



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Rol de la vía RdDM en la expresión de los efectos transgeneracionales de temperatura en semillas de *Arabidopsis thaliana*

Autora:

M. Clara Fontana

Directora:

Dra. Gabriela Auge

Laboratorio de Memoria Ambiental en Plantas

INSTITUTO DE BIOCIECIENCIAS, BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA TRANSLACIONAL (IB3),

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Marzo, 2021

“La semilla es pequeña, pero rompe cualquier piedra, cualquier roca y la hace florecer”

José María Arguedas

Resumen

Las plantas son capaces de percibir y responder a los cambios ambientales que ocurren durante sus ciclos de vida y los de generaciones anteriores, desarrollando estrategias para adaptarse a ellos y aumentar el éxito de supervivencia de la progenie. Entender estas respuestas transgeneracionales y sus mecanismos subyacentes es clave para comprender el ajuste de los ciclos de vida al cambio climático.

En *Arabidopsis thaliana*, la vernalización, periodo de frío prolongado que indica el paso del invierno, afecta el tiempo a floración de las plantas madre y la germinación de las semillas de la progenie. Ambas transiciones del desarrollo, están bajo fuerte presión de selección y sufren una fina regulación ya que son clave para el ajuste de los estadios de crecimiento de las plantas a las condiciones óptimas que aseguren la supervivencia de las mismas. De esta manera, los efectos transgeneracionales pueden afectar procesos ecológicos y evolutivos. En *Arabidopsis*, la regulación transgeneracional de la plasticidad fenotípica tiene un componente epigenético: la respuesta a cambios de temperatura fue asociada con la función de genes de síntesis de ARN pequeños y con los cambios en la frecuencia de metilación del ADN heredados por la progenie, sugiriendo que la vía de metilación de ADN mediada por RNA (RdDM) cumpliría el rol de transmitir información ambiental a través de las generaciones. Para entender el proceso mediante el cual cambios estacionales experimentados por las plantas son transmitidos a la progenie, caracterizamos la respuesta a la vernalización explorando la influencia del ambiente sobre caracteres clave del ciclo de vida de la planta madre (tiempo a floración y producción de biomasa reproductiva) y la progenie (características de las semillas, dormición, germinación y desarrollo de plántula), y las correlacionamos con la respuesta de mutantes del mecanismo RdDM.

Observamos que la vernalización de la planta madre afectó el tiempo a floración en la misma generación y equilibró la respuesta de los mutantes de la vía RdDM. La producción total de biomasa reproductiva, el tamaño de las semillas y el desarrollo de las plántulas se vieron afectados por el ambiente de la planta madre, y algunos mutantes de la vía RdDM mediaron este efecto. Además, la germinación y dormición de la progenie se vieron afectadas por el ambiente materno, y los mutantes de la vía RdDM mostraron tener una influencia en la expresión de la plasticidad transgeneracional.

Nuestros resultados muestran que el ambiente experimentado por las plantas madre tiene una fuerte influencia en la expresión de fenotipos en la misma generación y al menos una generación subsiguiente, afectando no sólo la regulación de las transiciones del desarrollo, sino también componentes del *fitness* de los individuos. Estos efectos están al menos en parte mediados por un mecanismo de regulación epigenética (mecanismo RdDM), mostrando una compleja interacción entre el ambiente experimentado por diferentes generaciones, los programas de desarrollo de las mismas y la memoria epigenética.

Abstract

Plants are able to sense environmental changes happening throughout their life cycles and those experienced by previous generations, developing strategies to adapt to those changes to increase their progeny's survival. The molecular mechanisms that underlie those transgenerational adaptive responses are just beginning to be unveiled. Understanding these responses may be key to assess the adjustment of life cycles to climate change in dynamical plant communities.

In *Arabidopsis thaliana*, vernalization, a period of cold that signals winter, affects flowering time of mother plants and germination of their progeny. Both developmental transitions are under strong selective pressure and are finely regulated as they are key to plants to adjust their life cycles to environmental conditions that are optimal for survival. Thus, transgenerational effects have the potential to influence ecological and evolutionary processes. In *Arabidopsis*, transgenerational regulation of phenotypic plasticity involves an epigenetic component: transgenerational responses to temperature changes have been associated with the function of small RNA synthesis genes and with DNA methylation frequency changes inherited by the progeny, suggesting a role for the RNA-directed DNA methylation pathway (RdDM) in passing environmental information across generations. To understand the process by which non-stressing seasonal environmental changes experienced by previous generations are passed to the progeny, we characterized responses to maternal vernalization across generations by exploring environmental influence on key traits of the maternal life cycle (bolting time and reproductive biomass production) and of the progeny (seeds traits, dormancy, germination and seedling development), and correlated those responses with the RdDM pathway by using pathway mutants.

Maternal vernalization affected bolting time within-generation and balanced RdDM mutants response. Total reproductive biomass production, seed size and seedling development were affected by environmental cues experienced by mother plants, and some RdDM mutants mediated this effect. Furthermore, progeny germination and dormancy were affected by the maternal environment as well and RdDM mutants influenced transgenerational plasticity.

Our results show that environmental cues experienced by plants have a strong influence in phenotypic expression of both, current and subsequent generations. These effects are at least in part mediated by an epigenetic mechanism (RdDM), showing a complex interaction between environments experienced by different generations, their developing programs and epigenetic memory.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Gaby, por abrirme las puertas en este equipo maravilloso y apoyarme en este proceso. Por enseñarme no solo a crecer profesionalmente, sino también a crecer como persona y como grupo con entusiasmo y alegría. Gracias por siempre estar y tener una palabra de apoyo. Gracias por hacer hasta lo imposible por ayudarme desde aceptarme en tu casa para hacer experimentos hasta por quedarte escribiendo hasta horas infinitas. Estoy feliz de seguir en este camino con la más divertida de las directoras y de seguir creciendo y trabajando juntas.

Gracias a Pablo por su generosidad. Por haberme incluido virtualmente en el 208 y por todo su apoyo como tutor. Gracias por orientarme a transitar esta carrera y haberme dado la posibilidad de conocer a Gaby y todo el grupo de trabajo.

Gracias a todo el 208 y el PEM lab por toda su ayuda y apoyo en este año pandémico, esta tesis se encuentra escrita en gran medida gracias a ustedes. Gracias a Ailén, Tomi, Mica, Santi, Mauro, Belén, MarB, Cristian, Pedro, Rosario, Isabella y, principalmente gracias a Vir.

Gracias a Gus por todo tu apoyo y ayuda, por darme la bienvenida desde el primer momento y por enseñarme con tanta paciencia. Gracias a Cami por su compañía en el laboratorio, por todas esas tardes de Spinetta y por ser mi gran compañera estos próximos años.

Gracias a la FCEN, a todos mis docentes y a todas las personas que trabajan día a día con mucho esfuerzo para que todo esté en funcionamiento y, personas como yo podamos aprender sobre esta carrera maravillosa y hacer de la facultad nuestro segundo hogar.

Gracias a Alexandra Elbakyan, creadora de sci-hub. Fue gracias a su trabajo que tuve la posibilidad de acceder a gran parte del material utilizado en el presente trabajo.

Gracias a Bren, Sofi, Anto y Mari por ser mi cable a tierra y siempre estar en todas. ¡No sé qué haría sin ustedes! Gracias por llenar mi vida de risas.

Gracias a Dani, la más loca de mis amigas, por saber cómo tranquilizarme cada vez que estoy en medio de la vorágine. Gracias por enseñarme a ver la vida desde otro punto de vista.

Gracias a Mica, mi amiga de toda la vida. Gracias por ser una hermana para mí.

Gracias a Lula, a pesar de tenerte a miles de kilómetros siempre te siento cerca. Gracias por ser un ejemplo de amiga y siempre tener un momento para los demás.

Gracias a Lu por empujarme para adelante, a pesar de conocernos desde la guardería gracias a la facultad hoy somos más cercanas, por lo tanto agradezco a la facultad por reencontrarme con ella.

Gracias a Ina, por ser esa amiga incondicional con la que no importa el tiempo que pase sin vernos, cada vez que nos encontramos es como si no hubiera pasado el tiempo.

Gracias a Florchi por apoyarme en las buenas y en las malas, por ser de esas personas que llevan a todos para adelante, gracias por ser tan transparente y tener siempre palabras de apoyo para compartir.

Gracias a Rasta por todas las catarsis y charlas filosóficas sobre la vida, gracias por ser tan buena compañera y por todas esas cervezas.

Gracias a Anita, Leilu y Mati, cruzarme con ustedes desde el principio de la carrera fue de los más increíble de la FCEN. A Anita por llenar todo de entusiasmo y a Mati por ser tanto tiempo un compañero de aventuras.

Gracias a Fausti, Ori, Pri y Luber por ser amigas, me encanta tenerlas en mi vida. Gracias a AIA y también a todo el grupo de preceptoría.

Gracias a Axel y a Mati, por dejarme ganar en el UNO y por tener siempre oídos para escucharme.

Y en último lugar, por más que las palabras no sean suficientes para describir lo que siento, quiero agradecer a las personas más cercanas para mí.

Gracias a Lucas por ser el viento en mi espalda. Por hacer que mi vida se llene de amor y felicidad. Gracias por siempre tener un abrazo para mí cuando lo necesito y gracias por ser parte de mí vida, el mundo es más lindo con vos.

Gracias a Adrián, Gabi y Rochi por siempre estar tan cerca y por todo el amor y cariño.

Gracias a Caro, Nacho, Abril, Alex y Mari por su extrema generosidad, por hacerme sentir siempre en casa y siempre tener los brazos abiertos.

Gracias a mis abuelos por enseñarme el valor de la familia y a trabajar para estar unidos.

Gracias a toda mi familia, tanto por Argentina como por Colombia. Gracias a Clau y Germán, a Guille y Maita, y a Martín y Vivi. Gracias a Pocho, Jackie y Vivi. A Facu, Coni, Chino y Maie. Gracias a todos y cada uno de mis primos.

Unas grandes gracias para Lauri, Zeque y Joaco que me enseñaron a ser la persona que hoy soy, no podría haber tenido mejores hermanos. Gracias por acompañarme toda la vida, por darme un empujón cada vez que lo necesité y por enseñarme a poner un freno cuando descarrilaba. Gracias por ser mis mejores maestros.

Y por último, porque después no cabe lugar para nada más, gracias a mamá y papá. A ustedes les agradezco todo. Les agradezco por haberme criado con tanto amor, les agradezco por siempre haber estado presentes para mí, por su incesante paciencia. Gracias por su forma de ver el mundo, por ser los papás más locos que existen y hacer de mi vida un mundo maravilloso.

Simplemente gracias.

Índice General

Resumen	5
Abstract	7
Agradecimientos	9
Índice General	11
Introducción	15
1.1. Modelo de estudio: <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
1.2. La vernalización	17
1.3. Integración de la información ambiental	18
1.3.1. Ajuste del ciclo de vida a los cambios estacionales	19
1.3.2. El mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM)	21
Hipótesis y Objetivos	25
Materiales y Métodos	27
3.1. Material vegetal	27
3.2. Condiciones de crecimiento	27
3.3. Generación de material inicial (F0) y de datos preliminares	28
3.4. Desarrollo de las plantas de la primera generación (F1)	28
3.4.1. Tiempo hasta aparición del botón floral	28
3.4.2. Hojas hasta aparición del botón floral	28
3.5. Ensayos de germinación	29
3.5.1. Proporción de germinación	29
3.5.2. Velocidad de germinación	30
3.6. Ensayos de dormición secundaria	30
3.7. Características de las semillas	31
3.7.1. Correlación entre caracteres analizados	31
3.7.2. Medición del peso de las semillas	31
3.7.3. Medición del tamaño de las semillas	31
3.7.4. Determinación del largo del hipocótilo	32
3.8. Análisis estadístico	32
Resultados	35
4.1. Desarrollo de las plantas de la primera generación	35
4.1.1. Tiempo hasta aparición del botón floral	35
4.1.2. Hojas hasta aparición del botón floral	37
4.2. Germinación	39
4.2.1. Proporción de germinación	40
4.2.2. Velocidad de germinación	43
4.3. Dormición secundaria	45
4.4. Características de las semillas	48
4.4.1. Peso de las semillas	49
4.4.2. Tamaño de las semillas	50
4.4.3. Largo del hipocotilo	52

Discusión y conclusión	55
5.1. Desarrollo de las plantas de la primera generación	55
5.2. Germinación y Dormición	61
5.3. Características de las semillas	66
5.4. Proyecciones a futuro	70
Bibliografía	73
Apéndice	81
A.1. Información de las plantas mutantes utilizadas	81
A.2. Correlación entre tiempos - ensayos de germinación	82
A.3. Tabla con análisis estadístico del ensayo de Dormición secundaria	83
A.3.1. Contrastes para cada genotipo, en cada tratamiento, entre días de incubación	83
A.3.3. Contrastes para cada genotipo, V respecto a NV	85
A.3.2. Contrastes respecto a Col-0	86
A.4. Correlación entre los datos para ambos tratamientos	87
Firmas	89

Introducción

Las plantas son capaces de percibir los cambios ambientales que experimentan generaciones anteriores y generar respuestas plásticas en la progenie. La información de los cambios ambientales experimentados o **memoria ambiental** es transmitida de generación en generación a través de mecanismos moleculares que recién están comenzando a desvelarse.

1.1. Modelo de estudio: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta floral dicotiledónea herbácea nativa de Eurasia y África, y naturalizada alrededor del planeta. Pertenece a la familia *Brassicaceae* que incluye también especies de interés agroeconómico, como el rabanito, el brócoli y la mostaza (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002; Berardini et al., 2015). La facilidad de su propagación y su gran variabilidad fenotípica la hacen un modelo ideal para estudiar sistemas funcionales, ecológicos y genéticos-evolutivos (Horton et al., 2012). *A. thaliana* ocupa un gran rango de hábitats incluyendo playas, pendientes rocosas, orillas de ríos, bordes de carreteras y la periferia de áreas agrícolas. Se recolectaron especímenes en América, Nueva Zelanda, montañas al este de África, islas tanto en el océano Pacífico y Atlántico, y a lo largo de todo su rango nativo en Eurasia. La gran distribución de la especie y la riqueza de los recursos genéticos, combinado con el hecho de que pueden ser mantenidas como líneas puras, hacen que *A. thaliana* sea un atractivo recurso para investigar las bases moleculares, genéticas y epigenéticas de caracteres ecológicamente relevantes (Horton et al., 2012).

Las poblaciones localmente adaptadas de *Arabidopsis thaliana* son consideradas **ecotipos**, corresponden a poblaciones genéticamente especializadas a condiciones ambientales particulares determinadas por la variación natural en caracteres claves del ciclo de vida y tolerancia a los ambientes (Donohue et al., 2010; Pigliucci & Marlow, 2001; Turesson, 1922). Existen dos ciclos de vida comúnmente encontrados en el rango nativo de *Arabidopsis* que llevan a que se observen ecotipos anuales de verano e invierno. Los ecotipos anuales de verano germinan al comienzo de la primavera y florecen inmediatamente después, mientras que los ecotipos anuales de invierno florecen alrededor del mismo tiempo estacional, pero germinan en el otoño anterior atravesando el invierno como roseta y floreciendo luego en la primavera (Figura 1.1.0.1) (Donohue et al., 2010; Weidner et al., 1985). La floración de los ecotipos anuales de invierno solo ocurre si la planta atravesó un período de vernalización (período de frío prolongado), que indica la finalización del invierno (Koornneef et al., 1991). El ecotipo Columbia-0 (Col-0), naturalizado en Estados Unidos, que es uno de los ecotipos más utilizados como material experimental en estudios de laboratorio, corresponde a una planta anual de verano.

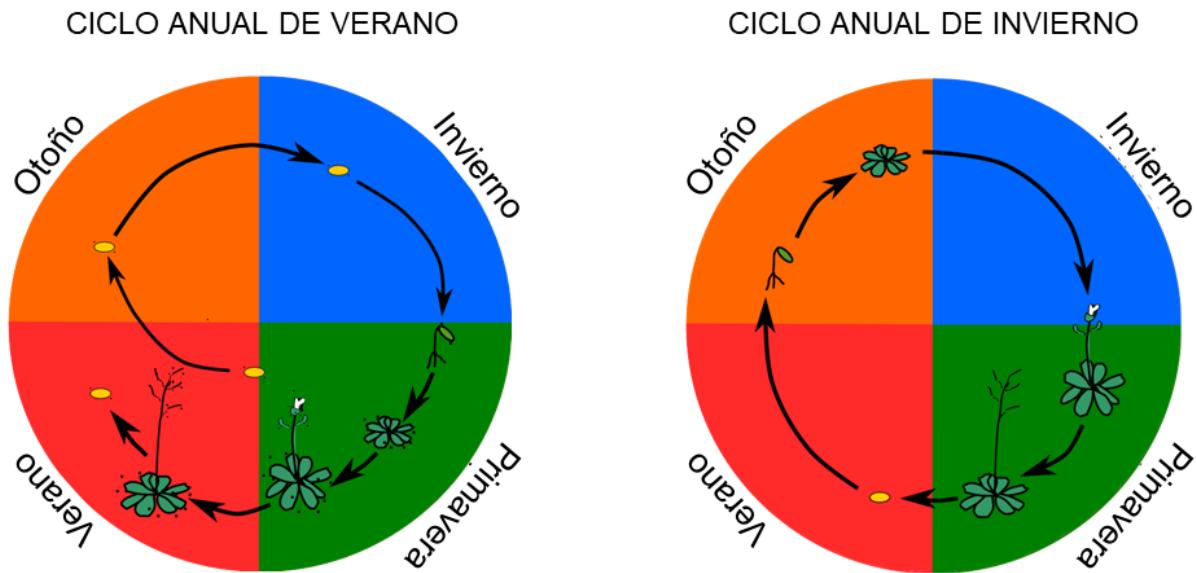


Figura 1.1.0.1: Esquema de ciclos de vida de *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda se muestra un ciclo de vida característico de ecotipos anuales de verano como Columbia-0 donde la germinación ocurre en la primavera y para el final de la primavera la planta libera las semillas, estas (1) germinan inmediatamente durante el verano y atraviesan el estadio vegetativo y reproductivo en la misma estación o (2) se mantienen dormidas a lo largo del verano, otoño e invierno para germinar nuevamente en la primavera. A la derecha se muestra un ciclo de vida característico de ecotipos anuales de invierno con requerimiento de vernalización para florecer, la germinación ocurre en el otoño donde comienza el desarrollo vegetativo que transiciona a desarrollo reproductivo una vez llegada la primavera. En primavera la planta produce semillas que son liberadas y se mantienen dormidas hasta la llegada del otoño.

Las semillas maduras de *Arabidopsis* consisten en un embrión desecado y altamente resistente rodeado de una única capa celular de endosperma y una capa externa, la testa o cubierta seminal, que consiste de tejido materno integumentario muerto (Piskurewicz et al., 2016). El endosperma, que provee nutrientes y señales para el desarrollo del embrión (Jiang & Köhler, 2012; Raissig et al., 2011), es triploide: cuenta con dos copias maternas del genoma y una paterna (proporción 2:1 materna-paterna). El zigoto o embrión, por su lado, es un tejido diploide, contando con una copia materna y una paterna (Kirkbride et al., 2019; Piskurewicz et al., 2016). El proceso de germinación de las semillas, transición del desarrollo que transforma al embrión en una frágil plántula, está finamente regulado (Kirkbride et al., 2019; Piskurewicz et al., 2016). La dormición - incapacidad de germinar de la semilla bajo condiciones que serían alternativamente favorables - es el factor crucial que regula el momento en que una semilla germina, determinando de este modo el ambiente del desarrollo vegetativo de la planta en crecimiento (Kirkbride et al., 2019; Piskurewicz et al., 2016). El estado de dormición de la semilla puede ser modulado por diversos factores ambientales (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Kerdaffrec & Nordborg, 2017). Al momento de la dispersión, las semillas tienen un estado de *dormición primaria*, la cual tiene una base genética y es principalmente determinada por el ambiente experimentado por la planta madre durante la maduración de las semillas (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Kerdaffrec & Nordborg, 2017). A medida que transcurre el tiempo, las semillas secas pierden el estado de dormición primaria mediante un proceso llamado post-maduración, adquiriendo de este modo la capacidad de germinar bajo un mayor rango de condiciones (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Piskurewicz et al., 2016). El período de tiempo requerido de post-maduración para que la semilla alcance la capacidad de germinar puede ser utilizado para definir los niveles de dormición que posee una semilla (Denay et al., 2017). Si el

estado de dormición de la semilla fue liberado pero las condiciones son desfavorables para la germinación, ésta puede verse bloqueada temporalmente o la semilla puede entrar en un estado de *dormición secundaria*: restablecimiento de la dormición cuando las condiciones desfavorables son prolongadas (Buijs et al., 2020; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Los niveles de dormición varían en gran medida entre especies de plantas, e incluso entre ecotipos de *Arabidopsis*, teniendo consecuencias importantes en los nichos ecológicos, fenología y agricultura (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Lawesson, 2000; Meng et al., 2008; Schmuths et al., 2006; Springthorpe & Penfield, 2015). Ecotipos de *Arabidopsis* con bajos niveles de dormición precisan de cortos períodos de post-maduración en comparación con los ecotipos que presentan altos niveles de dormición.

Luego de la germinación, el desarrollo vegetativo comienza con el desarrollo y establecimiento de la plántula y continúa con el desarrollo de hojas que se disponen en un patrón en espiral dando lugar a la roseta (Ferrández et al., 1999; Pirola, 2018). Bajo las condiciones ambientales correctas, y luego de la transición de crecimiento vegetativo a reproductivo, comienza el desarrollo de los meristemas florales en el meristema apical. Posteriormente se produce la elongación del brote principal y surge una inflorescencia. Aparecen también las hojas caulinares (las que salen directamente desde el tallo) en la parte inferior de la inflorescencia. Al igual que con las hojas, las flores se distribuyen en un patrón espiralado (Pirola, 2018).

1.2. La vernalización

La vernalización es un período de frío prolongado que experimentan las plantas cuando atraviesan el invierno y es un estímulo ambiental por el que perciben los cambios estacionales. Para plantas que residen en climas templados, el requerimiento de vernalización es importante para optimizar el *fitness* (medida de la capacidad de un individuo para sobrevivir y reproducirse) ya que evita que se produzca la transición floral antes de transcurrida la estación de invierno y promueve la ocurrencia de la transición del estadio vegetativo al reproductivo durante la primavera (Zografs & Sung, 2012). Uno de los mayores responsables del requerimiento de la vernalización en *Arabidopsis* es *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), un gen de la familia MADS box, que es represor de la floración (Michaels & Amasino, 1999). *FLC* se expresa en altos niveles previo a la exposición a frío en plantas anuales de invierno (Zografs & Sung, 2012). La vernalización, seguida de la inducción de la transcripción de *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*), provoca la represión epigenética de *FLC* que se mantiene luego de la mitosis (Sung & Amasino, 2004). *VIN3* de la mano del complejo represor POLYCOMB (*POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2, PRC2*) - un complejo proteico que presenta actividad metiltransferasa H3K27 - establecen el enriquecimiento de una serie de modificaciones represoras de la cromatina en el locus de *FLC* como respuesta al frío (Michaels & Amasino, 1999).

Dentro del proceso de represión epigenética de *FLC* están involucrados ARN largos no codificantes (lncARN) (Zografs & Sung, 2012). A partir de la región 3' de *FLC* se origina un tipo de lncARN, *COOLAIR*, que es transcripto en dirección antisentido en relación al locus *FLC* (Hornýík et al., 2010; Swiezewski et al., 2009). La expresión de *COOLAIR* aumenta con la exposición al frío (Swiezewski et al., 2009). Sin embargo, la transcripción de este lncARN antisentido no explica completamente la regulación de *FLC* (Helliwell et al., 2011). La represión estable de *FLC* mediada por

vernalización es también dependiente de un ARN intrónico no codificante, *COLDAIR* (*COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA*) que es transcrita a partir del primer intrón de *FLC* durante la exposición al frío e interactúa físicamente con PRC2 (Heo & Sung, 2011). Cuando *COLDAIR* se encuentra ausente, se ve una desregulación en el enriquecimiento de PRC2 en la cromatina de *FLC*, por lo tanto, *COLDAIR* es requerido para la represión estable de *FLC* a través de su interacción con PRC2 durante la respuesta a vernalización (Heo & Sung, 2011; Zografs & Sung, 2012).

El fenómeno de percepción de la vernalización está también fuertemente asociado a la regulación de la metilación del ADN. En *Arabidopsis* la reducción de la metilación en contextos CG como consecuencia de la inhibición de la actividad de la enzima METILTRANSFERASA 1 (MET1) acelera la floración (Finnegan et al., 1996).

1.3. Integración de la información ambiental

Debido a que los distintos estadios del ciclo de vida presentan distinta tolerancia a las condiciones ambientales, las plantas deben regular las transiciones del desarrollo de modo tal que cada estadio del ciclo de vida sea expuesto a las condiciones ambientales óptimas que permitan su desarrollo y supervivencia. La regulación apropiada de las transiciones del desarrollo requiere la percepción de caracteres estacionales para que haya una coordinación efectiva a lo largo del ciclo de vida (Auge et al., 2017). Para las plantas anuales, las cuales germinan, florecen y semillan en el curso de un año, hay dos transiciones del desarrollo que son clave: la transición del estadio vegetativo al estadio reproductivo (floración) y la transición de semilla a plántula (germinación) (Auge et al., 2017; Donohue et al., 2010; Ehrlén, 2015). El momento en que suceden dichas transiciones del desarrollo está bajo intensa selección natural y está fuertemente regulado por las condiciones ambientales, respondiendo a temperatura, calidad de luz, fotoperíodo y otros factores (Amasino, 2004; Donohue et al., 2010; Ehrlén, 2015; Holdsworth et al., 2008; Lawesson, 2000; Scott D. Michaels et al., 2005; Munguía-Rosas et al., 2011; Simpson & Dean, 2002).

La información ambiental es integrada por las plantas de manera que las condiciones ambientales experimentadas por las plantas madre influencian el comportamiento de la progenie (English et al., 2015; J. Marshall & Uller, 2007). En plantas hay varios efectos transgeneracionales registrados; un ejemplo de esto en *Arabidopsis thaliana* es la reducción de la germinación y de la longevidad de las semillas como respuesta al período de frío atravesado por las plantas madre antes o durante el desarrollo de la semilla (Auge et al., 2017; Burghardt et al., 2016; MacGregor & Penfield, 2015; Penfield & Springthorpe, 2012). Estos efectos de la temperatura persisten también en semillas post-maduradas (pérdida de dormición primaria) y atraviesan el ciclado de la dormición (Auge et al., 2017; Burghardt et al., 2016).

Es de gran interés entonces entender cómo la respuesta transgeneracional a condiciones ambientales, incluyendo la herencia epigenética, contribuye a la evolución adaptativa. Los padres encaran una serie de decisiones críticas en lo que respecta a la reproducción (Boesch, 1992; Rose & Mueller, 1993; Royle et al., 2012). La primera gran decisión es reproducirse, en cuyo caso la siguiente decisión tiene que ver con la inversión de recursos en la progenie. La elección óptima maximiza el éxito reproductivo (*fitness*) mediante la compensación entre la reproducción presente y

futura (Ratikainen et al., 2018). En plantas, otra gran decisión en cuanto a la inversión de recursos con el fin de garantizar el éxito reproductivo está relacionada con el balance entre la cantidad y la calidad de las semillas. Este balance podría estar determinado por las condiciones ambientales experimentadas por la planta madre, ya que en ambientes favorables podría haber una mayor inversión en la cantidad respecto a la calidad debido al exceso de recursos disponibles que cubren los requerimientos nutricionales de las semillas (Godfray, 1995; Shaanker et al., 1988). Por otro lado, si el ambiente es estresante podría verse favorecida la calidad de las semillas por sobre la cantidad, la planta madre favorece el *fitness* de la progenie y de esta manera garantiza su supervivencia (Godfray, 1995; Shaanker et al., 1988). La correcta percepción de las condiciones ambientales podría ser de vital importancia para determinar el *fitness* de los individuos, ya sea para el correcto ajuste de las transiciones del desarrollo a los distintos períodos estacionales garantizando su supervivencia, como para la producción de progenie con capacidad de desarrollarse en el ambiente en el que se encuentra favoreciendo el éxito reproductivo (Kuijper & Johnstone, 2018). En el presente trabajo hicimos foco en la percepción e integración de la información de los estímulos ambientales y en su relación con la regulación en las transiciones del desarrollo, pero también exploramos las consecuencias sobre algunas medidas del *fitness*.

1.3.1. Ajuste del ciclo de vida a los cambios estacionales

Los efectos transgeneracionales, en los cuales los cambios ambientales experimentados por generaciones pasadas afectan las respuestas de las siguientes generaciones, pueden influir en las trayectorias evolutivas de comunidades vegetales naturales y tienen el potencial de afectar el manejo y la producción de sistemas agrícolas en el corto y largo plazo (English et al., 2015; Yamamichi & Hoso, 2017). Los elementos moleculares que median estos efectos e influyen en las respuestas de las plantas a través de las generaciones, son en gran parte desconocidos, por lo que su estudio es de principal interés, particularmente en lo que respecta a las transiciones del desarrollo. La germinación y la floración son las principales transiciones del desarrollo en el ciclo de vida de las plantas y deben ser sincronizadas correctamente con los cambios estacionales para maximizar el *fitness* (supervivencia y éxito reproductivo). Los cambios cíclicos en temperatura, asociados con el paso de las estaciones, tienen entonces una fuerte influencia en la regulación de germinación y floración.

En *Arabidopsis*, estudios fisiológicos, genéticos y moleculares usando mutantes de genes relacionados con las vías de señalización que regulan la floración permitieron dilucidar diversas vías que promueven esta transición del desarrollo, incluyendo el fotoperíodo, la vernalización y la vía de señalización autónoma (Simpson & Dean 2002). Estas vías convergen en la regulación transcripcional de los genes integradores de la floración, *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*), *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) y *LFY* (*LEAFY* - involucrado en la determinación del meristema floral) (Araki, 2001; Scott D. Michaels et al., 2005; Parcy, 2005; Simpson & Dean, 2002). Entre estos genes integrales de la floración, *FT* se caracteriza por ser un *target* directo de *CO* (*CONSTANS*), un regulador central de la vía de señalización del fotoperíodo, y de *FLC*, regulador central de señalización de la vía de vernalización (Scott D. Michaels

INTRODUCCIÓN

et al., 2005; Samach et al., 2000). La expresión del ARN mensajero y/o la proteína de *FT* son interpretadas como parte de las señales que desencadenan la floración llamadas florígeno (Corbesier & Coupland, 2006; Ikeda et al., 2007; Imaizumi & Kay, 2006). De esta manera, la convergencia de distintas vías en reguladores comunes permiten la optimización de los fenotipos para que las transiciones del desarrollo, en este caso la floración, sucedan en el ambiente más propicio para la supervivencia de la planta en desarrollo.

A su vez, características de la planta madre tales como su edad y la posición del fruto -relacionadas con las condiciones ambientales experimentadas por ellas-, tienen influencia en características de las semillas, incluyendo el tamaño, la dormición y la germinación (Penfield, 2017; Roach & Wulff, 1987). Los efectos parentales en el tamaño de la semilla, están regulados por la remodelación de la cromatina y el dosage génico (Scott et al., 1998), y son determinados durante el desarrollo del endosperma por medio de un proceso de impronta genética - expresión de genes específicos dependiente del sexo del progenitor (Gehring, 2013). En *Arabidopsis*, la impronta genética es clave para la regulación de la expresión en el endosperma (Hsieh et al., 2011; Jullien & Berger, 2009; Kinoshita et al., 2004; Penterman et al., 2007). Además, el desarrollo de la semilla en *Arabidopsis* está asociado con pequeños ARNs de interferencia (*siRNAs*), cuya biogénesis depende de la Polimerasa de ARN IV (Pol-IV) (Lu et al., 2012; Mosher et al., 2009; Onodera et al., 2005; Raissig et al., 2011). La expresión espacio-temporal de un gran número de estos *siRNAs* depende del alelo materno en el endosperma y regula el dosage génico de diversos genes, tales como *AGL91* y *AGL40* que están involucrados en la división celular y regulación del tamaño de la semilla (Kirkbride et al., 2019; Lu et al., 2012; Raissig et al., 2011). Del mismo modo, la herencia materna está asociada a los niveles de dormición de la semilla por estar involucrada en la impronta génica sobre genes específicos de dormición en el endosperma maduro (Buijs et al., 2020). Sumado a esto, la expresión alelo específica en el endosperma de genes específicos de dormición es regulada por modificaciones epigenéticas (Iwasaki et al., 2019; Piskurewicz et al., 2016). Por lo tanto, considerando que la expresión parental-específica es primordial para el establecimiento de los niveles de dormición, es esperable que los niveles de dormición sean influenciados por condiciones climáticas experimentadas por la planta madre. Particularmente bajas temperaturas durante el desarrollo de la planta madre conllevan a niveles más altos de dormición en las semillas maduras de *Arabidopsis* (Kendall et al., 2011). Esta respuesta está controlada por los genes *FLC* y *FT* (Chen et al., 2014; Chiang et al., 2009). La integración de la información ambiental que regula los caracteres tempranos de la progenie es entonces clave para el ajuste de los ciclos de vida a los cambios estacionales. Coincidientemente, muchos genes que están involucrados en la regulación de la germinación y la floración en respuesta a cambios en el ambiente se han identificado y caracterizado en diversas especies. En *Arabidopsis*, se ha demostrado que genes que regulan floración también regulan germinación, y viceversa. Como mencionamos recientemente, el represor central de la floración *FLC*, que determina el requerimiento de vernalización para inducir la floración (Sheldon et al., 2000), y el integrador floral *FT*, regulan de manera pleiotrópica la germinación (Chen et al., 2014; Chiang et al., 2009). Otros genes de la vía de la vernalización han sido asociados con la regulación de la germinación, entre ellos *FRIGIDA* (*FRI*), *VERNALIZATION INDEPENDENCE3* (*VIP3*), *VIN3* y *VERNALIZATION2* (*VRN2*) (Auge et al., 2017). Por otro lado, *DELAY OF GERMINATION1* (*DOG1*),

asociado a la variación natural poblacional en dormición y germinación (Alonso-Blanco et al., 2003; Kronholm et al., 2012), regula pleiotrópicamente el tiempo a floración (Huo et al., 2016). Todos los genes mencionados presentan una compleja regulación epigenética (Auge et al., 2017; Samach et al., 2000). Por lo tanto, dado que muchos de los genes involucrados en la regulación pleiotrópica de germinación y floración están asociados con modificaciones epigenéticas, particularmente con el grado de metilación de la cromatina, y dichas modificaciones epigenéticas pueden estar asociadas con la expresión alelo-específica de pequeños ARNs, es fundamental estudiar la relación entre las experiencias maternas y los fenotipos de la progenie para avanzar en la comprensión de los efectos transgeneracionales y el desarrollo de las semillas. Es a su vez necesario identificar los mecanismos moleculares subyacentes.

1.3.2. El mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM)

La epigenética consiste en cambios heredables en la actividad génica que no son causados por cambios en la secuencia nucleotídica, sino por modificaciones químicas de la cromatina (Bonasio et al., 2010). Estas modificaciones ocurren en el nucleosoma a través de reacciones bioquímicas que incluyen la metilación del ADN y modificaciones en las histonas (Yaish et al., 2011). La metilación del ADN es el agregado mediante una unión covalente de un grupo metilo a una citosina, mientras que las modificaciones en las histonas corresponden a la acetilación (Grunstein, 1997), ADP-ribosilación (Tanigawa et al., 1984), glicosilación (Cervantes-Laurean et al., 1996), metilación (Zhang & Reinberg, 2001), fosforilación (Treviño et al., 2015), ubiquitinación (Sridhar et al., 2007), o SUMOilación (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007) en residuos de lisina o arginina de la cola de aminoácidos de las histonas. Comúnmente, la metilación de ADN conlleva a una disminución en la expresión génica, mientras que las modificaciones en las histonas son más complejas y conllevan a diferentes alteraciones en la expresión génica que dependen de la modificación involucrada (Richards & Elgin, 2002). A su vez, el proceso de metilación del ADN involucra a pequeños ARNs no codificantes (ncARN) que regulan la expresión génica a partir de la regulación de los patrones de metilación (Matzke & Birchler, 2005). Modificaciones en los patrones de metilación del ADN están a su vez relacionados con la modulación de transiciones del desarrollo en plantas y están asociadas a la respuesta por estrés biótico y abiótico (Yaish et al., 2011).

La alteración de los niveles globales de metilación del ADN puede modificar el tiempo a floración en numerosas especies (Yaish et al., 2011). La vernalización de la planta madre, que regula la germinación de la progenie, también afecta la frecuencia de metilación del ADN en el genoma de la progenie, especialmente en regiones ricas en transposones (G. Auge, M. Alvarez, K. Donohue, datos no publicados). La metilación del ADN, además de conducir al silenciamiento de genes, es un mecanismo importante de silenciamiento de transposones y secuencias repetitivas intrónicas (Slotkin et al., 2009; X. Zhang et al., 2006). En particular, el mecanismo de metilación del ADN dirigido por ARN (*RNA-directed DNA Methylation mechanism* o RdDM) silencia transcripcionalmente secuencias repetitivas y la expresión de transposones (Erdmann & Picard, 2020; Liu et al., 2021; Matzke et al., 2014). El mecanismo RdDM es único de plantas y está compuesto por dos vías que se diferencian en ciertos elementos: la canónica y la no canónica (Figura 1.3.2.1) (Erdmann & Picard, 2020; Matzke et al., 2015).

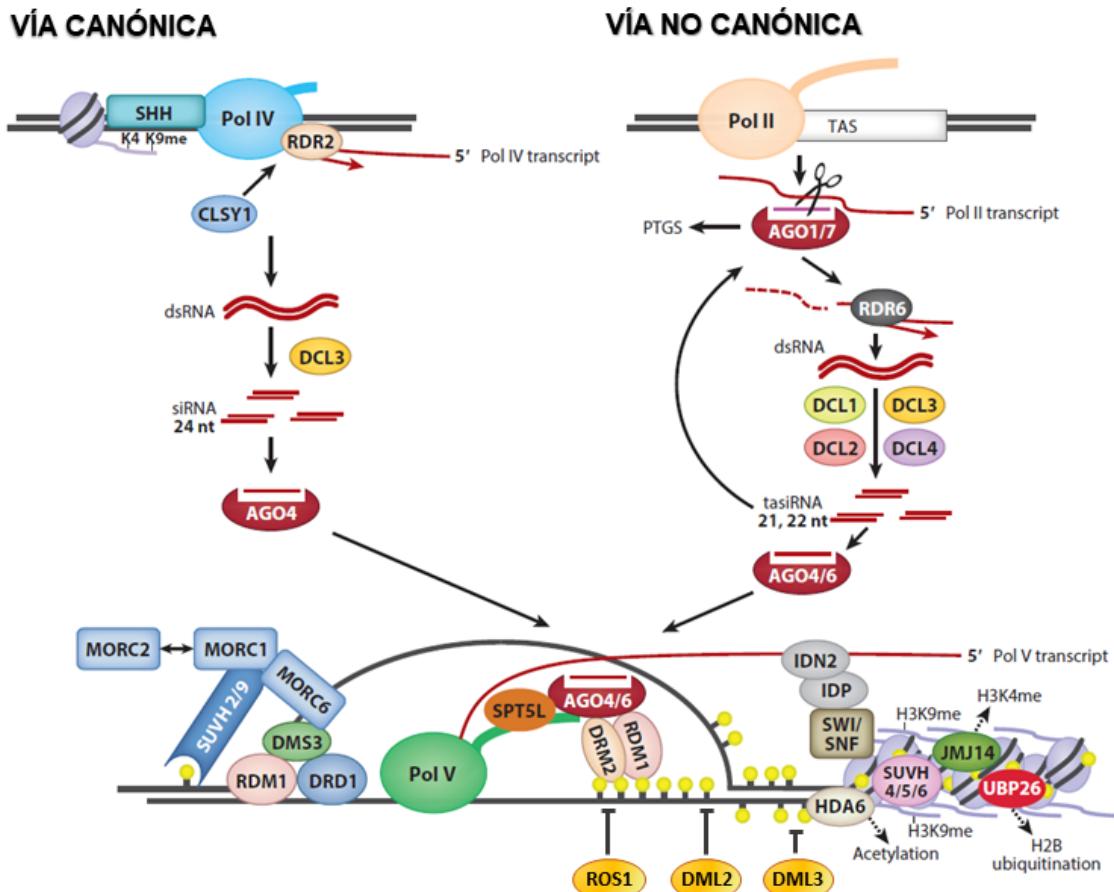


Figura 1.3.2.1: Vías canónica y no canónica del mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM). Arriba a la izquierda se observa la vía canónica. SHH1 se une a la histona H3 desmetilada en la lisina 4 (K4) y metilada en la lisina 9 (K9), y recluta a la Pol-IV para transcribir la región *target*. RDR2 interactúa físicamente con Pol-IV y convierte a los transcriptos en RNAs de doble cadena con la asistencia del remodelador de cromatina CLSY1. Los RNA doble cadena son procesados por DCL3, convirtiéndolos en siRNAs de 24 nucleótidos, y son incorporados en AGO4 o AGO6, para luego entrar en la rama de la vía mediada por Pol-V que produce metilación del DNA de novo. Arriba a la derecha se observa la vía no canónica. Pol-II transcribe ARNs TAS (Trans-acting siRNA) no codificantes, que son una clase de siRNA que reprimen la expresión a través del silenciamiento post transcripcional en plantas, que son cortados por AGO1 o AGO7. RDR6 transforma el RNA cortado en RNA doble cadena, que luego es procesado por varias proteínas con actividad DCL obteniendo siRNAs de 21-24 nucleótidos. Los ARNs de 21-22 nucleótidos corresponden a la clase de tasiRNAs (siRNAs que actúan en trans). Estos son incorporados a AGO4/6 para guiar la metilación de novo en genes TAS mediada por Pol-V. Un mecanismo similar ocurre con transposones recientemente insertados a partir del mecanismo RdDM mediado por Pol-II y RDR6. En la región de abajo de la figura se puede observar el proceso de metilación de DNA y formación de heterocromatina dependiente de Pol-V. La Pol-V es reclutada hacia algunos loci por SUVH2 y SUVH9, proteínas que se unen a regiones metiladas de DNA, y transcribe el locus *target* para producir un ARN de andamiaje que mediante apareamiento de bases se une al siRNA guía que a su vez se encuentra unido a AGO4/6. AGO4 interactúa con las regiones de unión para AGO en SPT5L y el dominio C-terminal de NRPE1 y DRM2, cuya función con DRD1 y DMS3 en el complejo DDR es liberar la transcripción de Pol-V a través de la cromatina y abrir la doble hélice de ADN. De manera opuesta las demetilasas ROS1, DML2 y DML3 regulan negativamente la metilación favoreciendo la desmetilación de la cromatina en genes *target* del mecanismo (Esquema modificado de Matzke et al., 2015).

La vía canónica se inicia con la síntesis de ARN por parte de la RNA Pol-IV que interacciona físicamente con RDR2 para convertir los transcriptos en ARN de doble cadena (dsRNA). Los dsRNAs son procesados por DCL3 en oligos de 24-nucleótidos que guían a AGO4 o AGO6 así entrando a la

vía de metilación dirigida por RNA Pol-V. La vía no canónica es iniciada por la síntesis mediada por la RNA Pol-II, seguido del clivado por parte de AGO1 o AGO7, copiado por RDR6 y el posterior procesamiento del ARN en oligos de 21-22-nucleótidos por DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4. Los oligos procesados de esta manera entran a la vía de la RNA Pol-V para dirigir la metilación del ADN. La RNA Pol-V sintetiza un ARN guía que se une a los ARN pequeños y recluta a AGO4, la cual interacciona con las metilasas DRM1 y DRM2 para catalizar la metilación de novo en el sitio *target* (Erdmann & Picard, 2020; Matzke et al., 2015). La metilación del ADN es dinámica y puede ser revertida para adaptarse a un determinado estímulo. En *Arabidopsis*, las demetilasas ROS1, DML2 y DML3 actúan sobre loci silenciados, probablemente permitiendo su activación (Ariel et al., 2014; Erdmann & Picard, 2020; Law & Jacobsen, 2010; Penterman, Uzawa, et al., 2007; Penterman, Zilberman, et al., 2007). Este mecanismo (RdDM) ha sido sugerido como mediador de la respuesta transgeneracional a estrés por congelamiento y está involucrado en la regulación de la dormición en respuesta al ambiente (Iwasaki et al., 2019; Migicovsky & Kovalchuk, 2014), por lo que resulta interesante estudiar su contribución en el ajuste transgeneracional de los ciclos de vida de las plantas en respuesta a los cambios estacionales (cambios ambientales no estresantes).

El mecanismo RdDM es el único mecanismo de metilación del ADN que puede agregar el grupo metilo de *novo* en los tres contextos de secuencia: CG, CHH y CHG (Erdmann & Picard, 2020). Existen, sin embargo, vías adicionales de metilación del ADN. Mientras que la altamente conservada metiltransferasa MET1 mantiene la metilación en el contexto CG, las transferasas específicas de plantas CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2) y CMT3 tienen como función mantener la metilación en los contextos CHH y CHG, respectivamente (Erdmann & Picard, 2020). La pérdida de función de alguna de estas vías puede ser compensada en ciertas condiciones por las otras, permitiendo mantener, aunque sea parcialmente, la homeostasis de metilación en el genoma (Stroud et al., 2013). El mecanismo RdDM además interacciona con la maquinaria de remodelación de la cromatina, la cual regula las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Erdmann & Picard, 2020). De esta manera, el mecanismo RdDM, con su capacidad de regular la metilación del ADN en todos los contextos de secuencia de forma dinámica, y de interaccionar con otros mecanismos que regulan la expresión de genes mediante marcas epigenéticas, es un excelente candidato como integrador transgeneracional de información ambiental. En esta tesis exploramos su rol como elemento de la memoria ambiental transgeneracional.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis del trabajo: Los cambios ambientales experimentados temprano en el ciclo de vida por la planta madre son traducidos en una combinación de modificaciones epigenéticas a través de la vía de metilación de ADN mediada por ARN (*RNA-directed DNA Methylation*, RdDM), regulando respuestas adaptativas a los cambios ambientales en las semillas de la progenie.

Objetivo General: Estudiar cómo los ambientes experimentados a lo largo del ciclo de vida de las plantas, especialmente los experimentados durante el desarrollo temprano, pueden afectar las respuestas de germinación y floración a lo largo de las generaciones e identificar mecanismos potenciales involucrados.

Más específicamente:

Hipótesis específica 1: La vernalización de la planta madre afecta el desarrollo en el corto plazo en la misma generación que experimenta el estímulo ambiental, y también las respuestas tempranas del desarrollo de la progenie.

Objetivo específico 1: Explorar la influencia de la vernalización sobre caracteres clave del ciclo de vida de la planta madre (tiempo a floración y producción de biomasa reproductiva) y la progenie (características de las semillas, dormición, germinación y desarrollo de plántula)

Hipótesis específica 2: El ambiente materno interacciona con el ambiente de la progenie modulando la expresión de la variación epigenética a través del mecanismo RdDM.

Objetivo específico 2: Evaluar el rol del mecanismo RdDM como posible mensajero e integrador de la información ambiental transgeneracional a partir del estudio del fenotipo de mutantes del mecanismo RdDM.

Hipótesis específica 3: La variación epigenética, especialmente cambios en la frecuencia de metilación del ADN que genera epialelos dirigida por el mecanismo RdDM, actúa otorgando plasticidad transgeneracional y permitiendo la expresión de fenotipos óptimos en respuesta a ambientes experimentados por generaciones anteriores.

Objetivo específico 3: Identificar variaciones en los fenotipos de las mutantes del mecanismo RdDM en respuesta al ambiente materno y asociarlo a potenciales genes involucrados proponiendo nuevos mecanismos que podrían estar actuando para analizar en futuros estudios.

Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las líneas mutantes del mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (*RNA-directed DNA Methylation*, RdDM) *rdr2*, *rdr6*, *dcl234*, *ago4*, *nrpd2a* y *rdd*, todas en la base genética correspondientes a la accesión Columbia (Col-0), fueron obtenidas gracias a la donación de los grupos de Javier Palatnik (IBR-CONICET-UNR, *rdr2*, *rdr6* y *dcl2/3/4*), Sebastián Asurmendi (Instituto de Biotecnología, CYCRIA-INTA Castelar, *ago4*) y Federico Ariel (IAL-CONICET-UNL, *nrpd2a* y *rdd*). Se usó como genotipo de referencia al ecotipo Columbia (Col-0) contra el cual se compararon a las mutantes ya mencionadas. La información correspondiente a las características de las mutantes se encuentra disponible en el apéndice A.1.

3.2. Condiciones de crecimiento

Las plantas fueron crecidas en dos condiciones diferentes: vernalización (V) o no vernalización (NV). En ambas condiciones, en el paso inicial las semillas fueron embebidas en placas con agar-agua 0,6% p/v (Plant Agar, Duchefa Biochemie) y luego estratificadas a 4°C durante 4 días en oscuridad. Pasados los cuatro días, con el uso de una pipeta se tomaron las semillas presentes en la placa con agar-agua y se transfirieron a macetas de 180 cc. con una mezcla de tierra negra (Grow Mix Multiprop, Agroquímica Larrocca S.R.L.) y perlita (Agroquímica Larrocca S.R.L.) (2:1). Una vez sembradas las macetas se colocaron en un cuarto de cultivo a 22°C, 16h luz (día largo, DL) en un cuarto con control de temperatura (iB3, FCEN-UBA). Pasados 7 días se procedió a remover el exceso de plántulas dejando una planta focal por maceta.

Aquellas plantas que se crecieron bajo la condición de no vernalización (NV) se mantuvieron a 22°C, 16h luz en el cuarto de plantas por el resto de su ciclo de vida; mientras que aquellas plantas crecidas bajo la condición de vernalización (V), luego de la remoción del exceso de plántulas, se transfirieron a una cámara de frío durante 4 semanas con un fotoperíodo de 12h a 7°C día / 5°C noche (Model I30BLL, Percival Scientific, Perry, IA, Estados Unidos). Una vez finalizadas esas cuatro semanas en la cámara de frío, las plantas fueron colocadas nuevamente en el cuarto de cultivo a 22°C, 16h luz y se mantuvieron en esas condiciones durante el resto de su ciclo de vida.

Una vez que las plantas tratadas con ambos tratamientos florecieron y ya contaban con el escape floral, se les agregó un tutor de madera y se las fertilizó con solución de Hakaphos 0,1% p/v (Compo Agricultura). La cosecha de las semillas provenientes de plantas de ambas condiciones de crecimiento se llevó a cabo cuando $\frac{2}{3}$ de los frutos se encontraron maduros y secos, y las semillas se almacenaron a 22°C en un ambiente seco hasta el momento de ser usadas para los experimentos. Tanto el cuarto de cultivo como la cámara de plantas utilizados para los ensayos contenían luces policromáticas LED [radiación fotosintéticamente activa (PAR): 120–150 mmol m⁻² s⁻¹].

3.3. Generación de material inicial (F0) y de datos preliminares

Este paso es necesario para homogeneizar las condiciones iniciales de crecimiento y evitar cualquier efecto transgeneracional no deseado. Semillas de todos los genotipos fueron crecidas en condiciones tanto de vernalización (V) como no vernalización (NV) tal como fue detallado en 3.2. Se midió el tiempo a floración contando el número de hojas desarrolladas y días hasta el momento de aparición del botón floral para poder realizar un calendario de siembra que permita sincronizar el momento de floración, y por lo tanto la cosecha de la F1. Aquellas semillas de los distintos genotipos provenientes del tratamiento NV fueron utilizadas para crecer la primera generación (F1).

3.4. Desarrollo de las plantas de la primera generación (F1)

A partir de semillas de plantas F0 NV, se crecieron 12 réplicas (plantas madre F1) de cada genotipo para cada tratamiento. Se caracterizó el tiempo a floración como se describe en 3.3, y se cosecharon todas las plantas en un mismo día cuando aproximadamente $\frac{2}{3}$ de los frutos se encontraron maduros (segunda generación, F2). Las semillas de cada planta madre fueron almacenadas por separado en tubos de plástico de 1.5 mL y secadas por 3 días en un recipiente hermético con sílica gel. Luego fueron almacenadas en un freezer a -80°C hasta el momento de los ensayos de germinación.

3.4.1. Tiempo hasta aparición del botón floral

En este caso, dado que el ecotipo utilizado (Col-0) no requiere pasar por un período de vernalización para florecer, se procedió a realizar el análisis estadístico por un lado considerando el tiempo en el que las plantas que fueron vernalizadas se encontraron en la cámara de frío con un fotoperíodo de 12h a 7°C día/5°C noche; y por otro lado no considerando dicho tiempo, es decir, se estudió el tiempo durante el cual las plantas se encontraron a 22°C, 16h luz (día largo, DL) en el cuarto de cultivo hasta que apareció el botón floral.

Para analizar las diferencias en el tiempo a floración para los distintos genotipos ante los distintos tratamientos, se tomaron los días transcurridos desde el momento de siembra en maceta hasta el momento de aparición del botón floral para cada planta. Se ajustaron los datos a un modelo lineal general con distribución normal utilizando la función "lm" en "R" estudiando la interacción entre los factores genotipo y tratamiento. Se estudió el coeficiente de interacción del modelo implementado mediante un análisis de varianza utilizando la función "Anova" del paquete "car". Se procedió a realizar comparaciones *a posteriori* mediante la utilización de contrastes múltiples de Tukey que permite comparar todas los valores medios obtenidos sin aumentar la probabilidad de cometer error de tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando esta es en verdad correcta) debido al control del error global.

3.4.2. Hojas hasta aparición del botón floral

Se tomaron los valores de las hojas totales alcanzadas por cada planta madre al momento de aparición del botón floral, es decir, al momento en que ocurre un cambio de desarrollo vegetativo a

desarrollo reproductivo. Se analizaron las diferencias entre las hojas totales obtenidas por las plantas correspondientes a distintos genotipos y expuestas a distintos tratamientos. Se ajustaron los datos a un modelo lineal general utilizando la función "lm" en "R" estudiando la interacción genotipo-tratamiento y luego se realizó un análisis de la varianza mediante el uso de la función "Anova" del paquete "car". Se realizaron comparaciones *a posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

3.5. Ensayos de germinación

Para estudiar la respuesta de germinación de la progenie se utilizaron las semillas (F2) cosechadas de las plantas F1 que fueron almacenadas como se detalla en 3.2.2. Por cada planta madre (12 réplicas por cada genotipo) se sembraron 20 semillas en una placa de Petri con agar-agua (0,6% p/v) y se incubaron en condiciones de día largo (16h luz, 8h oscuridad) a 24°C [radiación fotosintéticamente activa (PAR): 120–150 mmol m⁻² s⁻¹]. La germinación fue controlada periódicamente (diariamente en la primera semana, luego cada 2 días), midiendo cantidad de semillas con protrusión radical por placa con una lupa estereoscópica, hasta que no se observó nueva germinación de un conteo a otro (*plateau* de germinación).

3.5.1. Proporción de germinación

A partir de los datos obtenidos de germinación, se calculó la proporción de germinación por cada día como la cantidad de semillas germinadas al día analizado respecto al número total de semillas viables sembradas por placa. Las semillas no germinadas fueron consideradas viables si al final de la incubación conservaron su firmeza (Vayda et al., 2018). Se procedió a analizar la correlación en la proporción de germinación entre días. Debido a que entre el día 7 y el día 9 se obtuvo un coeficiente de correlación igual a 1 (ver apéndice A.2) se tomaron los valores de germinación del día 7 para realizar el análisis ya que corresponden al día en el que se alcanzó el *plateau* de germinación; tomar los datos a tiempos mayores podría agregar error por interacción con variables que no se están analizando en el presente trabajo.

Con los datos de proporción de germinación se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución quasi-binomial, ya que el ajuste a la distribución binomial no fue posible debido a la obtención de sobredispersión lo que conlleva al incumplimiento de los supuestos de la distribución. Para ello se utilizó la función "glm" en "R", se utilizó un análisis de la varianza mediante la función "Anova" del paquete "car" y se realizaron comparaciones *a posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

$$\text{Proporción de germinación}_{\text{placa}} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{semillas viables}} \quad [\text{E1}]$$

3.5.2. Velocidad de germinación

Se calculó la velocidad de germinación de cada placa de semillas analizada utilizando la siguiente función:

$$\text{Velocidad de germinación } (V) = \sum_{n=2}^9 \frac{\frac{\text{germ}(n+1) - \text{germ}(n)}{n \text{semillas}}}{n} \quad [\text{E2}]$$

Donde $\text{germ}(n+1)$ es la germinación en cada placa del día $n+1$, $\text{germ}(n)$ es la germinación en cada placa al día n , $n \text{semillas}$ es el número total de semillas viables en la placa, y n es el día de conteo.

Se tomaron los datos obtenidos de velocidad de germinación y se los utilizó para ajustar un modelo lineal generalizado con distribución *gamma* mediante el uso de la función "glmmTMB" de la librería "glmmTMB". Se procedió a analizar las diferencias en la velocidad de germinación entre las plantas con distintos genotipos expuestas a los distintos tratamientos mediante un análisis de la varianza aplicando la función "Anova" de la librería "car" y seguido a ello realizando comparaciones a *posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

3.6. Ensayos de dormición secundaria

Para inducir la dormición secundaria, semillas post-maduradas a temperatura ambiente por 10 semanas se expusieron a altas temperaturas (35°C) en oscuridad. Semillas cosechadas en 3.2.2 fueron embebidas en placas de Petri de 35 mm con 0,6% p/v e inmediatamente incubadas en oscuridad a 35°C en cámaras de incubación (I-501PF, Ingeniería para Laboratorios SRL, Argentina) durante 2 o 5 días. Luego de la estratificación por calor, las placas fueron incubadas a 22°C en un ciclo de 16h luz, 8h oscuridad [radiación fotosintéticamente activa (PAR): $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] en un cuarto de crecimiento de plantas durante 7 días. Las placas control, sin pre-incubación, se prepararon a su vez embebiendo las semillas en placas de 35mm con 0,6% p/v y se incubaron en las condiciones descriptas anteriormente sin el pretratamiento de calor.

Para todos los ensayos de germinación se sembraron 20 semillas obtenidas de cada planta madre (3.2.2) por placa. El número de réplicas biológicas (semillas provenientes de distintas plantas madres) fueron doce para el experimento con semillas pre-incubadas en estratificación por calor durante dos días y sin pre-incubación (control), y seis para el experimento con semillas pre-incubadas en estratificación por calor durante 5 días.

A los 7 días de la incubación en el cuarto de crecimiento de plantas, se midió la proporción final de germinación como la cantidad total de semillas germinadas (semillas con protrusión radical) respecto a la cantidad total de semillas sembradas por placa. Para ello se utilizó una lupa estereoscópica.

Para analizar los efectos de la inducción de la dormición secundaria por calor y su relación con el genotipo de las semillas y el tratamiento de las plantas madre, se utilizaron los datos de proporción de germinación para ajustar a un modelo lineal generalizado mixto con distribución binomial declarando la falta de independencia entre observaciones a partir del anidamiento a la planta madre, ya que la matriz de varianza-covarianza que se ajustaba de mejor manera a los datos analizados resultó ser la de simetría compuesta. Para ello se implementó la función "glmmTMB" de la librería "glmmTMB" en "R" tomando al tiempo de incubación como variable cualitativa, no fue posible ajustar un modelo de

regresión como consecuencia del incumplimiento del supuesto de linealidad. Se implementó un análisis de la varianza mediante el uso de la función "Anova" del paquete "car" y seguido a ello se realizaron comparaciones *a posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

3.7. Características de las semillas

3.7.1. Correlación entre caracteres analizados

Para la correlación entre los caracteres analizados, se utilizaron los valores medios para cada una de las características tomando como réplica cada planta madre. Se utilizó la función de matrices de correlación dentro del paquete 'rstatix' en 'R' que analiza si la correlación entre dos variables es significativamente distinta a cero mediante el método de spearman.

3.7.2. Medición del peso de las semillas

Para caracterizar la producción de biomasa reproductiva se realizaron mediciones del peso total de las semillas F2 producidas por cada planta F1.

Los tubos de plástico de 1.5 mL conteniendo a las semillas de cada planta fueron pesados con una balanza de precisión. Al valor obtenido (correspondiente al peso del tubo sumado a las semillas) se le restó el valor del peso del tubo de plástico de 1.5 mL, para ello se cuantificó el peso de 3 tubos de plástico de 1.5 mL y se consideró el valor promedio. En los casos en los que el valor obtenido del peso de las semillas, al restarles el valor del peso promedio de tubos de plástico de 1.5 mL, fue menor a cero, se lo consideró como nulo.

Con los datos del peso de las semillas se realizó el ajuste a un modelo lineal general con distribución normal, utilizando la función "lm" en "R" estudiando la interacción entre las variables explicatorias genotipo y tratamiento. Se realizó un análisis de la varianza mediante el uso de la función "Anova" del paquete "car" y se realizaron comparaciones *a posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

3.7.3. Medición del tamaño de las semillas

La medición del tamaño de las semillas se realizó a partir de fotos tomadas con una cámara de fotos NIKON D3300 (ISO 1600, 1/160 segundos f/8 55mm) de 20-40 semillas de cada planta madre con una hoja milimetrada como referencia de la escala y un identificador. Para realizar las mediciones se utilizó el programa ImageJ.

En primer lugar se estableció la escala de la imagen en milímetros, utilizando la hoja milimetrada como referencia. Luego se seleccionaron y transformaron en una imagen binaria las semillas de la fotografía, tomando aquellos objetos dentro del espacio de coloración HSB con brillo entre 0-203, saturación entre 159-255, y matiz entre 0-57. Se eliminaron los valores seleccionados de la imagen que no correspondían a semillas y se agregó una línea de píxeles entre las semillas superpuestas para poder considerar las semillas por separado y no sobreestimar los valores del área de semillas. Seguido a ello se procedió a obtener las medidas del área de las semillas y el número de semillas totales medidas usando el analizador de partículas del programa.

Se tomaron los valores del área de las semillas en mm^2 de cada planta madre y se ajustó a un modelo lineal general mixto declarando el anidamiento de las semillas a la planta madre correspondiente. Para ello se utilizó la función "lme" del paquete "nlme" en "R". Fue necesario realizar un modelado de la varianza para obtener un modelo que cumpla con los supuestos, por lo que luego de comparar diferentes modelos se seleccionó aquel modelado con la función de varianza 'varIdent' (adiciona una varianza diferente para cada grupo de datos) ya que resultó el más óptimo utilizando el criterio de información de Akaike (menor valor de AIC). Para analizar la diferencia en el tamaño de las semillas para los distintos genotipos expuestos a los distintos tratamientos, se realizó un análisis de la varianza utilizando la función "Anova" del paquete "car"; luego se realizaron comparaciones a *posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

3.7.4. Determinación del largo del hipocótilo

Se utilizó el largo del hipocótilo como medida de deposición de sustancias de reserva (recursos). Se tomaron 6 tubos de semillas de todos los genotipos y tratamientos, se sembraron 10 semillas de cada tubo en una placa con agar 0,6% p/v, se estratificaron por 5 días en oscuridad a 4°C, y posteriormente fueron expuestas a la luz por 16h a 22°C para inducir la germinación en un cuarto de crecimiento de plantas [radiación fotosintéticamente activa (PAR): $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]. Luego, se colocaron nuevamente en oscuridad a 22°C durante 7 días en el mismo cuarto. Una vez terminados los 7 días, se tomaron las placas de cada genotipo y tratamiento, y mediante el uso de una hoja milimetrada se obtuvieron las medidas del largo del hipocótilo de las plántulas.

Se ajustaron los datos del largo del hipocótilo a un modelo lineal general mixto declarando el anidamiento de las semillas a su planta madre correspondiente. Para ello se utilizó la función "lme" del paquete "nlme" en "R". Fue necesario realizar un modelado de la varianza para obtener un modelo que cumpla con los supuestos, por lo que luego de comparar diferentes modelos se seleccionó aquel modelado con la función de varianza 'varPower' (adiciona un único parámetro extra) ya que resultó el más óptimo utilizando el criterio de información de Akaike (menor valor de AIC). Para analizar la diferencia en el largo del hipocótilo entre los distintos genotipos expuestos a los distintos tratamientos, se realizó un análisis de la varianza utilizando la función "Anova" del paquete "car"; luego se realizaron comparaciones a *posteriori* mediante el uso de contrastes múltiples de Tukey.

3.8. Análisis estadístico

Para el total de los análisis estadísticos detallados se utilizaron diversos paquetes estadísticos desarrollados dentro del lenguaje de programación "R". Se determinaron las distribuciones de probabilidades utilizadas a partir del análisis de las características de las variables respuesta en estudio (cuantitativas continuas, cuantitativas discretas) y se analizó el buen ajuste a los modelos utilizados mediante el estudio gráfico del cumplimiento de los supuestos de la distribución implementada o del coeficiente de correlación en los casos en los que la distribución utilizada fue de tipo binomial.

Los gráficos de barra mostrados a lo largo del presente trabajo informan los valores predichos por los modelos ajustados con sus respectivos intervalos de confianza. Mientras que los gráficos de caja

de bigote (*boxplot*) muestran la mediana de los valores observados y la dispersión de los mismos. En todos los casos se detallan las diferencias significativas mediante el uso de la siguiente codificación: ‘***’ ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), ‘ns’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

Las bases de datos con las cuales se trabajó en el presente trabajo y el código utilizado con sus respectivos comentarios tanto en R como en R-Markdown (y el pdf obtenido a partir del compilado de este último) se encuentran disponibles en el siguiente [link](#).

Resultados

4.1. Desarrollo de las plantas de la primera generación

Con el fin de analizar las diferencias en el desarrollo de las plantas madres de los distintos genotipos expuestas a los distintos tratamientos, determinamos el momento en el que se realizó el cambio de crecimiento vegetativo a crecimiento reproductivo. Para ello medimos el tiempo en días hasta la aparición del botón floral y la cantidad de hojas que tenían las rosetas de las plantas con los distintos genotipos al momento de aparición del botón floral tal como fue detallado en 3.4.1 y 3.4.2.

4.1.1. Tiempo hasta aparición del botón floral

La transición del estadio vegetativo al estadio reproductivo, caracterizado por la floración, en el momento adecuado es esencial para muchas especies de plantas para reproducirse exitosamente. Dado que el tiempo a floración puede estar bajo control de muchos factores, incluidos los patrones de metilación a partir del mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN, procedimos a analizar el tiempo hasta aparición del botón floral para todos los genotipos estudiados bajo el tratamiento de vernalización o en condiciones de no vernalización. Analizamos el tiempo hasta aparición del botón floral considerando el tiempo que las plantas estuvieron a 22°C y 16h luz ya que consideramos que el tiempo durante el cual las plantas estuvieron en la cámara de frío retrasa el desarrollo vegetativo.

Con los datos del tiempo hasta aparición del botón floral realizamos comparaciones de las mutantes respecto a Col-0 para ambos tratamientos (Figura 4.1.1.1) y para cada uno de los genotipos entre tratamientos (Figura 4.1.1.2). En la figura 4.1.1.1 se puede observar que las plantas mutantes *rdr2*, *rdr6*, *dcl234* y *ago4* expuestas a tratamiento control de no vernalización precisaron un tiempo significativamente mayor que Col-0 (*wild type*) para alcanzar el estadio reproductivo. Sin embargo, cuando recibieron el tratamiento de vernalización no presentaron diferencias significativas respecto al genotipo salvaje, indicando que respondieron al tratamiento de vernalización. Por otro lado, las plantas mutantes para las demetilasas, *rdd*, alcanzaron el desarrollo reproductivo en un tiempo menor a Col-0 tanto cuando fueron expuestas a tratamiento de vernalización como no vernalización, sugiriendo un rol general en el tiempo a floración. Las plantas con genotipo *nRPD2a* no presentaron diferencias respecto a Col-0 en el tiempo hasta la aparición del botón floral en ninguno de los tratamientos. La respuesta contrastante de los mutantes que generan una hipometilación del genoma mediante la vía canónica del mecanismo RdDM respecto a *rdd* que genera la hipermetilación, sugiere efectos opuestos del balance de metilación en la transición de crecimiento vegetativo a reproductivo.

RESULTADOS

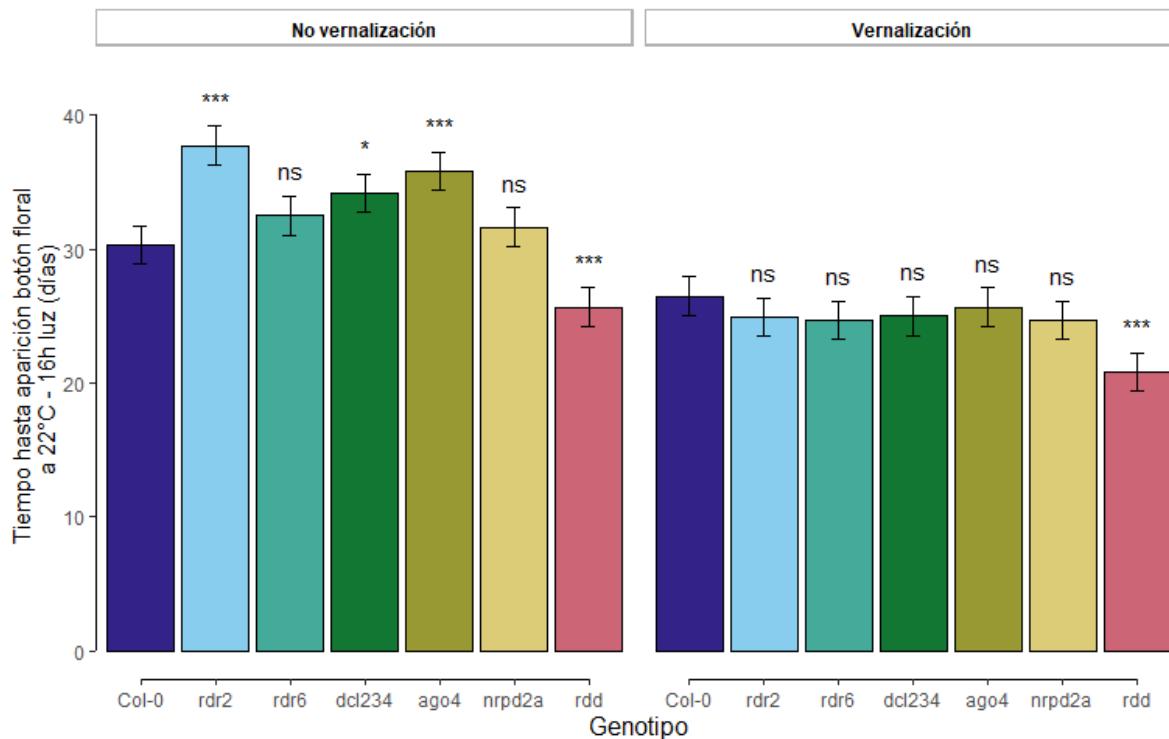


Figura 4.1.1.1: Tiempo hasta aparición del botón floral a 22°C-16h luz de todos los genotipos cuando fueron expuestos a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Los resultados significativos de la comparación respecto a Col-0 se indican con la siguiente codificación: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), 'ns' ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

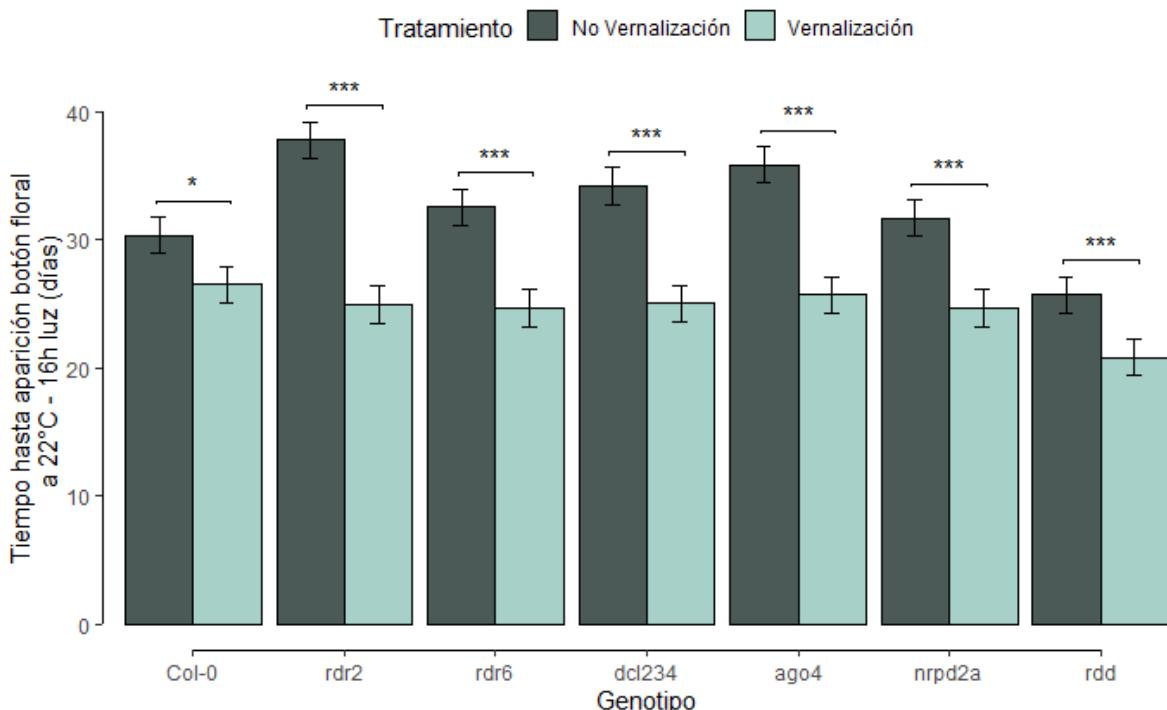


Figura 4.1.1.2: Tiempo hasta aparición del botón floral a 22°C-16h luz de todos los genotipos cuando fueron expuestos a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Los resultados significativos de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indica como: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$)

En lo que respecta a la diferencia en el tiempo de desarrollo para cada genotipo al ser o no expuesta al tratamiento vernalización, se puede observar en la figura 4.1.1.2 que para todos los genotipos el tiempo que precisaron para alcanzar el estadio reproductivo a 22°C-16h luz fue menor cuando fueron expuestas al tratamiento de vernalización, indicando que todos los genotipos responden a este tratamiento y que las mutaciones en el mecanismo RdDM no interrumpen la percepción del estímulo ambiental.

4.1.2. Hojas hasta aparición del botón floral

Debido a que el número de hojas al momento de aparición el botón floral es una medida mucho más certera del desarrollo de la planta, ya que plantas sometidas a estrés pueden demorar más en florecer pero debido a las restricciones en el desarrollo como respuesta al frío pueden presentar una menor cantidad de hojas, procedimos a analizar la cantidad de hojas de la roseta que alcanzaron las plantas de los distintos genotipos expuestas a los distintos tratamientos. En caso de que las plantas no hayan estado expuestas a periodos prolongados de frío se espera observar una correlación positiva entre la cantidad de hojas y el tiempo a floración.

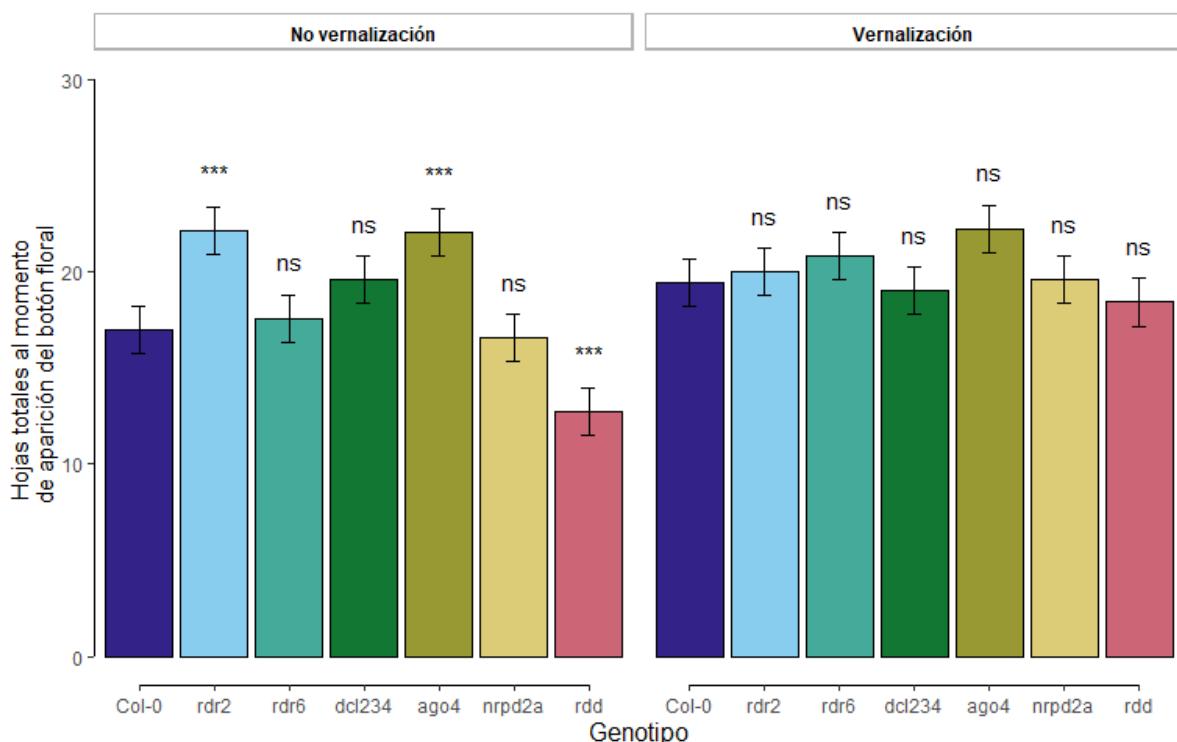


Figura 4.1.2.1: Cantidad de hojas de roseta al momento de aparición del botón floral en función del genotipo cuando fueron expuestos a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Los resultados significativos de la comparación respecto a Col-0 se indica con la siguiente codificación: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), 'ns' ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

Al igual que sucedió con el tiempo hasta la obtención del botón floral, en la figura 4.1.2.1 los genotipos *rdr2* y *ago4* presentaron mayor cantidad de hojas que Col-0 bajo el tratamiento de no vernalización y no presentaron diferencias significativas en el tratamiento vernalización. La mutante *rdd* a su vez presentó menor cantidad de hojas que Col-0 en el tratamiento no vernalización, lo que

RESULTADOS

coincide con su menor tiempo de desarrollo vegetativo, sin embargo en el tratamiento vernalización no presentó diferencias significativas. Las mutantes *rdr6*, *dcl234* y *nrpd2a* no presentaron diferencias significativas respecto a Col-0 en la cantidad de hojas de la roseta para ninguno de los dos tratamientos, siendo la última la que presentó la misma respuesta en el tiempo hasta alcanzar el botón floral.

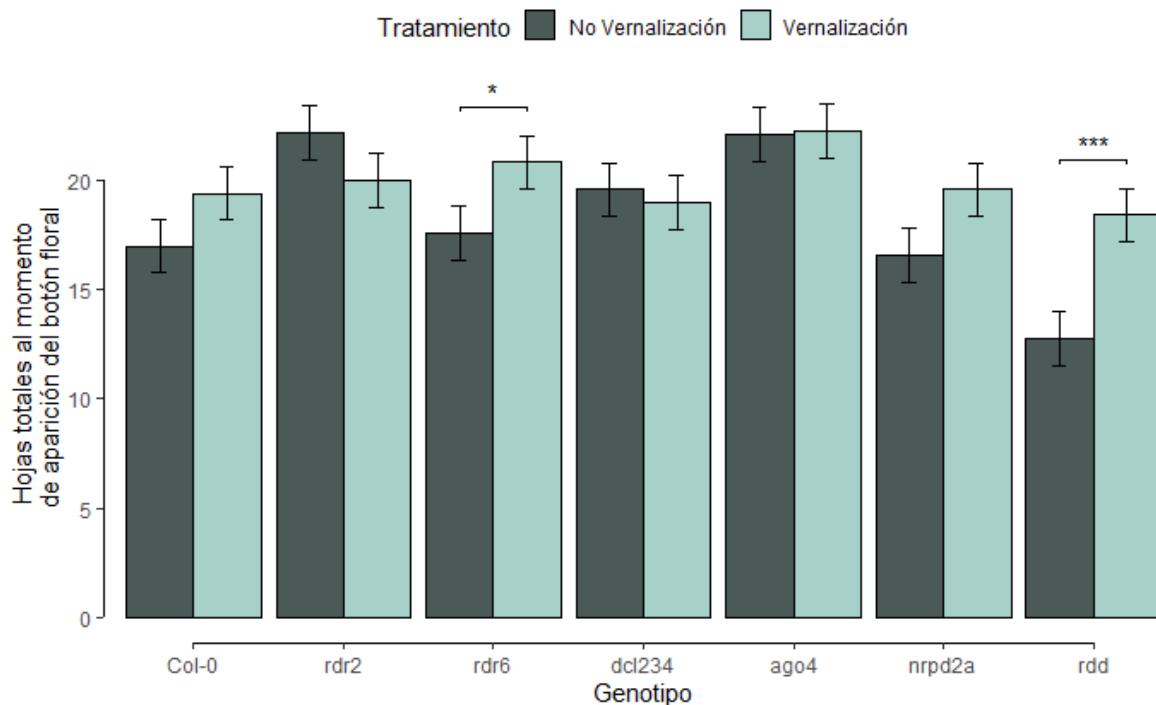


Figura 4.1.2.2: Cantidad de hojas de roseta al momento de aparición del botón floral en función del genotipo al ser expuestas a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Se representa la significación de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos: “***” ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), “**” ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), “*” ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

En la figura 4.1.2.2 se puede observar que los genotipos *rdr6* y *rdd* alcanzaron una mayor cantidad de hojas cuando fueron vernalizados. Los genotipos restantes no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la cantidad de hojas de la roseta. Si bien el tiempo a floración, en función de los días a 22°C (Figura 4.1.1.2), fue acelerado por el tratamiento de vernalización, las 4 semanas a bajas temperaturas permitieron mayor desarrollo de hojas en algunos genotipos.

4.2. Germinación

La germinación (protrusión de la radícula) es un carácter de vital importancia ya que el momento en que sucede determina las condiciones ambientales en las cuales se desarrollará la planta. Un correcto ajuste de esta transición de desarrollo a los ciclos estacionales es esencial para asegurar el crecimiento en óptimas condiciones. Con el objetivo de caracterizar si los distintos tratamientos aplicados a las plantas madre (F1) afectan a la respuesta de germinación de la progenie, y para evaluar si el mecanismo RdDM estaría involucrado en transmitir la información ambiental de una generación a la otra, incubamos semillas (F2) provenientes de las distintas plantas madre crecidas en los dos tratamientos y medimos la proporción de germinación a lo largo del tiempo hasta alcanzar el *plateau* de germinación. En las figuras 4.2.0.1 y 4.2.0.2 se puede observar la tendencia de los valores medios de los datos de germinación a lo largo del tiempo.

Analizando cualitativamente la respuesta de germinación de aquellas semillas cuyas plantas madres recibieron el tratamiento de no vernalización, todos los genotipos parecen alcanzar una proporción de germinación media final similar, mientras que cuando las plantas madres fueron tratadas con vernalización, los genotipos *nRPD2a* y *rdd* parecen alcanzar una proporción final de germinación menor (Figura 4.2.0.1). En todos los casos el aumento de la germinación a lo largo del tiempo parece ser pronunciado hasta los días 2-3 y luego incrementa levemente hasta alcanzar el *plateau* (en el apéndice A.2 se observa la correlación para la proporción de germinación entre tiempos).

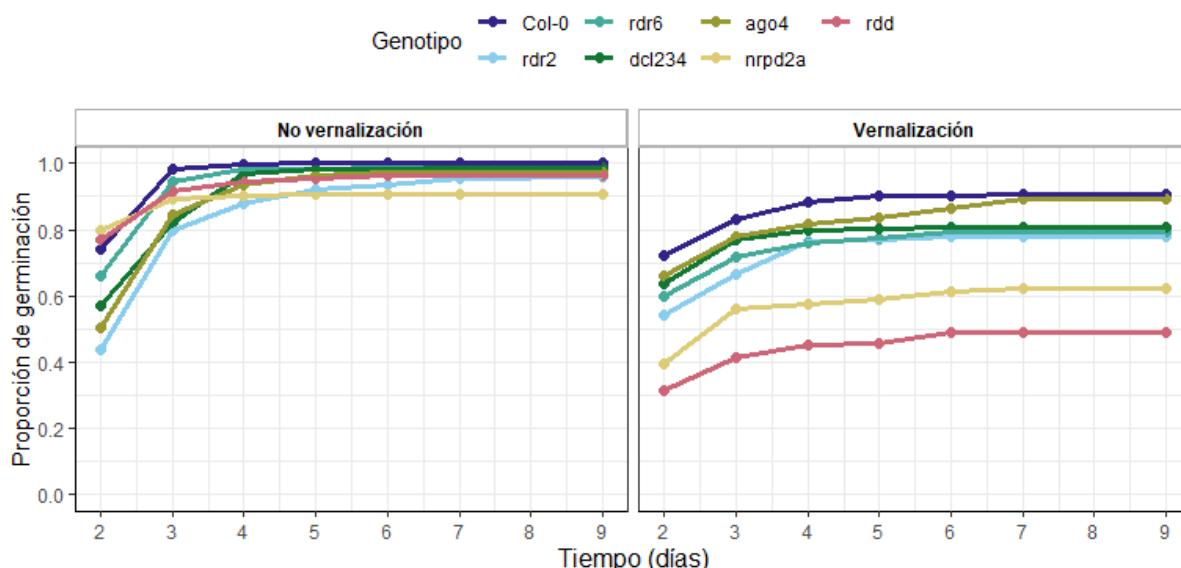


Figura 4.2.0.1: Proporción de germinación en función del tiempo de semillas F2 provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha).

Al graficar la proporción de germinación en función del tiempo separada por genotipos (Figura 4.2.0.2), se puede observar que todos los genotipos parecen alcanzar una menor proporción final media cuando la planta madre fue vernalizada que cuando la planta madre fue no vernalizada. Con excepción de *nRPD2a* y *rdd*, los distintos genotipos no parecen diferenciarse en la proporción de germinación entre los tratamientos durante los primeros días. Los genotipos *nRPD2a* y *rdd* muestran

RESULTADOS

una proporción de germinación media menor cuando las plantas madres fueron vernalizadas que cuando no fueron vernalizadas durante todo el transcurso de la incubación.

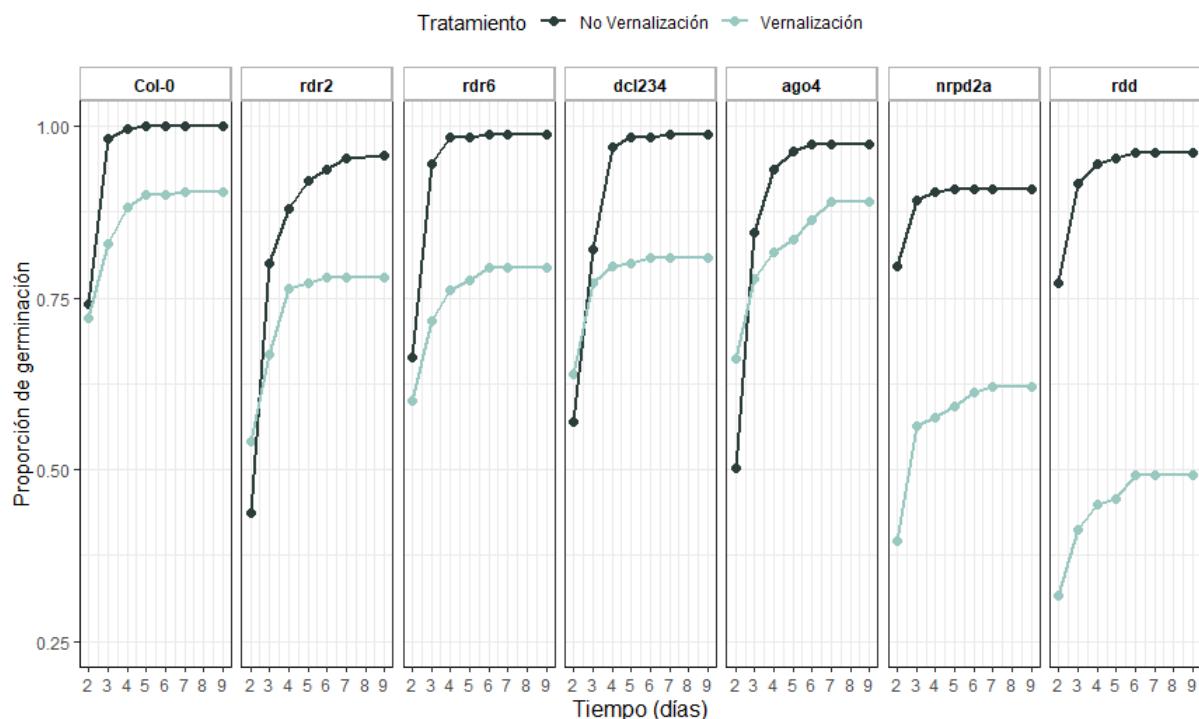


Figura 4.2.0.2: Proporción de germinación en función del tiempo de semillas F2 provenientes de plantas madre de los distintos genotipos (Col-0, rdr2, rdr6, dcl234, ago4, nrpd2a y rdd) expuestas a tratamiento de no vernalización (color claro), o vernalización (color oscuro).

4.2.1. Proporción de germinación

La proporción de germinación da un indicio del estado de dormición de la población de semillas. Aquellas semillas viables que, a pesar de encontrarse bajo las condiciones adecuadas para germinar, no germinan, se consideran bajo estado de dormición. La dormición es una característica que le confiere a la progenie la capacidad de ajustar su ciclo de vida a los ciclos estacionales y tener un crecimiento óptimo. Con el fin de analizar los niveles de dormición primaria de plantas vernalizadas y la relación con el mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM) procedimos a analizar la proporción de germinación para los distintos genotipos estudiados en ambos tratamientos maternos.

Según lo observado en las figuras 4.2.0.1 y 4.2.0.2, al día 7 todos los genotipos en ambos tratamientos parecen haber alcanzado el *plateau* de germinación, además se determinó el coeficiente de correlación entre tiempos para la proporción de germinación obteniendo un coeficiente de correlación (*r*) igual a 1 entre los días 7 y 9 (Apéndice A.2). Dado que a medida que transcurre más tiempo hay más variables involucradas que podrían estar agregando error en el análisis y que al séptimo día desde la siembra se alcanzó el *plateau* de germinación en más de un 99% de las observaciones, tomamos el día 7 como el día final del ensayo y procedimos a realizar el análisis estadístico con los valores obtenidos en ese tiempo.

En la figura 4.2.1.1 se observa que no hay diferencias significativas en la proporción de germinación entre genotipos cuando las plantas madres no fueron vernalizadas. Cuando las plantas madre fueron vernalizadas, tanto *nrpd2a* como *rdd* presentan una disminución significativa en la proporción de germinación.

En la figura 4.2.1.2 se puede observar que para la mayoría de los genotipos no hay diferencias significativas en la proporción de germinación entre tratamientos. La mutante *nrpd2a* es la única que presenta una disminución significativa en la proporción de germinación cuando la planta madre fue vernalizada respecto a cuando la planta madre no fue vernalizada. En el genotipo *rdd*, si bien parece haber una disminución en la media de la proporción de germinación cuando la planta madre fue vernalizada, esta diferencia no es significativa, lo que puede deberse a la gran variabilidad en la germinación de las semillas provenientes de una F1 vernalizada. Dicha variabilidad provoca un intervalo de confianza muy amplio que evita que las diferencias analizadas sean estadísticamente significativas.

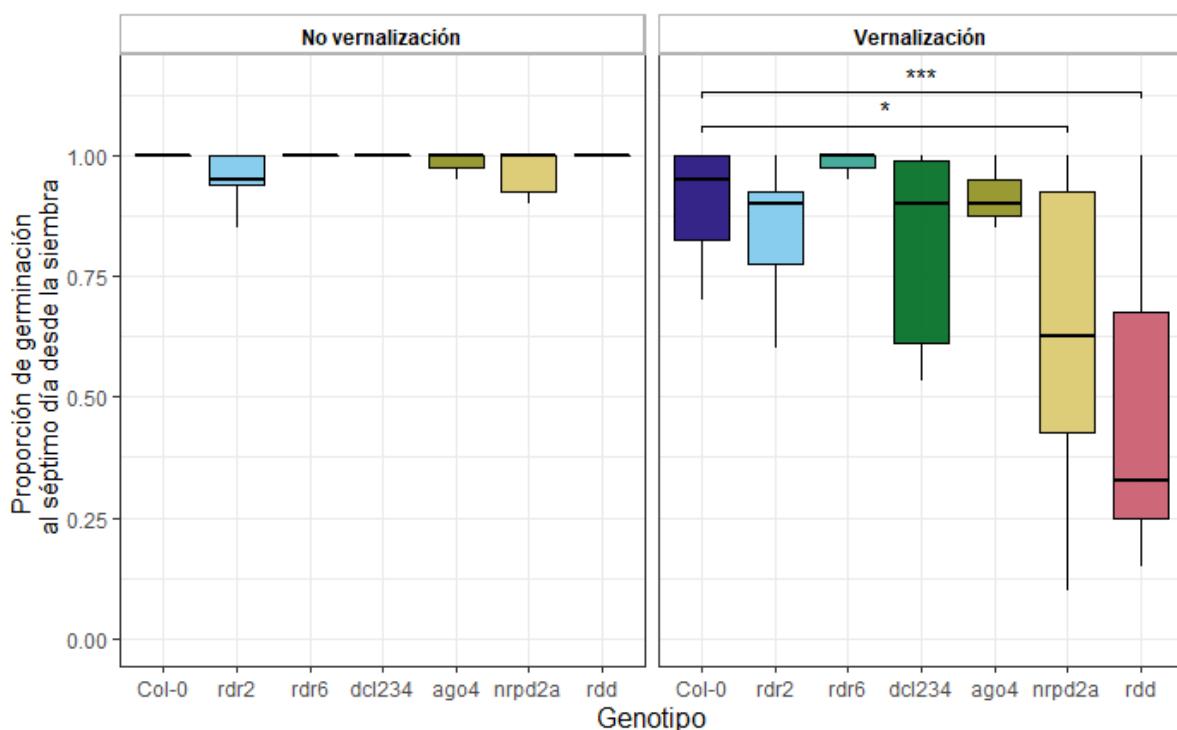


Figura 4.2.1.1: Proporción de germinación de semillas F2 al séptimo día desde la siembra provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Diferencias significativas en la comparación respecto a Col-0 se indican con la siguiente codificación: *** ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ** ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), * ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

De todos modos, la diferencia de variabilidad observada en la germinación de las semillas F2 captó nuestra atención. Fue por ello que procedimos a analizar cómo varía la relación entre la media y la varianza de la proporción de germinación para los distintos genotipos provenientes de plantas F1 tanto vernalizadas como no vernalizadas (Figura 4.2.1.3). Se puede observar que para todos los genotipos la media disminuye y la varianza aumenta cuando las plantas madres atravesaron un período de vernalización. Sin embargo, en los genotipos *rdr6* y *ago4* el aumento de la varianza parece ser menor que en el resto de los genotipos.

RESULTADOS

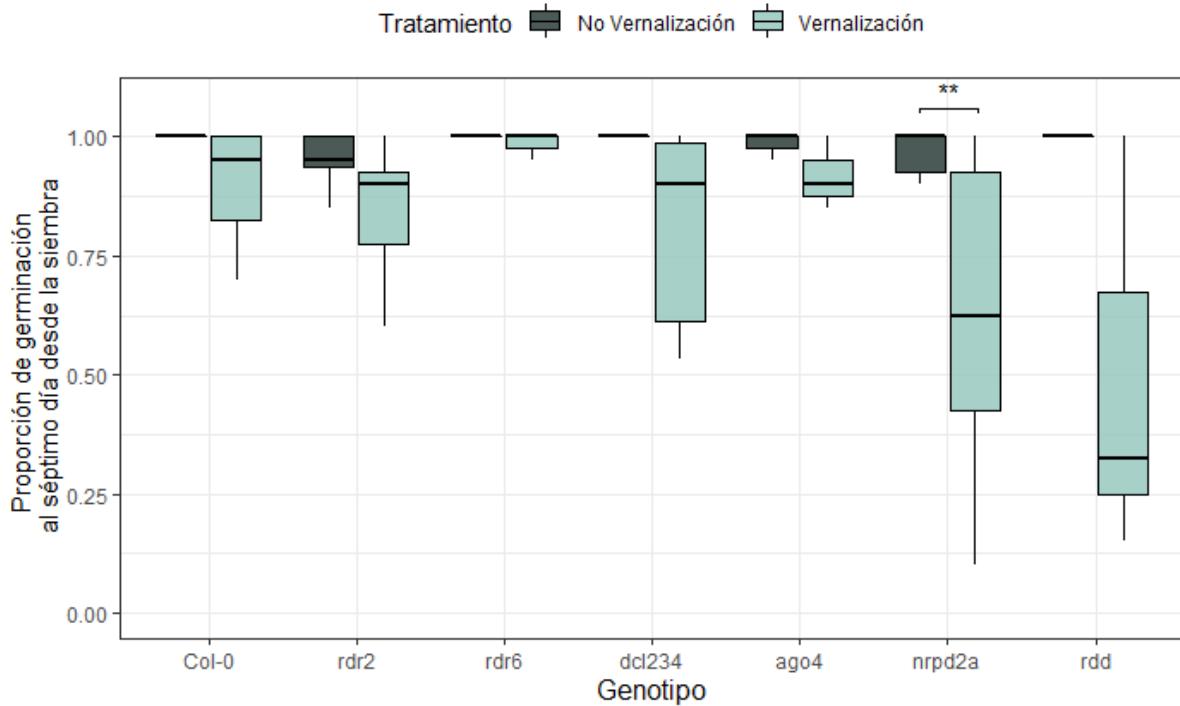


Figura 4.2.1.2: Proporción de germinación de semillas F2 al séptimo día desde la siembra en función del genotipo al ser expuestas a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Diferencias significativas de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indica como: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

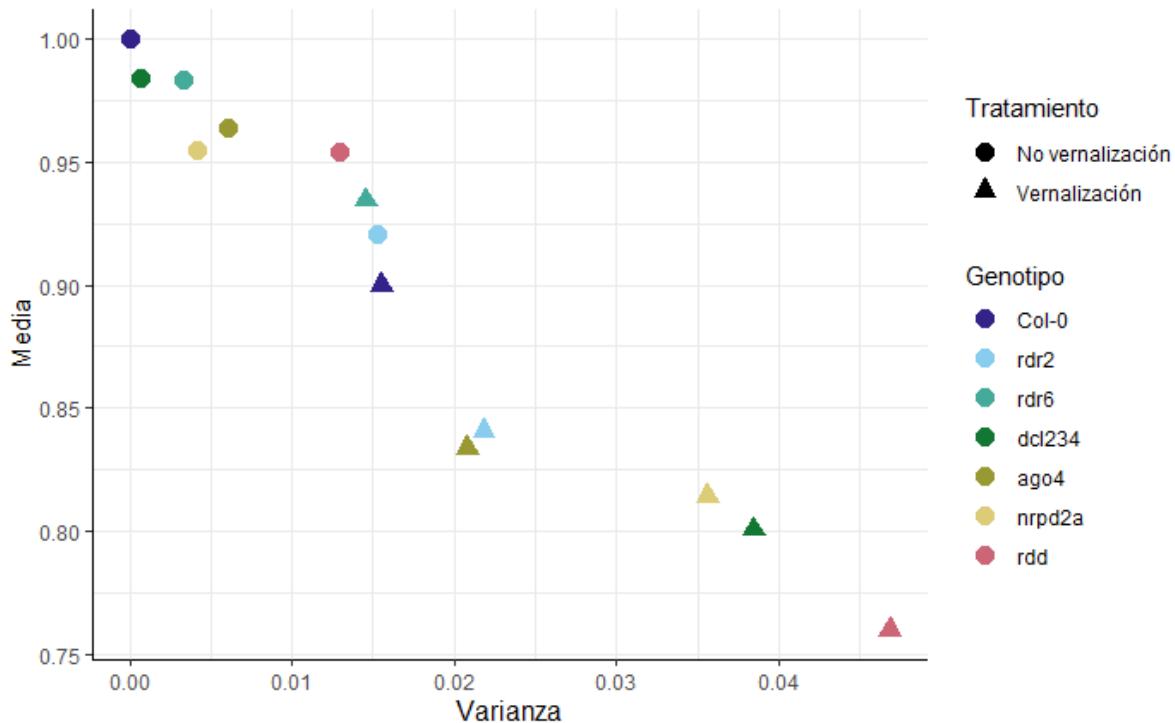


Figura 4.2.1.3: Media de la proporción de germinación de semillas F2 al séptimo día desde la siembra en función de la varianza para cada genotipo al ser expuestas a tratamiento no vernalización (círculos) o vernalización (triángulos).

Este aumento de variabilidad y disminución de la media observado cuando las plantas madre experimentaron un período de vernalización, nos sugiere que como estrategia al cambio de las condiciones ambientales experimentada por la planta madre, la planta F1 podría estar generando semillas con respuestas más variables y esto podría tener la ventaja adaptativa de que, entre todas las semillas producidas, alguna tenga las condiciones de germinar en el momento tal que ocurra la coincidencia de los estadios del ciclo de vida con las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo.

Como la dinámica del proceso de germinación es de nuestro interés, además de la proporción de germinación, analizamos la velocidad de germinación.

4.2.2. Velocidad de germinación

La velocidad de germinación (proporción de semillas germinadas/día) es una buena aproximación para determinar el efecto de los tratamientos maternos sobre el vigor de las semillas. El vigor es un carácter de importancia agronómica utilizado para determinar el éxito del establecimiento de los cultivos y los costos de manejo de los mismos. Dado que evidencia la calidad fisiológica de un lote de semillas, resulta entonces de gran importancia estudiar cómo los efectos maternos pueden afectar esta respuesta. Sumado a ello, al sembrar semillas viables, en caso de sostener el experimento en el tiempo, a la larga la proporción de germinación llegaría a 1 en todos los casos. En ese caso, la variable de mayor interés a analizar no sería la proporción final de germinación sino alguna que considere el tiempo, tal como el tiempo hasta alcanzar el 50% de la germinación o bien la velocidad de germinación. Debido a que nuestro set de datos no nos permitía analizar el tiempo hasta el alcance del 50% de la germinación porque se debería haber extendido el análisis mucho más tiempo, procedimos a analizar la velocidad de germinación (semillas germinadas por día de incubación).

En la figura 4.2.2.1 se observa la velocidad de germinación en función del genotipo y se compara para cada uno de los tratamientos los distintos genotipos respecto a Col-0. Se puede ver que las semillas cuyas plantas madres fueron expuestas a no vernalización presentan una velocidad de germinación similar (las mutantes no presentan diferencias significativas respecto a Col-0). Por otro lado, en el caso de las semillas cuyas plantas madres fueron expuestas a tratamiento vernalización, únicamente las mutantes *nRPD2a* y *rdd* presentaron una disminución significativa de la velocidad de germinación respecto a *wild type*. Se puede además ver, por la amplitud de los *boxplot* que, exceptuando a la mutante *AGO4*, en todos los casos parece haber un aumento en la variabilidad de la velocidad de germinación cuando las plantas madre fueron vernalizadas respecto a cuando las plantas madre no lo fueron.

En la figura 4.2.2.2 se puede observar que para las semillas de los genotipos *rdr6*, *nRPD2a* y *rdd* provenientes de plantas madre tratadas con vernalización presentaron una disminución significativa de la velocidad de germinación respecto a aquellas provenientes de plantas madres tratadas con no vernalización, sugiriendo que estos genes estarían involucrados en regular la germinación en el tiempo en respuesta al ambiente materno.

RESULTADOS

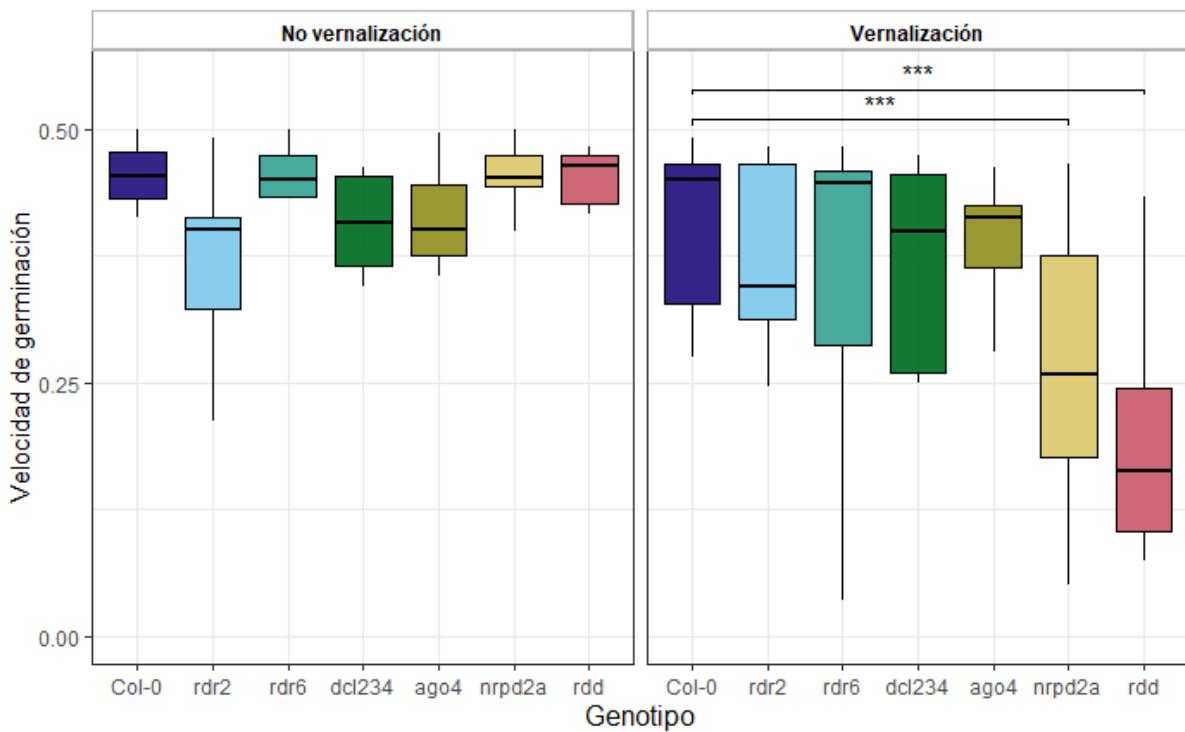


Figura 4.2.2.1: Velocidad de germinación de semillas F2 provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Diferencias significativas de la comparación respecto a Col-0 se indican con la siguiente codificación: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

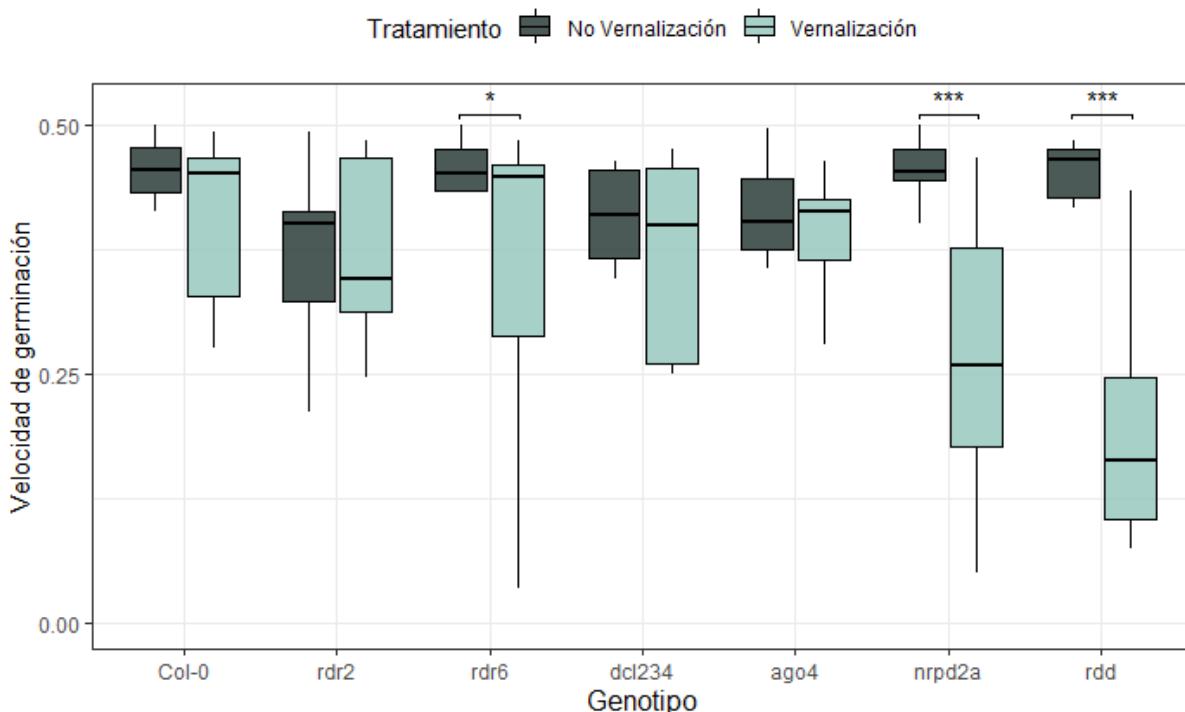


Figura 4.2.2.2: Velocidad de germinación de semillas F2 en función del genotipo al ser expuestas a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Diferencias significativas de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indican como: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

4.3. Dormición secundaria

El ambiente materno puede modificar cómo las semillas responden a su propio ambiente y, en consecuencia, el ciclado en estadios de dormición secundaria asociados a la percepción de ese ambiente. Por esto analizamos la respuesta de las semillas a un pretratamiento de calor cuyo efecto es inducir la dormición en semillas postmaduradas. El tratamiento materno influyó en la expresión de la respuesta a la incubación a 35°C de los distintos genotipos (interacción Tratamiento Materno x Tratamiento de Incubación x Genotipo significativo, P -valor: 4.442e-08***). Cuando el tratamiento materno fue no vernalización, todos los genotipos presentaron una disminución en la proporción de germinación al incubar las semillas a 35°C (tanto 2 como 5 días) respecto al control (0 días de incubación) (Anexo A.3.1). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la proporción de germinación cuando la cantidad de días de incubación en el pretratamiento de inducción fueron 2 o 5 días (Anexo A.3.1). El pretratamiento más prolongado (5 días) no fue suficiente para dormir completamente las semillas, sugiriendo que períodos de pretratamiento más prolongados serían necesarios. Por otro lado, para los genotipos *rdr2*, *rdr6*, *ago4*, *dcl234* y *rdd* cuando el tratamiento materno fue vernalización, hubo una disminución significativa de la proporción de germinación recién cuando las semillas fueron incubadas 5 días a 35°C respecto al control (0 días de incubación), indicando que la estratificación por calor fue efectiva en inducir la dormición secundaria para estos genotipos, pero requirió períodos más prolongados en esta progenie comparada con la de plantas control no vernalizadas (Anexo A.3.1).

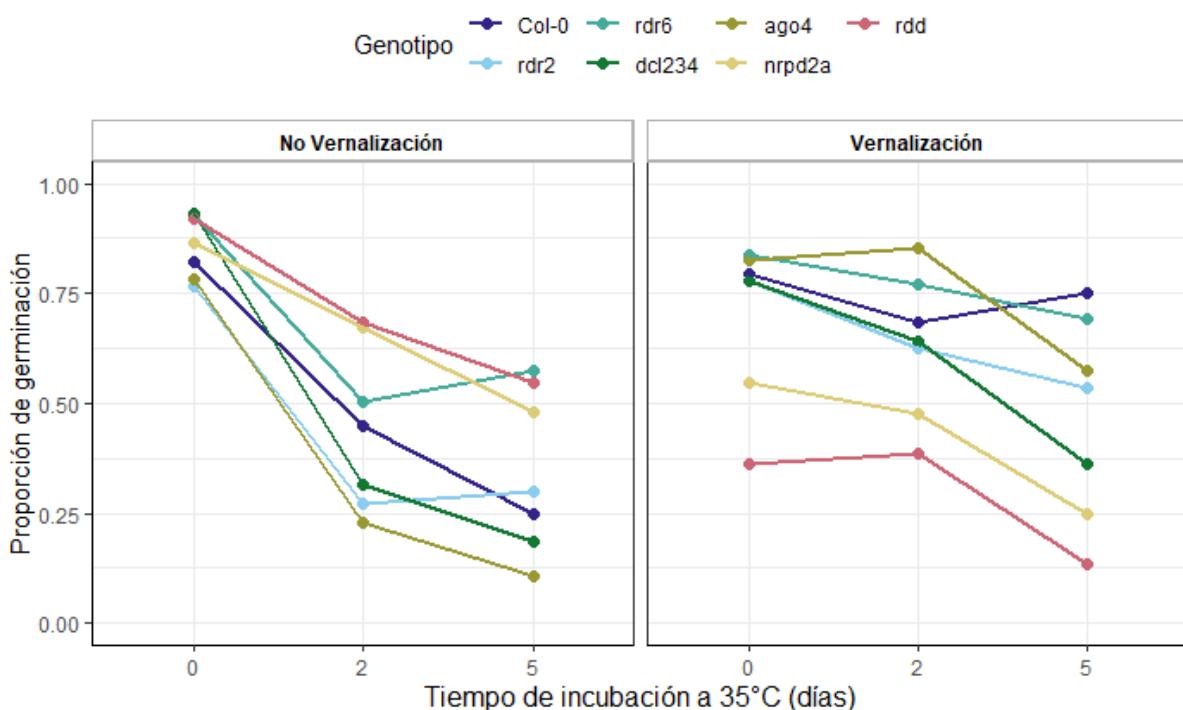


Figura 4.3.0.1: Proporción de germinación en función del tiempo de incubación a 35°C para inducir la dormición secundaria de semillas provenientes de plantas madre no vernalizadas (izquierda) o vernalizadas (derecha).

En la figura 4.3.0.1 se observan los valores medios de proporción de germinación de los distintos genotipos cuando las plantas madre recibieron los distintos tratamientos (Figura 4.3.0.1, Anexo

RESULTADOS

A.3.2). Cuando el tratamiento materno fue no vernalización, no hubo diferencias significativas en la proporción de germinación de semillas F2 a ninguno de los tiempos de incubación a 35°C (control, 2 días y 5 días) entre los genotipos. Cuando el tratamiento materno fue de vernalización, luego de 5 días de incubación a 35°C se pudo observar que la proporción de germinación de semillas *rdd* fue significativamente menor que la correspondiente a las semillas Col-0 (P-valor ~0,002, Anexo A.3.2).

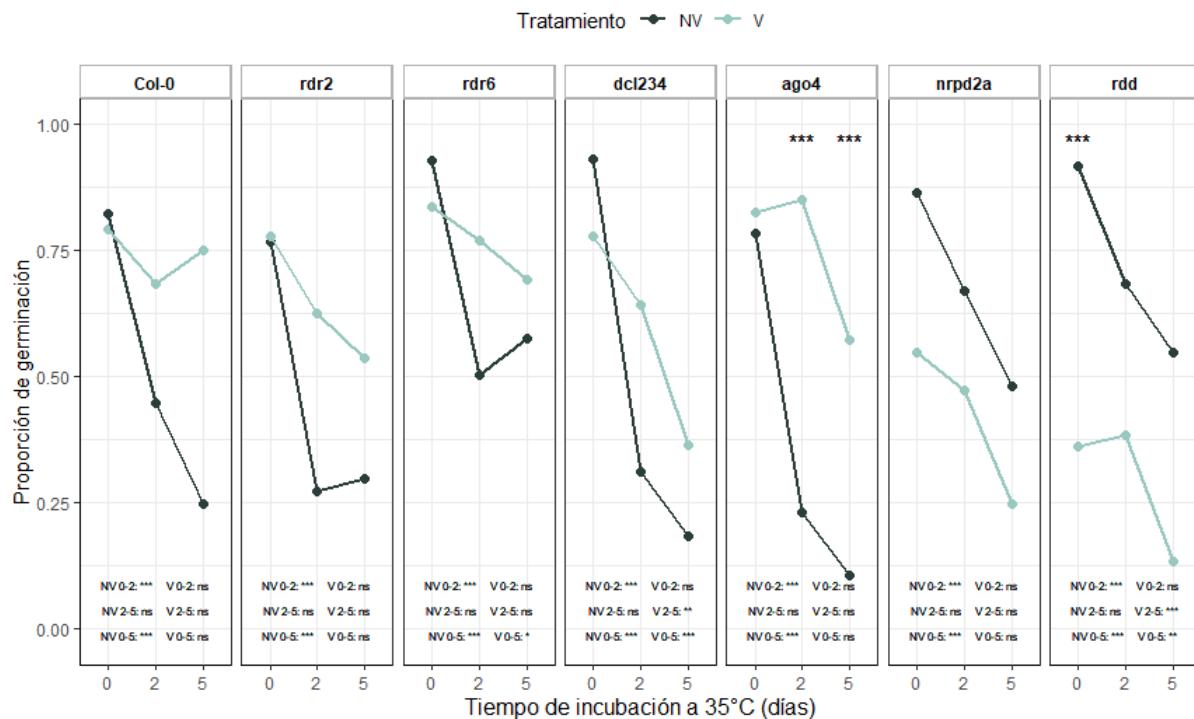


Figura 4.3.0.2: Proporción de germinación por genotipo en función del tiempo de incubación a 35°C para inducir la dormición secundaria de semillas provenientes de plantas madre no vernalizadas (color oscuro) o vernalizadas (color claro). Diferencias significativas de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indican como: ‘***’ ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Diferencias entre tratamientos maternos se indican por encima de los puntos graficados (ver genotipos *ago4* y *rdd*). En la región inferior del gráfico se indican los valores obtenidos para el análisis estadístico correspondiente a la diferencia entre días de incubación.

Respecto al efecto de los tratamientos maternos para los distintos genotipos, en la Figura 4.3.0.2 se observan los valores de proporción de germinación en función del tiempo de incubación a 35°C (Anexo A.3.3). En condiciones control (sin incubación a 35°C) el genotipo *rdd* presentó una proporción de germinación significativamente menor cuando la planta madre fue vernalizada respecto a cuando no lo fue (P-valor~0.0005); sin embargo, esa diferencia no se observa a los 2 y 5 días de incubación a 35°C. Por el contrario, *ago4* no presentó diferencias significativas en la proporción de germinación entre tratamientos maternos en condiciones control, pero sí presentó una proporción de germinación significativamente mayor cuando el tratamiento materno fue vernalización tanto a día 2 como 5 de incubación a 35°C (P-valor~0.0001 y P-valor~0.0009 respectivamente). El resto de los genotipos analizados (Col-0, *rdr2*, *rdr6*, *dcl234* y *nrpd2a*) no presentaron diferencias significativas en la proporción de germinación de semillas F2 entre tratamientos maternos para ninguno de los tiempos de incubación a 35°C. Aunque la variabilidad de la respuesta de las semillas impidió obtener diferencias significativas entre tratamientos, el tratamiento materno de vernalización parece estar impidiendo que las semillas ciclen en un estado de dormición secundaria ya que las semillas de

plantas madre vernalizadas en general germinan más que las de plantas control (no vernalizadas) en todas las condiciones de estratificación en calor. Este patrón fue el contrario para los mutantes *nrpd2a* y *rdd* para los que se observa que semillas de plantas madre vernalizadas germinan menos que las de plantas no vernalizadas, posiblemente debido a que estos genotipos presentan diferentes grados de dormición dependientes del ambiente materno. Además, el retraso en la entrada de las semillas a un estado de dormición secundaria parece ser dependiente del mecanismo RdDM ya que en mutantes de esta vía bajo tratamiento vernalización se observa una disminución de la proporción de germinación al aumentar el tiempo de estratificación por calor, mientras que para Col-0 no.

4.4. Características de las semillas

Las semillas proveen hasta el 70% de la energía ingerida por la población humana, es por ello que es de vital importancia comprender los mecanismos genéticos y epigenéticos que regulan las características de las mismas. El número de semillas producidas, el tamaño de las semillas y el largo del hipocotilo son caracteres clave para determinar el *fitness* de los individuos y el rendimiento de cultivos. La comprensión de las bases genéticas y epigenéticas son, por lo tanto, de crucial importancia. Con el objetivo de estudiar si el mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN regula el tamaño de las semillas, la cantidad de semillas producidas y la cantidad de nutrientes provistos por la planta madre, procedimos a analizar dichas características al estar sometida, o no, la planta madre a un tratamiento de vernalización.

Mientras que el peso de las semillas calculado corresponde al peso total de semillas cosechadas para cada planta madre, los datos obtenidos tanto para el área de la semilla como para el largo del hipocotilo se obtuvieron individualmente de cada semilla o plántula F2. Para analizar la relación entre estas variables y con las demás características analizadas (tiempo a floración a 22°C, velocidad de germinación y hojas totales al momento de aparición del botón floral), realizamos un análisis de correlación para los datos de todos los genotipos en todos los tratamientos (Figura 4.4.0.1).

En la figura 4.4.0.1 se puede observar que las tres variables analizadas en las semillas presentan una correlación positiva entre ellas. Para el análisis de correlación entre el largo del hipocotilo (LH) y el área de las semillas (AS), entre el largo del hipocotilo (LH) y el peso de las semillas (PS), y entre el área de las semillas (AS) y el peso de las semillas (PS), obtuvimos los coeficientes de correlación (r) 0,5, 0,39 y 0,26 respectivamente.

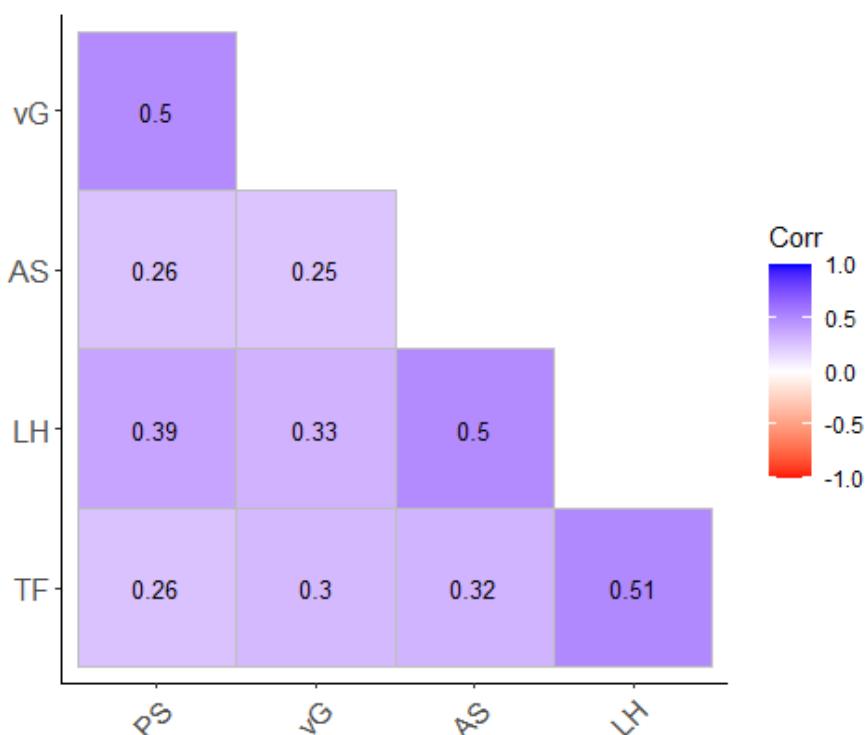


Figura 4.4.0.1: Correlación entre los caracteres analizados para todos los genotipos y tratamientos maternos. Se observan los valores numéricos del coeficiente de correlación (r) en caso de que dicho valor sea significativamente distinto a cero. Los caracteres analizados son el tiempo a floración (TF), el largo del hipocotilo (LH), el área de las semillas (AS), la velocidad de germinación (vG), el peso de las semillas (PS) y las hojas totales hasta aparición del botón floral (HF).

A su vez, se puede observar que el tiempo a floración correlaciona positivamente con el total de los caracteres analizados indicando que el aumento en el tiempo a floración está asociado con el aumento en el peso de la semilla (PS, $r=0,26$), del área de la semilla (AS, $r=0,32$), del largo del hipocotilo (LH, $r=0,51$) y de la velocidad de germinación (vG, $r=0,3$). Del mismo modo, se ve una correlación positiva entre la velocidad de germinación y las características de las semillas analizadas. El aumento de la velocidad de germinación está asociado con: el aumento en el peso de las semillas (PS, $r=0,5$); el aumento en el área de las semillas (AS, $r=0,25$) y el aumento en el largo del hipocotilo (LH, $r=0,33$).

En el apéndice A.4 se pueden observar los datos de correlación entre las distintas variables separadas por tratamiento.

4.4.1. Peso de las semillas

Realizamos la medición del peso de las semillas totales producida con el fin de caracterizar la biomasa reproductiva. En la figura 4.4.1.1 se puede observar que las semillas de los distintos genotipos provenientes de plantas madre que fueron tratadas con no vernalización no presentan diferencias significativas respecto a *wild type*. Sin embargo, cuando las plantas madre fueron tratadas con vernalización, el genotipo *rdd* mostró un peso de semillas significativamente menor que aquel obtenido con Col-0.

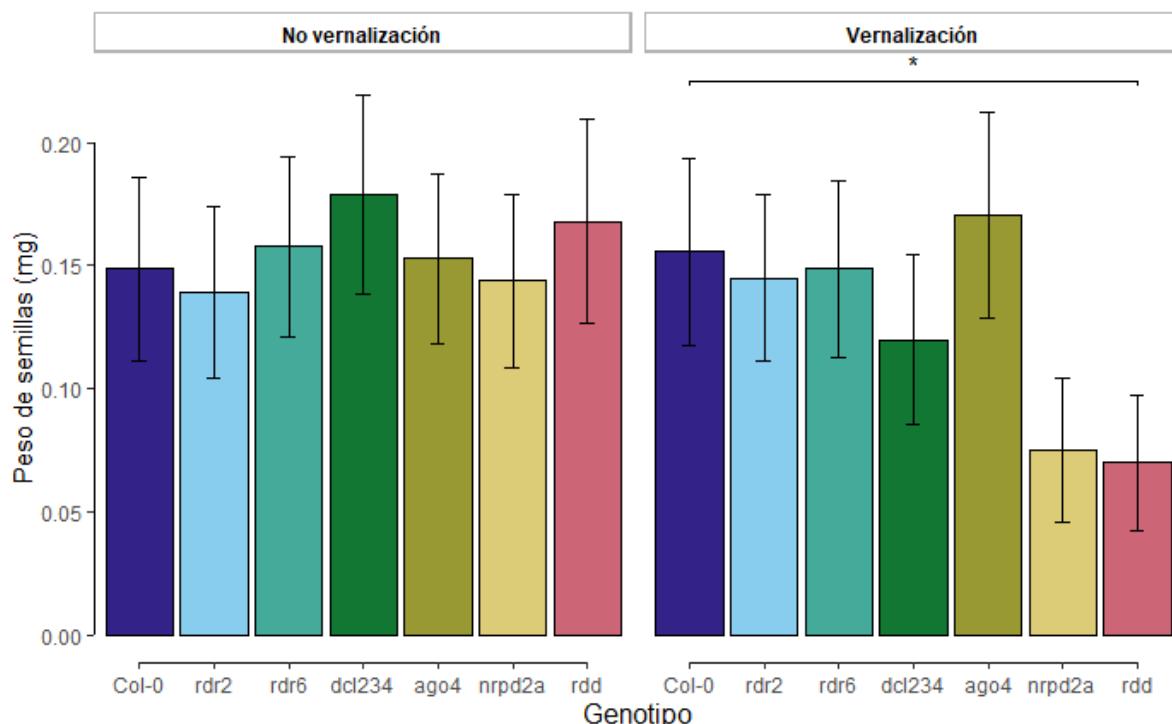


Figura 4.4.1.1: Peso de semillas en función del genotipo provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Diferencias significativas de la comparación respecto a Col-0 se indican con la siguiente codificación: *** ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ** ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), * ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

Por otro lado, en la figura 4.4.1.2 se puede observar que el único genotipo que presenta diferencias significativas respecto al peso total de las semillas F2 al comparar entre las semillas

RESULTADOS

obtenidas de plantas madre no vernalizadas y vernalizadas, es el que corresponde a la mutante de demetilasas *rdd*.

Se puede observar tanto en la figura 4.4.1.1 como en la figura 4.4.1.2 que los genotipos *nrp2d2a* y *dcl234*, si bien no presentan diferencias significativas, parecerían tener un menor peso medio que *Col-0* cuando el tratamiento materno fue vernalización; y a su vez parecerían tener menor peso cuando las plantas madre fueron vernalizadas respecto a cuando no lo fueron. Dichas diferencias no significativas podrían deberse a la gran amplitud de los intervalos de confianza.

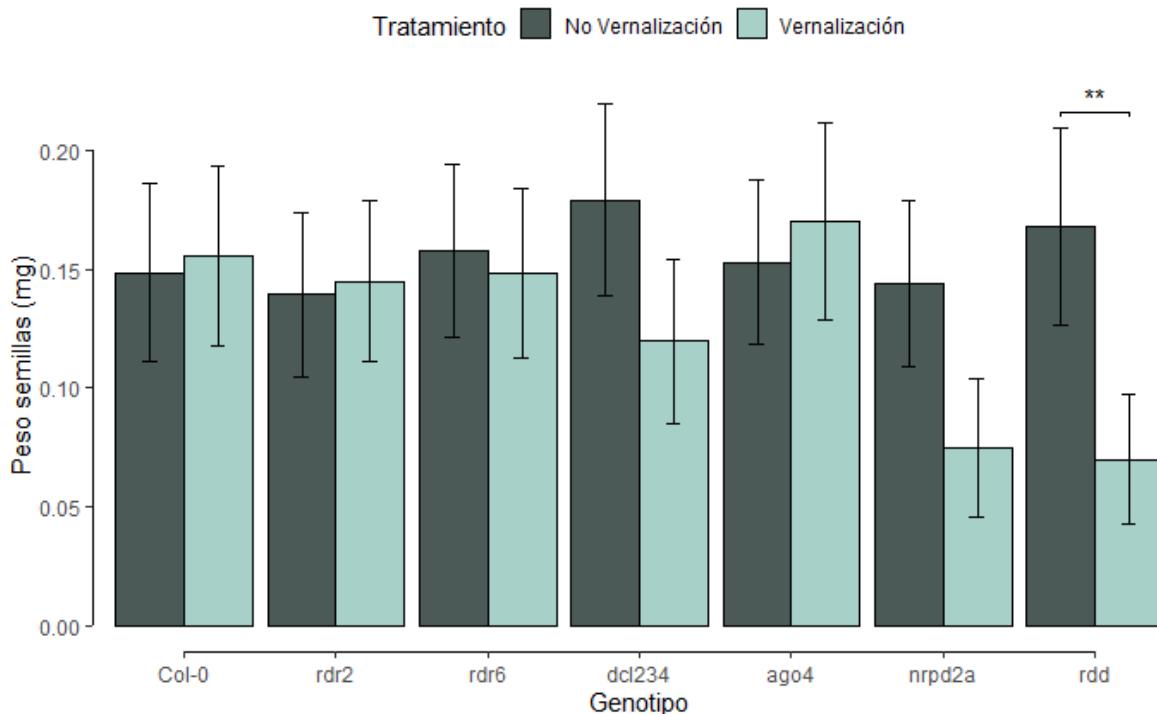


Figura 4.4.1.2: Peso de semillas provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Diferencias significativas de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indican de la siguiente manera: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

4.4.2. Tamaño de las semillas

A partir de imágenes tomadas de semillas provenientes de plantas de los distintos genotipos expuestas a los distintos tratamientos, medimos el área de las semillas en mm^2 con el analizador de medidas del programa ImageJ.

En la figura 4.4.2.1 se puede observar que todos los genotipos (*rdr2*, *rdr6*, *dcl234*, *ago4* y *rdd*), con excepción de *nrpd2a*, mostraron un aumento significativo del área de las semillas respecto al *wild type* cuando el tratamiento materno fue de no vernalización. Sin embargo, el único genotipo que presentó un aumento significativo en el área de las semillas cuando el tratamiento materno fue de vernalización, fue *rdr6*.

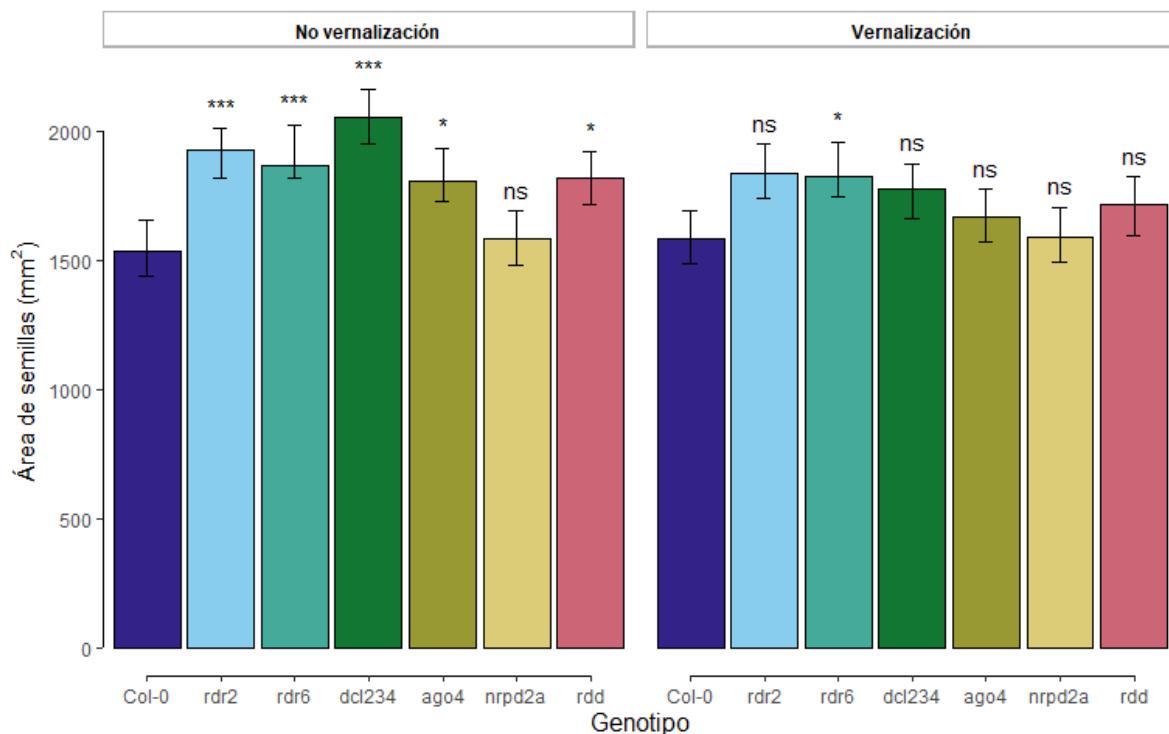


Figura 4.4.2.1: Área en mm^2 de semillas en función del genotipo provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Diferencias significativas de la comparación respecto a Col-0 se indican con la siguiente codificación: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), 'ns' ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

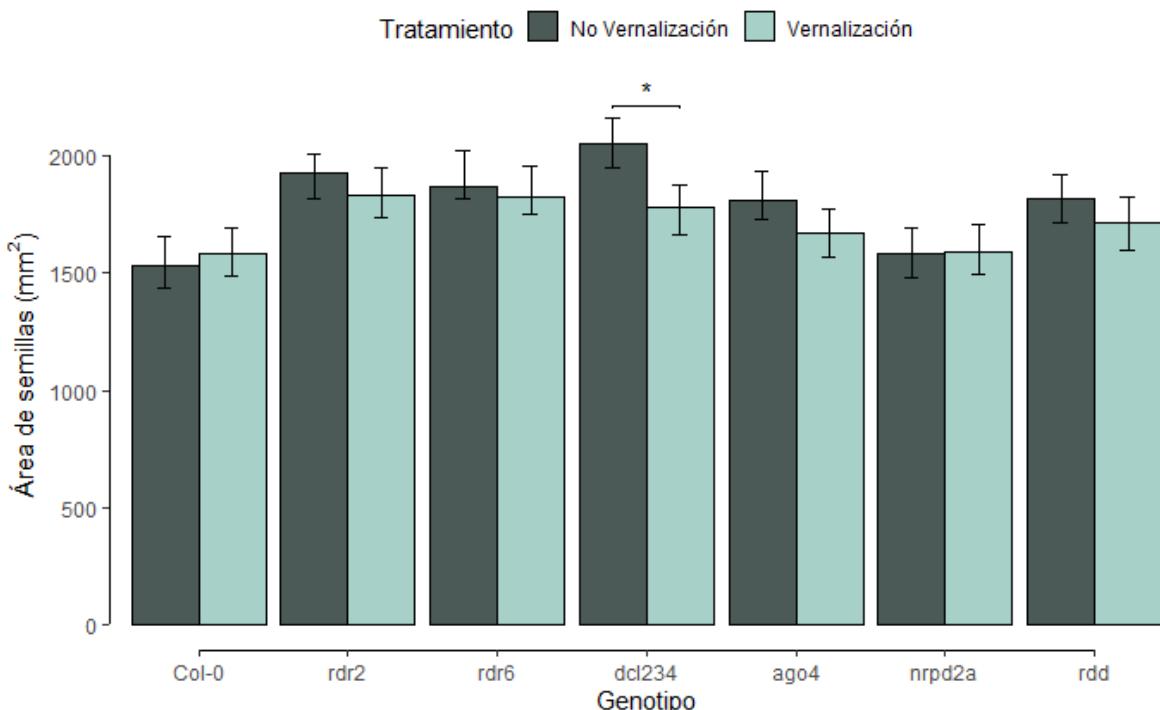


Figura 4.4.2.2: Área en mm^2 de semillas provenientes de plantas madre expuestas a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Diferencias significativas de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indican de la siguiente manera: '***' ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), '**' ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), '*' ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado. Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

RESULTADOS

En lo que respecta a las diferencias en el área de las semillas entre semillas del mismo genotipo cuyas plantas madre fueron sometidas a los distintos tratamientos, se puede observar en la figura 4.4.2.2 que el único genotipo que presentó una disminución significativa del área de la semilla cuando la planta madre fue sometida a vernalización fue *dcl234*. El resto de los genotipos no mostraron diferencias significativas entre semillas provenientes de plantas madre tratadas con los distintos tratamientos. Ambos resultados (efectos de genotipo y tratamiento materno) sugieren que el fenotipo de aumento del tamaño de la semilla es revertido cuando el tratamiento materno es vernalización para la mayoría de los genotipos; por lo tanto el mecanismo RdDM estaría involucrado en la regulación del tamaño de las semillas principalmente bajo condiciones control (no vernalización).

4.4.3. Largo del hipocotilo

Al medir el largo del hipocotilo de plántulas F2 se puede observar que no hay diferencias significativas entre las mutantes y *wild type* para plántulas provenientes de plantas madre de ambos tratamientos (Figura 4.4.3.1). Sin embargo, cuando las plantas madre del genotipo *nRPd2a* fueron sometidas al tratamiento control de no vernalización, parece haber una disminución (aunque no significativa respecto a Col-0) del largo del hipocotilo de la F2. Dicho genotipo presenta un largo del hipocotilo significativamente menor que el resto de las mutantes (diferencia respecto a los distintos genotipos: *rdr2* **; *rdr6* ****; *dcl234* **; *ago4* ****; *rdd* *).

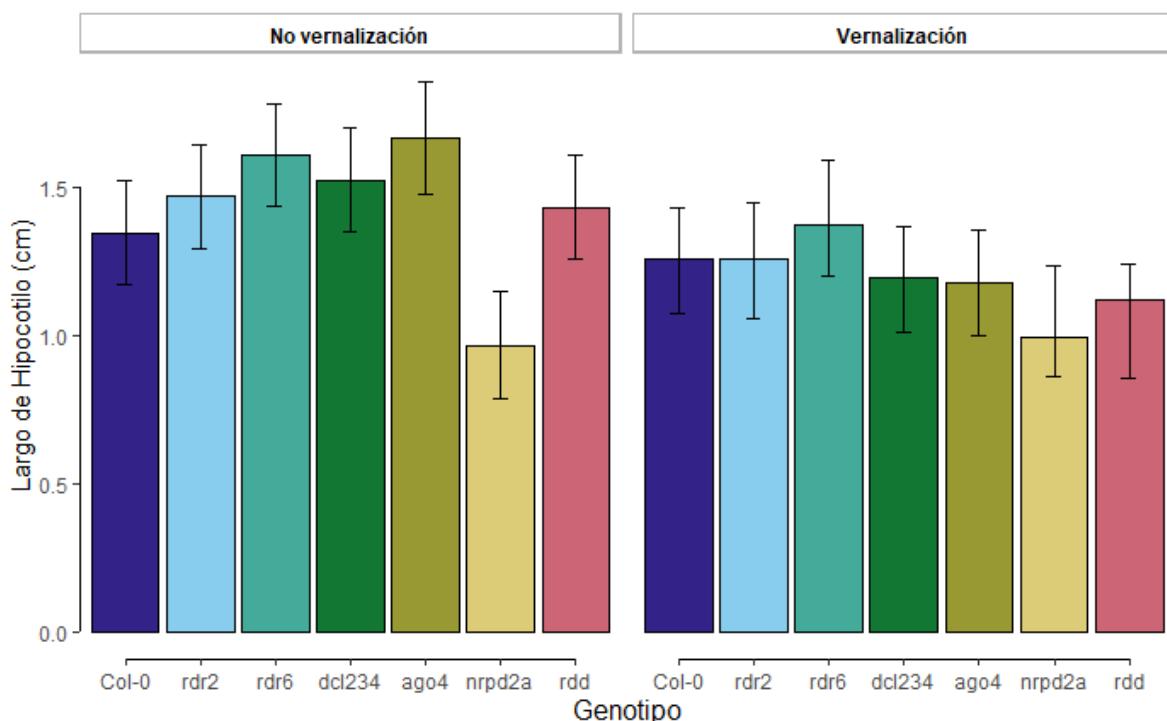


Figura 4.4.3.1: Largo del hipocotilo en función del genotipo de plántulas F2 cuyas plantas madre fueron expuestas a tratamiento de no vernalización (izquierda), o vernalización (derecha). Diferencias significativas de la comparación respecto a Col-0 se indican con la siguiente codificación: **** ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), *** ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), ** ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

Al comparar el largo del hipocotilo para cada uno de los genotipos entre tratamientos maternos, no se obtuvieron diferencias significativas para la gran mayoría de los genotipos. Sin embargo, *ago4*

presentó una disminución significativa en el largo del hipocotilo cuando las plantas madre fueron vernalizadas respecto al control (Figura 4.4.3.2).

Al igual que con el tamaño de las semillas, a pesar de no mostrar diferencias significativas probablemente debido a la gran amplitud del intervalo de confianza, el mecanismo RdDM regularía la elongación de las plántulas cuando el tratamiento materno es de no vernalización. Cuando el tratamiento es de vernalización las diferencias descriptivas en el largo del hipocotilo para las mutantes se revierte, sugiriendo que la vernalización afectaría el volcado de recursos en las semillas. Por lo tanto, el mecanismo RdDM regularía la elongación de las plántulas en general bajo condiciones control, pero no así cuando la planta madre recibió el tratamiento de vernalización.

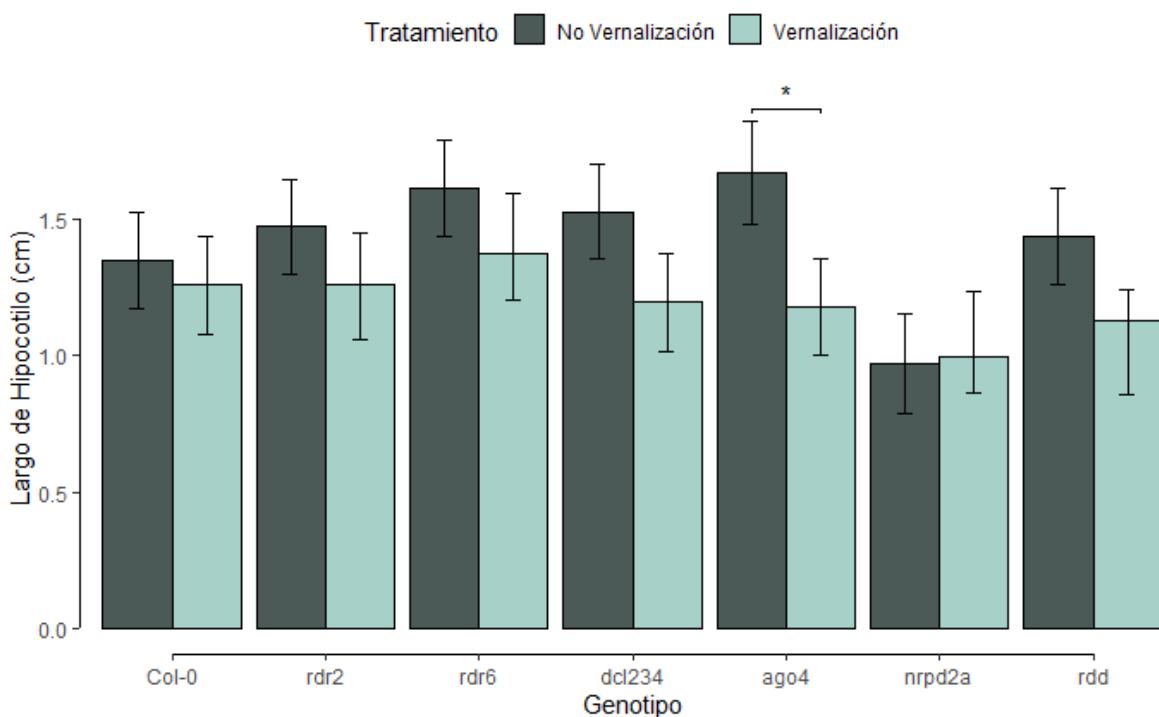


Figura 4.4.3.2: Largo del hipocotilo de plántulas F2 cuyas plantas madre fueron expuestas a tratamiento no vernalización (color oscuro) o vernalización (color claro). Diferencias significativas de la comparación entre tratamientos para cada uno de los genotipos se indican de la siguiente manera: *** ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ** ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), * ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$) y sin caracteres ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Los intervalos de cada barra representan al intervalo de confianza obtenido a partir del modelo estadístico utilizado.

Discusión y conclusión

La integración de información ambiental a través de las generaciones permite la coordinación de respuestas adaptativas en generaciones subsiguientes. En este estudio observamos que el tratamiento de vernalización experimentado temprano en el ciclo de vida de la planta madre afecta no solo las transiciones del desarrollo de la misma, sino también caracteres tempranos del ciclo de vida de la progenie. El mecanismo RdDM parece cumplir un rol importante en la regulación de la transmisión de dicha información ambiental ya que interrupciones en el funcionamiento del mecanismo conllevan a la desregulación de la respuesta al ambiente materno para dormición, germinación, y características de las semillas (peso, tamaño y elongación de plántulas).

La vía canónica del mecanismo RdDM parece estar afectando el tiempo a floración y la cantidad de hojas de la planta madre bajo tratamiento de no vernalización, y con el tratamiento de vernalización parece haber una reversión de dicho fenotipo. La germinación a su vez, parece verse afectada por el tratamiento materno de no vernalización cuando hay una desregulación del mecanismo RdDM, y esto se revierte bajo tratamiento de vernalización. La dormición secundaria, por el contrario, no presenta variación en las mutantes del mecanismo RdDM cuando el tratamiento materno es no vernalización, pero sí se observa una variación en la capacidad de inducción a dormición secundaria cuando el tratamiento materno fue vernalización. Del mismo modo que ocurre con la germinación y floración, el tamaño de las semillas y la elongación del hipocotilo presentan, cualitativamente, variaciones en la respuesta para las mutantes de RdDM respecto a *wild type* en condiciones control (no vernalización) y esas variaciones parecen compensarse para la mayoría de los genotipos cuando la planta madre fue vernalizada. El peso de las semillas, que puede representar una medida de la cantidad de nutrientes invertidos en la progenie sin considerar la relación cantidad y calidad de semillas, no presenta variaciones bajo tratamiento materno control, pero sí se observa disminución de este carácter cuando la planta madre fue vernalizada para algunas de las mutantes estudiadas. En las siguientes secciones se explican con más detalle las respuestas observadas para cada uno de los caracteres y se proponen distintos mecanismos que podrían estar involucrados y que deberían estudiarse a futuro para avanzar en la comprensión de la transmisión de información ambiental a través de generaciones y su rol en la regulación de las transiciones del desarrollo.

5.1. Desarrollo de las plantas de la primera generación

Bajo el tratamiento de no vernalización las mutantes de la vía canónica de metilación de ADN mediada por ARN (*rdr2*, *dcl234*, *ago4*) presentan fenotipo de floración tardía respecto a Col-0 ya que el tiempo a floración aumenta significativamente; y este fenotipo se ve revertido cuando el tratamiento fue de vernalización. Con la cantidad de hojas de roseta al momento de aparición del botón floral ocurre algo similar, estas mutantes presentan una mayor cantidad de hojas que Col-0 (*dcl234* a modo descriptivo ya que parece presentar una mayor cantidad de hojas pero no presenta diferencias significativas respecto a Col-0). La transición de crecimiento vegetativo a reproductivo muestra una

fina regulación a nivel epigenético (Luo & He, 2020; Qüesta et al., 2020; Whittaker & Dean, 2017; Xu et al., 2016). La metilación del ADN es una de las marcas epigenéticas con mayor heredabilidad y regula el silenciamiento de secuencias tales como elementos transponibles (TE), genes regulatorios del desarrollo y genes con impronta genética (Rangwala & Richards, 2004; Rod J Scott & Spielman, 2004). Entre los genes con impronta genética, en *Arabidopsis thaliana* fueron identificados los genes *MEDEA* y *FWA* que son regulados por metilación de ADN (Grossniklaus et al., 1998; T Kinoshita et al., 1999; Soppe et al., 2000; Vielle-Calzada et al., 1999). El silenciamiento de estos genes se ve afectado por mutaciones en el gen codificante de mantenimiento de transferencia de metilos en el ADN *MET1* (*METHYLTRANSFERASE 1*) o en el gen codificante remodelador de la cromatina *DDM1* (*DECREASE IN DNA METHYLATION1*) (Tetsu Kinoshita et al., 2004; Vielle-Calzada et al., 1999; Xiao et al., 2003). Estos genes por defecto se encuentran silenciados y metilados, y su activación depende del gen *DEMETER* que corresponde a una demetilasa de ADN (Tetsu Kinoshita et al., 2004). El silenciamiento de *FWA* depende de la metilación *de novo* regulada por la metiltransferasa DRM, la subunidad de la ARN polimerasa IV (SDE4/NRPD1a), y de genes relacionados con la maquinaria de procesamiento de pequeños ARN tales como *RDR2* (*RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 2*), *DCL3* (*DICER-LIKE3*), y *AGO4* (*ARGONAUTE4*) (Cao & Jacobsen, 2002). Esto último indica que la metilación de *FWA* se encuentra regulada principalmente por la vía canónica del mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM). El aumento de la expresión de *FWA* se encuentra asociado con la disminución de los patrones de metilación en las secuencias repetitivas en la región 5' del gen alrededor del sitio de inicio de la transcripción, y esta expresión ectópica está directamente relacionada con un fenotipo de floración tardía y aumento en la cantidad de hojas de roseta (Kakutani, 1997; Soppe et al., 2000).

El fenotipo de floración tardía y aumento en la cantidad de hojas roseta de las mutantes de la vía canónica de metilación del ADN mediada por ARN cuando las plantas madres fueron no vernalizadas y su consecuente reversión cuando las plantas madres fueron vernalizadas, podría ser explicado con la regulación epigenética del gen *FWA* (At4g25530) (Y. Kinoshita et al., 2007). Como estas mutantes presentan interrumpida la vía canónica del mecanismo RdDM, se esperaría que los patrones de metilación se vean disminuidos y de este modo aumente la expresión de los genes *target* como *FWA*, cuya hiper-expresión provocaría el fenotipo de floración tardía y aumento en el número de hojas (Figura 5.1.0.1).

A su vez, el genotipo *rdd* presenta el fenotipo opuesto, una disminución del tiempo a floración respecto a Col-0 (tanto bajo tratamiento de vernalización como no vernalización) y una disminución de la cantidad de hojas roseta al momento de aparición del botón floral (únicamente bajo tratamiento de no vernalización). Esto puede deberse a que en este caso los patrones de metilación de las secuencias repetitivas que se encuentran alrededor del sitio de inicio de la transcripción de *FWA*, en la mutante *rdd*, se encontrarían hipermetiladas debido a la deficiencia de demetilasas. Dado que por defecto *FWA* se encontraría metilado y silenciado, al encontrarse hipermetilado puede encontrarse hiper-silenciado (Figura 5.1.0.1). Esta disminución de los patrones de expresión de *FWA* podrían provocar una floración temprana y por lo tanto una disminución de la cantidad de hojas roseta.

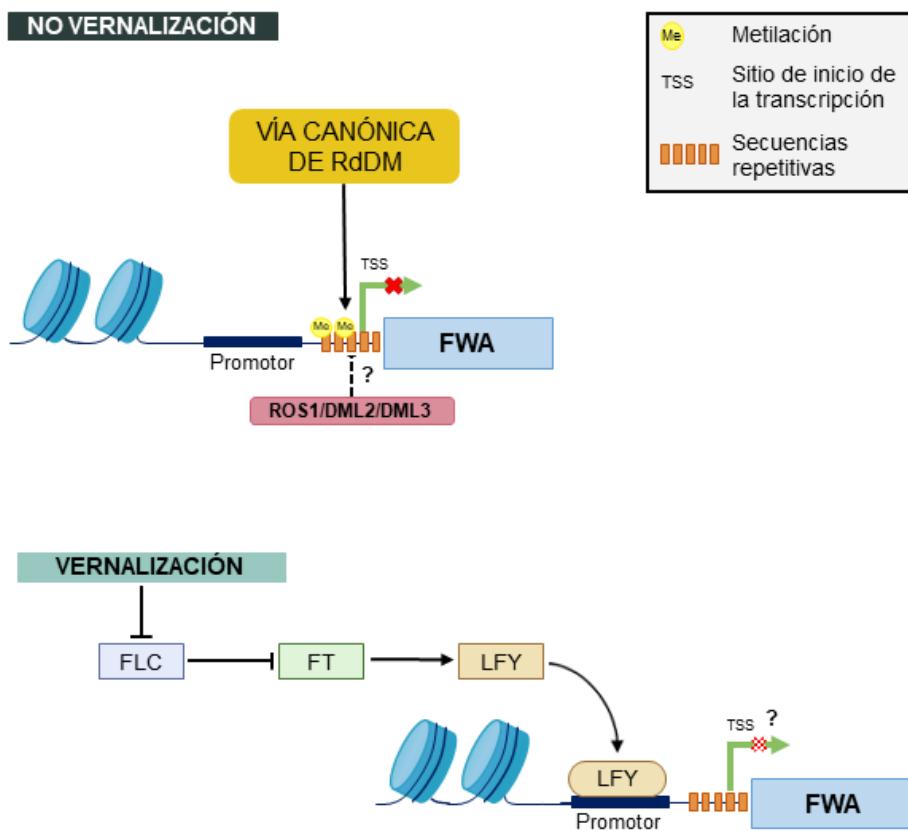


Figura 5.1.0.1: Esquema propuesto sobre la regulación del gen promotor del fenotipo de floración tardía y aumento del número de hojas FWA. Arriba se esquematiza la inducción de la metilación por medio de la vía canónica de RdDM en las regiones cortas repetitivas que flanquean al sitio de inicio de la transcripción de FWA inhibiendo su transcripción bajo el tratamiento de **no vernalización**. Se propone a su vez que las demetilasas *ROS1*, *DML2* y/o *DML3* regulan negativamente la metilación en las regiones cortas repetitivas. De ciclos de vida de *Arabidopsis thaliana*. Abajo se esquematiza el mecanismo propuesto bajo el tratamiento de **vernalización**, donde se sugiere que *LFY* interacciona con el promotor de FWA reprimiendo su transcripción. De este modo bajo el tratamiento de vernalización se observaría una regulación de los niveles de expresión de FWA independiente de la metilación de las regiones cortas repetitivas flanqueantes del sitio de inicio de la transcripción, sin embargo la hipermetilación de dicha región podría indicar menores niveles de expresión que el basal explicando el fenotipo observado para la mutante *rdd*.

Dado que el aumento de la expresión de *FWA* provoca un retraso en la floración, *FWA* bien podría reprimir la floración o promover el desarrollo vegetativo. A partir de información obtenida de la base de datos de factores de transcripción AGRIS y de la base de datos de interacción de proteínas STRING, se puede mencionar que *LFY* (*LEAFY* - factor de transcripción que promueve la transición del estadio vegetativo al reproductivo y que está involucrado en el desarrollo del meristema floral) está registrado como un factor de transcripción que puede regular la expresión del gen *FWA*, y que las proteínas *FWA* y *FT* (*FLOWERING LOCUS T*, florígeno que regula la transición al estadio reproductivo promoviendo la floración) interaccionan entre sí (Ikeda et al., 2007; Palaniswamy et al., 2006). El retraso de la floración observado cuando *FWA* interacciona con *FT* sugiere que el aumento de la expresión de *FWA* en el ápice del vástago podría retrasar la floración mediante la intervención en el funcionamiento de *FT* a través de su interacción, ese retraso no se observa cuando la expresión

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

de *FWA* sucede en los tejidos vasculares (Ikeda et al., 2007). Por lo tanto, cuando la planta atraviesa un período de vernalización, ocurre una represión epigenética estable de *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*, represor de la floración) tras la inducción del factor de transcripción *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE3*, represor de *FLC*) (Sung & Amasino, 2004). *VIN3* y el complejo represor *POLYCOMB 2* (*PRC2*) - que posee actividad de metiltransferasa H3K27 - establecen el enriquecimiento de una serie de modificaciones represoras de la cromatina en el locus de *FLC* como respuesta al frío (Dennis & Peacock, 2007). Además, en la región 3' de *FLC* y en el primer intrón de la región 5', cuando la planta es expuesta a un período de vernalización, se activa la transcripción de ARN no codificantes llamados *COOLAIR* y *COLDAIR* respectivamente, y estos regulan negativamente la expresión de *FLC* (Zografos & Sung, 2012). La represión de *FLC* evita que pueda actuar como un represor de la floración, de esta manera *FT* integra las señales de *CONSTANS* (gen cuya expresión es controlada por el reloj circadiano) y migra al meristema apical, donde promueve la transcripción de *APETALA1* (*AP1*, gen involucrado en la transición a estadio reproductivo) y *LFY* (Araki, 2001; Scott D. Michaels et al., 2005; Parcy, 2005; Simpson & Dean, 2002). *LFY* a su vez, regula a *FWA* (Palaniswamy et al., 2006). En este trabajo se observa que bajo el tratamiento de vernalización ni las plantas con mutaciones en la vía canónica de RdDM ni la planta mutante para las demetilasas *-rdd-* presentan el fenotipo de floración tardía. Esto podría deberse a que cuando la planta es vernalizada, al inhibirse *FLC* y desencadenarse la respuesta a floración donde *LFY* es activado por *FT* en el meristema apical del vástago, *LFY* podría estar regulando negativamente la expresión de *FWA* y de este modo, independientemente de los patrones de metilación del gen, se inhibe el fenotipo de floración tardía ya que todos los genotipos tendrían floración temprana (Figura 5.1.0.1).

Con respecto a la cantidad de hojas roseta, los genotipos estudiados no presentan diferencias significativas respecto a lo observado en el tratamiento de no vernalización, o bien presentan un aumento significativo en la cantidad de hojas roseta. Esto puede deberse a que, si bien a 22°C todos los genotipos presentaron una disminución en el tiempo a floración, considerando todo el tiempo en estadio vegetativo (incluso el tiempo en la cámara de frío durante el tratamiento de vernalización) las plantas contaron con más tiempo de acumulación de recursos, lo que podría conferirles la capacidad de desarrollar mayor cantidad de biomasa vegetativa. Sin embargo, como sólo los genotipos *rdr6* y *rdd* presentan un aumento significativo en la cantidad de hojas roseta cuando el tratamiento materno fue vernalización respecto a no vernalización, se debería estudiar con más detalle cómo la cantidad de hojas de roseta es regulada bajo los distintos tratamientos maternos.

Para poner a prueba la hipótesis de que *LFY* es un regulador negativo de la expresión de *FWA* y está mediando la respuesta de los mutantes RdDM en nuestras condiciones, habría que analizar los niveles de expresión de *FWA* en las mutantes de la **vía canónica**, en *rdd* y en Col-0 en ambos tratamientos. Esperaría observar que los niveles de expresión de *FWA* se encuentran aumentados en las mutantes de la vía canónica bajo condiciones control (no vernalización) respecto a Col-0 y que bajo tratamiento de vernalización no presenta diferencias significativas respecto a Col-0. En *rdd* esperaría observar que los niveles de expresión de *FWA* se encuentran disminuidos como consecuencia de la hipermetilación en tratamiento de no vernalización respecto a Col-0, mientras que en el tratamiento vernalización esperaría ver niveles de expresión de *FWA* iguales o menores a Col-0. En lo que respecta a las mutantes de la **vía no canónica** de metilación de ADN mediada por ARN,

esperaría que no se observen diferencias significativas respecto a Col-0 ni para la cantidad de hojas roseta al momento de aparición del botón floral ni para el tiempo a floración. Si el modelo propuesto es el correcto, entonces la vía no canónica no estaría regulando estas dos características.

Por otro lado, la mutante *nRPD2a*, que es la mutante de una subunidad catalítica tanto de Pol-IV como de Pol-V, presenta el mismo fenotipo que Col-0 a pesar de presentar una disminución de los patrones de metilación de ADN mediados por ARN por deficiencia en el funcionamiento del mecanismo. Esto último puede deberse a que, dado que este mecanismo tiene como uno de los principales roles el mantenimiento de la estabilidad del genoma silenciando elementos transponibles, los bajos niveles de metilación podrían provocar que muchos de los transposones que se encuentran silenciados en *wild type*, se encuentren activos en esta mutante provocando la interrupción en la expresión de genes (Figura 5.1.0.2 Modelo 1). En este caso, se podría ver interrumpida la expresión de *FWA* y obtener un fenotipo similar a *wild type*. Otro motivo podría ser que el aumento de la expresión de los elementos transponibles provoque un aumento en los patrones de metilación por otros mecanismos, generando de cierta manera una compensación en los patrones de metilación (Figura 5.1.0.2 Modelo 2).

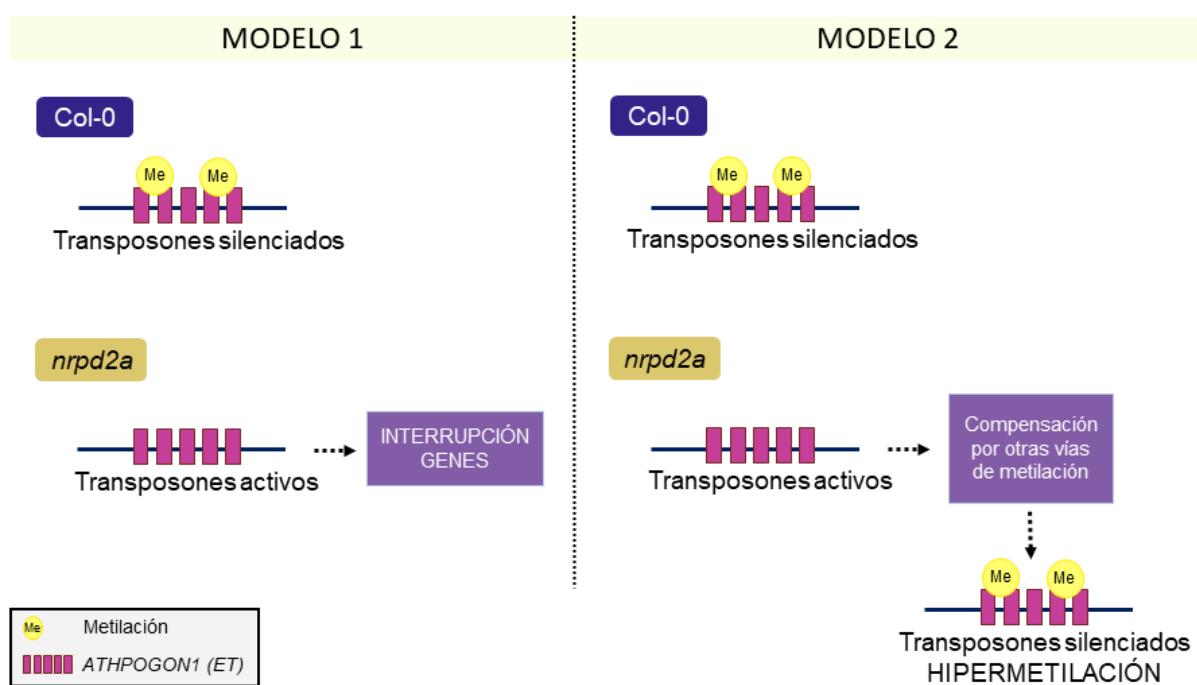


Figura 5.1.0.2: Esquema sobre los modelos propuestos para explicar los fenotipos observados en la mutante *nrpd2a*. En el **modelo 1** (izquierda) se sugiere que, a diferencia de *wild type* donde los transposones se ven silenciados por el mecanismo RdDM, en la mutante *nrpd2a* al no estar funcional el mecanismo RdDM los elementos transponibles no consiguen ser silenciados y se transponen a distintas regiones del genoma provocando la interrupción de genes. En el **modelo 2** (derecha) se propone que en la mutante *nrpd2a*, dado que los elementos transponibles no consiguen ser silenciados por el mecanismo RdDM, habría una compensación de la metilación de los elementos transponibles por otras vías de metilación, lo que podría dar lugar a la hipermetilación de los elementos transponibles observando de este modo en varios fenotipos la misma respuesta en la mutante *nrpd2a* y *rdd*.

5.2. Germinación y Dormición

La dormición es una característica adaptativa que previene la germinación prematura fuera de temporada. En *Arabidopsis*, los niveles de dormición son mayores cuando la planta madre atravesó un período de frío durante el desarrollo de la semilla (Penfield & Springthorpe, 2012). Estos niveles son en parte regulados por la planta madre a partir de un proceso de impronta genética, donde en el endosperma de la semilla hay expresión preferencial del alelo materno del gen *ALN* (*ALLANTOINASE*), un regulador negativo de la dormición (Iwasaki et al., 2019; Piskurewicz et al., 2016). La represión del alelo paterno de *ALN* está determinada mediante el silenciamiento por metilación del ADN de la región promotora por la vía no canónica del mecanismo RdDM que involucra *RDR6* en respuesta a bajas temperaturas experimentadas durante el estadio de desarrollo de las semillas (Iwasaki et al. 2019). Esto lleva a la supresión de la expresión de *ALN* y la intensificación de los niveles de dormición de la semilla sugiriendo que la impronta genética sobre el alelo paterno provocada por la acción tejido-específica inducida por frío de RdDM, genera en la semilla memoria ambiental transitoria de las condiciones ambientales experimentadas por la planta madre (Iwasaki et al. 2019).

En nuestro estudio observamos que la vernalización de la planta madre reduce en general los niveles de germinación (aumento de la dormición) en semillas frescas. Sin embargo, para la mutante *rdr6* se observa una alta proporción de germinación sin importar el ambiente materno. Considerando a *ALN* como un potencial regulador de la dormición en las condiciones utilizadas en este trabajo, los niveles de metilación de *ALN* podrían ser regulados por frío (vernalización) mediante la vía no canónica de RdDM también durante la etapa de desarrollo vegetativo y no solamente durante la etapa de desarrollo de las semillas (desarrollo reproductivo). En este caso, sería de esperar que en la mutante *rdr6* se observe hipometilación en la región promotora de *ALN*, llevando a un aumento de la germinación en este genotipo. *Rdr6* es la única de las mutantes utilizadas en este trabajo que presenta un bloqueo total de la vía no canónica, ya que las mutantes *ago4* y *dcl234* presentan redundancia por la presencia de las proteínas DCL1 y AGO6 (Matzke et al., 2015; Panda et al., 2016; Rowley et al., 2017). Teniendo esto en consideración, se podría sugerir que la poca variación entre el tratamiento de vernalización y no vernalización observada en el genotipo *rdr6* se debe a los bajos niveles de dormición promovidos por los patrones de hipometilación en el gen *ALN* (Figura 5.2.0.1), mientras que en los genotipos *rdr2*, *ago4*, *dcl234* y *rdd* se observa un aumento de la variación en la respuesta de germinación cuando el tratamiento materno fue vernalización que, a modo descriptivo pero no estadístico, parece estar asociado con una disminución de la proporción de germinación media. Esto último podría deberse al aumento de los patrones de metilación del promotor del gen *ALN* cuando la planta madre atravesó un período de vernalización por medio de otros elementos involucrados en la vía no canónica de RdDM que compensan la función de los mutantes. El aumento de la variabilidad cuando la planta madre fue vernalizada, podría a su vez estar asociada con la distribución irregular de los nutrientes hacia las semillas según la localización espacial dentro de la planta madre, por lo que sería de interés analizar si los niveles de dormición son dependientes de la posición de la semilla en nuestras condiciones (Lu et al., 2017). Esta estrategia podría tener la ventaja

adaptativa de que al menos una semilla tenga las condiciones de germinar en el momento adecuado ajustando su ciclo de vida con las variaciones estacionales exitosamente.

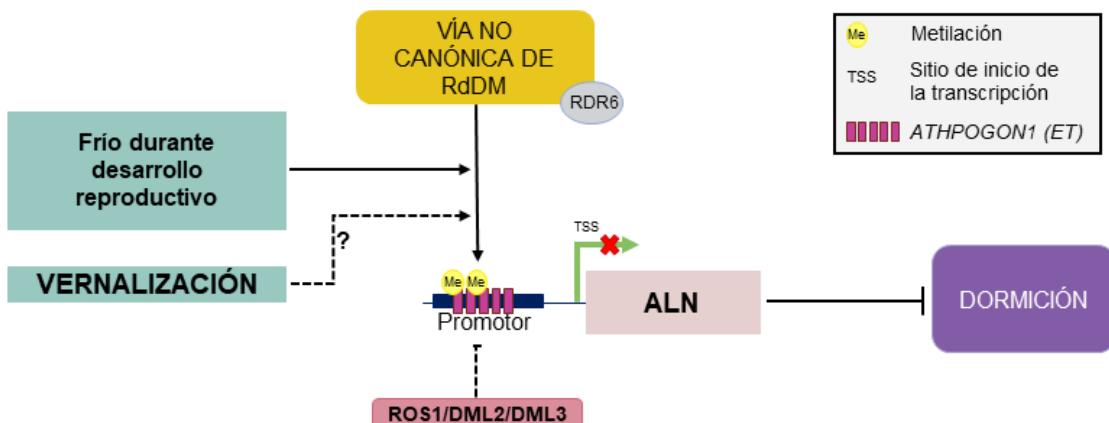


Figura 5.2.0.1: Esquema propuesto sobre la regulación del gen *ALN* (inhibidor de la dormición) para explicar los fenotipos observados en el ensayo de germinación. La metilación en el elemento transponible *ATHPOGON1* en la región promotora del gen *ALN* a partir de la vía canónica de RdDM fue reportada bajo condiciones de frío durante el desarrollo reproductivo (Iwasaki et al. 2019). En este esquema se propone que dicha metilación por medio de la vía no canónica de RdDM es también inducida por condiciones de frío durante estadios tempranos del desarrollo vegetativo de la planta madre y de este modo se reprime la expresión de *ALN*. A su vez la metilación de *ATHPOGON1* es regulada negativamente por las demetilasas *ROS1*, *DML2* y/o *DML3*.

El efecto de disminución de la proporción de germinación cuando la planta madre atravesó un período de invierno en el estadio vegetativo en la mutante *rdd* podría verse intensificado como consecuencia de la imposibilidad de demetilar aquellos genes *target* del mecanismo RdDM. Por otro lado, lo observado para la mutante *nrp2a* nuevamente no se correlaciona con lo observado para el resto de las mutantes del mecanismo RdDM, ya que presenta diferencias significativas en la proporción de germinación respecto a Col-0, menor proporción de germinación y mayor variación en la respuesta cuando la planta madre fue vernalizada. Esto último, coincidentemente con lo discutido en 5.1, puede deberse a dos cosas: (1) a que los bajos niveles de metilación podrían provocar que muchos de los transposones que se encuentran silenciados en el genotipo *wild type*, se encuentren activos en esta mutante provocando la interrupción en la expresión de genes - en este caso, se podría ver interrumpida la expresión de *ALN* y obtener un fenotipo similar a *rdd* con altos niveles de dormición -; o (2) a que el aumento de la expresión de los elementos transponibles provoque un aumento en los patrones de metilación por otros mecanismos, generando de cierta manera una compensación en los patrones de metilación (Figura 5.1.0.2). En relación con esta/s última/s hipótesis, *ALN* cuenta con un elemento transponible (*ATHPOGON1*) en la región promotora, por lo que sería de gran interés analizar cuál es la actividad de dicho transposón y sus patrones de metilación en la mutante *nrp2a* en nuestras condiciones (Iwasaki et al., 2019).

Sin embargo, aumento de los niveles de dormición en semillas postmaduradas de *Arabidopsis* como respuesta a temperaturas frías también fueron asociados a los genes *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)*, ya que un aumento en la expresión de *FLC* se asoció a mayores niveles de germinación (Chiang et al., 2009; Kendall et al., 2011). Por lo tanto, *FLC*

corresponde a un regulador pleiotrópico (regula más de un carácter) que regula negativamente la transición al estadío reproductivo pero positivamente el proceso de germinación. Coincidentemente, el aumento de la expresión de *FRI* (regulador positivo de *FLC*) provoca un aumento de la germinación (Auge et al., 2017, Blair et al. 2017). A su vez, se registró que el mecanismo RdDM es capaz de regular tanto positiva como negativamente la expresión de *FT* (río abajo de *FLC*) dependiendo de la región del gen donde se induzca la metilación (Deng & Chua, 2015). Cuando el mecanismo RdDM genera metilación en la región promotora de *FT*, provoca una disminución de su expresión, sin embargo cuando la metilación es dirigida a la región intrónica CArG (sitio de unión de *FLC*) *FT* es activado (Deng & Chua, 2015). Teniendo en cuenta que la germinación inducida por el aumento de la expresión de *FLC* podría deberse a una regulación negativa de la expresión de *FT*, se podría pensar que la actividad de RdDM cuando la planta madre fue vernalizada podría estar activando *FT* mediante la metilación de la región intrónica y, de este modo, llevando a que las semillas tengan mayores niveles de dormición. Sería por ello que Col-0 presenta mayor variación en la respuesta de germinación cuando la planta fue vernalizada con un valor medio, si bien no estadísticamente significativo, aparentemente menor; y la mutante *rdd* que tiene imposibilitada la demetilación de los *targets* de RdDM presenta una intensificación en los niveles de dormición cuando la planta madre fue vernalizada, ambos por la potencial hipermetilación de la región intrónica de *FT*.

A su vez, *FT* regula la dormición de las semillas a partir de la regulación de la expresión de *FLC* y del estado de la cromatina mediante la activación de la transcripción del antisentido de *FLC* (*COOLAIR*) (Chen & Penfield, 2018). Por lo tanto, en lo que respecta a la **dormición secundaria** se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de incubación a 35°C habría una disminución en la proporción de metilación media para los distintos tratamientos maternos y los distintos genotipos. Esto no se observó para Col-0, ya que este genotipo no mostró disminución de la proporción de germinación al incubar las semillas a 35°C cuando la planta madre fue expuesta a vernalización. A su vez, para los genotipos Col-0, *rdr2*, *rdr6*, *dcl234* y *ago4* la proporción de germinación de semillas estratificadas con calor parece ser menor cuando las plantas madres fueron no vernalizadas que cuando fueron vernalizadas. Por lo tanto, el tratamiento materno de vernalización parece estar impidiendo que las semillas entren en un estado de dormición secundaria cuando las condiciones para germinar no son favorables. Sin embargo, para las mutantes RdDM la entrada a dormición secundaria parece verse activada ya que presenta menores niveles de germinación que Col-0 luego de la estratificación con calor, el cual no presenta diferencias a lo largo del tratamiento. Esto indica que el mecanismo RdDM parece estar involucrado en la regulación de la entrada a dormición secundaria cuando la planta madre percibe frío prolongado durante su desarrollo vegetativo. Por lo tanto, la desregulación de los patrones de metilación, por medio del mecanismo RdDM, cuando la planta madre fue vernalizada parece provocar un aumento en los niveles de dormición, ya que todas las mutantes analizadas presentan una disminución significativa de la proporción de germinación luego de la estratificación en calor por cinco días respecto a las condiciones control. La regulación de la vía RdDM asociada a la entrada de dormición secundaria cuando la planta madre fue vernalizada podría deberse a una interacción entre los patrones de metilación en las regiones promotoras e intrónicas de *FT*, provocando el mismo fenotipo tanto en mutantes con hipometilación como hipermetilación. Por otro lado, cuando la planta madre

experimentó condiciones control (no vernalizada), no hay diferencias significativas en la proporción de germinación entre genotipos, lo que sugiere que el mecanismo RdDM no sería necesario para la inducción a dormición secundaria en plantas crecidas durante todo su ciclo de vida a 22°C.

Si bien *DOG1* es conocido como uno de los principales reguladores de la dormición en *Arabidopsis*, en la accesión Col-0 no es requerido para la regulación de la dormición primaria cuando las semillas se incuban a bajas temperaturas (Kendall et al., 2011; Murphey et al., 2015). Además, si bien es conocido que la expresión de *DOG1* es regulada por la temperatura del ambiente materno durante el desarrollo reproductivo (Carrillo-Barral et al., 2020) el mecanismo por el cual *DOG1* es regulado cuando la planta madre atraviesa un período de vernalización aún es desconocido. Es necesario analizar los patrones de expresión y metilación de los genes mencionados en las condiciones estudiadas para poder dar un paso más hacia la comprensión de la regulación de la dormición por el ambiente materno y su relación con el mecanismo RdDM.

Cabe destacar que el correcto funcionamiento de la vía de metilación de ADN mediada por ARN es fundamental para la respuesta de germinación cuando la planta madre fue vernalizada, ya que en los genotipos *nrpd2a* y *rdd*, los dos mutantes con efectos más fuertes en la homeostasis de metilación del genoma, muestran una disminución en la proporción de germinación y velocidad de germinación respecto a Col-0 únicamente cuando la planta madre atravesó un período de frío durante su desarrollo vegetativo. A su vez, es necesario el correcto funcionamiento del mecanismo para la regulación del ciclado de dormición secundaria cuando la planta madre fue vernalizada ya que para todas las mutantes se observó una disminución de la proporción de germinación al ser estratificadas con calor, mientras que Col-0 no respondió al tratamiento.

Col-0 es un ecotipo anual de verano que germina en primavera y dentro de la misma estación atraviesa tanto el estadio vegetativo como reproductivo dando semillas al comienzo del verano, las cuales permanecen dormidas hasta la primavera siguiente. Por lo tanto, la respuesta del genotipo *wild type* al tratamiento de vernalización podría presentar la ventaja adaptativa de ajustar su ciclo de vida de modo tal de germinar apenas terminado el invierno y alcanzada la primavera, por lo que requiere niveles muy bajos de dormición. Mientras que cuando la planta experimentó durante su desarrollo vegetativo y reproductivo únicamente temperaturas cálidas no extremas (como es el caso del tratamiento de no vernalización: 22°C), esto podría indicar que su desarrollo transcurrió en la estación de primavera y probablemente la dispersión de las semillas ocurra a finales de primavera o en verano. En este último caso, la semilla debe permanecer dormida de modo tal de atravesar las condiciones estresantes y garantizar su supervivencia germinando en la siguiente primavera, por lo tanto semillas provenientes de estas plantas con niveles más altos de dormición tienen más probabilidad de ajustar su ciclo de vida a los ciclos estacionales (Figura 5.2.0.2). La percepción de temperaturas altas puede representar un estímulo ambiental interesante en el ecotipo Columbia-0 ya que puede indicar el comienzo de estaciones desfavorables para el desarrollo (Figura 5.2.0.2). La incapacidad de las mutantes RdDM de mantener bajos los niveles de dormición al experimentar altas temperaturas, siendo que la planta madre atravesó un período de frío durante su desarrollo, podría conllevar a la disminución de la germinación en primavera y la pérdida del desarrollo anual de la planta. Sin embargo, podría ocurrir también que la disruptión del mecanismo RdDM ofrezca una ventaja adaptativa en la cual las semillas puedan percibir condiciones desfavorables -como una primavera

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

extremadamente calurosa alcanzando temperaturas de verano - y responder al ambiente para que el desarrollo y crecimiento se produzcan en condiciones óptimas. Sería de gran interés analizar qué ocurre para todos los genotipos en ambos tratamientos si luego de la estratificación en calor, se embeben las semillas a altas temperaturas, ya que 24°C (temperatura utilizada para los ensayos de germinación) se relaciona mayormente con temperaturas de primavera, por lo que la exposición por unos cinco días a 35°C para inducir la dormición secundaria puede no ser suficiente para que las semillas se consideren en una estación de verano, y la incubación a 24°C sea un indicador de estaciones primaverales donde la respuesta óptima es la germinación.

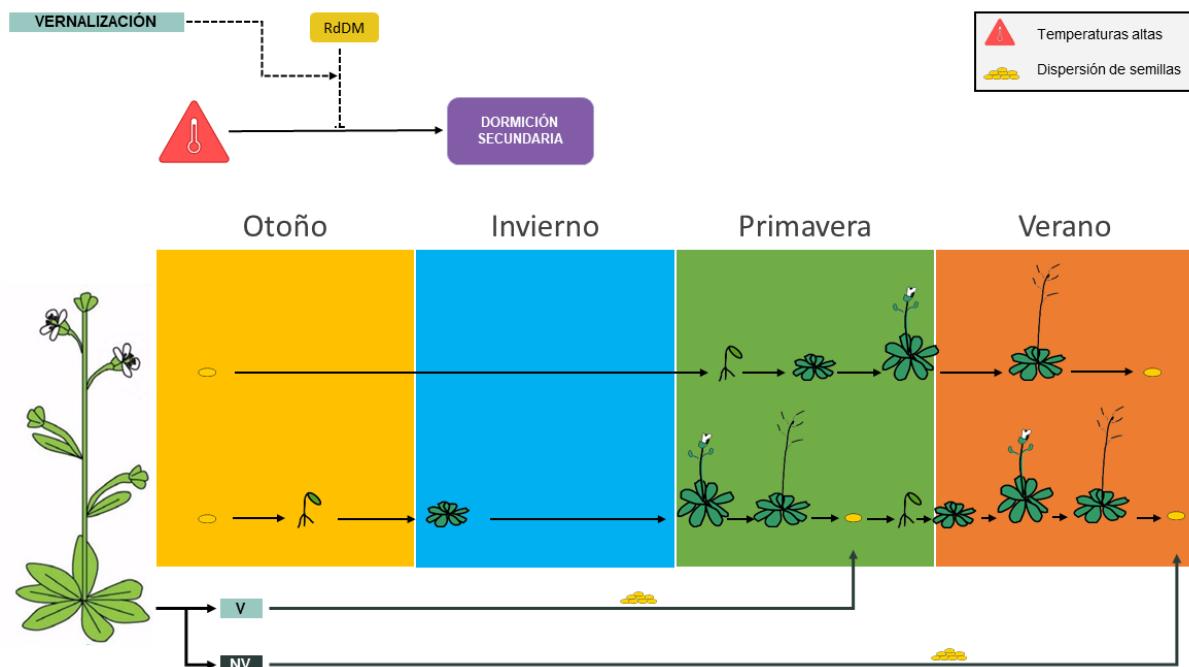


Figura 5.2.0.2: Esquema propuesto sobre la regulación de los niveles de dormición secundaria en respuesta a la estratificación por calor (incubación a 35°C). En el esquema de arriba se observa que la percepción de temperaturas altas en las semillas induce la entrada a dormición secundaria, y se propone que el mecanismo RdDM inhibe el ciclado de dormición secundaria cuando la planta madre atravesó un período de vernalización. En el esquema de abajo se observa que en condiciones naturales aquellas plantas que atraviesan un invierno durante estadios tempranos del desarrollo vegetativo estarían dispersando sus semillas en primavera, la que corresponde a una estación con condiciones óptimas para la germinación, por lo que niveles bajos de dormición podrían permitir el ajuste del ciclo de vida de la planta a los cambios estacionales. En cambio, cuando la planta madre creció bajo condiciones de no vernalización, las semillas estarían siendo dispersadas a finales del verano por lo que mayores niveles de dormición le permitirían germinar una vez llegada la siguiente primavera.

5.3. Características de las semillas

El número de semillas producidas, su tamaño y la provisión de nutrientes son caracteres clave que determinan el *fitness* individual y el rendimiento de los cultivos (Gnan et al., 2014). La variación observada para estas características entre distintas especies se suele explicar no solo por el *fitness* de la progenie, sino también por el de las plantas madre que establece una compensación entre la cantidad y calidad de las semillas dependiente de las condiciones ambientales (Auge et al., 2017; Gnan et al., 2014; Ratikainen et al., 2018). Cuando los fenotipos óptimos de la progenie son costosos para el *fitness* materno, los conflictos padre-progenie pueden llevar a la obtención de caracteres subóptimos en la progenie (Kirkpatrick & Lande, 1989; Uller, 2008). Si los efectos maternos le confieren desventaja adaptativa a la progenie, la plasticidad de la progenie puede compensar y restituir un fenotipo adaptativo (Prizak et al., 2014). Por lo tanto, los conflictos padre-progenie pueden contribuir a respuestas antagonistas en las generaciones paternas o de la progenie (Auge et al., 2017; Ratikainen et al., 2018).

Las características analizadas en el análisis de correlación (tiempo a floración, velocidad de germinación, largo del hipocotilo, tamaño de las semillas y peso de las semillas) presentan correlación positiva entre sí, siendo las correlaciones más altas aquellas entre el tiempo hasta aparición del botón floral y el largo del hipocotilo ($r=0.51$), entre el largo del hipocotilo y el área de la semilla ($r=0.5$) y entre la velocidad de germinación y el peso de la semilla ($r=0.5$) (Figura 4.4.0.1). En este estudio observamos que para plantas madre que fueron vernalizadas la producción de biomasa reproductiva y el largo del hipocotilo de la F2 fue menor, pero el tamaño de las semillas no difirió significativamente de las de plantas control (no vernalizadas). Sin embargo, algunos de los mutantes del mecanismo mostraron diferencias significativas respecto al *wild type* en algunas de las condiciones ensayadas, sugiriendo un rol de la metilación del ADN en la regulación de estos caracteres.

El peso de las semillas brinda información sobre la biomasa reproductiva obtenida en diferentes ambientes; el peso de semillas puede relacionarse directamente con el tamaño de las semillas y la cantidad de nutrientes presentes en ellas, o bien con la cantidad de semillas producidas. En nuestro caso, no podemos determinar a cuál de las dos variables se debe la diferencia en peso total ya que no contamos con datos de peso individual de semillas al momento de escritura de la tesis. Contando con el peso de 1000 semillas por planta, tratamiento materno y genotipo por ejemplo, podríamos analizar si hay diferencias entre la cantidad de semillas producidas; y poner a prueba la hipótesis de que las plantas madre invierten sus recursos preferencialmente en la producción de mayor cantidad de semillas de menor calidad o menor cantidad de semillas de mayor calidad en función del tratamiento materno. El peso de las semillas presentó una correlación positiva con el tiempo a floración ($r=0.26$), el largo del hipocotilo ($r=0.39$), el área de las semillas ($r=0.26$) y la velocidad de germinación ($r=0.5$). Esto podría indicar que a mayor tiempo de desarrollo vegetativo las plantas pueden adquirir más cantidad de nutrientes para invertir en un mayor número de biomasa reproductiva. Sin embargo, los coeficientes de correlación obtenidos, si bien significativamente diferentes a cero son lejanos a uno, lo que indica que gran parte de la variabilidad en el peso de las semillas no se explica por el tiempo a floración, el largo del hipocotilo y el área de las semillas, sino probablemente a la cantidad de semillas producidas. En cuanto a la velocidad de germinación, un

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

mayor peso de semillas está asociado a una mayor velocidad de germinación, lo que podría hacer que las semillas sean más vigorosas. Sería de gran interés entonces realizar un experimento en donde se pesen un set de semillas de cada genotipo provenientes de plantas madres sometidas a los distintos tratamientos y esas mismas semillas utilizarlas para medir la proporción y velocidad de germinación, de modo tal de poder realizar un modelo estadístico donde se analice la relación entre estas dos variables y su posible interacción con el genotipo y el tratamiento.

El peso de las semillas no presentó diferencias significativas entre los distintos genotipos respecto a Col-0 para el tratamiento materno de no vernalización. Esto podría deberse a que la distribución de los recursos en las distintas plantas en función del tratamiento materno y genotipo sólo pueda verse reflejada cuando se analizan la cantidad de semillas y la calidad de las mismas (relacionada con el peso individual) por separado. Por el contrario, cuando el tratamiento materno es de vernalización, los genotipos *rdd* y *nrpd2a* presentan una disminución significativa del peso de las semillas respecto al control *wild type*, aunque para este último esta diferencia es estadísticamente no significativa. Esto último sugiere que el mecanismo de metilación RdDM podría estar afectando a la cantidad de biomasa reproductiva cuando la planta madre fue vernalizada, y una desregulación de los patrones de metilación podría provocar una limitación en la inversión de nutrientes hacia la progenie ya sea en cantidad o calidad de semillas (Figura 5.3.0.2). Dado que los genotipos afectados son *rdd* y *nrpd2a*, esta limitación en la inversión de nutrientes podría deberse a la disminución de la expresión de genes involucrados en el desarrollo de las semillas mediante alguna de las siguientes posibilidades: 1) hipermetilación en el genotipo *rdd* y disminución en la expresión como consecuencia de la irrupción por transposones activos, o 2) hipermetilación producida por otro mecanismo de metilación que se ve activado para silenciar los transposones activados en el genotipo *nrpd2a*.

El tamaño (área en mm^2) de las semillas presenta para todas las mutantes, con excepción de *nrpd2a*, un aumento significativo respecto a *wild type* cuando el tratamiento materno fue de no vernalización. El tratamiento de vernalización en cambio provocó que el fenotipo de aumento del área de la semilla se revierta para las mutantes de la vía canónica (las diferencias no resultan significativas respecto al control). La única mutante sin redundancia en la vía no canónica de RdDM es *rdr6* (Matzke et al., 2015; Rowley et al., 2017), y presenta un aumento significativo del tamaño de las semillas incluso cuando las plantas madres fueron sometidas a vernalización respecto al *wild type*. Salvo *dcl234*, los genotipos no presentaron diferencias significativas entre tratamientos maternos, lo que sugiere que si bien el mecanismo RdDM regularía de alguna forma el tamaño de las semillas, esta regulación no sería mayormente dependiente del ambiente materno.

El mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN regula la metilación de varios genes *target* involucrados en determinar el tamaño de la semilla, entre ellos se encuentran los genes que codifican los factores de transcripción *AGL* (*AGAMOUS-LIKE*) (Kirkbride et al., 2019). Cuando hay deficiencias en el mecanismo RdDM, la regulación espacio-temporal de estos genes se ve afectada ya que genes como *AGL40* y *AGL91* presentan expresión ectópica dependiente del tiempo desde polinización en todo el endosperma en la mutante *nrpd1* (*Nuclear RNA Polymerase D1* - subunidad de la polimerasa IV) (Kirkbride et al., 2019). Esta desregulación de la expresión de estos genes desde estadios tempranos del desarrollo de la semilla provoca la promoción de la expansión celular que resulta en un mayor tamaño de las semillas (Kirkbride et al., 2019) (Figura 5.3.0.1). Dado que el área de las

semillas en nuestro estudio aumenta tanto para las mutantes del mecanismo RdDM como para la mutante de demetilasas, con excepción de *nrpd2a*, podría suceder que no solamente la metilación por medio de este mecanismo es esencial para el correcto establecimiento del tamaño de la semilla, sino también la correcta demetilación de genes *target* que podrían estar asociados a la celularización del endosperma (Figura 5.3.0.2). La mutante *nrpd2a* nuevamente no coincide con los demás genotipos, y en este caso podría deberse a que la activación de los elementos transponibles podría interrumpir la expresión de genes tales como *AGL40* y *AGL91*, o que otras vías de metilación, como la regulada por MET1 (Xiao et al., 2006), compensen la hipometilación de los *targets*, de este modo presentando un fenotipo normal (Figura 5.1.0.2).

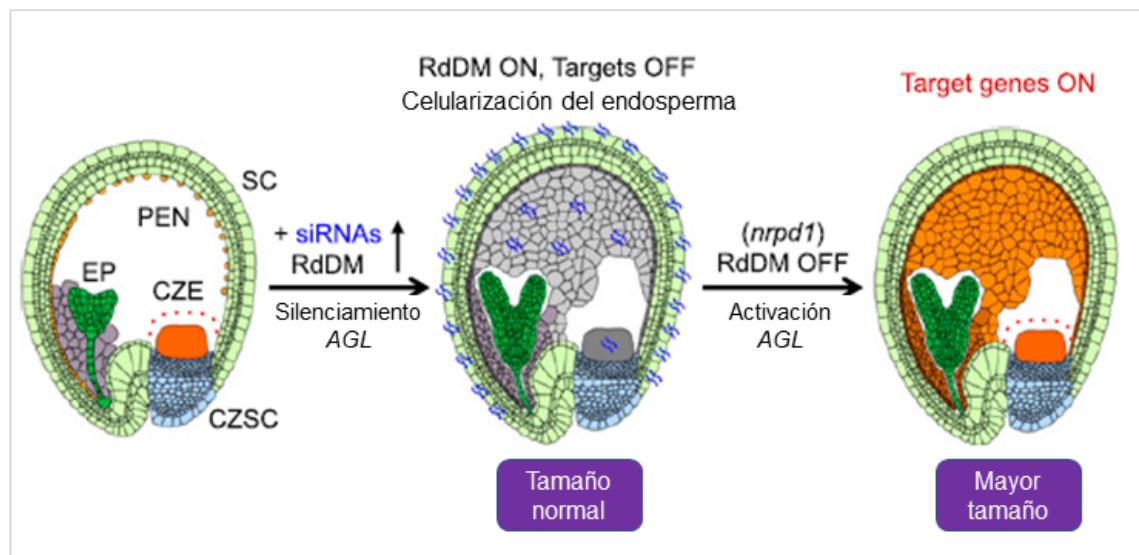


Figura 5.3.0.1: Esquema que representa la relación entre la funcionalidad del mecanismo RdDM y el tamaño de la semilla. Se propone que cuando el mecanismo RdDM se encuentra funcional, aumentan los niveles de expresión de pequeños ARN y se produce el silenciamiento de genes *AGL*: de división celular. De este modo ocurre la celularización del endosperma y se obtienen semillas de tamaño normal. Cuando el mecanismo RdDM no se encuentra funcional, los genes *AGL* no son silenciados, por lo que se encuentran activos, obteniéndose de este modo semillas de mayor tamaño (diagrama modificado de Kirkbride et al., 2019).

El correcto desarrollo de las semillas es de vital importancia tanto a nivel evolutivo como agronómico, es por eso que el estudio de la regulación espacio-temporal de genes *target* del mecanismo RdDM es clave para comprender las bases genéticas y epigenéticas del desarrollo de las semillas y su relación con el ambiente materno. Dado que sólo la mutante *rdr6* mostró diferencias significativas en el tamaño de las semillas para plantas madre que fueron vernalizadas, la vía no canónica del mecanismo RdDM podría cumplir un rol importante en el establecimiento del tamaño de la semilla. Es necesario profundizar en el estudio de esta vía y su relación con el tamaño de la semilla en función del ambiente materno para desentrañar el mecanismo subyacente y generar información que permita ser aplicada al mejoramiento de caracteres agronómicos.

En el caso del largo del hipocotilo, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas, se observa cualitativamente una respuesta similar a la obtenida para el tamaño de la semilla de todos los genotipos en ambos tratamientos. A su vez, la correlación entre el tamaño de la semilla y el largo del hipocotilo es positiva y corresponde al segundo valor más alto de correlación analizado en este

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

trabajo. Esto sugiere que el aumento del tamaño de la semilla está directamente relacionado con la provisión de nutrientes por medio de la planta madre que puede afectar el establecimiento y supervivencia de las plántulas. El mecanismo RdDM podría estar regulando en función del ambiente materno del mismo modo que regula genes *target* del tamaño de la semilla a genes involucrados en la provisión de nutrientes a las semillas por parte de la planta madre; o bien podría estar ocurriendo que los mismos genes *target* del mecanismo RdDM involucrados en la regulación del tamaño de la semilla presenten efectos pleiotrópicos regulando del mismo modo la provisión de nutrientes.

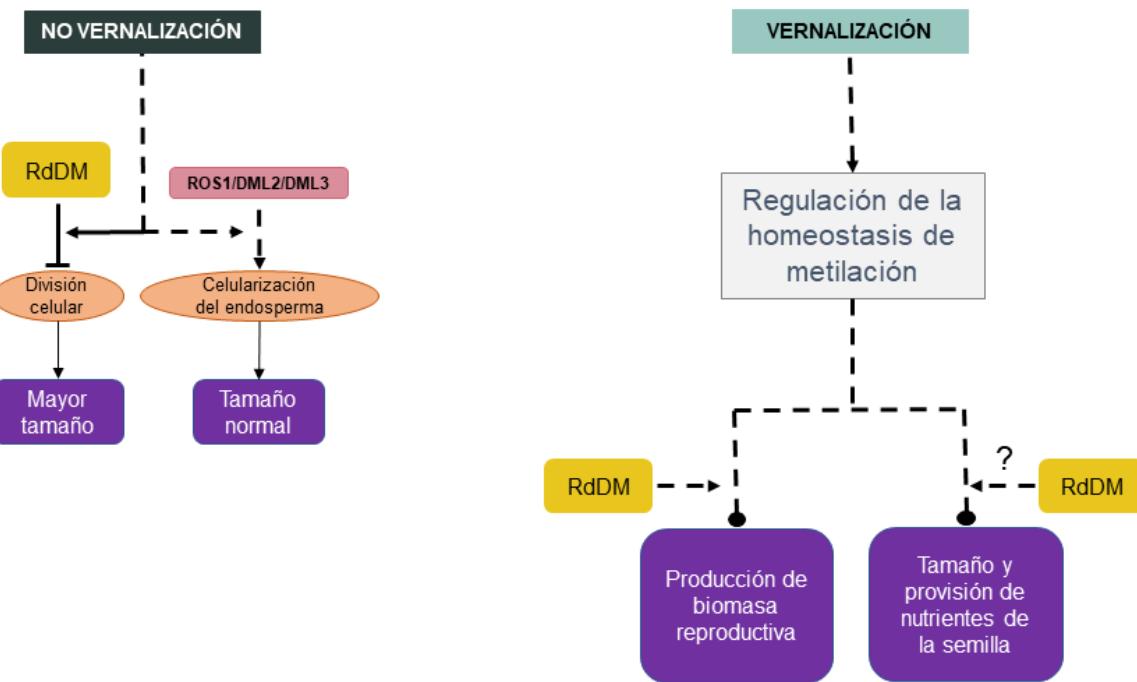


Figura 5.3.0.2: Esquema propuesto para explicar los fenotipos observados al analizar las características de las semillas. Bajo el tratamiento de **no vernalización** (izquierda) se indica una represión de la división celular evitando la inducción del fenotipo de mayor tamaño de semillas (Kirkbride et al., 2019). Se propone además que el mecanismo RdDM podría estar involucrado en la regulación de la celularización del endosperma ya que la mutante *rdd* presenta también un fenotipo de mayor tamaño de semilla, por lo que las demetilasas *ROS1*, *DML2* y/o *DML3* podrían estar involucradas en la inducción de la expresión de genes relacionados a la cellularización del endosperma. Bajo el tratamiento de **vernalización** (derecha) se propone que la regulación de la homeostasis de metilación por medio del mecanismo RdDM podría ser el principal responsable de los fenotipos observados al analizar la producción de biomasa reproductiva (peso de semillas) ya que las mutantes que presentaron diferencias significativas respecto a *wild type* fueron *rdd* y *nrp2a* y se corresponden con una mayor desregulación de la homeostasis de metilación. En lo que respecta al tamaño de la semilla y provisión de nutrientes, es necesario realizar más estudios para proponer un mecanismo de acción del mecanismo RdDM bajo este tratamiento y su relación con la homeostasis de metilación.

5.4. Proyecciones a futuro

A partir de lo observado en el presente trabajo cabe resaltar la importancia del estudio del mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM) como regulador de las transiciones del desarrollo en respuesta a las condiciones ambientales experimentadas a través de generaciones.

Tomando en consideración los mecanismos propuestos como involucrados en los fenotipos observados surgen las siguientes diversas hipótesis.

H1: *LFY* es un regulador negativo de la expresión de *FWA* y está mediando la respuesta de mutantes de RdDM al tratamiento de vernalización.

Para estudiar dicha hipótesis se podría analizar la expresión de *FWA* en mutantes de la vía canónica y correlacionarlo con los niveles de expresión de *LFY* en ambientes maternos contrastantes.

H2: Los niveles de metilación de *ALN*, que determinan los niveles de dormición, son regulados por frío mediante la vía no canónica de RdDM incluso cuando el período de vernalización fue experimentado en estadios tempranos del ciclo de vida de la planta madre.

Para ponerla a prueba habría que analizar bajo las condiciones estudiadas los niveles de metilación de *ALN*, ya sea a través de un estudio de secuenciación bisulfítica o a partir de un estudio con enzimas de restricción que cliven al ADN preferencialmente en regiones metiladas/no metiladas.

H3: El mecanismo RdDM, como respuesta a un tratamiento de vernalización de la planta madre, induce la metilación de *FT* en la región intrónica activando su expresión y de este modo se obtienen semillas con mayores niveles de dormición.

Para ello se podría analizar la expresión de *FT* (tanto a nivel del ARN como a nivel proteína) bajo las condiciones utilizadas en el presente trabajo y correlacionar los niveles de expresión con el grado de metilación de ADN a lo largo del locus para las distintas mutantes.

H4: La relación entre las temperaturas experimentadas por la planta madre y la semilla le brindan a la progenie la capacidad de ajustar su ciclo de vida a las variaciones estacionales: la vernalización de la planta madre indica dispersión de semillas en primavera por lo que un estado de menor dormición resulta mayormente adaptativo; mientras que no vernalización de la planta madre indica dispersión en verano siendo en este caso el estado de mayor dormición el que resulta más adaptativo. El mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN cumple un rol importante en la inhibición de la germinación cuando la planta madre fue vernalizada.

Si la incubación a 35°C fuera prolongada, esperaría que las semillas de plantas vernalizadas germinen con el tiempo ya que la experiencia de vernalización de la planta madre le indicaría que se encuentra en una estación de primavera al ser dispersada, mientras que semillas provenientes de plantas no vernalizadas presentarían muy baja proporción de germinación en estas condiciones. Para analizar cuáles son los genes *target* de este mecanismo que regulan el ciclado de dormición secundaria, se podrían realizar ensayos de secuenciación masiva (genéticos y/o epigenéticos) de plantas *wild type* en estas condiciones y de plantas mutantes del mecanismo RdDM.

H5: Las plantas madre invierten sus recursos preferencialmente en la producción de mayor cantidad de semillas de menor calidad o menor cantidad de semillas de mayor calidad en función del tratamiento materno, y esta inversión de recursos está regulada por el mecanismo RdDM.

Para analizar esta hipótesis, dentro de las condiciones utilizadas en el presente trabajo, se puede contar el peso de 1000 semillas por planta, tratamiento materno y genotipo, y analizar la relación entre el peso de las semillas con la cantidad de semillas producidas y el largo de hipocotilo (como medida de la cantidad de nutrientes provistos por la planta madre) o el análisis cuantitativo de algún/os metabolito/s.

H6: Los genes *AGL*, promotores del desarrollo celular, son regulados por el mecanismo RdDM diferencialmente dependiendo de las condiciones ambientales experimentadas por la planta madre aún en momentos tempranos del desarrollo.

Para estudiar dicha hipótesis se podría analizar la expresión de *AGL40* y *AGL91* (tanto a nivel del ARN como a nivel proteína) bajo las condiciones de estudio y correlacionar los niveles de expresión con el grado de metilación de ADN. Además, se podrían analizar los patrones de metilación en estos loci en las distintas mutantes en función de los tratamientos maternos contrastantes.

H7: La mutante *nrpd2a* responde de manera diferente al resto de las mutantes del mecanismo RdDM debido a una de las siguientes causas: (1) los bajos niveles de metilación provocan que muchos de los transposones que se encuentran silenciados en el genotipo *wild type* se activen en esta mutante provocando la interrupción en la expresión de genes; o (2) el aumento de la expresión de los elementos transponibles provoca un aumento en los patrones de metilación por otros mecanismos, generando de cierta manera una compensación en los patrones de metilación.

Esto último se puede poner a prueba usando el mecanismo propuesto para *ALN*, que cuenta con un elemento transponible (*ATHPOGON1*) en la región promotora. Se puede analizar la actividad de dicho transponer, sus patrones de metilación en la mutante *nrpd2a* y correlacionarlo con los niveles de expresión de *ALN* en diferentes tratamientos maternos.

Bibliografía

- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C. J., Blankestijn-de Vries, H., & Koornneef, M. (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 164(2), 711–729. <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300030008x>
- Al-Shehbaz, I. A., & O'Kane, S. L. J. (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (brassicaceae). *The Arabidopsis Book*, 1, e0001. <https://doi.org/10.1199/tab.0001>
- Amasino, R. (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *The Plant Cell*, 16(10), 2553–2559. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.161070>
- Araki, T. (2001). Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00137-0)
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, 55(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>
- Auge, G. A., Blair, L. K., Neville, H., & Donohue, K. (2017). Maternal vernalization and vernalization-pathway genes influence progeny seed germination. *New Phytologist*, 216(2), 388–400. <https://doi.org/10.1111/nph.14520>
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 53(8), 474–485. <https://doi.org/10.1002/dvg.22877>
- Blair, L., Auge, G., & Donohue, K. (2017). Effect of FLOWERING LOCUS C on seed germination depends on dormancy. *Functional Plant Biology*, 44(5), 493–506. <https://doi.org/10.1071/FP16368>
- Boesch, C. (1992). Clutton-Brock T. H. 1991. The Evolution of Parental Care. Princeton University Press. 352 pp., P/b: \$19.95, H/b \$ 49.50. ISBN: 0-691-02516-9. *Journal of Evolutionary Biology*, 5(4), 719–721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1992.5040719.x>
- Bonasio, R., Tu, S., & Reinberg, D. (2010). Molecular signals of epigenetic states. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6004), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1191078>
- Buijs, G., Vogelzang, A., Nijveen, H., & Bentsink, L. (2020). Dormancy cycling: translation-related transcripts are the main difference between dormant and non-dormant seeds in the field. *Plant Journal*, 102(2), 327–339. <https://doi.org/10.1111/tpj.14626>
- Burghardt, L. T., Edwards, B. R., & Donohue, K. (2016). Multiple paths to similar germination behavior in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 209(3), 1301–1312. <https://doi.org/10.1111/nph.13685>
- Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2002). Role of the *arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology : CB*, 12(13), 1138–1144. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00925-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00925-9)
- Carrillo-Barral, N., del Carmen Rodríguez-Gacio, M., & Matilla, A. J. (2020). Delay of germination-1 (DOG1): A key to understanding seed dormancy. In *Plants* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/plants9040480>
- Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L., & Jacobson, M. K. (1996). Glycation and glycoxidation of histones by ADP-ribose. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10461–10469. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10461>
- Chen, M., MacGregor, D. R., Dave, A., Florance, H., Moore, K., Paszkiewicz, K., Smirnoff, N., Graham, I. A., & Penfield, S. (2014). Maternal temperature history activates Flowering Locus T in fruits to control progeny dormancy according to time of year. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52), 18787–18792. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412274111>

BIBLIOGRAFÍA

- Chen, M., & Penfield, S. (2018). Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time. *Science*, 360(6392), 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.aar7361>
- Chiang, G. C. K. K., Barua, D., Kramer, E. M., Amasino, R. M., Donohue, K., Kramer, E. M., Amasino, R. M., & Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), 11661–11666. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901367106>
- Corbesier, L., & Coupland, G. (2006). The quest for florigen: Review of recent progress. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3395–3403. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl095>
- Denay, G., Chahtane, H., Tichtinsky, G., & Parcy, F. (2017). A flower is born: an update on *Arabidopsis* floral meristem formation. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.003>
- Deng, S., & Chua, N. H. (2015). Inverted-Repeat RNAs Targeting FT Intronic Regions Promote FT Expression in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1667–1678. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv091>
- Dennis, E. S., & Peacock, W. J. (2007). Epigenetic regulation of flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.06.009>
- Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K., & Willis, C. G. (2010). Germination, Postgermination Adaptation, and Species Ecological Ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1), 293–319. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144715>
- Ehrlén, J. (2015). Selection on flowering time in a life-cycle context. *Oikos*, 124(1), 92–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/oik.01473>
- English, S., Pen, I., Shea, N., & Uller, T. (2015). The Information Value of Non-Genetic Inheritance in Plants and Animals. *PLOS ONE*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116996>
- Erdmann, R. M., & Picard, C. L. (2020). RNA-directed DNA Methylation. In *PLoS Genetics* (Vol. 16, Issue 10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>
- Ferrández, C., Pelaz, S., & Yanofsky, M. F. (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 321–354. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.321>
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501–523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8449 LP – 8454. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8449>
- Gehring, M. (2013). Genomic imprinting: insights from plants. *Annual Review of Genetics*, 47, 187–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155527>
- Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), 947–956. <https://doi.org/10.1038/nrm2293>
- Gnan, S., Priest, A., & Kover, P. X. (2014). The genetic basis of natural variation in seed size and seed number and their trade-off using *Arabidopsis thaliana* magic lines. *Genetics*, 198(4), 1751–1758. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.170746>
- Godfray, H. C. J. (1995). Evolutionary theory of parent–offspring conflict. *Nature*, 376(6536), 133–138. <https://doi.org/10.1038/376133a0>
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J. P., Hoeppner, M. A., & Gagliano, W. B. (1998). Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5362), 446–450. <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.446>
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649), 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664>

- Helliwell, C. A., Robertson, M., Finnegan, E. J., Buzas, D. M., & Dennis, E. S. (2011). Vernalization-Repression of Arabidopsis FLC Requires Promoter Sequences but Not Antisense Transcripts. *PLOS ONE*, 6(6), e21513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021513>
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA. *Science*, 331(6013), 76 LP – 79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>
- Holdsworth, M. J., Bentsink, L., & Soppe, W. J. J. (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179(1), 33–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x>
- Hornyik, C., Duc, C., Rataj, K., Terzi, L. C., & Simpson, G. G. (2010). Alternative polyadenylation of antisense RNAs and flowering time control. *Biochemical Society Transactions*, 38(4), 1077–1081. <https://doi.org/10.1042/BST0381077>
- Horton, M. W., Hancock, A. M., Huang, Y. S., Toomajian, C., Atwell, S., Auton, A., Muliyati, N. W., Platt, A., Sperone, F. G., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Borevitz, J. O., & Bergelson, J. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature Genetics*, 44(2), 212–216. <https://doi.org/10.1038/ng.1042>
- Hsieh, T.-F., Shin, J., Uzawa, R., Silva, P., Cohen, S., Bauer, M. J., Hashimoto, M., Kirkbride, R. C., Harada, J. J., Zilberman, D., & Fischer, R. L. (2011). Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 1755–1762. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019273108>
- Huo, H., Wei, S., & Bradford, K. J. (2016). DELAY OF GERMINATION1(DOG1) regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(15), E2199 LP-E2206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600558113>
- Ikeda, Y., Kobayashi, Y., Yamaguchi, A., Abe, M., & Araki, T. (2007). Molecular basis of late-flowering phenotype caused by dominant epi-alleles of the FWA locus in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 48(2), 205–220. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl061>
- Imaiizumi, T., & Kay, S. A. (2006). Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science*, 11(11), 550–558. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.09.004>
- Iwasaki, M., Hyvärinen, L., Piskurewicz, U., & Lopez-Molina, L. (2019a). Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.37434>
- J. Marshall, D., & Uller, T. (2007). When is a maternal effect adaptive? *Oikos*, 116(12), 1957–1963. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x>
- Jiang, H., & Köhler, C. (2012). Evolution, function, and regulation of genomic imprinting in plant seed development. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4713–4722. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers145>
- Jullien, P. E., & Berger, F. (2009). Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.004>
- Kakutani, T. (1997). Genetic characterization of late-flowering traits induced by DNA hypomethylation mutation in *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Journal* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1447–1451). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12061447.x>
- Kendall, S. L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I. A., & Penfield, S. (2011). Induction of Dormancy in *Arabidopsis* Summer Annuals Requires Parallel Regulation of DOG1 and Hormone Metabolism by Low Temperature and CBF Transcription Factors. *The Plant Cell Online*, tpc.111.087643. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087643>
- Kerdaffrec, E., & Nordborg, M. (2017). The maternal environment interacts with genetic variation in regulating seed dormancy in Swedish *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 12(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190242>

BIBLIOGRAFÍA

- Kinoshita, T., Yadegari, R., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (1999). Imprinting of the MEDEA polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm. *The Plant Cell*, 11(10), 1945–1952. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.10.1945>
- Kinoshita, Tetsu, Miura, A., Choi, Y., Kinoshita, Y., Cao, X., Jacobsen, S. E., Fischer, R. L., & Kakutani, T. (2004). One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), 521–523. <https://doi.org/10.1126/science.1089835>
- Kinoshita, Y., Saze, H., Kinoshita, T., Miura, A., Soppe, W. J. J. J., Koornneef, M., & Kakutani, T. (2007). Control of FWA gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. In *Plant Journal* (Vol. 49, Issue 1, pp. 38–45). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02936.x>
- Kirkbride, R. C., Lu, J., Zhang, C., Mosher, R. A., Baulcombe, D. C., & Jeffrey Chen, Z. (2019). Maternal small RNAs mediate spatial-temporal regulation of gene expression, imprinting, and seed development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(7), 2761–2766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807621116>
- Kirkpatrick, M., & Lande, R. (1989). THE EVOLUTION OF MATERNAL CHARACTERS. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 43(3), 485–503. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04247.x>
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., & van der Veen, J. H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *MGG Molecular & General Genetics*, 229(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF00264213>
- Kronholm, I., Picó, F. X., Alonso-blanco, C., Goudet, J., & Meaux, J. de. (2012). Genetic basis of adaptation in *Arabidopsis thaliana*: local adaptation at the seed dormancy QTL DOG1. *Evolution*, 2287–2302. <https://doi.org/10.5061/dryad.4rp76r87>
- Kuijper, B., & Johnstone, R. A. (2018). Maternal effects and parent–offspring conflict. *Evolution*, 72(2), 220–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/evo.13403>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews. Genetics*, 11(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lawesson, J. E. (2000). Baskin, C. C. & Baskin, J. M. 2001. Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. *Nordic Journal of Botany*, 20(5), 598. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2000.tb01610.x>
- Liu, S., de Jonge, J., Trejo-Arellano, M. S., Santos-González, J., Köhler, C., & Hennig, L. (2021). Role of H1 and DNA methylation in selective regulation of transposable elements during heat stress. *The New Phytologist*, 229(4), 2238–2250. <https://doi.org/10.1111/nph.17018>
- Lu, J. J., Tan, D. Y., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2017). Effect of seed position on parental plant on proportion of seeds produced with nondeep and intermediate physiological dormancy. *Frontiers in Plant Science*, 8(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00147>
- Lu, J., Zhang, C., Baulcombe, D. C., & Chen, Z. J. (2012). Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5529–5534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203094109>
- Luo, X., & He, Y. (2020). Experiencing winter for spring flowering: A molecular epigenetic perspective on vernalization. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 104–117. <https://doi.org/10.1111/jipb.12896>
- MacGregor, D. R., & Penfield, S. (2015). Exploring the pleiotropy of *hos1*. *Journal of Experimental Botany*, 66(6), 1661–1671. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv022>
- Matzke, M. A., & Birchler, J. A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews. Genetics*, 6(1), 24–35. <https://doi.org/10.1038/nrg1500>
- Matzke, M. A., Kanno, T., & Matzke, A. J. M. (2015). RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 243–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114633>

- Matzke, M. A., Kanno, T., Matzke, A. J. M., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Annual Review of Plant Biology*, 66(6), 394–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114633>
- Meng, Q.-J., Logunova, L., Maywood, E. S., Gallego, M., Lebiecki, J., Brown, T. M., Sládek, M., Semikhodskii, A. S., Glossop, N. R. J., Piggins, H. D., Chesham, J. E., Bechtold, D. A., Yoo, S.-H., Takahashi, J. S., Virshup, D. M., Boot-Handford, R. P., Hastings, M. H., & Loudon, A. S. I. (2008). Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*, 58(1), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.019>
- Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell*, 11(5), 949–956. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.949>
- Michaels, Scott D., Himmelblau, E., Sang, Y. K., Schomburg, F. M., & Amasino, R. M. (2005). Integration of flowering signals in Winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137(1), 149–156. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052811>
- Migicovsky, Z., & Kovalchuk, I. (2014). Transgenerational inheritance of epigenetic response to cold in *Arabidopsis thaliana*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.001>
- Mosher, R. A., Melnyk, C. W., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Studholme, D. J., & Baulcombe, D. C. (2009). Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature*, 460(7252), 283–286. <https://doi.org/10.1038/nature08084>
- Munguía-Rosas, M. A., Ollerton, J., Parra-Tabla, V., & De-Nova, J. A. (2011). Meta-analysis of phenotypic selection on flowering phenology suggests that early flowering plants are favoured. *Ecology Letters*, 14(5), 511–521. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01601.x>
- Murphrey, M., Kovach, K., Elnacash, T., He, H., Bentsink, L., & Donohue, K. (2015). DOG1-imposed dormancy mediates germination responses to temperature cues. *Environmental and Experimental Botany*, 112, 33–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.013>
- Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, 5, 233. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00233>
- Onodera, Y., Haag, J. R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., & Pikaard, C. S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, 120(5), 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.007>
- Palaniswamy, S. K., James, S., Sun, H., Lamb, R. S., Davuluri, R. v., & Grotewold, E. (2006). AGRIS and AtRegNet. a platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiology*, 140(3), 818–829. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072280>
- Panda, K., Ji, L., Neumann, D. A., Daron, J., Schmitz, R. J., & Slotkin, R. K. (2016). Full-length autonomous transposable elements are preferentially targeted by expression-dependent forms of RNA-directed DNA methylation. *Genome Biology*, 17(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1032-y>
- Parcy, F. (2005). Flowering: a time for integration. *The International Journal of Developmental Biology*, 49(5–6), 585–593. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041930fp>
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 27(17), R874–R878. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.050>
- Penfield, S., & Springthorpe, V. (2012). Understanding chilling responses in *Arabidopsis* seeds and their contribution to life history. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1586), 291–297. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0186>
- Penterman, J., Uzawa, R., & Fischer, R. L. (2007). Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145(4), 1549–1557. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107730>
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H., Ballinger, T., Henikoff, S., & Fischer, R. L. (2007). DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6752–6757. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701861104>

BIBLIOGRAFÍA

- Pigliucci, M., & Marlow, E. T. (2001). Differentiation for flowering time and phenotypic integration in *Arabidopsis thaliana* in response to season length and vernalization. *Oecologia*, 127(4), 501–508. <https://doi.org/10.1007/s004420000613>
- Pirola, M. J. (2018). PROYECTO FINAL DE INVESTIGACION GERMINACION Y FLORACIÓN DE ARABIDOPSIS THALIANA.
- Piskurewicz, U., Iwasaki, M., Susaki, D., Megies, C., Kinoshita, T., & Lopez-Molina, L. (2016). Dormancy-specific imprinting underlies maternal inheritance of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 5, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.19573>
- Prizak, R., Ezard, T. H. G., & Hoyle, R. B. (2014). Fitness consequences of maternal and grandmaternal effects. *Ecology and Evolution*, 4(15), 3139–3145. <https://doi.org/10.1002/ece3.1150>
- Questa, J. I., Antoniou-Kourounioti, R. L., Rosa, S., Li, P., Duncan, S., Whittaker, C., Howard, M., & Dean, C. (2020). Noncoding SNPs influence a distinct phase of Polycomb silencing to destabilize long-term epigenetic memory at *Arabidopsis* FLC. *Genes & Development*, 34(5–6), 446–461. <https://doi.org/10.1101/gad.333245.119>
- Raissig, M. T., Baroux, C., & Grossniklaus, U. (2011). Regulation and flexibility of genomic imprinting during seed development. *Plant Cell*, 23(1), 16–26. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081018>
- Rangwala, S. H., & Richards, E. J. (2004). The value-added genome: building and maintaining genomic cytosine methylation landscapes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(6), 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.09.009>
- Ratikainen, I. I., Haaland, T. R., & Wright, J. (2018). Differential allocation of parental investment and the trade-off between size and number of offspring. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1884). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1074>
- Richards, E. J., & Elgin, S. C. R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4), 489–500. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00644-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00644-x)
- Roach, D. A., & Wulff, R. D. (1987). MATERNAL EFFECTS IN PLANTS. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 209–235. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001233>
- Rose, M. R., & Mueller, L. D. (1993). Stearns, Stephen C., 1992. The Evolution of Life Histories. Oxford University Press, London xii + 249 pp., £16.95. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(2), 304–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1993.6020304.x>
- Rowley, M. J., Rothi, M. H., Böhmdorfer, G., Kuciński, J., & Wierzbicki, A. T. (2017). Long-range control of gene expression via RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genetics*, 13(5), e1006749. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006749>
- Royle, J. A., Chandler, R. B., Yackulic, C., & Nichols, J. D. (2012). Likelihood analysis of species occurrence probability from presence-only data for modelling species distributions. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 545–554. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00182.x>
- Samach, A., Onouchi, H., Ditta, G., Schwarz-Sommer, Z. S., Yanofsky, M., & Coupland, G. (2000). Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, 288, 1613–1616. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1613>
- Schmuths, H., Bachmann, K., Weber, W. E., Horres, R., & Hoffmann, M. H. (2006). Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 97(4), 623–634. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl012>
- Scott, R J, Spielman, M., Bailey, J., & Dickinson, H. G. (1998). Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 125(17), 3329–3341.
- Scott, Rod J, & Spielman, M. (2004). Epigenetics: imprinting in plants and mammals--the same but different? *Current Biology : CB*, 14(5), R201-3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.022>

- Seo, E., Lee, H., Jeon, J., Park, H., Kim, J., Noh, Y.-S., & 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063883>
- Shaanker, R. U., Ganeshiah, K. N., & Bawa, K. S. (1988). PARENT-OFFSPRING CONFLICT, SIBLING RIVALRY, AND BROOD SIZE PATTERNS IN PLANTS. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1), 177–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.001141>
- Sheldon, C. C., Rouse, D. T., Finnegan, E. J., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2000). The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3753–3758. <https://doi.org/10.1073/pnas.060023597>
- Simpson, G. G., & Dean, C. (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta Stone of Flowering Time? *Science*, 296(5566), 285 LP – 289. <https://doi.org/10.1126/science.296.5566.285>
- Slotkin, R. K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdžić, M., Becker, J. D., Feijó, J. A., & Martienssen, R. A. (2009). Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*, 136(3), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.038>
- Soppe, W. J. J. J., Jacobsen, S. E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J. P., Kakutani, T., Koornneef, M., & Peeters, A. J. M. M. (2000). The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Molecular Cell*, 6(4), 791–802. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(05\)00090-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(05)00090-0)
- Springthorpe, V., & Penfield, S. (2015). Flowering time and seed dormancy control use external coincidence to generate life history strategy. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05557>
- Sridhar, V. v, Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., & Zhu, J.-K. (2007). Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*, 447(7145), 735–738. <https://doi.org/10.1038/nature05864>
- Stroud, H., Greenberg, M. V. C., Feng, S., Bernatavichute, Y. v, & Jacobsen, S. E. (2013). Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell*, 152(1–2), 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.054>
- Sung, S., & Amasino, R. M. (2004). Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.11.010>
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., & Dean, C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 462(7274), 799–802. <https://doi.org/10.1038/nature08618>
- Tanigawa, Y., Tsuchiya, M., Imai, Y., & Shimoyama, M. (1984). ADP-ribosyltransferase from hen liver nuclei. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 2022–2029.
- Treviño, L. S., Wang, Q., & Walker, C. L. (2015). Phosphorylation of epigenetic “readers, writers and erasers”: Implications for developmental reprogramming and the epigenetic basis for health and disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(1–2), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.013>
- Turesson, G. (1922). The species and variety as ecological units. *Hereditas III*.
- Uller, T. (2008). Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(8), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.005>
- Vayda, K., Donohue, K., & Auge, G. A. (2018). Within- and trans-generational plasticity: Seed germination responses to light quantity and quality. *AoB PLANTS*, 10(3). <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply023>
- Vielle-Calzada, J. P., Thomas, J., Spillane, C., Coluccio, A., Hoeppner, M. A., & Grossniklaus, U. (1999). Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis* medea locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes & Development*, 13(22), 2971–2982. <https://doi.org/10.1101/gad.13.22.2971>
- Weidner, M., Franz, A., & Napp-Zinn, K. (1985). Plastid ultrastructure and photosynthesis in greening petaloid hypsophylls. *Planta*, 163(2), 164–174. <https://doi.org/10.1007/BF00393502>

BIBLIOGRAFÍA

- Whittaker, C., & Dean, C. (2017). The FLC Locus: A Platform for Discoveries in Epigenetics and Adaptation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, 555–575. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060546>
- Xiao, W., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (2006). Regulation of Seed Size by Hypomethylation of Maternal and Paternal Genomes. *Plant Physiology*, 142(3), 1160 LP – 1168. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088849>
- Xiao, W., Gehring, M., Choi, Y., Margossian, L., Pu, H., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Pennell, R. I., & Fischer, R. L. (2003). Imprinting of the MEA Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Developmental Cell*, 5(6), 891–901. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00361-7)
- Xu, M., Hu, T., Smith, M. R., & Poethig, R. S. (2016). Epigenetic Regulation of Vegetative Phase Change in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(1), 28 LP – 41. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00854>
- Yaish, M. W., Colasanti, J., & Rothstein, S. J. (2011). The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3727–3735. <https://doi.org/10.1093/jxb/err177>
- Yamamichi, M., & Hoso, M. (2017). Roles of maternal effects in maintaining genetic variation: Maternal storage effect. *Evolution*, 71(2), 449–457. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/evo.13118](https://doi.org/10.1111/evo.13118)
- Yan, J., Chia, J.-C., Sheng, H., Jung, H., Zavodna, T.-O., Zhang, L., Huang, R., Jiao, C., Craft, E. J., Fei, Z., Kochian, L. v., & Vatamaniuk, O. K. (2017). Arabidopsis Pollen Fertility Requires the Transcription Factors CTF1 and SPL7 That Regulate Copper Delivery to Anthers and Jasmonic Acid Synthesis. *The Plant Cell*, 29(12), 3012 LP – 3029. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00363>
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W. L. L., Chen, H., Henderson, I. R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E., & Ecker, J. R. R. R. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell*, 126(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.003>
- Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15(18), 2343–2360. <https://doi.org/10.1101/gad.927301>
- Zografos, B., & Sung, S. (2012). Vernalization-mediated chromatin changes. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4343–4348. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers157>

Apéndice

A.1. Información de las plantas mutantes utilizadas

Se utilizaron mutantes del mecanismo de metilación de ADN mediado por ARN (RdDM). Dicho mecanismo cuenta con dos posibles vías, la canónica mediada por Pol-IV y RDR2, y la no canónica mediada por Pol-II y RDR6 (Figura 1.3.2.1). Las mutantes utilizadas se detallan a continuación:

- *rdr2 (sail_1277_HO8)*: Es una mutante deficiente en RDR2 (ARN Polimerasa 2 dependiente de ARN) por lo que los transcriptos obtenidos por Pol-IV no pueden ser convertidos en ARN doble cadena. Se bloquea la vía canónica de RdDM (Xie et al., 2004).
- *rdr6-11*: Es una mutante deficiente en RDR6 (ARN Polimerasa 6 Dependiente de ARN) por lo que los transcriptos obtenidos por Pol-II y cortados por AGO1/7 no pueden ser convertidos en ARN doble cadena. Se bloquea la vía no canónica de RdDM (Miki et al., 2017).
- *dcl234 (dcl2-1 dcl3-1 dcl3-2)*: Es una triple mutante deficiente en DCL2, DCL3, y DCL4 (proteínas de la familia Dicer Like). La función de estas proteínas es procesar el ARN convirtiéndolo en pequeños ARN de 21-24 nucleótidos, por lo que esta triple mutante carece de la actividad de estas proteínas. Sin embargo, la vía no canónica cuenta con DCL1 (proteína de la misma familia) por lo que se ve bloqueada la vía canónica por completo y la vía no canónica parcialmente (Xie et al., 2004; Miki et al., 2017; Tang et al., 2019).
- *ago4-1*: Es una mutante deficiente en AGO4 (Argonauta 4) por lo que los siRNAs no se pueden incluir en ella, y los transcriptos sintetizados por Pol-V no logran ser identificados como regiones target para la metilación de novo. Sin embargo, tanto la vía canónica como no canónica cuentan con la presencia de AGO6 (Argonauta 6) que cumple la misma función que AGO4, por lo que ambas vías se encuentran parcialmente reprimidas (Kirkbride et al., 2019)
- *nrp2a*: Es una mutante deficiente en una subunidad catalítica de Pol-IV y Pol-V, *nrp2a* (Subunidad 2 de las RNA Polimerasas IV y V dirigidas por DNA) por lo que se ven interrumpidas las vías canónica y no canónica de RdDM debido a que se encuentra bloqueada la actividad tanto de Pol-IV, lo que impide la transcripción de los ARN en la vía canónica, como de Pol-V, lo que impide la producción de metilación de novo del ARN bloqueando ambas vías (Le et al., 2014).
- *rdd (ros1-3; dml2-1; dml3-1)*: Es una triple mutante de ADN demetilasas (ROS1, DML2, DML3). Esta mutante presenta un estado de hipermetilación ya que el equilibrio entre metilación/demetilación se encuentra desbalanceado por la deficiencia en las demetilasas mencionadas (Zhu et al., 2018; Schumann et al., 2017).

A.2. Correlación entre tiempos - ensayos de germinación

Matriz de correlación entre la proporción de germinación a distintos días desde la incubación de semillas para todos los genotipos provenientes de ambos tratamientos (vernalización y no vernalización).

Se puede ver que entre menor diferencia de tiempos hay mayor correlación, indicando menor variación en la proporción de germinación. Sumado a esto, entre el día 7 desde la incubación de las semillas hasta el día 9, el coeficiente de correlación es igual a 1 indicando que la variabilidad entre estos días no aporta nueva información.

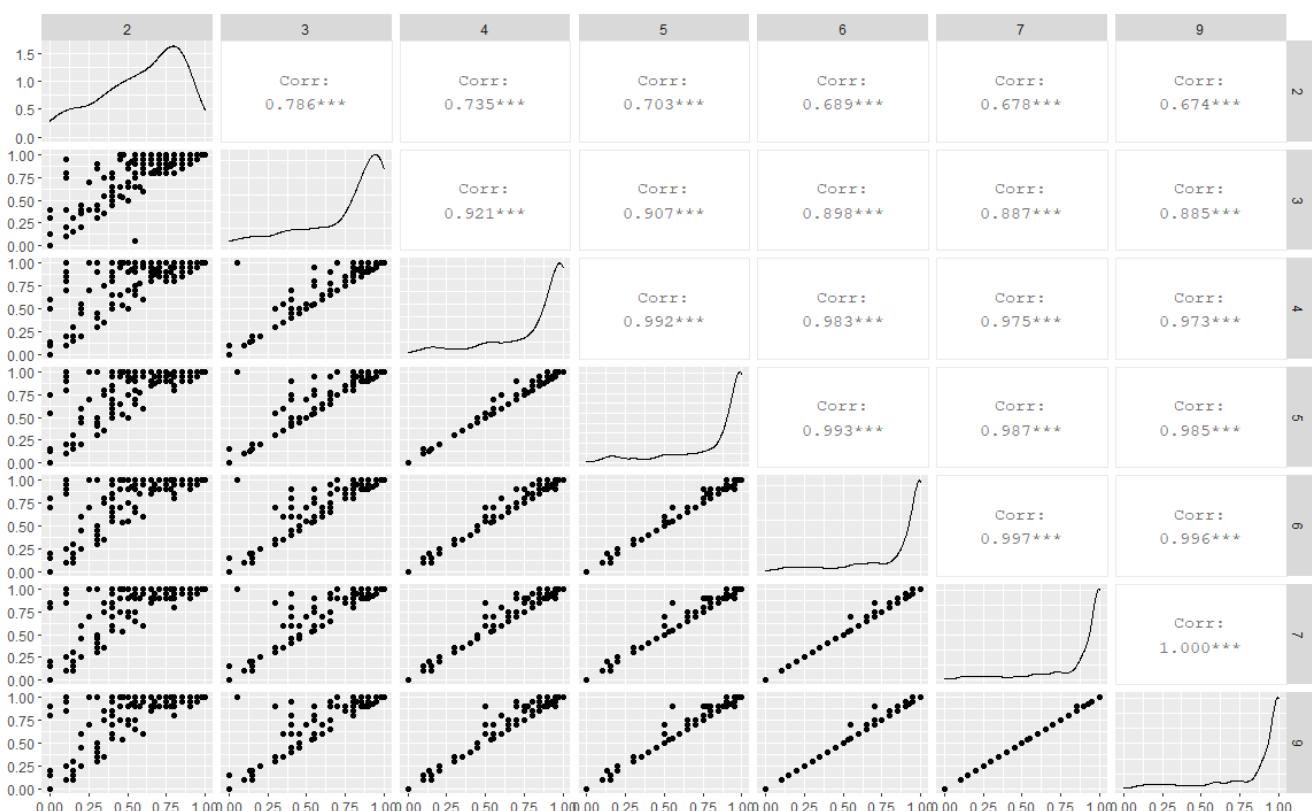


Figura A.2.1: Matriz de correlación de la proporción de germinación entre días desde la incubación de las semillas para el ensayo de germinación. En la línea horizontal se observa la dispersión de los valores observados para cada uno de los días, por la izquierda y por debajo de la horizontal se ve el gráfico de correlación de las observaciones entre los días correspondientes a la columna y la fila. Por encima y por la derecha de la horizontal se observan los coeficientes de correlación de entre el día correspondiente a la columna y el día correspondiente a la fila, todos son significativamente distintos a 0 (***).

A.3. Tabla con análisis estadístico del ensayo de Dormición secundaria

En las siguientes tablas se observan desglosados los valores del estadístico P obtenidos mediante el método de Tukey: (A.3.1) entre tratamientos para un dado genotipo y cada uno de los días de incubación en calor, en este caso se contrasta para todas las combinaciones de genotipos y días de incubación entre no vernalización y vernalización; (A.3.2) entre genotipos para un dado tratamiento y cada uno de los días de incubación en calor, estos contrastes se hacen para todos los genotipos respecto a Col-0; (A.3.3) entre días de incubación a 35°C para cada uno de los genotipos y cada uno de los tratamientos.

A.3.1. Contrastes para cada genotipo, en cada tratamiento, entre días de incubación

En la tabla A.3.1.1 se observan los contrastes entre días de incubación para un dado genotipo y tratamiento de no vernalización para los datos obtenidos a partir del ensayo de dormición secundaria.

Tratamiento	Genotipo	Contraste de incubación	P-valor
NV	Col0	0 - 2	0
		0 - 5	0
		2 - 5	0.999
	rdr2	0 - 2	0
		0 - 5	0
		2 - 5	1
	rdr6	0 - 2	0
		0 - 5	0
		2 - 5	0.999
	dcl234	0 - 2	0
		0 - 5	0
		2 - 5	0.118
	ago4	0 - 2	0
		0 - 5	0
		2 - 5	0.698
	nrpd2a	0 - 2	0.0001
		0 - 5	1.677 x 10 ⁻⁷
		2 - 5	0.431
	rdd	0 - 2	7.004 x 10 ⁻⁷
		0 - 5	4.349 x 10 ⁻⁹
		2 - 5	0.206

Tabla A.3.1.1: Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada a los distintos días de incubación a 35°C para semillas de cada uno de los genotipos provenientes de plantas madre crecidas bajo condiciones de **no vernalización** (NV). En la tercera columna desde la izquierda se indica el contraste realizado y en la cuarta fila se indica el P-valor obtenido a partir de poner a prueba que la diferencia entre las observaciones contrastadas es igual a 0. Aquellas comparaciones cuya diferencia difiere significativamente de 0 fueron resaltadas en amarillo.

APÉNDICE

En la tabla A.3.1.2 se observan los contrastes entre días de incubación para un dado genotipo y tratamiento de vernalización para los datos obtenidos a partir del ensayo de dormición secundaria.

Tratamiento	Genotipo	Contraste de incubación	P-valor
V	Col0	0 - 2	0.4834
		0 - 5	1
		2 - 5	1
	rdr2	0 - 2	0.0380
		0 - 5	0.0107
		2 - 5	1
	rdr6	0 - 2	0.9801
		0 - 5	0.0164
		2 - 5	0.720
	dcl234	0 - 2	0.168
		0 - 5	2.592 × 10 ⁻⁸
		2 - 5	0.007
	ago4	0 - 2	1
		0 - 5	2.186 × 10 ⁻⁶
		2 - 5	0.664
	nrpd2a	0 - 2	0.999
		0 - 5	0.276
		2 - 5	0.801
	rdd	0 - 2	1
		0 - 5	0.001
		2 - 5	2.986 × 10 ⁻⁴

Tabla A.3.1.2: Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada a los distintos días de incubación a 35°C para semillas de cada uno de los genotipos provenientes de plantas madre crecidas bajo condiciones de vernalización (V). En la tercera columna desde la izquierda se indica el contraste realizado y en la cuarta fila se indica el P-valor obtenido a partir de poner a prueba que la diferencia entre las observaciones contrastadas es igual a 0. Aquellas comparaciones cuya diferencia difiere significativamente de 0 fueron resaltadas en amarillo.

A.3.2. Contrastes para cada genotipo, V respecto a NV

En la tabla A.3.2.1 se observan los contrastes entre tratamientos para un dado genotipo para los datos obtenidos a partir del ensayo de dormición secundaria.

Genotipo	Día de incubación	Contraste de tratamientos	P-valor
Col-0	0	NV - V	1
	2	NV - V	0.957
	5	NV - V	0.857
rdr2	0	NV - V	1
	2	NV - V	0.343
	5	NV - V	0.999
rdr6	0	NV - V	0.999
	2	NV - V	0.874
	5	NV - V	0.999
dcl234	0	NV - V	0.922
	2	NV - V	0.700
	5	NV - V	0.808
ago4	0	NV - V	1
	2	NV - V	1.023×10^{-4}
	5	NV - V	0.001
nrpd2a	0	NV - V	0.489
	2	NV - V	1
	5	NV - V	0.972
rdd	0	NV - V	0.001
	2	NV - V	0.945
	5	NV - V	0.148

Tabla A.3.2.1: Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada en semillas provenientes de distintos tratamientos maternos para cada uno de los genotipos y días de incubación a 35°C. En la tercera columna desde la izquierda se indica el contraste realizado y en la cuarta fila se indica el P-valor obtenido a partir de poner a prueba que la diferencia entre las observaciones contrastadas es igual a 0. Aquellas comparaciones cuya diferencia difiere significativamente de 0 fueron resaltadas en amarillo.

A.3.3. Contrastes respecto a Col-0

En la tabla A.3.3.1 se observan los contrastes entre genotipos para un dado tratamiento para los datos obtenidos a partir del ensayo de dormición secundaria.

Tratamiento	Día de incubación	Contraste de genotipos	P-valor
NV	0	Col0 - rdr2	1
		Col0 - rdr6	0.975
		Col0 - dcl234	1
		Col0 - ago4	1
		Col0 - nrpd2a	1
		Col0 - rdd	1
	2	Col0 - rdr2	1
		Col0 - rdr6	1
		Col0 - dcl234	1
		Col0 - ago4	0.997
		Col0 - nrpd2a	0.996
		Col0 - rdd	0.998
	5	Col0 - rdr2	1
		Col0 - rdr6	1
		Col0 - dcl234	0.957
		Col0 - ago4	0.888
		Col0 - nrpd2a	1
		Col0 - rdd	1
V	0	Col0 - rdr2	1
		Col0 - rdr6	1
		Col0 - dcl234	1
		Col0 - ago4	1
		Col0 - nrpd2a	0.892
		Col0 - rdd	0.040
	2	Col0 - rdr2	1
		Col0 - rdr6	1
		Col0 - dcl234	1
		Col0 - ago4	1
		Col0 - nrpd2a	0.996
		Col0 - rdd	0.753
	5	Col0 - rdr2	1
		Col0 - rdr6	1
		Col0 - dcl234	0.951
		Col0 - ago4	1
		Col0 - nrpd2a	0.436
		Col0 - rdd	0.002

Tabla A.3.2.1: Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada en semillas mutantes para el mecanismo RdDM respecto a wild type para cada tratamiento materno y días de incubación a 35°C. En la tercera columna desde la izquierda se indica el contraste realizado y en la cuarta fila se indica el P-valor obtenido a partir de poner a prueba que la diferencia entre las observaciones contrastadas es igual a 0. Aquellas comparaciones cuya diferencia difiere significativamente de 0 fueron resaltadas en amarillo.

A.4. Correlación entre los datos para ambos tratamientos

En la siguiente figura se observa la correlación entre los caracteres analizados pero separada entre tratamientos con el fin de observar si la correlación entre los distintos fenotipos depende del tratamiento materno.

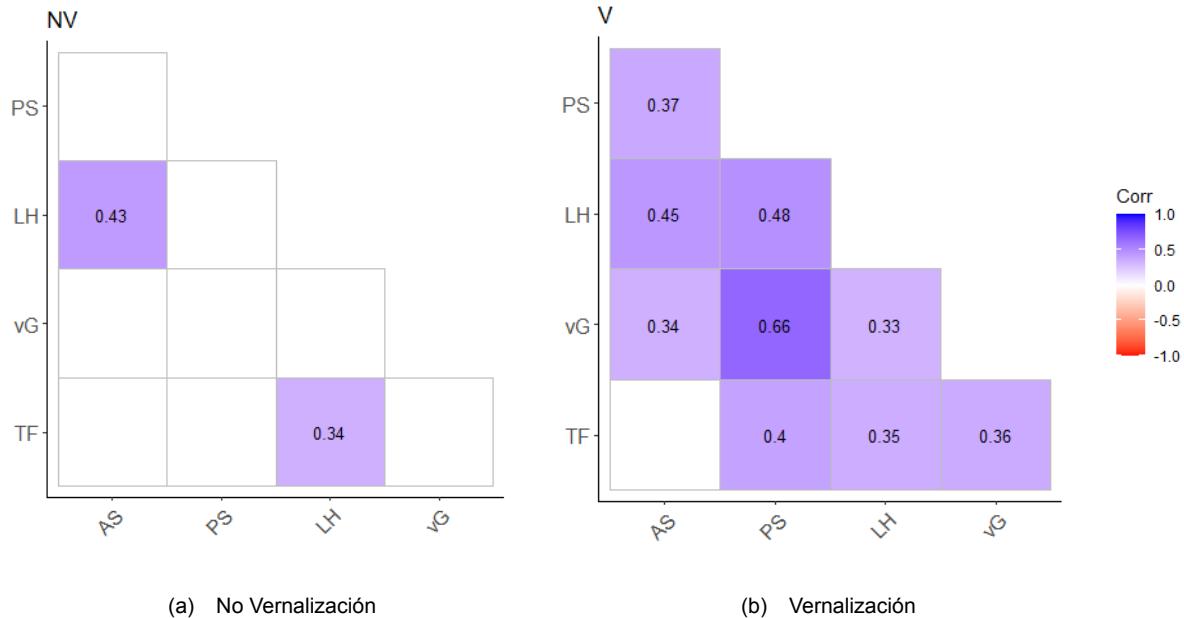


Figura A.4.1. Correlación entre las características analizadas para el tratamiento control (a) y tratamiento vernalización (b)

Firmas



Firma Autora

María Clara Fontana

Aclaración



Firma Directora

Gabriela Auge

Aclaración