555–2563.
- Schruff, M. C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., y Scott, R. J.** (2006). The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development*, 133(2), 251–261.
- Silverstone, A. L., Mak, P. Y. A., Martínez, E. C., y Sun, T. P.** (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 146(3), 1087–1099.
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., y Sun, T. P.** (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, 10(2), 155–169.
- Singer, T., Fan, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Hazen, S. P., y Briggs, S. P.** (2006). A high-resolution map of *Arabidopsis* recombinant inbred lines by whole-genome exon array hybridization. *PLoS Genetics*, 2(9), 1352–1361.

- Sun, T. P.** (2010). Gibberellin-GID1-DELLA: A pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiology*, 154(2), 567–570.
- Sun, T. P.** (2011). The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Current Biology*, 21(9), R338–R345.
- Torres, A.M. Monforte, A.J. Millan, y T. Satovic, Z.** (2012). Análisis de QTLs para la mejora genética vegetal. En Ferreira, J.J.; Ordás, A.; Pérez, M. (Eds.), *La Genética de Los Caracteres Cuantitativos en la mejora vegetal del siglo XXI* (pp. 2–39).
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., y Matsuoka, M.** (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 183–198.
- Vera-Sirera, F., Gomez, M. D., y Perez-Amador, M. A.** (2016). DELLA Proteins, a Group of GRAS Transcription Regulators that Mediate Gibberellin Signaling. In *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*.
- Weller, J.L. y Macknight, R.C.** (2019). Genetic control of flowering time in legumes. En F. de Bruijn (Ed.), *The Model Legume *Medicago truncatula** (pp. 182-188).
- Wen, C. K., y Chang, C.** (2002). *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14(1), 87–100.
- Xi, W., Liu, C., Hou, X., y Yu, H.** (2010). MOTHER OF FT and *TFL1* regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22(6), 1733–1748.
- Xia, T., Li, N., Dumenil, J., Li, J., Kamenski, A., Bevan, M. W., y Li, Y.** (2013). The Ubiquitin Receptor DA1 Interacts with the E3 Ubiquitin Ligase DA2 to Regulate Seed and Organ Size in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(9), 3347–3359.
- Yabuta, T.** (1935) Biochemistry of the ‘bakanae’ fungus of rice. *Agric. Hort. (Tokyo)*, 10, 17–22.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225–251.
- Zeng, Z.** (1994). Precision of Quantitative Trait Loci. *Genetics*, 136, 1457–1468.

Zhang, J. Z., y Somerville, C. R. (1997). Suspensor-derived polyembryony caused by altered expression of valyl-tRNA synthetase in the *twn2* mutant of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7349–7355.

7.Anexo

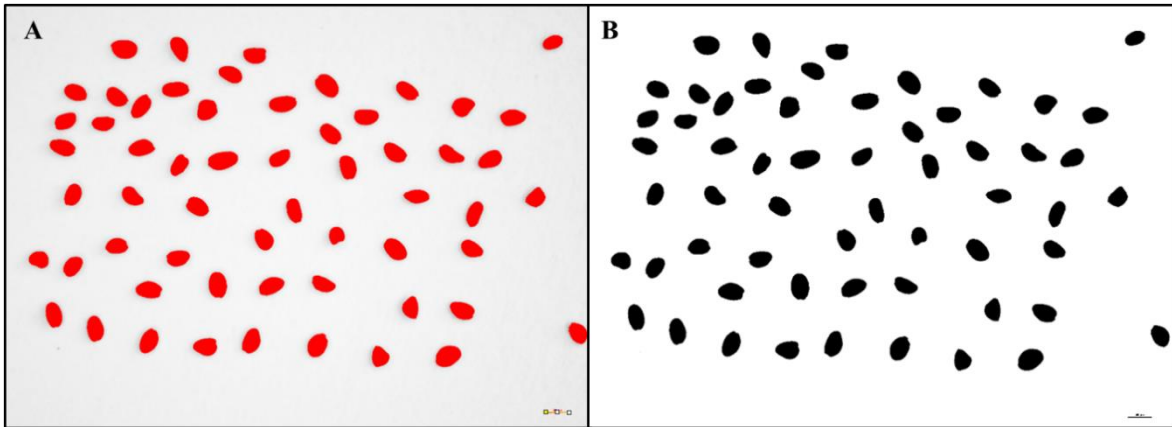


Figura 1a. Imágenes de semillas de la RIL 1909 PCB durante el procesamiento con ImageJ. A, semillas durante el proceso de selección del valor umbral. B, resultado de la aplicación del umbral. A partir de la imagen B se realizan los cálculos pertinentes.

```

/*
-----
MACRO para medir Áreas. Antes hay que hacer SetScale y dar a Global. Luego
ya se abre el macro y Run.
-----
*/

print ("\Clear");
print ("este ejemplo lee las imagenes de un directorio,");
print ("crea otro y las pasa a 8-bits en el nuevo");

dir = getDirectory("Choose a Directory ");
count = 1;
print (dir);

waitForUser ("parada1");

newDir=getString("como se llama el nuevo directorio?", "areas 8-bit");
dirGrabar=dir+newDir;
print (dirGrabar);
File.makeDirectory (dirGrabar);

waitForUser("parada2");

list = getFileList(dir);
for (i=0; i<list.length; i++) {
    if (endsWith(list[i], ".tif"))
        print("este es un directorio"+dir+list[i]);
    else {
        print((count++) + " : " + dir + list[i]);
        open (dir + list[i]);
        run("8-bit");
    }
}

run("Threshold...");

setOption("BlackBackground", false);

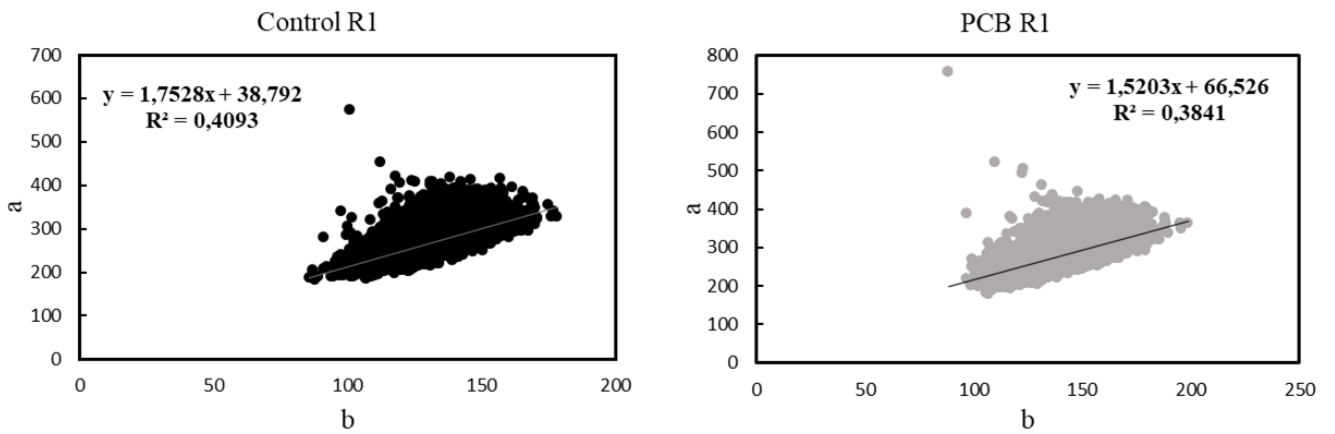
waitForUser("parada3"); /* en este punto, ajustar el threshold y limpiar la imagen*/
run("Analyze Particles...", "size=40000-400000 circularity=0.10-1.00 show=Outlines display exclude in_situ");
saveAs("tiff", dirGrabar+ "\\" + list[i]);
print(dirGrabar+ "\\" + list[i]);
close();
}
}

/*
sssssssssssssssin COMENTARIOSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS
*/

waitForUser("pulse ENTER para concluir");

```

Figura 2a. Macro de instrucciones del programa ImageJ. Este macro crea una nueva carpeta para guardar las imágenes generadas tras la aplicación del umbral. Permite la selección individual del umbral para cada imagen y el cálculo del área y perímetro de cada semilla dentro de unos parámetros determinados.



menor y el eje Y representan el eje mayor del área de las semillas, aproximada a una elipse. Además, se muestra la ecuación de la recta de regresión.

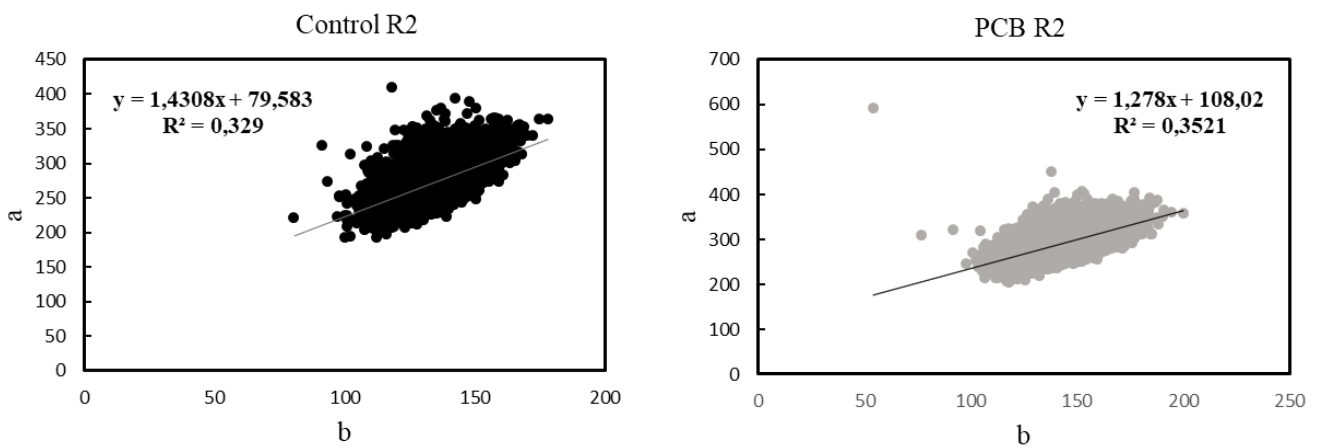


Figura 4a. Distribución lineal del área de la segunda repetición. El eje X representa el eje menor y el eje Y representan el eje mayor. Además, se muestra la ecuación de la recta de regresión.

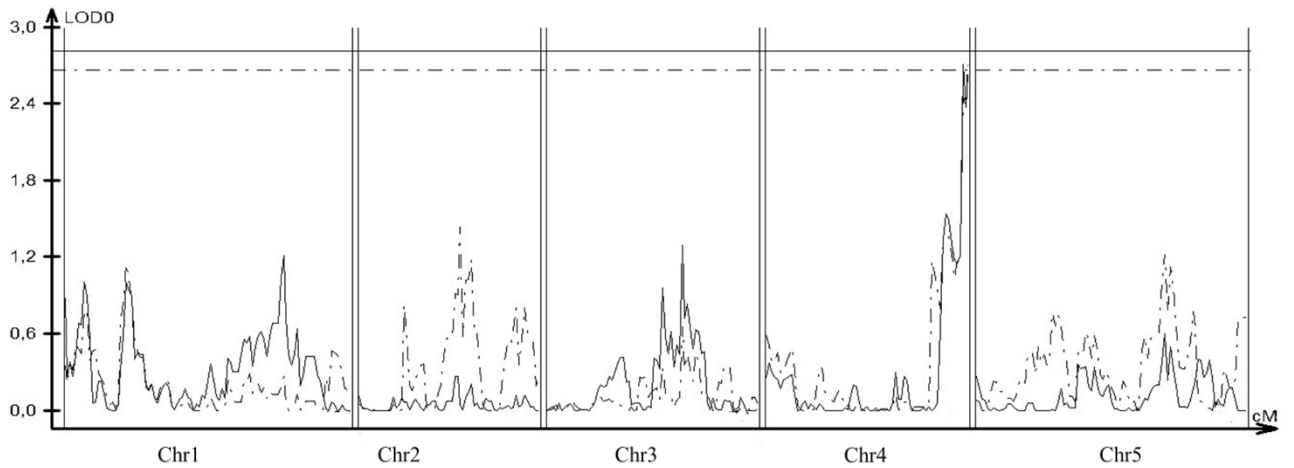


Figura 5a. Análisis de QTL de área y perímetro combinados para control de la primera repetición. El eje X representa la distancia en cM de cada cromosoma, indicado con “Chr” y su número. El eje Y representa los valores de LOD como resultado del análisis CIM. El área se representa con línea continua y el perímetro con línea discontinua. Los niveles de significancia de LOD se presentan con líneas horizontales según la situación.

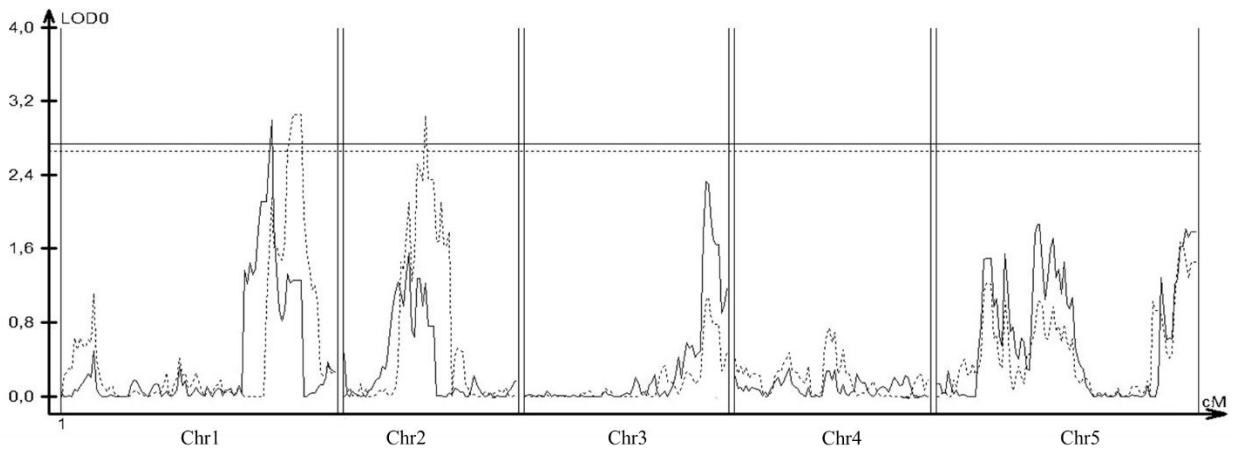


Figura 6a. Análisis de QTL de área y perímetro combinados para PCB de la primera repetición. El área se representa con línea continua y el perímetro con línea discontinua.

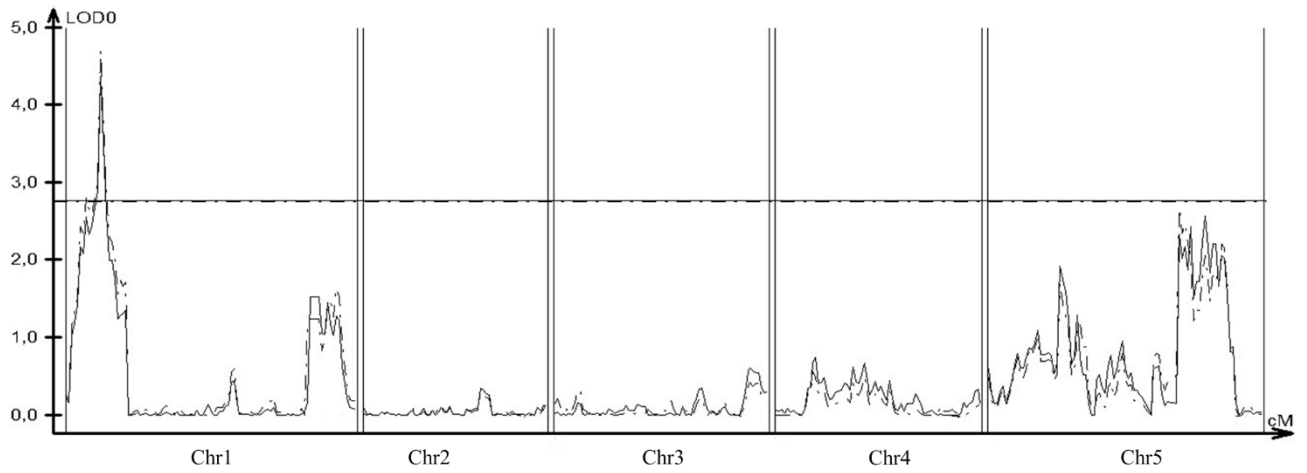


Figura 7a. Análisis de QTL de área y perímetro combinados para la diferencia de la primera repetición. El área se representa con línea continua y el perímetro con línea discontinua.

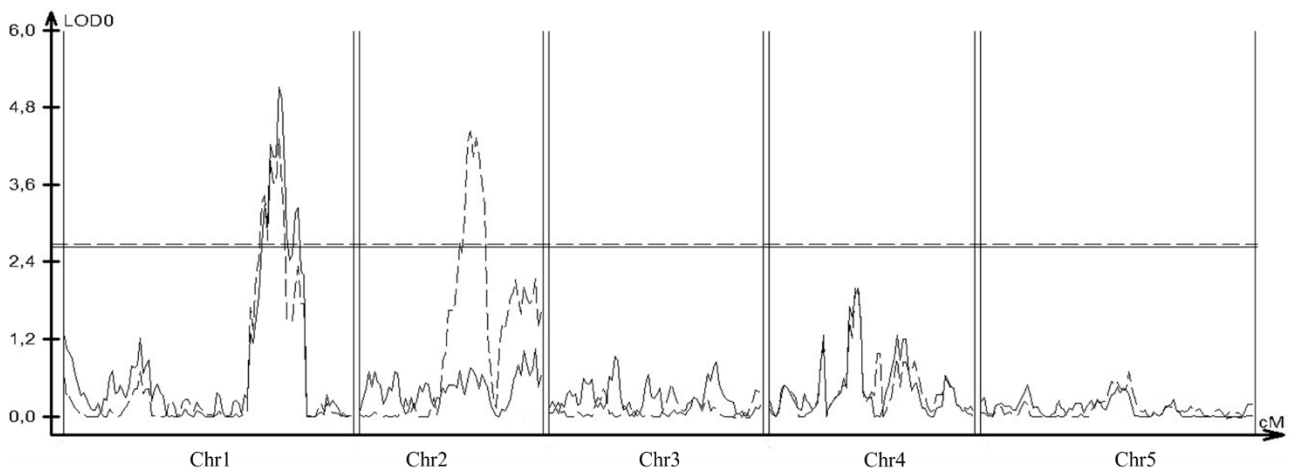


Figura 8a. Análisis de QTL de área y perímetro combinados para control de la segunda repetición. El área se representa con línea continua y el perímetro con línea discontinua.

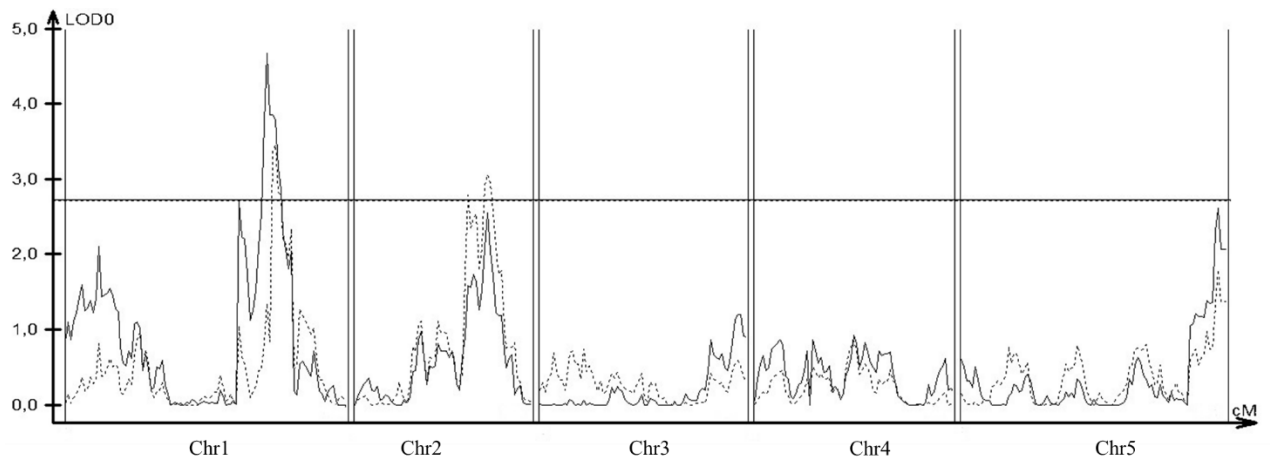


Figura 9a. Análisis de QTL de área y perímetro combinados para PCB de la segunda repetición. El área se representa con línea continua y el perímetro con línea discontinua.

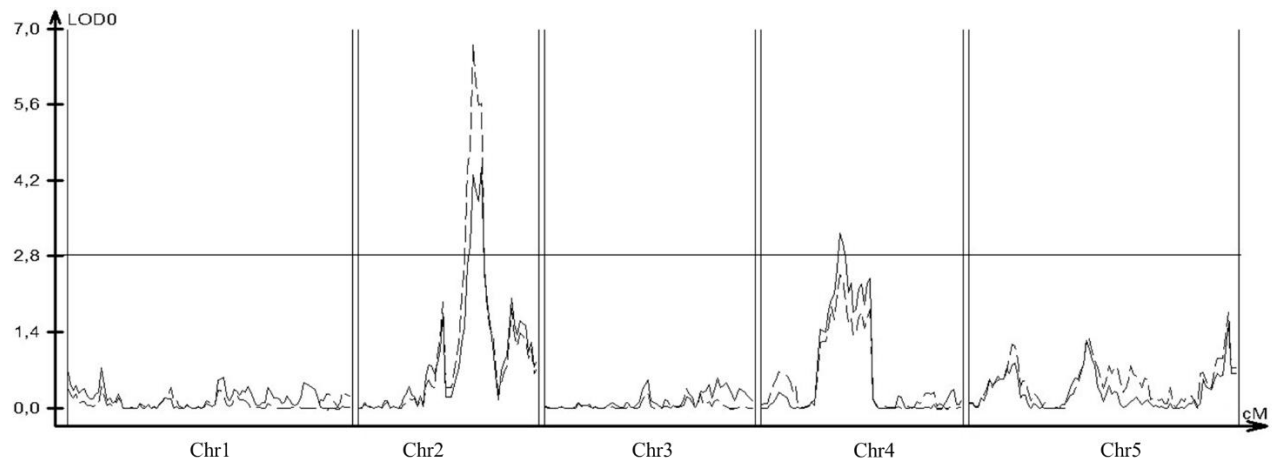


Figura 10a. Análisis de QTL de área y perímetro combinados para la diferencia de la segunda repetición. El área se representa con línea continua y el perímetro con línea discontinua.

Mutante	Gen afectado	Ecotipo	Referencia NASC
<i>gai-2</i>	<i>At1g14920</i>	Col-0	N869445
<i>ga3ox1</i>	<i>At1g15550</i>	Col-0	Stock Laboratorio
<i>hll-1</i>	<i>At1g17560</i>	Laer	N68695
<i>twn2</i>	<i>At1g14610</i>	Col-0	N658873
<i>klu-2</i>	<i>At1g13710</i>	Laer	Stock Laboratorio
<i>mft-3</i>	<i>At1g18100</i>	Col-0	N665021
<i>inp2</i>	<i>At1g15320</i>	Col-0	N681972
<i>ga20ox4</i>	<i>At1g60980</i>	Col-0	N531204
<i>rgl1-2</i>	<i>At1g66350</i>	Col-0	N16353
<i>sod2-1</i>	<i>At2g28190</i>	Col-0	N665863
<i>sod2-2</i>	<i>At2g28190</i>	Col-0	N667261
Col-er	<i>At2g26330</i>	Col-0	Stock Laboratorio

Tabla 1a. Mutantes estudiados durante el proyecto. Esta tabla recoge la nomenclatura de cada mutante, su código AGI, su fondo genético y su referencia.

Gen	Cebadores (5'→3')	Temperatura (°C)	Producto	Enzima Restricción
<i>At1g61230</i> (NGA280)	D:CTGATCTCACGGACAATAGTGC R:GGCTCCATAAAAAGTGCACC	52	105 (C) 85 (L)	---
<i>At1g69840</i> (F5I14)	D:CTGCCTGAAATTGTCGAAAC R:GGCATCACAGTTCTGATTCC	52	196 (C) 310 (L)	---
<i>At2g25130</i> (MSAT2.36)	D:GATCTGCCTCTTGATCAGC R:CCAAGAACTCAAACCGTT	60	158 (C) 200 (L)	---
<i>At1g13500</i>	D:GGGGCCGAGAAAATAACCG R:ATCAGCCACCTTCCTCCAATC	60	417	MboII (GAAGA)
<i>At1g18440</i>	D:TGTCGGAAGCTGACGAAAGGAATAAGAGGT R:GCATCAGCCAAAGCGTCCACC	60	336	Eco3II (GGTCTC)
<i>At2g30240</i>	D:GATCATTCTTGCTTTAAAGGTTGAAGGAC R:AGGAAAAGACTATGGAGCTTTCGAT	52	254	HgaI (GACGC)
<i>At1g60980</i>	D:GGAGGCTGAAAGACTCGTCT R:GAGGGATTGATTGCCACTGGT	56	723	

Tabla 2a. Información adicional del análisis genómico. Esta tabla recoge los marcadores moleculares que delimitan cada QTL, así como sus cebadores y las condiciones necesarias para su detección. La última fila se corresponde con el gen *GA20OX4* cuya detección de ADN-T se realiza con los cebadores indicados.

	p-valor Control	p-valor PCB
Col-0	1,00000000	0,00090725
Laer	0,002315986	0,00461026
Col-0 x Laer	0,65205898	0,02746253
Laer x Col-0	0,08270594	0,00055874

Tabla 3a. Análisis estadístico F1. Se presentan los resultados de p-valor tras la aplicación de t-Student. Los análisis se realizan en función de Col-0 en situación control.

	p-valor
Repetición 1	0,726993601
Repetición 2	0,861134219
Controles	0,420092527
PCB	0,889567262

Tabla 4a. Análisis estadístico área. Se presentan los resultados de p-valor tras la aplicación de t-Student.

	p-valor
<i>gai-2</i>	0,1105
<i>mft-3</i>	0,2723
<i>inp2</i>	0,0098
<i>twm2</i>	0,0063
<i>ga3ox1</i>	0,0599
<i>hll-1</i>	0,0064
<i>klu-2</i>	0,0001
<i>sod2-1</i>	0,0832
<i>sod2-2</i>	0,1668
<i>rgl1-2</i>	0,1010
<i>Col-er</i>	0,0312

Tabla 5a. Análisis estadístico de los mutantes. Se presentan los resultados de p-valor tras la aplicación de t-Student. Los análisis se realizan en función del genotipo control de cada mutante.