



**Tesis de grado para optar por el título de Ingeniero en
Agrobiotecnologías.**

UNSAM-INTA

**“Mecanismos asociados a los efectos transgeneracionales en
Arabidopsis thaliana”**

Franco Gomez Rodriguez

Directora: Dra. Gabriela Auge

Laboratorio de Memoria Ambiental en Plantas

Instituto de Agrobiotecnologías y Biología Molecular

INTA Castelar

Universidad Nacional de San Martín

Marzo, 2025

"Las plantas nos enseñan que la vida es cooperación y adaptación, no sólo
competencia".

Franco Gomez Rodriguez

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 temperatura y la vernalización (período de frío prolongado que indica el paso del invierno) afectan 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 están sujetas a 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 particular para la floración, el mutante *gigantea suppressor5* (*gis-5*), es termosensible y acelera la transición del estadio vegetativo al reproductivo. A 18°C, las plantas mutantes no presentan un fenotipo evidente, pero a 23°C presentan hojas curvadas y a 28°C no completan su ciclo de vida. Esta respuesta a la temperatura se asoció a una sustitución A707V en la subunidad catalítica de la ADN polimerasa Polδ, codificada por *POLD1*. Además, *gis-5* muestra elevada expresión ectópica de genes marcadores de estrés de replicación del ADN, junto con una mayor recombinación homóloga, determinando el fenotipo temprano de floración.

La regulación transgeneracional de la plasticidad fenotípica tiene un componente genético y epigenético, por lo que la mutante *gis-5* resulta de interés por su termosensibilidad como elemento en el mecanismo complejo de los efectos transgeneracionales de la temperatura. En este contexto, evaluamos el impacto de la temperatura materna en la progenie mediante tratamientos térmicos diferenciados (18°C y 23°C) y combinaciones de estas temperaturas en distintas fases del desarrollo en la mutante *gis-5* comparada con la accesión salvaje Columbia-0 (*Col-0*). Nuestros resultados indican que la mutante afecta la respuesta de germinación independientemente de la temperatura de incubación y esto sería debido a una menor sensibilidad al ácido abscísico (ABA). Además, la mutante inhibe la entrada a dormición secundaria por estratificación por calor. Las plantas *gis-5* no produjeron semillas cuando se crecieron a 23°C durante todo su ciclo de vida; sin embargo, esta restricción se revierte al reducir la temperatura pre- o post-floración a 18°C. Las semillas de la mutante *gis-5* muestran una menor respuesta al ambiente materno: mientras que las semillas de plantas *Col-0* tienen mayor dormición cuando las plantas madres fueron crecidas a bajas temperaturas, para las mutantes se observó una proporción superior de germinación. Para entender el efecto del ambiente en la falta de producción de semillas en la mutante *gis-5* a 23°C, analizamos la morfología de las flores de la mutante observando ausencia de polen. Luego se realizaron cruzamientos

dirigidos con Col-0, generando híbridos *GIS-5/gis-5* (♂/♀) y analizamos la germinación de la progenie heterocigota. Observamos que las semillas híbridas presentan fenotipos similares a Col-0, confirmando que la infertilidad de *gis-5* a 23°C no se debe a abortos de semillas o incompatibilidad gamética, sino a la ausencia de producción de polen en estas condiciones.

Nuestros resultados indican que el gen *GIS-5* contribuye a la respuesta de germinación en *Arabidopsis thaliana* y sería un elemento en el intrincado mecanismo de regulación transgeneracional de las respuestas tempranas de la progenie a la temperatura de las plantas madre.

Abstract

Plants are capable of perceiving and responding to environmental changes that occur during their life cycles and those of previous generations, developing strategies to adapt to them and increase the survival success of offspring. Understanding these transgenerational responses and their underlying mechanisms is key to comprehending the adjustment of life cycles to climate change.

In *Arabidopsis thaliana*, temperature and vernalization, a period of prolonged cold that indicates the passage of winter, affect the flowering time of mother plants and the seed germination of offspring. Both developmental transitions are under strong selection pressure and are subject to fine regulation, as they are key to adjusting plant growth stages to optimal conditions that ensure their survival. Thus, transgenerational effects can affect ecological and evolutionary processes.

Particularly for flowering, the *gigantea suppressor5* (*gis-5*) mutant is temperature-sensitive and accelerates the transition from the vegetative to the reproductive stage. At 18°C, the mutant plants do not show an evident phenotype, but at 23°C they show curved leaves and at 28°C they do not complete their life cycle. This temperature response was associated with an A707V substitution in the catalytic subunit of the Pol δ DNA polymerase, encoded by *POLD1*. In addition, *gis-5* shows high ectopic expression of DNA replication stress marker genes, along with increased homologous recombination, determining the early flowering phenotype.

The transgenerational regulation of phenotypic plasticity has a genetic and epigenetic component, so the *gis-5* mutant is of interest due to its temperature sensitivity as an element in the complex mechanism of temperature transgenerational effects. In this context, we evaluated the impact of maternal temperature on offspring through differentiated thermal treatments (18°C and 23°C) and combinations of these temperatures in different development phases in the *gis-5* mutant compared to the Columbia-0 (Col-0) wild accession. Our results indicate that the mutant affects the germination response regardless of the incubation temperature, and this would be due to a lower sensitivity to abscisic acid (ABA). Furthermore, the mutant inhibits entry into secondary dormancy by heat stratification. Mutant *gis-5* plants did not produce seeds when grown at 23°C throughout their life cycle; however, this restriction is reversed by reducing the post-flowering temperature to 18°C. The *gis-5* mutant seeds show a lower response to the maternal environment, while Col-0 plant seeds have greater dormancy when mother plants were grown at low temperatures, for mutants a higher germination proportion was observed.

To understand the effect of the environment on the lack of seed production in the *gis-5* mutant at 23°C, we analyzed the flower morphology of the mutant, observing the absence of pollen. Then, directed crosses with Col-0 were performed, generating *GIS-*

5/*gis-5* (♂/♀) hybrids, and we analyzed the germination of the heterozygous offspring. We observed that hybrid seeds show similar phenotypes to Col-0, confirming that *gis-5* infertility at 23°C is not due to seed abortions or gametic incompatibility, but to the absence of pollen production under these conditions.

Our results indicate that the *GIS-5* gene contributes to the germination response in *Arabidopsis thaliana* and would be an element in the intricate mechanism of transgenerational regulation of early offspring responses to mother plant temperature.

Agradecimientos

En primer lugar, a mi directora, la Dra. Gabriela Auge. Por la paciencia, dedicación y amor que pusiste en cada uno de los experimentos que “largábamos”. Hace un año y medio atrás, me encontraba en una habitación de residencia en Chascomús, solo, pensando lo complicado que iba a ser que un laboratorio se “fijara en mí” y me diera la oportunidad de terminar mi trabajo final para recibirme. Y ahí apareciste vos, con tu publicación en Twitter buscando pasantes. Y mi *quasi* maldición al no obtener respuesta breve de tu parte jaja. Y acá estamos, llegamos. Nunca voy a olvidar la oportunidad que me diste de poder ser el biotecnólogo que muchas veces sentí que estaba dejando de ser.

A los Dres. Francisco Iglesias y Pablo Cerdán, mi más sincero agradecimiento por la generosa provisión de las semillas *gis-5* y la invaluable información que hicieron posible la realización de esta tesis.

A las Dras. Victoria Alfonso, Gabriela Tranquilli y Silvina Mangano. Victoria y Gabriela, por haberme abierto la puerta en sus laboratorios para capacitarme y formarme en Biología Molecular, aún antes de tenerlas como docentes en la carrera. Y a vos, Silvina, por introducirme en este mundo tan sensacional que son las plantas. Muchísimas gracias por la paciencia que me tuvieron el tiempo que trabajamos juntos.

A Marina Di Filippo, con quien terminé mi última materia de la carrera, y te encargaste de que ese día fuera inolvidable para mí y los chicos del curso. Me acercaste por primera vez al mundo de la agronomía que no conocía muy bien. Hoy día tengo mi huerta en casa gracias a vos. Muchas gracias por las palabras tan lindas que siempre tuviste conmigo, por haberme permitido presentar mi proyecto de Tesis en la materia, y por haber hecho hasta lo imposible para que pueda trabajar en tu grupo. Gracias por ser hoy mi Jurado de Tesis.

A las Dras. María José Diéguez y Paula Fernández. Muchas gracias por haber aceptado ser hoy jurado de mi tesis, y por haberme acompañado durante este último tiempo en el Instituto. Súper agradecido de haber aprendido con ustedes las aplicaciones biotecnológicas a la agricultura.

Al Dr. Jorge Moriconi, mi consejero de estudio y docente de Biología Vegetal. Tu apoyo y confianza fueron fundamentales para mi crecimiento académico y personal. Gracias por ayudarme a creer en mí mismo.

A Valeria Magdalena. Vale, creo que sin vos nada hubiera sido lo mismo. Estuviste con nosotros desde esos primeros correos consultando sobre la carrera hasta hacer lo imposible para arreglar cualquier tipo de trámite que necesitábamos. Profundamente agradecido.

A mis colegas y amigos de la carrera, Sofía Sánchez, Job Sosa y Agustín Bosio Guaraz. ¿Qué decirles, locura? Siempre van a estar en mi corazón y en esa felicidad que me

agarra cada vez que me acuerdo de las “macanas” que nos mandábamos jaja. Que nunca falten “bostezos y cortauñas” cuando nada vaya saliendo bien jaja.

A mis incondicionales de la carrera, Nehuén González del Río y Paula Chung. Por esas cosas de la vida, no pudimos terminar juntos, pero sepan que me dejaron una parte tan linda de ustedes como creo haberles dejado yo también una. Anhele un día que nos volvámos a encontrar y estar horas y horas delirando, como cuando sentíamos que no íbamos a aprobar un parcial. Los amo con mi alma y más.

A mi compa y amigo de fernet, Jonatán Wamba. Desde el primer momento supe que íbamos a ser amigos. Fuiste la única persona que logró hacer que me quedara en Chascomús y, de alguna manera, hasta llegar a disfrutarlo. Entre nuestras tardes-noches de escabeada y las salidas a Almas Bar , me quedan recuerdos que todavía me sacan una sonrisa. Gracias por haberme permitido ser tu amigo, por cada charla, cada risa y cada delirio compartido. Ojalá la vida nos siga encontrando así, sin importar en que parte nos encontremos cada uno.

A las nuevas personitas que conocí este año, gracias a ese mundo que dejé rezagado durante mucho tiempo en mi vida: la Filosofía. Celeste González, Iván Castillo y Yamila Roa. Gracias por haber sido este pilar tan importante durante este año en mi vida. Sin ustedes, no sé qué hubiera sido de mí. Me bancaron, me hicieron reír, se fumaron mis ataques de ira y de llanto. Siempre desde el amor. Me abrieron la puerta de su vida. Siempre voy a estar agradecido con ustedes tres.

A mi amiga Maira Ruiz, con quien tuve el placer de reencontrarme nuevamente en pandemia, y desde entonces nunca más dejamos de ser amigos. Gracias por cada momento compartido, por nuestras juntadas de charlas, de llanto y de apoyo incondicional. Gracias por haber estado el día que terminé la carrera, porque fue uno de esos momentos que jamás en mi vida olvidaré.

A vos, Rosaneldo. Leandro Coronel. Desde esa tarde que te conocí en 2018, supe que íbamos a ser grandes amigos. Cuando yo no tenía un peso y vos me ofreciste tu café en saquito que siempre tenías. Nunca me dejaste solo, siempre ahí alentándome. Horas y horas de charlas, de ver qué podíamos hacer y darnos ese apoyo que necesitábamos para no bajar los brazos e intentar seguir haciendo “ciencia” desde el lugar que nos tocaba.

A Daniela González, mi Guapetona. 26 años de amistad incondicional. Cada evento que nos pasaba, por algo de la vida, estábamos sincronizados jaja. Te adoro un montón y deseo que te pasen cosas súper hermosas porque te lo mereces. Las personas bendecidas brillamos hasta con el alma rota.

A mis amigas del secundario, Carla Miño y Daiana Raffo. Pensar que teníamos 15 años cuando nos conocimos, y acá seguimos, amigos como el primer día. Mirar atrás y ver todo lo que vivimos, todo lo que superamos, y saber que cada una de esas cosas nos trajo hasta aquí. Ahora cada uno con su vida, pero siempre con ese mensaje de aliento o ese: ¿Estás para un fernet? Muchas gracias por haberme acompañado durante todos estos años.

A mis hermanos, Flavia, Sebastián y Paula. Por acompañarme en este largo viaje llamado vida. En todos estos años, tuvimos algún que otro altibajo, pero siempre nos acompañó el amor y la hermandad.

A vos, mi amor, Naza, mi Naza. Me llevó mucho tiempo soltarte y aceptar que ya no estás y no vas a volver. Siempre flasheábamos que, cuando me recibía, nos íbamos a casar. Que ahí sí íbamos a tener plata. Y heme aquí, vos te tuviste que ir antes, porque así la vida lo quiso, y yo sigo sin plata todavía. Te amo un montón, mi gordo hermoso, y sé que en la otra vida nos vamos a estar esperando.

Y finalmente, a la persona más importante de todas: mi mamá. Má, no sé ni siquiera por dónde arrancar a agradecerte. Son tantas, pero tantas las cosas que hiciste por mí. Estoy súper agradecido con la vida de que me haya llevado a conocer este camino de Agronomía y compartir todos esos saberes que vos tuviste naciendo en el campo. No te dieron la posibilidad de escolarizarte, sufriste explotación laboral infantil, violencia física por parte de la persona que debería haber cumplido su rol de “padre” con nosotros; y, aun así, vos nunca bajaste los brazos. Todos los días, ahí vos con tu bicicleta. Llueva, haga calor, se venga el mundo abajo, siempre trabajando para que a nosotros no nos falte nada. Fuiste y sos ese pilar tan importante que necesité en mi vida. No hubiera sido lo mismo si vos no hubieras sido mi mamá. Te amo con el alma y no me va a alcanzar esta vida para agradecerte.

Espero no haberme olvidado de nadie. Y si así lo hice, sepan disculpar. Estoy muy emocionado (y llorando) al escribir este fragmento. No pensé que iba a llegar el día. Lo venía soñando desde que era muy chico, y acá estamos.

Confíen en ustedes y sepan que todo llega. Y que, como dice la frase: “Lo imposible solo tarda un poco más”.

Espero que disfruten de leer mi tesis. Dejé el alma durante la duración de toda mi carrera.

Índice General

Contenido

Tabla de contenido

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Agradecimientos.....	7
Índice General	10
1. Introducción	12
1.1. <i>Modelo de estudio: Arabidopsis thaliana</i>	12
1.1.1. Dormición de semillas: Regulación y Adaptación en Ciclos Anuales	13
1.1.2. Regulación hormonal de la dormición y germinación de semillas	14
1.1.3. Regulación genética de la floración en el ciclo de vida vegetal	14
1.2. <i>Mutante termosensible: gigantea supresor5 (gis-5)</i>	15
1.3. <i>Mecanismos moleculares de la memoria ambiental</i>	17
2. Hipótesis y Objetivos	19
<i>Hipótesis general de trabajo</i>	19
<i>Objetivos general y específicos:</i>	19
3. Materiales y Métodos.....	20
3.1. <i>Material vegetal</i>	20
3.2. <i>Condiciones de crecimiento</i>	20
3.3. <i>Caracteres de plantas G1</i>	21
3.3.1. Tiempo hasta aparición del botón floral:	21
3.3.2. Hojas hasta aparición de botón floral	21
3.4. <i>Rendimiento de las plantas y almacenamiento de semillas:</i>	21
3.5. <i>Ensayos de germinación</i>	21
3.6. <i>Ensayos de Ácido absísico</i>	22
3.7. <i>Ensayos de estratificación por calor</i>	22
3.8. <i>Características de las semillas</i>	23
3.9. <i>Obtención y evaluación de la cruz gisxcol</i>	23
3.10. <i>Análisis estadístico</i>	24
4. Resultados	27
4.1. <i>Desarrollo de las plantas de la primera generación</i>	27
4.2. <i>Características de las semillas de la progenie</i>	28
4.2.1. <i>Peso total de semillas</i>	28

4.2.2. Tamaño de las semillas.....	29
4.2.3. Color de semillas.....	29
4.3. Respuesta de germinación de las semillas de la progenie	30
4.3.1. Efecto de la incubación con ácido abscísico (ABA).....	31
4.4. Inducción de dormición secundaria	32
4.5. Influencia de la temperatura en la producción y respuesta de semillas de gis-5.....	33
4.6. Características de plantas y semillas híbridas de gis-5	35
5. Discusión	37
5.1. Efectos de gis-5 sobre el desarrollo de las plantas de Arabidopsis.....	37
5.2. El ambiente materno y gis-5.....	39
5.2.1. Compromiso peso total / tamaño de semillas y los efectos genéticos y maternos	39
5.3. Efecto de gis-5 sobre la respuesta de germinación	40
5.4. Influencia de la temperatura materna en la producción y respuesta de semillas de gis-5	41
6. Conclusiones.....	42
7. Proyecciones a futuro	42
8. Bibliografía	44
9. Anexo	48

Introducción

Las plantas son capaces de percibir los cambios ambientales y generar respuestas plásticas que permitan ajustar su crecimiento y desarrollo a las condiciones fluctuantes. La información de los cambios ambientales experimentados puede traducirse en factores genéticos y epigenéticos que regulan las respuestas dentro del mismo ciclo de vida de las plantas, así como los de generaciones futuras. Cuando los efectos del ambiente afectan las respuestas de forma transgeneracional, se expresa una memoria ambiental, la cual es transmitida de generación en generación a través de mecanismos moleculares que recién están comenzando a revelarse (Auge *et al.*, 2023).

1.1. Modelo de estudio: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta anual de invierno de ciclo de vida corto. En su rango nativo, las semillas germinan en otoño y la floración ocurre en primavera, una vez que el invierno ha finalizado (Fig.1). La germinación y la floración son procesos clave por estar directamente relacionados con el éxito de supervivencia y *fitness* de las plantas, entonces el momento en el que suceden estas transiciones del desarrollo está finamente regulado para que cada estadio del ciclo de vida coincida con las condiciones ambientales que permitan el crecimiento óptimo de la planta. Para que esto suceda, la planta debe ser capaz de percibir las condiciones ambientales características de las distintas estaciones del año, como la temperatura y el fotoperíodo (Auge *et al.*, 2017). Floración y germinación están fenotípicamente relacionadas: el momento en que ocurre la floración determinará el ambiente en que las semillas se desarrollarán, mientras que la germinación establece el ambiente durante el crecimiento vegetativo y en el que las plantas van a florecer. Entender la regulación de ambos procesos del desarrollo por parte del ambiente es relevante para comprender la respuesta y adaptación de las plantas en un contexto de cambio climático.

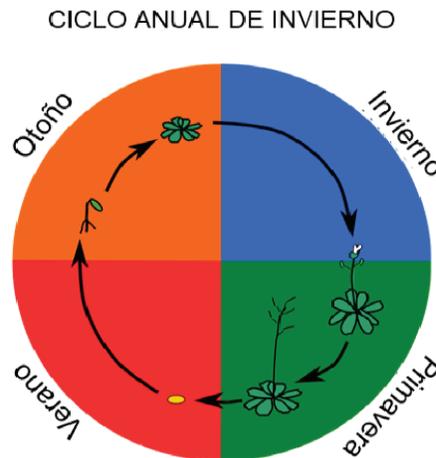


Figura 1: Ciclo de vida típico de *Arabidopsis thaliana*. La germinación ocurre en otoño cuando las temperaturas bajan y la humedad aumenta, dando inicio al desarrollo vegetativo, que transiciona a reproductivo con la llegada de los días más largos y las temperaturas más cálidas de la primavera. Durante esta estación, la planta produce semillas que, tras ser liberadas cerca del verano, permanecen en dormición hasta el próximo otoño.

1.1.1. Dormición de semillas: Regulación y Adaptación en Ciclos Anuales

Las alteraciones en las condiciones ambientales pueden modificar el ajuste del ciclo de vida. Por ejemplo, otoños excesivamente secos pueden retrasar la germinación hasta la primavera, lo que desplaza el ciclo hacia condiciones menos favorables, como el verano, reduciendo la supervivencia (Zacchello *et al.*, 2020; Postma y Ågren, 2022). Algunas poblaciones han desarrollado una fenología anual de primavera-verano, permitiendo completar el ciclo tras la dispersión de semillas en primavera, siempre que las condiciones sean favorables. Esto implica un compromiso entre los factores ambientales anteriores y posteriores a la dispersión (Penfield y Springthorpe, 2012; Huang *et al.*, 2014). Dado que cada fase del desarrollo vegetal posee distintas tolerancias ambientales, la sincronización de estas transiciones es crucial para el crecimiento y la supervivencia. Incluso pequeñas variaciones pueden alterar el momento de las transiciones, exponiendo a la planta a condiciones subóptimas (Gray y Brady, 2016).

La dormición, definida como la incapacidad de germinar de la semilla aún bajo condiciones favorables, es un carácter adaptativo que determina el momento en que las semillas germinan en la naturaleza (Donohue *et al.*, 2010). La dormición primaria se establece durante el desarrollo y maduración de las semillas, antes de la dispersión de la planta madre. Esta dormición puede ser liberada luego de la dispersión, pero si 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 (Iwasaki *et al.*, 2022). Estos estados de dormición en semillas de *Arabidopsis thaliana* dependen fuertemente de las condiciones ambientales experimentadas por la planta madre (Auge *et al.* 2017; Iwasaki *et al.* 2022); se espera que la planta madre provea a la progenie con información sobre las condiciones ambientales estacionales, y dicha información podría ser usada para ajustar el comienzo del ciclo de vida de la progenie de manera de optimizar la supervivencia de la planta en crecimiento (Auge *et al.*, 2023). Las semillas de *Arabidopsis* responden a la temperatura experimentada por la planta madre y la de las mismas semillas luego de la dispersión: a menor temperatura durante la maduración, mayor el nivel de dormición de las semillas luego de dispersión, mientras que menores temperaturas durante la incubación, promueven la germinación (Penfield and Springthorpe, 2012; Burghardt *et al.*, 2016; Authier *et al.*, 2023).

La plasticidad transgeneracional en *A. thaliana* puede ser influenciada incluso por cambios no estresantes en la temperatura ambiental, lo que afecta distintos aspectos de su ciclo de vida, como la germinación, el tiempo de floración, la producción de biomasa reproductiva y el tamaño de las semillas. Estos efectos pueden depender del momento en que ocurren las variaciones térmicas y de su persistencia a lo largo del desarrollo de la planta. Se ha propuesto que las condiciones ambientales experimentadas por la generación parental influyen en la progenie, incluso antes de la floración, afectando la expresión de transiciones del desarrollo y contribuyendo a la capacidad adaptativa de futuras generaciones (Authier *et al.*, 2023).

1.1.2. Regulación hormonal de la dormición y germinación de semillas

El uso de mutantes de síntesis y señalización de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) ha demostrado el rol clave de estas hormonas en la regulación de la dormición y germinación en semillas de *A. thaliana* (Sajeev *et al.*, 2024). El ABA está asociado al establecimiento y mantenimiento de la dormición, mientras que las GA promueven la germinación. Durante el desarrollo de las semillas, la acumulación de ABA impide la germinación precoz y está involucrado en el establecimiento de la dormición primaria antes de la dispersión de la planta madre. La vía de síntesis de ABA comienza con la conversión de un precursor epoxicarotenoide por enzimas *9-epoxicarotenoid dioxygenase* (codificadas por las familias multigénicas *ABA* y *NCED* en *Arabidopsis*) seguido de la reacción de enzimas aldehído oxigenasas (Milborrow, 2001). Luego de la dispersión, los niveles de ABA se reducen permitiendo la germinación. El catabolismo de ABA está regulado por enzimas citocromo P450, codificadas por la familia multigénica *CYP707A* (Cutler y Krochko, 1999). Durante la imbibición, la germinación es inducida por la acumulación de GA en las semillas. La vía de síntesis de GA está compuesta por múltiples enzimas en las que se destacan las *ent*-kaureno sintasas y oxidasas, y giberelina-hidroxilasas y dioxigenasas (Hedden, 2020). El balance entre la acumulación de estas hormonas y la sensibilidad a estas (activación de vías de señalización) determina la probabilidad de germinación de las semillas (Sajeev *et al.*, 2024). La incubación de semillas en ABA exógeno, impide la germinación. Sin embargo, en estas mismas condiciones, mutantes de la vía de señalización del ABA pueden germinar a pesar de las concentraciones crecientes de la hormona (Sajeev *et al.*, 2024).

1.1.3. Regulación genética de la floración en el ciclo de vida vegetal

Arabidopsis es una planta facultativa de día largo (DL), lo que significa que los DL aceleran la floración, mientras que en días cortos (DC) se retrasa. Esta regulación depende de la vía del fotoperiodo, en la cual los genes *GIGANTEA (GI)*, *CONSTANS (CO)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)* promueven la floración. *GI* activa *CO*, que

finalmente se acumula al final de la tarde y al inicio de la noche en condiciones de DL, induciendo así la expresión de *FT* en las células acompañantes del floema (Fig. 2). La proteína FT actúa como una señal sistémica clave en este proceso, desplazándose al meristema apical para promover la transición a la floración (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu *et al.*, 2007). Una vez en el meristema apical del tallo (SAM), FT interactúa con el factor de transcripción de tipo bZIP FLOWERING LOCUS D (FD) para inducir la transcripción de genes como *SUPRESOR DE SOBREENPRESIÓN DE CONSTANS 1 (SOC1)* y *APETALA 1 (API)*, los cuales desempeñan un papel crucial en la formación de los primordios florales (Turk *et al.*, 2008). Además, *API* reprime la expresión de *SOC1* en el meristema floral (FM), cerrando así el circuito regulador.

Estas interacciones dinámicas y la coordinación entre diferentes genes y proteínas resaltan la complejidad de la regulación de la floración en *Arabidopsis*.

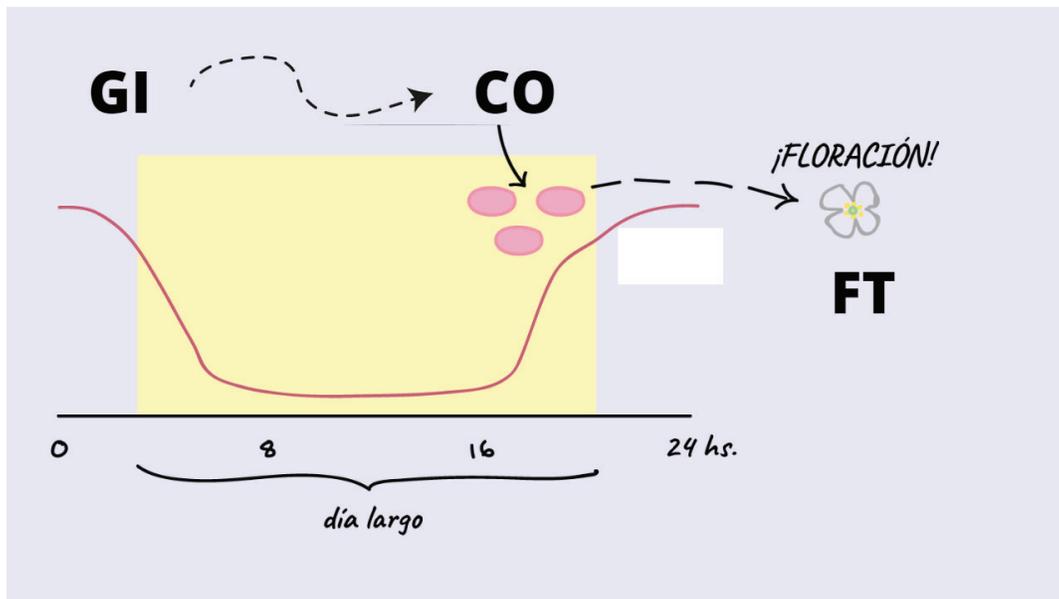


Figura 2: *FLOWERING LOCUS T (FT)* como señal sistémica.

1.2. Mutante termosensible: *gigantea supressor5 (gis-5)*

El mutante *gigantea supressor5 (gis-5)*, seleccionado de un screening cuyo objetivo era identificar genes que reviertan el fenotipo de floración tardía del mutante *gigantea-2*, resultó ser termosensible además de acelerar el tiempo a floración (Iglesias *et al.*, 2015). Las plantas mutantes *gis-5* presentan un fenotipo similar a Col-0 cuando se crecen a 18°C, pero a temperaturas más cálidas (23°C) muestran un fenotipo de hoja curvada y a 28°C no pueden completar su ciclo de vida (Iglesias *et al.*, 2015) (Fig. 3).



Figura 3: Los fenotipos de *gis-5* dependen de la temperatura. Las plantas *gis-5* (izquierda) exhiben un fenotipo característico de hojas curvadas a 24°C, mientras que no se observan alteraciones significativas a 18°C (derecho). Foto: FGR

Estos fenotipos se deben a una sustitución A707V en la subunidad catalítica de la ADN polimerasa Pol δ codificada por el gen *POLD1*. Además, el mutante *gis-5* muestra elevada expresión de genes marcadores de estrés de replicación del ADN (Fig.4), elevada recombinación homóloga y expresión ectópica de *SEPALLATA3* (*SEP3*) correlacionada con un incremento en la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) en dicho locus (Iglesias *et al.*, 2015). La alta expresión de *SEP3* en el tejido vascular promueve la expresión del *LOCUS DE FLORACIÓN T* (*FT*), lo que genera un ciclo de retroalimentación positiva con *SEP3* y conduce a fenotipos de floración temprana y hojas rizadas.

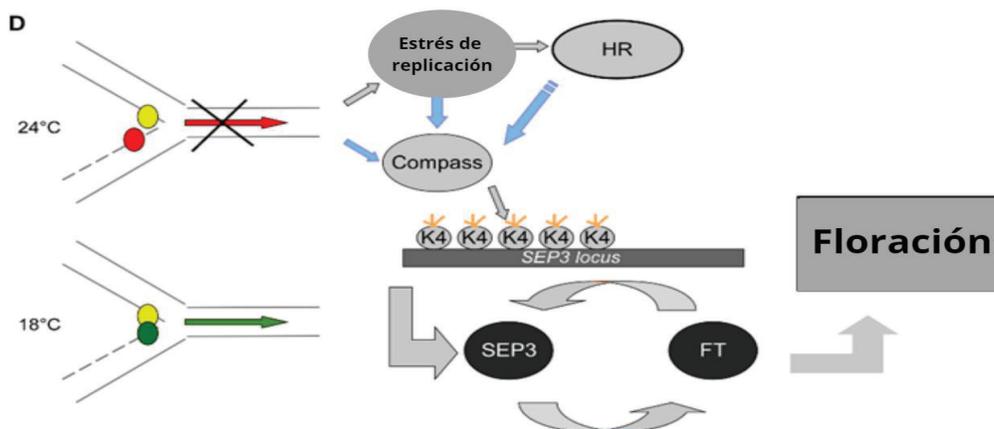


Figura 4: Esquema modificado de Iglesias *et al.* (2015) que representa el modelo del efecto dependiente de la temperatura del alelo *gis-5*. La horquilla de replicación funciona normalmente a 18 °C (flecha verde), pero se detiene a 24 °C (flecha roja). Los pequeños círculos de colores representan Pole (cadena

líder) y Polδ (cadena rezagada). A temperaturas más altas, Polδ se retrasa (círculo rojo), lo que desencadena una respuesta de estrés de replicación de ADN y un aumento de H3K4me3 en el locus *SEP3*, participando en un ciclo de retroalimentación positiva con FT para inducir la floración y el fenotipo de hoja enrollada. Las flechas azules indican relaciones tentativas aún no comprobadas. El complejo Compass se incluye tentativamente debido a su papel en el establecimiento de H3K4me3. Las líneas cortas de color naranja representan la trimetilación en H3K4.

Tanto *FLC* como *FT* han sido involucrados en la regulación pleiotrópica de la germinación y en la respuesta a ambientes de generaciones pasadas (Chiang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014; Auge *et al.*, 2017; Iwasaki *et al.*, 2022). Ambos genes sufren una fina regulación genética y epigenética a través del ciclo de vida de las plantas además de estar regulados en ciertas condiciones por *GIS5*, por lo que el estudio de los mecanismos involucrados en dicha regulación resulta de relevancia para entender los procesos adaptativos de las plantas. Por esto, estudiar el mutante *gis-5* puede proveer información sobre el rol de la replicación del ADN y los mecanismos epigenéticos involucrados en la integración transgeneracional de información ambiental.

1.3. Mecanismos moleculares de la memoria ambiental

Las distintas etapas de la vida de las plantas responden con frecuencia a la misma señal ambiental para regular el desarrollo de modo que cada estadio coincida con la estación correspondiente. Los cambios de temperatura, especialmente cuando son experimentados por la generación parental en *A. thaliana*, pueden inducir plasticidad fenotípica en la descendencia (Whittle *et al.*, 2009; Suter y Widmer, 2013; He *et al.*, 2014; Burghardt *et al.*, 2016; Groot *et al.*, 2017; Auge *et al.*, 2017a). Además, las altas temperaturas afectan negativamente todas las fases del ciclo de vida de esta especie (Zinn *et al.*, 2010; Groot *et al.*, 2017), lo que las convierte en un posible factor de selección en su entorno natural (Wolfe y Tonsor, 2014). El ambiente parental también tiene un impacto significativo en la cantidad, viabilidad y vigor de las semillas producidas por la progenie (Valencia-Díaz y Montaña, 2005; Wang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Awan *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018). Estos rasgos, que están sujetos a selección natural, podrían influir directamente en la aptitud de las generaciones futuras (Larios *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016).

El ambiente experimentado por la planta madre afecta la germinación de la progenie modificando los niveles de dormición (Penfield & Springthorpe, 2012; He *et al.*, 2014; Auge *et al.*, 2015; Burghardt *et al.*, 2016; Edwards *et al.*, 2016; Leverett *et al.*, 2016; Authier *et al.*, 2023). La vernalización de la planta madre en las primeras etapas del ciclo de vida influye en la germinación de la progenie, incluso si las semillas en desarrollo no experimentaron frío (Auge *et al.*, 2017). Por lo tanto, la vernalización tiene un doble efecto sobre el desarrollo: un efecto a corto plazo sobre el tiempo de floración que se restablece durante la fertilización, y un efecto transgeneracional que

modifica la germinación de las semillas de la progenie. Los genes en la vía de floración-vernalización regulan pleiotrópicamente la germinación de las semillas. Por ejemplo, genotipos con altos niveles de *FLC* germinan más que los que tienen alelos no funcionales o mutantes nulos (Chiang *et al.*, 2009). Sin embargo, con frecuencia, el efecto de estos genes sobre la germinación no es consistente con su función en la vía de floración, y la expresión de estos genes en respuesta a la vernalización no está correlacionada entre las etapas tempranas y tardías de la vida. Por lo tanto, a pesar de los efectos persistentes de la vernalización en las etapas posteriores de la vida, y a pesar de la pleiotropía de la regulación de la floración y la germinación, estos genes de vernalización parecen ser capaces de regular diferentes etapas de la vida con cierto grado de independencia (Auge *et al.*, 2017).

Incluso cambios moderados en la temperatura ambiente pueden generar plasticidad transgeneracional en *A. thaliana*, afectando rasgos clave como la germinación, el tiempo de floración, la producción de biomasa reproductiva y el tamaño de las semillas (Authier *et al.*, 2023). Esta plasticidad no solo ocurre en respuesta a condiciones estresantes, sino también a variaciones ambientales no extremas, lo que sugiere la presencia de efectos transgeneracionales adaptativos que influyen en el ciclo de vida completo de las plantas. El efecto materno de la temperatura también está mediado por el gen *FT* que regula la síntesis de proantocianidinas (PAs) en las cubiertas de las semillas, de modo que el aumento de la síntesis de PA se asocia con una menor permeabilidad de la cubierta de la semilla y niveles más altos de dormición debido a las temperaturas frías experimentadas por las plantas madre (Chen *et al.*, 2014; MacGregor *et al.*, 2015).

En este contexto, la mutante *gis-5* resulta particularmente interesante, ya que es termosensible, interacciona con múltiples genes de regulación de la floración y exhibe fenotipos marcados incluso en condiciones no estresantes. Este conjunto de características convierte a *gis-5* en un potencial componente clave para estudiar cómo las plantas retienen y transmiten información sobre las condiciones ambientales pasadas, proporcionando un modelo ideal para comprender los procesos de memoria térmica en las plantas, integrando información que les permita adaptarse al ambiente a toda su descendencia futura.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis general de trabajo

La hipótesis general de trabajo estipula que el ambiente térmico experimentado por generaciones anteriores de plantas afectan los caracteres del *fitness* de las plantas y del desarrollo temprano de la progenie a través de mecanismos genéticos que incluyen el gen *GIS-5* como elemento clave de la transmisión de información.

Objetivos general y específicos:

El objetivo general de esta tesis es el de explorar mecanismos moleculares involucrados en la regulación transgeneracional del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a los cambios de temperatura del ambiente.

En particular, se propone

- 1) Caracterizar la función del mutante en el gen *GIGANTEA SUPPRESSOR5*, *gis-5*, de *Arabidopsis thaliana* (mutante en la replicación del ADN) en el *fitness* de las plantas y la respuesta de germinación a cambios no estresantes de temperatura;
- 2) Analizar en el mutante el efecto del ambiente a través de las generaciones sobre el desarrollo temprano de las plantas de sucesivas generaciones.

Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) y la línea mutante *gis5*. Las plantas mutantes fueron gentilmente donadas por el Dr. Pablo Cerdán de la Fundación Instituto Leloir.

3.2. Condiciones de crecimiento

Las plantas madre (G1) se cultivaron en condiciones de día largo (16h luz/8h oscuridad) bajo dos temperaturas no estresantes (18 y 23°C) durante todo el ciclo de vida de la planta, o en combinaciones de estas temperaturas antes y después de la floración, generando cuatro tratamientos:

18-18°C: temperatura constante de 18°C.

23-23°C: temperatura constante de 23°C.

18-23°C: 18°C antes de la floración y 23°C después de la floración.

23-18°C: 23°C antes de la floración y 18°C después de la floración.

Cabe señalar que, a diferencia de lo reportado por Iglesias *et al.* (2015), se empleó una temperatura de 23°C en lugar de 24°C, decisión que respondió a la disponibilidad de cámaras de cultivo con control térmico en nuestro Instituto.

Se cultivaron 6 réplicas por genotipo y tratamiento en cámaras de crecimiento controladas (Percival y Conviron).

Inicialmente, 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 en la placa con agar-agua y se transfirieron a macetas de 180 cc. con sustrato (Tabacco Grow Mix, Agroquímica Larrocca S.R.L.). Una vez sembradas las macetas se colocaron en las cámaras de crecimiento a 18°C o 23°C, en fotoperiodo de 16h luz / 8h oscuridad (día largo, DL; radiación fotosintéticamente activa (PAR): 120–150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pasados 7 días se procedió a remover el exceso de plántulas dejando una plantula por maceta.

Una vez que las plantas florecieron y desarrollaron el tallo 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 se llevó a cabo cuando $\frac{1}{3}$ de los frutos se encontraron maduros y secos. Las semillas se almacenaron en tubos de microcentrífuga separadas

por plantas madre a temperatura ambiente en un ambiente seco (ambiente de post-maduración) hasta el momento de ser usadas para los experimentos.

3.3. Caracteres de plantas G1

3.3.1. Tiempo hasta aparición del 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.

3.3.2. Hojas hasta aparición de botón floral

Se contó el número de hojas de la roseta 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. La aparición del botón floral se detectó visualmente como una estructura central en el ápice de la roseta, ligeramente elevada y más compacta, que precede a la formación del tallo floral

3.4. Rendimiento de las plantas y almacenamiento de semillas:

Al momento de la cosecha, se recolectaron las semillas cuando dos tercios de los frutos estaban maduros y secos. Las semillas cosechadas se almacenaron en tubos de 1.5 mL separados por planta madre (réplica biológica) y se secaron en un recipiente hermético con sílica gel por 3 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se cuantificó el peso total pesando los tubos de plástico 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.

3.5. Ensayos de germinación

Para estudiar la respuesta de germinación de la progenie se utilizaron las semillas G2 cosechadas de las plantas G1 que fueron almacenadas como se detalla en 3.4. Por cada planta madre (6 réplicas por cada genotipo) se sembraron 20 semillas frescas (3 días

luego de cosecha) en una placa de Petri de 35mm con agar-agua (0,6% p/v) y se incubaron en condiciones de día largo (16h luz, 8h oscuridad) a 18°C y 23°C (radiación fotosintética activa (PAR): 120-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). 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). A partir de los datos obtenidos de germinación, se calculó la proporción de germinación como la cantidad de semillas germinadas al final del ensayo 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).

3.6. Ensayos de Ácido absísico

Para evaluar el efecto del ácido absísico (ABA) en la germinación de semillas, utilizamos semillas de *gis-5* y Col-0 que habían sido almacenadas durante un mes a temperatura ambiente luego de su cosecha (como se indica más arriba). Este tiempo de post-maduración fue suficiente para que las semillas pierdan cualquier vestigio de dormición primaria y permitir un 100% de germinación en condiciones controladas. Las semillas fueron sembradas en placas Petri con 2 capas de papel de filtro embebido en soluciones con ABA de concentraciones 0,5 mM, 1 mM y 3 mM, además de un control sin ABA (agua destilada). En cada placa sembramos 20 semillas, con tres réplicas (diferentes plantas madre) por tratamiento y genotipo. Luego, las placas fueron incubadas a 18°C y 23°C para evaluar la influencia de la temperatura de incubación en la germinación. La germinación se observó diariamente con una lupa binocular, considerando que una semilla había germinado cuando se observaba protrusión de la radícula. El conteo continuó hasta que no se registró germinación en dos días consecutivos, momento en el que se dio por finalizado el experimento.

3.7. Ensayos de estratificación por calor

Para inducir la dormición secundaria, semillas post-maduradas por 1 mes a temperatura ambiente se pre-incubaron a altas temperaturas (37°C) en oscuridad. Semillas cosechadas en 3.4 fueron embebidas en placas de Petri de 35 mm con 0,6% p/v e inmediatamente incubadas en oscuridad en un cuarto a 37°C durante 1, 4 o 7 días. Luego de la estratificación por calor, las placas fueron incubadas a 18°C y 23°C en un ciclo de 16h luz / 8h oscuridad (radiación fotosintéticamente activa (PAR): $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). 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. Se sembraron 20 semillas obtenidas de cada planta madre por placa. Se usaron 6 réplicas biológicas (semillas provenientes de distintas plantas madres) por genotipo y tratamiento. Se registró la germinación como se

indica más arriba hasta alcanzar el *plateau*. Para ello se utilizó una lupa estereoscópica. Se calculó 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.

3.8. Características 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, las semillas de la fotografía se seleccionaron y transformaron en una imagen binaria, 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 de cada planta madre en mm^2 y se calculó el área promedio de la población de semillas por réplica biológica.

3.9. Obtención y evaluación de la cruz *gisxcol*

Para la generación de la cruz, se utilizaron plantas *gis-5* y Col-0 cultivadas a 23°C, bajo las mismas condiciones de crecimiento descritas en el apartado 3.2. Se utilizó polen de Col-0 (donor, ♂) para fertilizar manualmente flores de *gis-5* (aceptor, ♀), asegurando previamente mediante observación con lupa que estas últimas no contienen polen propio. A partir de esta cruz (*gis-5* x Col-0), se obtuvieron entre 1 y 3 silicuas por planta, con una producción entre 3 y 6 semillas por silicua. El almacenamiento de semillas se realizó siguiendo los procedimientos detallados en el apartado 3.4. Tres días luego de la cosecha, se sembraron las semillas obtenidas de la cruz en un total de nueve placas, junto con tres placas adicionales de Col-0, siguiendo el protocolo descrito en 3.5, tomando a su vez la proporción final de germinación de las semillas híbridas. Las plántulas fueron trasplantadas individualmente a macetas, manteniendo una planta por maceta según lo especificado en 3.2. Todas las plantas fueron cultivadas a 23°C durante todo su ciclo de vida.

3.10. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos detallados a continuación se realizaron usando el lenguaje de programación "R" (R Core Team, 2024) y utilizando la interfaz gráfica 'RStudio' (RStudio Team, 2020). Inicialmente, se determinó el ajuste a la normalidad de todos los datos obtenidos con el test de Shapiro-Wilk utilizando la función 'shapiro.test' del paquete 'stats'. Para aquellos datos que no mostraron una distribución normal, se utilizó la función 'descdist' del paquete 'fitdistrplus' para determinar la distribución a la que mejor se ajustaban (Delignette-Muller y Dutang, 2015).

FLORACIÓN. Se analizaron las diferencias en el número de hojas totales desarrolladas por las plantas (variable respuesta) correspondientes a los distintos genotipos y expuestas a distintos tratamientos (variables explicatorias). Tanto genotipo como tratamiento se consideraron como variables fijas. Se ajustaron los datos a un modelo lineal generalizado utilizando la función 'glm' del paquete 'stats', analizando la interacción genotipo y tratamiento con una familia de distribución Poisson y realizando un análisis de la varianza mediante el uso de la función 'Anova' del paquete 'car' con un enlace 'log' (Fox y Weisberg, 2019). Luego, se analizó el efecto del genotipo en submodelos por tratamiento.

GERMINACIÓN. Con los datos de proporción de germinación se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución binomial utilizando la función 'glm' y un enlace 'logit'. Luego se realizó un test de verosimilitud de tipo III (test de X^2 para ajuste) con la función 'Anova'. Primero se analizó el efecto del genotipo, tratamiento materno y temperatura de incubación (variables fijas). Como el ensayo no estaba balanceado (las plantas madre *gis-5* crecidas a 23°C no produjeron semillas), la interacción entre las variables explicatorias no pudo testearse. Además, como la inclusión de interacciones dobles entre las variables no mejoraron el modelo completo (testado por el criterio de información de Akaike o AIC), sólo se analizaron los efectos sin interacción. Luego, se analizó el efecto del genotipo en semillas de plantas madre crecidas a 18°C en submodelos por temperatura de incubación.

Para testear el efecto de la incubación en ácido abscísico (ABA), se analizaron los efectos del genotipo y la concentración de ABA (variables fijas categóricas), y su interacción, ajustando a un modelo lineal generalizado con distribución binomial seguido por un test de máxima verosimilitud como se describe más arriba. Luego se analizó el efecto del genotipo en cada condición de concentración de ABA.

Para analizar los efectos de la inducción de la dormición secundaria por estratificación en calor y su relación con el genotipo de las semillas, el tratamiento de las plantas madre y el de incubación de las semillas (variables fijas categóricas), se utilizaron los datos de proporción de germinación para ajustar a un modelo lineal generalizado con distribución binomial seguido por un test de máxima verosimilitud como se describe más arriba. Al tener una tabla de datos desbalanceada (no obtuvimos semillas *gis-5* de plantas crecidas a 23°C), el modelo completo con todas las interacciones posibles no

mostró convergencia. Usando el test de AIC, determinamos que el modelo más completo era aquel que incluía todas las posibles interacciones dobles entre las variables explicatorias. Luego, analizamos submodelos por temperatura de incubación. Para semillas incubadas a 18°C, determinamos que el mejor modelo era el que no incluía interacciones; mientras que para las semillas incubadas a 23°C, el mejor modelo era aquel que sólo incluía las interacciones dobles entre las variables explicatorias. Para analizar el efecto del genotipo en la respuesta a la estratificación por calor, se comparó el efecto de la mutante en cada día de duración del tratamiento de calor en cada temperatura de incubación para semillas de plantas madre crecidas a 18°C. Además, para analizar el efecto del tratamiento materno sobre la respuesta de las semillas pre-incubadas en calor, se comparó el efecto del ambiente materno a 18 y 23°C para semillas del genotipo Col-0 en cada día de duración del tratamiento y temperatura de incubación.

Para analizar los efectos del ambiente de la planta madre antes y después de floración y la contribución de *gis-5* sobre la germinación de la progenie, se analizaron los efectos del genotipo, el tratamiento de las plantas madre y el de incubación de las semillas (variables fijas categóricas) ajustando los datos de proporción de germinación a un modelo lineal generalizado con distribución binomial seguido por un test de máxima verosimilitud como se describe más arriba. Primero, se testeó un modelo determinando al tratamiento materno como una variable única para el ciclo de vida entero (antes + después de floración) y su interacción con las otras variables explicatorias. Luego, se testearon los efectos del genotipo y tratamiento materno, y su interacción, en cada temperatura de incubación. Posteriormente, para analizar la contribución del ambiente antes y después de floración por separado, se analizó un modelo sin interacciones entre las variables explicatorias genotipo, tratamiento antes de floración, tratamiento después de floración y temperatura de incubación (mejor modelo determinado por el AIC). Finalmente, analizamos el efecto del genotipo en cada temperatura de incubación y tratamiento materno (antes + después de floración, excepto en 23-23), y el efecto del ambiente materno en cada temperatura de incubación para cada genotipo (excepto en 23-23 para *gis-5*).

Para comparar la respuesta de germinación de las semillas híbridas *gis-5* x Col-0, se analizó el efecto del genotipo ajustando a un modelo lineal generalizado con distribución binomial seguido por un test de máxima verosimilitud como se describe más arriba.

PESO DE SEMILLAS. Se analizaron las diferencias en el peso total de semillas producidas por las plantas (variable respuesta) correspondientes a los distintos genotipos y expuestas a distintos tratamientos maternos (variables explicatorias). Tanto genotipo como tratamiento se consideraron como variables fijas. Se ajustaron los datos a un modelo lineal generalizado utilizando la función ‘glm’ con una familia de distribución Gamma y se realizó un análisis de la varianza mediante el uso de la función ‘Anova’ del paquete ‘car’ usando el enlace ‘inverse’. Como el ensayo no estaba

balanceado (las plantas madre *gis-5* crecidas a 23°C no produjeron semillas), la interacción entre las variables explicatorias no pudo testearse.

ÁREA DE SEMILLAS. Los datos de área de semillas mostraron ajustarse a una distribución normal y cumplir con el supuesto de homoscedasticidad. Entonces para analizar el efecto del genotipo y el tratamiento materno, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) usando la función ‘aov’ del paquete ‘stats’ de R.

En todos los casos donde se realizaron comparaciones múltiples, se corrigió el *p*-valor con el método de Holm usando la función ‘p.adjust’ del paquete ‘stats’ de R.

Las tablas de datos con los resultados del presente trabajo y el script de R con el código utilizado se encuentran disponibles en el siguiente link: <https://bit.ly/tesisFGR>.

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 (aparición del botón floral). Para ello contamos la cantidad de hojas de las rosetas que presentaban las plantas de los distintos genotipos al momento de la aparición del botón floral, tal como se detalla en el apartado 3.3.

Como era esperado (Iglesias *et al.* 2015), comparadas con las plantas Col-0, las plantas de la mutante *gis-5* florecieron más temprano cuando fueron crecidas a 23°C, mientras que las que se crecieron a 18°C no mostraron diferencias en el tiempo a floración (interacción genotipo x tratamiento significativa, $X^2 = 6.965$ y p-valor = 0.008; Fig. 5). Al realizar un análisis por tratamientos, a 18°C no se observan diferencias significativas entre genotipos ($X^2 = 1.946$ y p-valor = 0.162). Por el contrario, en el tratamiento a 23°C se observan diferencias significativas entre Col-0 y *gis-5* ($X^2 = 18.886$ y p-valor = 0.0000139).

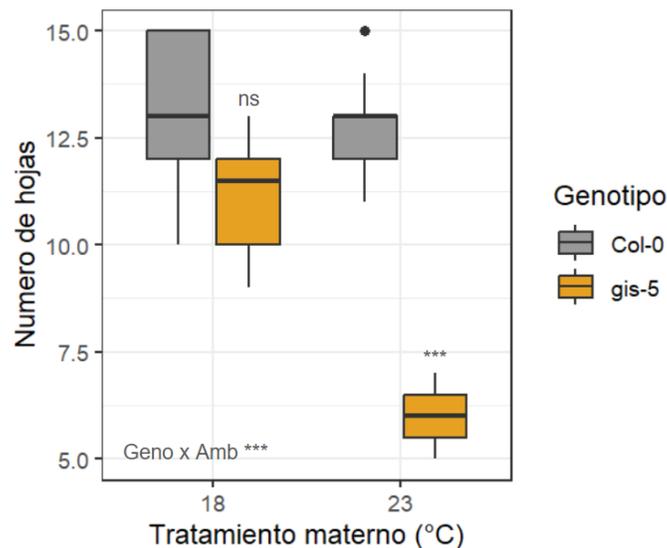


Figura 5: Cantidad de hojas de roseta al momento de aparición del botón floral en función de los genotipos (Col-0, gris, y *gis-5*, naranja) cuando las plantas fueron crecidas a temperatura de 18°C (izquierda), o 23°C (derecha). Diferencias significativas se indican con la siguiente codificación: ‘***’ ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), ‘ns’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

4.2. Características de las semillas de la progenie

Con el objetivo de estudiar si el genotipo y la temperatura regula la producción y el tamaño de las semillas, analizamos ambas características al estar sometida, o no, la planta madre a un tratamiento de 18°C y 23°C.

4.2.1. Peso total de semillas

Para calcular el rendimiento de las plantas, pesamos las semillas totales producidas con el fin de caracterizar la biomasa reproductiva. Las plantas mutantes *gis-5* crecidas a 23°C no lograron producir semillas en nuestras condiciones. Tanto el tratamiento materno como el genotipo afectaron la producción de semillas de la progenie (X^2 : 58.872 y p-valor: 1.681×10^{-14} , y X^2 : 28.235 y p-valor: 1.074×10^{-7} , respectivamente). En la Fig. 6 se puede observar que las plantas Col-0 producen más semillas cuando se crecen a 18°C que a 23°C. Si bien las plantas mutantes *gis-5* muestran un fenotipo similar a las Col-0 en 18°C, producen menos semillas en esta temperatura.

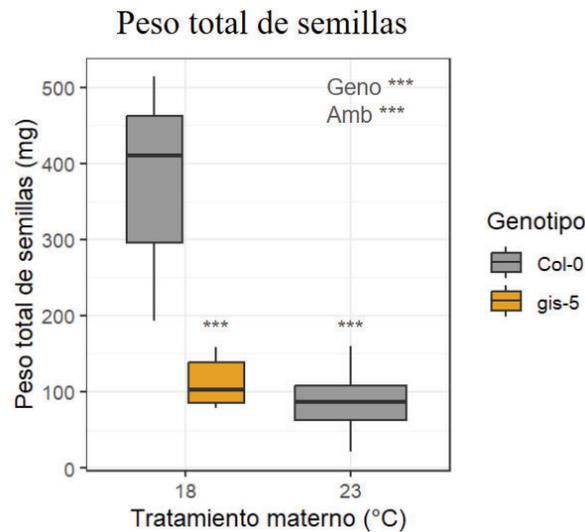


Figura 6: Peso total de semillas (mg) en función del genotipo (Col-0, gris, y *gis-5*, naranja) producidas por plantas madre expuestas a tratamiento de 18°C (izquierda), o 23°C (derecha). No se obtuvieron semillas de *gis-5* a 23°C. La mayor amplitud de la barra correspondiente al tratamiento materno a 23°C se debe a la ausencia de datos para el genotipo *gis-5* en dicha condición. Diferencias significativas se indican con la siguiente codificación: ‘***’ ($0 \leq P$ -valor $< 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P$ -valor $< 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P$ -valor $< 0,05$), ‘ns’ ($0,05 \leq P$ -valor).

4.2.2. Tamaño de las semillas

El tamaño de las semillas se estimó calculando el área a partir de fotografías tomadas de semillas provenientes de plantas de los dos genotipos expuestas a los distintos tratamientos. Las plantas de la mutante *gis-5* produjeron semillas más pequeñas que las del genotipo salvaje Col-0 ($F = 10.171$ y p -valor = 0.0061; Fig. 7), mientras que el tratamiento materno no tuvo un efecto significativo en el tamaño de las semillas de plantas Col-0 ($F = 1.256$ y p -valor = 0.28).

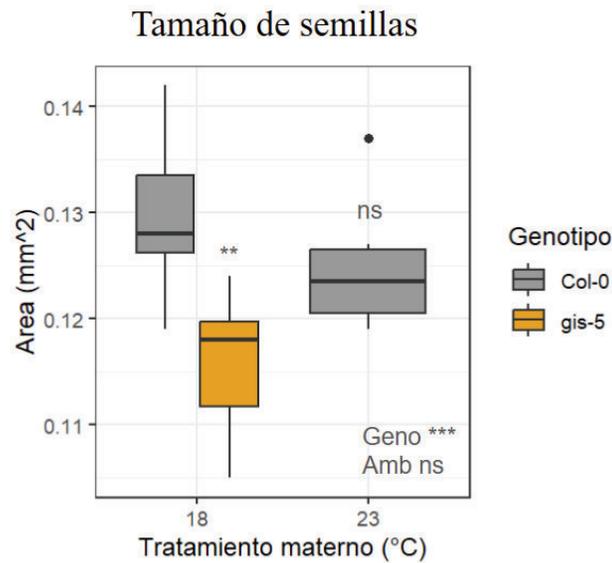


Figura 7: Área en mm^2 de las semillas de la progenie en función del genotipo (Col-0, gris, y *gis-5*, naranja) producidas por plantas madre expuestas a tratamiento de 18°C (izquierda), o 23°C (derecha). No se obtuvieron semillas de *gis-5* a 23°C. La mayor amplitud de la barra correspondiente al tratamiento materno a 23°C se debe a la ausencia de datos para el genotipo *gis-5* en dicha condición. Diferencias significativas se indican con la siguiente codificación: ‘***’ ($0 \leq P$ -valor $< 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P$ -valor $< 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P$ -valor $< 0,05$), ‘ns’ ($0,05 \leq P$ -valor).

4.2.3. Color de semillas

El color de las semillas constituye un rasgo fenotípico distintivo que indica diferencias en la composición de la capa celular de la cubierta. En la Fig. 8 se presentan imágenes comparativas de semillas de los genotipos estudiados donde claramente se puede observar que las semillas Col-0 exhiben un tono marrón oscuro con matices rojizos, mientras que las semillas del mutante *gis-5* presentan un color significativamente más claro, de tonalidad beige/amarillezco.



Figura 8: Imagen de semillas de *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda, genotipo salvaje Col-0 y a la derecha, mutante *gis-5*.

4.3. Respuesta de germinación de las semillas de la progenie

Con el objetivo de caracterizar si la información ambiental de los distintos tratamientos de temperatura aplicados a las plantas madre (G1) afectan a la respuesta de germinación de la progenie, y para evaluar si el gen *GIS5* está involucrado en la regulación de la germinación y potencialmente en la transmisión de la información transgeneracional, incubamos semillas provenientes de las distintas plantas madre crecidas en los dos tratamientos (18°C y 23°C) y medimos la proporción de germinación luego de la incubación a 18°C y 23°C.

El tratamiento materno, el genotipo y la temperatura de incubación afectaron la germinación de las semillas de la progenie (tratamiento materno: $X^2 = 287.209$ y p-valor = $2.016 \cdot 10^{-64}$; genotipo: $X^2 = 42.362$ y p-valor = $7.584 \cdot 10^{-11}$; incubación: $X^2 = 80.942$ y p-valor = $2.323 \cdot 10^{-19}$; Fig. 9). La proporción de germinación de las semillas de *gis-5* en ambos tratamientos de incubación es mayor a su contraparte Col-0. Sin embargo, el efecto del genotipo es significativo cuando las semillas son incubadas a 23°C ($X^2 = 58.037$ y p-valor = $2.57 \cdot 10^{-14}$) y no a 18°C ($X^2 = 0.212$ y p-valor = 0.6446).

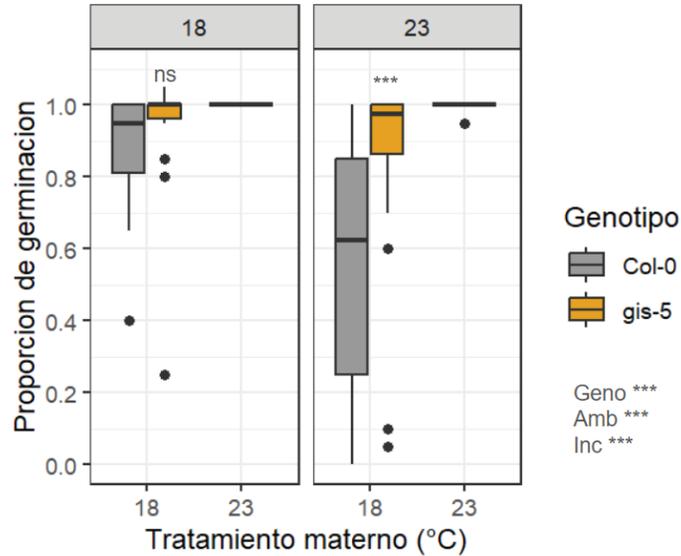


Figura 9: Proporción de germinación de semillas de la progenie de los genotipos Col-0 (gris) y *gis-5* (naranja) producidas en plantas madre crecidas a 18°C y 23°C (eje x) e incubadas a 18°C (panel izquierdo) o 23°C (panel derecho). No se obtuvieron semillas de *gis-5* a 23°C. Diferencias significativas 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’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

4.3.1. Efecto de la incubación con ácido abscísico (ABA)

Analizamos la respuesta de las semillas a un tratamiento de incubación con ABA para evaluar el posible mecanismo de respuesta de las semillas de la mutante *gis-5*. En la Fig. 10 se observa que el tratamiento con ABA tiene un efecto significativo en la inhibición de la germinación ($X^2 = 202.5035$, $p \text{ valor} = 5.94 \cdot 10^{-46}$) y esto depende del genotipo (interacción genotipo x incubación en ABA $X^2 = 10.326$, $p \text{ valor} = 0.0013$), lo que sugiere que la sensibilidad a esta fitohormona varía según el genotipo. El análisis por submodelos mostró que las semillas *gis-5* germinan más en la concentración de 0.5 μM de ABA ($X^2 = 12.247$, $p \text{ valor} = 0.0004661$), mientras que en las otras concentraciones no hay diferencias significativas. Estos resultados indican que la sensibilidad al ABA es clave en la respuesta de germinación mediada por *GIS5*.

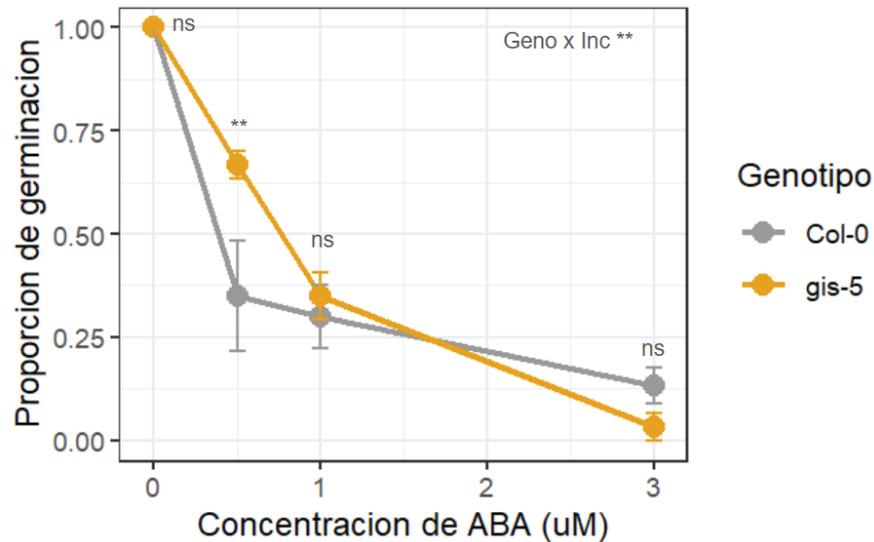


Figura 10: Proporción de germinación de semillas de los genotipos Col-0 (gris) y *gis-5* (naranja) en función de diferentes concentraciones de ABA (eje x). Las semillas fueron expuestas a concentraciones de 0, 0,5, 1 y 3 µM de ABA. Diferencias significativas se indican con la siguiente codificación: ‘***’ ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), ‘ns’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

4.4. Inducción de 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 secundaria en semillas postmaduradas. Los resultados muestran que todas las variables estudiadas influyen significativamente en la germinación (Fig. 11; Tabla 1). El genotipo y el tratamiento materno influyen sobre la respuesta de las semillas a la estratificación por calor en las dos condiciones de temperatura de incubación (Tabla 2). Para las semillas producidas por plantas madre crecidas a 18°C, el mutante *gis-5* germina significativamente más que las de Col-0 en todas las condiciones de estratificación con calor: mientras que las semillas Col-0 muestran una reducción en la germinación con el aumento de los días de estratificación en calor, las *gis-5* mantienen una alta capacidad germinativa e insensible al pre-tratamiento (Tabla 3), lo que sugiere que los genotipos responden de manera diferencial al tratamiento térmico.

Por otro lado, las semillas de Col-0 responden diferente al tratamiento de calor si fueron producidas por plantas madre crecidas a diferentes temperaturas. Aquellas semillas de plantas crecidas a 23°C tienen la máxima proporción de germinación (100%) y no mostraron sensibilidad a la pre-incubación comparadas con las de plantas crecidas a 18°C (Tabla 4).

En contraste, la interacción entre el ambiente materno y la temperatura de incubación no muestra un efecto significativo en la germinación (tratamiento materno x temperatura de incubación no significativo; Tabla 1), lo que sugiere que el ambiente de la planta madre no afecta la respuesta de las semillas a las condiciones de incubación.

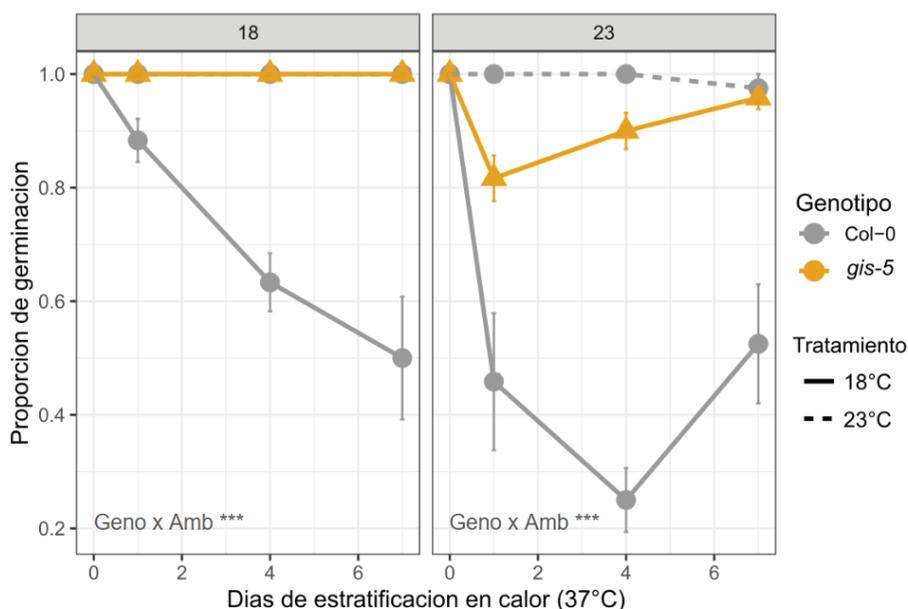


Figura 11: Proporción de germinación en función del tiempo de pre-incubación a 37°C (eje x) para inducir la dormición secundaria de semillas de los genotipos Col-0 (gris) y *gis-5* (naranja) provenientes de plantas madre crecidas a tratamientos de 18°C (línea llena) y 23°C (línea discontinua), e incubadas a 18°C (izquierda) o 23°C (derecha). Tiempo de incubación a 37°C corresponden a 0, 1, 4 y 7 días. Diferencias significativas 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’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

4.5. Influencia de la temperatura en la producción y respuesta de semillas de *gis-5*

Para profundizar sobre el efecto de la temperatura en la producción y respuesta de semillas de la mutante, se llevó a cabo un ensayo en el que las plantas madre fueron sometidas a diferentes combinaciones térmicas antes y después de floración: 18-18°C, 18-23°C, 23-18°C y 23-23°C. En particular, el objetivo era determinar si *gis-5* podía recuperar la capacidad de producción de semillas cuando se desarrollaba a 23°C antes de la floración y se trasladaba a 18°C después de la floración, y viceversa (18-23°C), en comparación con aquellas plantas mantenidas a 23°C durante todo el ciclo. Los resultados mostraron que la producción de semillas en *gis-5* dependía de la temperatura a la que se encontraban las plantas antes y después de la floración: las plantas que

experimentaron la condición 23-18°C y 18-23°C fueron capaces de producir semillas (Fig. 12). Esto sugiere que la temperatura durante todo el ciclo de vida de las plantas madre desempeña un papel determinante en la capacidad reproductiva de *gis-5*, afectando directamente el desarrollo de las semillas.

La respuesta de germinación de las semillas fue afectada significativamente por el genotipo, el tratamiento materno y la temperatura de incubación (Fig. 12; Tabla 5). El genotipo influyó sobre la expresión de los efectos maternos en la respuesta de las semillas (interacción genotipo x tratamiento materno significativo en incubación a 18 y 23°C, Tabla 6). Para las semillas Col-0 se observó una alta proporción de germinación cuando las plantas madres experimentaron 23°C después de floración (18-23°C y 23-23°C). Las semillas de *gis-5* mostraron un alto nivel de germinación (mayor o similar) comparado con las del genotipo salvaje Col-0, aun cuando las plantas madre experimentaron 18°C luego de floración. Sin embargo, ambos genotipos mostraron un efecto significativo del ambiente materno (excepto las semillas *gis-5* incubadas a 18°C; Tabla 7)

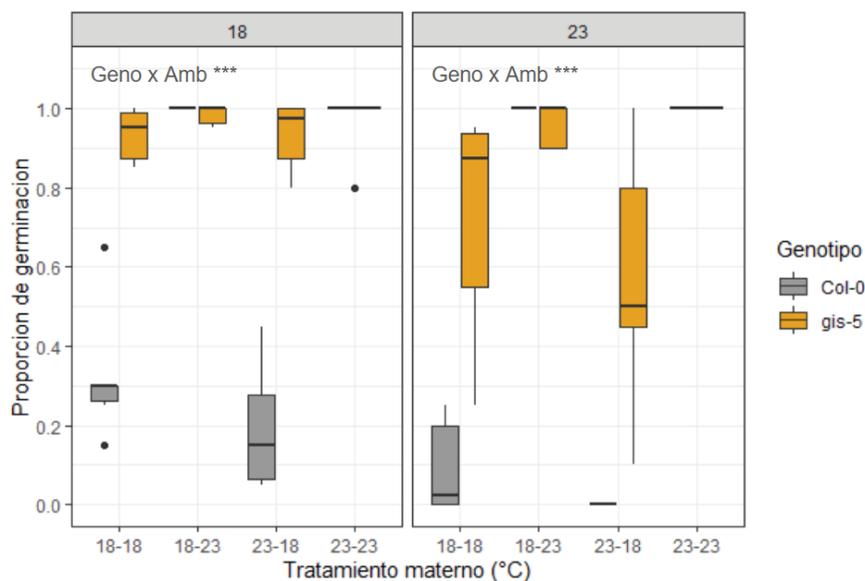


Figura 12: Proporción de germinación de semillas de los genotipos Col-0 (gris) y *gis-5* (naranja) en función del tratamiento de las plantas madre expuestas a diferentes condiciones térmicas antes y después de floración (18-18°C, 18-23°C, 23-18°C y 23-23°C). En el panel izquierdo se presentan los resultados de semillas incubadas a 18°C, mientras que en el panel derecho se muestran aquellas incubadas a 23°C. No se obtuvieron semillas de *gis-5* a 23-23°C. Diferencias significativas 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’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

4.6. Características de plantas y semillas híbridas de *gis-5*

Al observar que las plantas del genotipo *gis-5* no producían semillas cuando la planta madre era crecida durante todo su ciclo de vida a 23°C, indagamos si había algún fenotipo particular en la estructura reproductiva de planta. La observación bajo lupa de flores de *gis-5* reveló la ausencia de polen en estas plantas (Fig. 13).

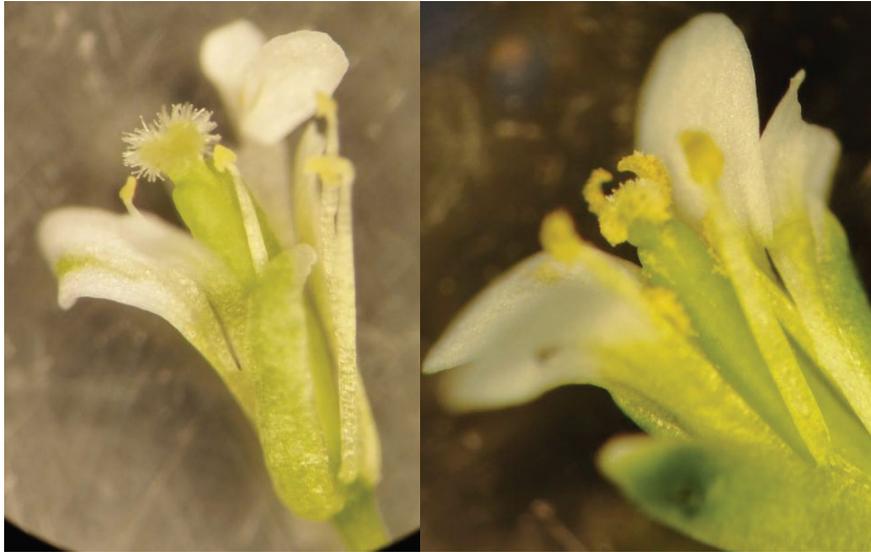


Figura 13: Fotos de las flores de los genotipos Col-0 (derecha) y *gis-5* (izquierda) crecidas durante todo su ciclo de vida a 23°C.

Para explorar si esta condición podía ser revertida, se realizaron cruzamientos dirigidos utilizando el polen de Col-0 para fecundar flores de *gis-5*. Como resultado se obtuvieron semillas viables, confirmando que la esterilidad observada en *gis-5* a 23°C post-floración, se debe exclusivamente a la falta de polen y no a aborto de semillas o incompatibilidad de polen.

Las semillas obtenidas de la cruce *gis-5* x Col-0, así como las de Col-0, fueron analizadas en términos de germinación. En el análisis de la germinación de los genotipos expuestos a 23°C durante todo su ciclo de vida, no se observaron diferencias significativas en la respuesta de germinación entre las semillas de Col-0 y la cruce *gisxcol* (X^2 : 0.44977 y p-valor = 0.5024; Fig. 14). En la figura se puede observar que la proporción de germinación es similar entre Col-0 y los híbridos *gisxcol*.

Además, las plantas de la cruce *gisxcol* presentan las mismas características que Col-0 (Fig. 15).

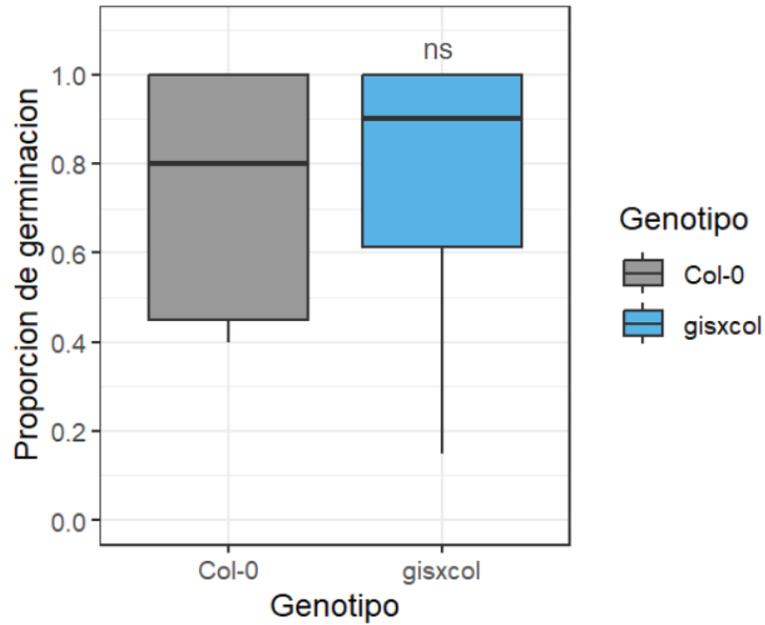


Figura 14: Proporción de germinación de semillas de los genotipos Col-0 (gris) y *gisxcol* (celeste). Diferencias significativas se indican con la siguiente codificación: ‘***’ ($0 \leq P\text{-valor} < 0,001$), ‘**’ ($0,001 \leq P\text{-valor} < 0,01$), ‘*’ ($0,01 \leq P\text{-valor} < 0,05$), ‘ns’ ($0,05 \leq P\text{-valor}$).



Figura 15: Plantas cultivadas a 23°C durante todo su ciclo de vida. A la izquierda, híbridos de la cruce *gis x Col* que exhiben un fenotipo similar a *Col-0*, mostrados a la derecha.

Discusión

La integración de información ambiental a través de generaciones permite la coordinación de respuestas adaptativas en la descendencia. Las condiciones ambientales experimentadas durante todo el ciclo de vida de la generación parental, incluso antes de la floración, influirán en la respuesta de germinación, el tiempo de floración, el rendimiento de semillas y el tamaño de las generaciones posteriores (Authier *et.al.* 2023). En este estudio, observamos que el tratamiento térmico materno influye significativamente en la germinación y el tamaño de las semillas de la progenie. Además, nuestros resultados demuestran que la temperatura de crecimiento afecta el tiempo de floración. En conjunto, estos datos sugieren que *gis-5* tiene un papel regulador en estos procesos. 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. Efectos de *gis-5* sobre el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis*

El desarrollo de *Arabidopsis thaliana* está sujeto a la influencia de múltiples factores ambientales, siendo la temperatura uno de los reguladores más críticos en la determinación de los tiempos de floración y germinación (Auge et al., 2023). En nuestro trabajo, se observó que *gis-5* exhibe una respuesta diferencial al tratamiento térmico, evidenciado por la disminución del número de hojas antes de la transición floral en plantas cultivadas a 23°C en comparación con aquellas cultivadas a 18°C. Este fenotipo concuerda con lo reportado por Iglesias *et al.* (2015), quienes identificaron que *gis-5* es una mutante termosensible con una respuesta acelerada a la floración bajo temperaturas moderadamente elevadas. La mutante *gis-5* es el primer alelo hipomórfico y viable que se ha aislado de *POLD1* y, curiosamente, es termosensible. En esta mutante, a 18°C tanto Pole como Pol δ avanzan en la horquilla de replicación de manera coordinada, mientras que a 24°C la menor actividad del alelo *gis-5* conduciría a tramos más grandes de ADN de cadena sencilla, lo que eventualmente resultaría en rotura en doble cadena (DSB) de ADN y un aumento de la recombinación homóloga, mecanismo utilizado para reparar DSB (Branzei y Foiani, 2010). La inestabilidad genética ya se había reportado en líneas de *Arabidopsis* con bajos niveles de expresión de *POLD1* (Colon-Carmona et. al, 1999). Sin embargo, en esas líneas no se observaron defectos en la herencia epigenética ni cambios significativos en el análisis transcriptómico. En nuestras condiciones, a diferencia de lo reportado en Iglesias *et al.* (2015), las plantas mutantes no llegaron a producir semillas a 23°C. La razón por la cual las plantas no produjeron polen podría deberse a diferentes factores, ya que el efecto de la mutación afecta

múltiples procesos celulares. Esto también podría estar asociado al menor número de hojas observadas en *gis-5* a 23°C, mostrando que la temperatura no solo influye en la duración de la fase vegetativa, sino que también impacta en la disponibilidad de recursos que la planta puede acumular antes de la reproducción. Sin embargo, observamos que las mutantes si bien llegaban a producir flores, éstas no producían polen. Este fenotipo no había sido descripto anteriormente para esta mutante.

El aumento de las temperaturas a menudo puede tener un efecto perjudicial en la reproducción sexual de las plantas, lo que puede conducir a una reducción en la fertilidad de muchas especies (Carrizo García *et al.*, 2017). La reproducción sexual en las angiospermas comprende tres fases: desarrollo del gametofito, fase progámica y desarrollo del embrión y la semilla (de cigoto a semilla). El gametofito masculino (polen) juega un papel clave en la reproducción de las plantas y la productividad de los cultivos, a través de la formación y entrega de espermatozoides masculinos al gametofito femenino para la doble fertilización (Carrizo García *et al.*, 2017). El estrés térmico (HS) afecta a los gametofitos masculinos y femeninos de manera diferente. Los gametofitos masculinos son más sensibles al HS a lo largo de su desarrollo (Zinn *et al.*, 2010 ; Hedhly, 2011); el HS afecta la cantidad y morfología del polen, la arquitectura de las paredes celulares y, de manera importante, el metabolismo del polen (Hoyle, 2012). Sin embargo, la sensibilidad al HS varía entre especies cuando se aplican tratamientos de alta temperatura (Park *et al.*, 2009). La mutante *gis-5* no produce polen viable a 23°C después de la floración, pero sí lo hace a 18°C, lo que sugiere que la temperatura crítica para la producción de polen en *gis-5* se encuentra dentro de este rango. Este fenómeno puede estar relacionado con la sensibilidad del desarrollo del gametofito masculino al estrés térmico, tal como se ha observado en otros estudios (Zinn *et al.*, 2010; Hoyle, 2012). A 23°C, es probable que el estrés térmico afecte procesos clave como la diferenciación del tapete, la formación de la pared celular del polen o el metabolismo de los microsporos, lo que resulta en la esterilidad masculina. Por el contrario, a 18°C, las condiciones son más favorables para el desarrollo normal del polen, lo que permite la producción de gametofitos masculinos viables. Además, el retraso en la polimerización del ADN debido a la temperatura en la mutante, junto con el estrés de replicación, puede tener efectos adversos significativos en el desarrollo del polen, afectando su viabilidad y función.

Arabidopsis thaliana es una especie predominantemente autógena, con niveles de heterocigosidad bajos en comparación con organismos de polinización cruzada. Se ha reportado que el 95% de sus individuos poseen cinco o menos loci heterocigotos debido a la autofecundación y la endogamia biparental (Paul-Victor *et al.*, 2010). Para evaluar si la esterilidad de *gis-5* podía revertirse, se realizaron cruza dirigidas utilizando polen de Col-0 para fecundar flores de *gis-5*. La obtención de semillas viables a partir de estas cruza confirma que la esterilidad observada en *gis-5* a 23°C post-floración se debe exclusivamente a la ausencia de polen, descartándose aborto de semillas, entre otras. Además, el análisis de germinación de las semillas obtenidas de la cruza *gis-5* x Col-0, comparadas con las de Col-0, no mostró diferencias significativas cuando ambas fueron incubadas a 23°C. Finalmente, las plantas derivadas de la cruza *gis-5* x Col-0

presentaron características fenotípicas similares a Col-0, lo que indica que la restauración de la fertilidad en *gis-5* mediante polinización cruzada no afecta otros aspectos morfológicos observables de la planta.

5.2. El ambiente materno y *gis-5*

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 y el tamaño de las semillas, 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.

5.2.1. Compromiso peso total / tamaño de semillas y los efectos genéticos y maternos

Tras la floración, la acumulación de biomasa reproductiva y el tamaño de las semillas son medidas relacionadas con los recursos invertidos en la producción de la siguiente generación y constituyen un sólido indicador de la aptitud fisiológica. Estos pueden medirse como el peso total o el área de las semillas como indicador del *fitness* (Authier *et al.* 2023). Por lo tanto, comprender la arquitectura genética del tamaño y la producción de semillas, y cualquier posible restricción genética para maximizarlos, es crucial tanto desde una perspectiva evolutiva como aplicada (Sadras, 2007; Van Daele *et al.*, 2012; Kesavan *et al.*, 2013). Estudios previos sobre la base genética de los rasgos de las semillas han usado predominantemente plantas mutantes y genes identificados en vías clave involucradas en el desarrollo de las semillas (García *et al.* 2003; Tzafrir *et al.* 2004; Adamski *et al.* 2009; Fang *et al.* 2012). En nuestro trabajo hemos observado efectos genéticos y del ambiente materno en la producción de semillas. Las plantas mutantes *gis-5* produjeron una menor biomasa de semillas y de menor tamaño que las de las plantas Col-0 crecidas a 18°C y 23°C. Pero las plantas *gis-5*, aún creciendo a 18°C sin fenotipos destacables, detectan aún el estrés generado por la mutación y producen menor cantidad de semillas (reflejadas en la producción total) y más chicas (similar a Col-0 23°C). A su vez, las plantas Col-0 crecidas a 18°C produjeron mayor cantidad de semillas comparadas con las crecidas a 23°C, pero en ambas condiciones fueron de similar tamaño. El efecto perjudicial observado de la temperatura más cálida sugiere que, para plantas anuales como Col-0, el ambiente más frío es el más favorable, lo que sería esperable dado el hábito de crecimiento de la especie (Authier *et al.* 2023). Estos resultados sugieren que la estrategia adaptativa sería producir semillas con más recursos (semillas más grandes) en detrimento del número de semillas en el ambiente más cálido y que el control de la correcta replicación del ADN (y sus mecanismos afectados río abajo) es necesario para regular el efecto.

Por otra parte, si bien el color de las semillas no fue objeto de un análisis cuantitativo en el presente estudio, la diferencia observada en las imágenes sugiere la posible influencia de la mutación *gis-5* en la pigmentación de la cubierta seminal. En *Arabidopsis thaliana*, la coloración de la cubierta está determinada en gran medida por la acumulación de proantocianidinas (PA), un tipo de flavonoide precursor de los pigmentos marrones (Chen *et al.*, 2014; MacGregor *et al.*, 2015). Los flavonoides son compuestos polifenólicos que colorean la mayoría de las flores, frutos y semillas. La regulación de los genes biosintéticos de los flavonoides está dirigida por complejos ternarios compuestos por los factores de transcripción MYB-bHLH-WD40 (Salez *et al.*, 2022). La regulación de la síntesis de flavonoides por bHLH ha sido ampliamente estudiada en plantas vasculares, y caracterizada más funcionalmente en *Arabidopsis* (Hong *et al.*, 2003, Nonogaky, 2014, Chen *et al.* 2019). Las alteraciones en la biosíntesis o acumulación de compuestos como las PA pueden generar variaciones en la germinación de las semillas gracias a un cambio en la permeabilidad de las cubiertas seminales (Nesi *et al.*, 2000, 2001, 2002). En las semillas de *Arabidopsis*, el gen *FT* regula la síntesis de PA frente al aumento de la temperatura del ambiente materno, y en consecuencia, la germinación final de la progenie (Chen *et al.*, 2014). El aumento de la temperatura en el mutante *gis-5* induce cambios en las marcas epigenéticas del gen *SEPALLATA3* (*SEP3*), lo que lleva a un aumento en la expresión de *SEP3* y, a su vez, un aumento en la expresión de *FT* (Iglesias *et al.*, 2015). En nuestras condiciones, *gis-5* podría estar mediando un incremento en *FT* tal que resultaría en una menor producción de PA y, en consecuencia, una mayor germinación. Por lo tanto, la mutación *gis-5* parece influir tanto en la pigmentación de la cubierta seminal como en la regulación de la dormición y germinación de las semillas a través de la modulación de las vías de señalización de flavonoides y *FT*. Estos hallazgos nos dan indicio de un papel pleiotrópico de *gis-5* en la adaptación de las plantas a las variaciones de temperatura, afectando tanto la apariencia de las semillas como su comportamiento germinativo.

5.3. Efecto de *gis-5* sobre la respuesta de germinación

La germinación está finamente regulada de forma ambiental, genética y epigenética (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En nuestro trabajo, observamos que la respuesta de las semillas *gis-5* es mayor (germinan más) que las de Col-0, y que esto estaría relacionado con una disminución en la sensibilidad al ABA. En particular, las semillas *gis-5* presentan una mayor tasa de germinación en presencia de bajas concentraciones de ABA en comparación con Col-0, lo que sugiere que la regulación mediada por GIS5 estaría relacionada con la respuesta a esta hormona. El ABA es una fitohormona clave en la regulación de la dormición de semillas y su respuesta al ambiente, y cuando es aplicada exógenamente puede inhibir la germinación. La vía de señalización del ABA comienza con la actividad de los receptores PYR/PYL/RCAR, una familia de 14 proteínas en *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Los receptores median la respuesta al ABA al interactuar con reguladores negativos río

abajo como las proteínas fosfatasa tipo 2C (PP2C) y antagonizar su acción. Dentro de estas PP2C, las más estudiadas son ABA-INSENSITIVE 1 (ABI1) y ABI2, identificadas originalmente en mutantes insensibles al ABA (Koornneef *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1997). Se ha demostrado que los mutantes *abi1-1* y *abi2-1*, caracterizados por mutaciones dominantes negativas, muestran dormición reducida y germinan más en presencia de ABA (Koornneef *et al.*, 1984; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), lo que sugiere una alteración en la señalización de esta hormona. En este sentido, la respuesta observada en *gis-5*, con una mayor tasa de germinación en presencia de ABA, podría estar relacionada con una reducción de la señalización del ABA con blanco todavía a identificar.

Por otra parte, luego de la dispersión, las semillas responden a señales ambientales, ajustando sus ciclos de dormición a las estaciones y determinando así el momento óptimo para el establecimiento de la planta. La dormición secundaria, un estado de quiescencia inducido por condiciones ambientales desfavorables en el banco del suelo, también se encuentra bajo la regulación del ácido abscísico (ABA). La expresión de genes involucrados tanto en la síntesis como en el catabolismo del ABA muestra un patrón cíclico durante el ciclo de la dormición (Footitt *et al.* 2011). Los patrones de expresión génica en el suelo juegan un papel crucial en la modulación de la dormición secundaria de las semillas, permitiéndoles adaptarse a las fluctuaciones ambientales (Footitt *et al.* 2011). Esto es particularmente relevante al considerar las semillas *gis-5*, caracterizadas por su insensibilidad al ABA. Es posible que la dinámica de germinación e imposibilidad de entrar en un estado de dormición secundaria inducida por estratificación por calor de las semillas *gis-5* esté directamente relacionada con la regulación diferencial de la vía de señalización de ABA.

Mientras que la insensibilidad al ABA es un factor clave en la germinación de las semillas *gis-5*, investigaciones futuras deberían incluir ensayos con concentraciones intermedias de ABA entre 0 y 1 μM , para caracterizar mejor la respuesta germinativa. Además, sería relevante explorar la posible contribución de la acumulación diferencial o la señalización aumentada de GA durante la imbibición, así como el ciclo de genes de síntesis y señalización de ABA y GA en condiciones naturales con dormición secundaria.

5.4. Influencia de la temperatura materna en la producción y respuesta de semillas de *gis-5*

Las plantas responden de forma plástica a los cambios estacionales, lo que a menudo resulta en adaptación a la variación ambiental. Si bien se sabe mucho sobre cómo la estacionalidad regula las transiciones del desarrollo dentro de las generaciones, los efectos transgeneracionales de los cambios ambientales no estresantes apenas comienzan a revelarse (Authier *et al.* 2023). Esta tesis tuvo como uno de sus objetivos evaluar los efectos de los cambios de temperatura ambiental en la expresión de la

plasticidad transgeneracional en rasgos clave del desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. En las condiciones de crecimiento usadas en este trabajo, no se logró obtener semillas de plantas *gis-5* cultivadas a 23°C durante todo su ciclo de vida, pero si cuando pre- o post-floración la temperatura era de 18°C. Los resultados mostraron que la producción de semillas en *gis-5* dependía de la temperatura a la que se encontraban las plantas antes y después de la floración. El gen represor del tiempo a floración *FLC* muestra un rol en la promoción de la germinación de semillas dependiente de la temperatura (Chiang *et al.*, 2009). La regulación de la germinación mediada por *FLC* actúa posteriormente a través de la vía de degradación de ABA y síntesis de GA en las semillas embebidas imbuídas (Chiantg *et. al* 2009). La expresión de *FLC* además está disminuida en la mutante *gis-5*; sin embargo, la mutación *flc* en el fondo *gis-5* no acelera la floración respecto a la simple mutante, sugiriendo que *FLC* actúa río arriba de *GIS5* (Iglesias *et al.*, 2015). Entonces es probable que la insensibilidad al ambiente materno por parte de las semillas *gis-5* esté relacionado con la mediación de *GIS5* en el control materno de la germinación por parte de *FLC*.

Conclusiones

En esta tesis de grado se caracterizó la mutante *gis-5*, una mutante termosensible con un ciclo de floración acelerado. Se observó que a 18°C su desarrollo y producción de semillas eran similares a Col-0, mientras que a 23°C presentaba un fenotipo alterado con hojas curvadas, menor cantidad de hojas y ausencia de producción de semillas, siendo esta última, un efecto que no había sido previamente documentado. Además, se identificaron nuevas características de *gis-5* como una mayor tasa de germinación en comparación con Col-0, diferencias en el color de las semillas, insensibilidad en respuesta al ácido abscísico (ABA) exógeno y menor dormición inducida por la estratificación por calor. Sumado a esto, se detectó una insensibilidad al ambiente de la planta madre en la respuesta temprana de la progenie. Todo junto indica un papel potencial de este gen en la transmisión de información transgeneracional, lo que podría influir en la adaptabilidad y aptitud de las plantas, sobre todo en un contexto de cambio climático.

Dada la relevancia de estos resultados, se considera fundamental continuar investigando *gis-5*, ya que podría aportar conocimientos clave sobre los mecanismos de regulación del desarrollo vegetal y su respuesta a condiciones ambientales cambiantes.

Proyecciones a futuro

En esta tesis de grado, los hallazgos sobre la mutante *gis-5* evidencian la necesidad de continuar su estudio, tanto en los mecanismos que regulan el desarrollo como en la respuesta a largo plazo de las plantas a cambios ambientales pasados.

Un aspecto no explorado en profundidad es el desarrollo radicular de *gis-5*. Si bien no se realizaron estudios específicos, se observó que las plantas cultivadas a 23°C presentaban un sistema radicular notablemente reducido, lo que sugiere que las alteraciones fenotípicas no se limitan a hojas y flores, sino que también afectan el crecimiento de las raíces.

Resulta relevante analizar el impacto de *gis-5* en la síntesis y acumulación de fitohormonas, especialmente para explorar el mecanismo de regulación en relación con la producción de pequeñas semillas de color más claro y en menor cantidad. Estos rasgos podrían estar asociados a variaciones en la concentración de PAs u otras señales reguladoras del desarrollo reproductivo.

Otro punto clave es la esterilidad de *gis-5*, ya que la falta de producción de polen podría estar vinculada a un mecanismo de regulación genética con aplicaciones en biotecnología, por ejemplo, en cultivos transgénicos donde se requiere evitar la dispersión de genes en poblaciones silvestres.

Finalmente, el estudio del híbrido *gis-5* × Col-0 permitiría comprender mejor la herencia de estos fenotipos y su interacción con el fondo genético silvestre, lo que podría aportar información valiosa sobre los mecanismos de adaptación en plantas. En particular, conociendo que la expresión de *FLC* está disminuida en *gis-5*, sería relevante el papel de la mutante *gis-5* en la información transgeneracional de información ambiental, particularmente en su interacción con *FLC* y su regulación con *FT*, lo que abriría la posibilidad de explorar su impacto en otras transiciones de desarrollo de la progenie y su respuesta a la temperatura.

Bibliografía

- Adamski N, Anastaslou E, Eriksson S, O'Neill C, Lenhard M, 2009 Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 20115–20120.
- Authier A, Pablo Cerdán, Gabriela Auge, Non-stressful temperature changes affect transgenerational phenotypic plasticity across the life cycle of *Arabidopsis thaliana* plants, *Annals of Botany*, Volume 132, Issue 7, 1 December 2023, Pages 1259–1270, <https://doi.org/10.1093/aob/mcad171>.
- Alvarez M, Bleich A, Donohue K. 2020. Genotypic variation in the persistence of transgenerational responses to seasonal cues. *Evolution* 74: 2265–2280.
- Auge GA , Blair LK , Burghardt LT , Coughlan J , Edwards B , Leverett LD , Donohue K. 2015. La dinámica de la latencia secundaria depende del estado de latencia primaria en *Arabidopsis thaliana* . *Seed Science Research* 25 : 230 – 246 .
- Auge GA, Blair LK, Neville H, Donohue K. 2017. Maternal vernalization and vernalization-pathway genes influence progeny seed germination. *New Phytologist* 216: 388–400.
- Auge G, Hankofer V, Groth M, Antoniou-Kourouniotti R, Ratikainen I, Lampei C. 2023. Plant Environmental Memory: Implications, Mechanisms, And Opportunities For Plant Scientists And Beyond. *AoB PLANTS*: plad032.
- Auge GA, Leverett LD, Edwards BR, Donohue K. 2017. Adjusting phenotypes via within- and across-generational plasticity. *New Phytologist*.
- Awan S, Footitt S, Finch-Savage WE. 2018. Interaction of maternal environment and allelic differences in seed vigour genes determines seed performance in *Brassica oleracea*. *The Plant Journal* 94: 1098–1108.
- Branzei D, Foiani M (2010) Mantenimiento de la estabilidad del genoma en la horquilla de replicación. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 208–219. pmid:20177396
- Burghardt LT, Edwards BR, Donohue K. 2016. Multiple paths to similar germination behavior in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 209: 1301–1312.
- Carrizo García, C., Nepi, M. & Pacini, E. It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms—a review. *Protoplasma* 254, 57–73 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0950-6>
- Chen M, MacGregor DR, Dave A, et al. 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* 111: 18787–18792.
- Chiang GCK, Barua D, Kramer EM, Amasino RM, Donohue K. 2009. Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 11661–11666.
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Avance técnico: análisis espacio-temporal de la actividad mitótica con una proteína de fusión lábil ciclina-GUS. *Plant J* 20: 503–508. pmid:10607302

- Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* (New York, N.Y.) 316: 1030–1033.
- Cutler, Adrian J and Krochko (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, Volume 4, Issue 12, 472 - 478
- Donohue K, Rubio de Casas R, Burghardt L, Kovach K, Willis CG. 2010. Germination, Postgermination Adaptation, and Species Ecological Ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 293–319.
- Edwards BR , Burghardt LT , Zapata-García M , Donohue K. 2016. Los efectos de la temperatura materna sobre la latencia influyen en las respuestas de germinación a la disponibilidad de agua en *Arabidopsis thaliana* . *Botánica ambiental y experimental* 126 : 55-67
- Fang W, Wang Z, Cui R, Li J, Li Y, 2012 Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 70: 929–939.
- Finch-Savage W.E. & Leubner-Metzger G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171, 501–523.
- Footitt S., I. Douterelo-Soler, H. Clay, & W.E. Finch-Savage, Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (50) 20236-20241, <https://doi.org/10.1073/pnas.1116325108> (2011).
- Garcia D, Saingery V, Chambrier P, Mayer U, Jurgens Get al. , 2003 *Arabidopsis* haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiol.* 131: 1661–1670.
- Gray SB, Brady SM. 2016. Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology* 419: 64–77.
- Groot MP, Kubisch A, Ouborg NJ, et al. . 2017. Transgenerational effects of mild heat in *Arabidopsis thaliana* show strong genotype specificity that is explained by climate at origin. *The New Phytologist* 215: 1221–1234.
- He H, Vidigal DdeS , Snoek LB , Schnabel S , Nijveen H , Hilhorst H , Bentsink L. 2014. La interacción entre el entorno parental y el genotipo afecta el rendimiento de las plantas y las semillas en *Arabidopsis* . *Journal of Experimental Botany* 65 : 6603 – 6615.
- Hedden P, The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis, *Plant and Cell Physiology*, Volume 61, Issue 11, November 2020, Pages 1832–1849, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>
- Hong, S. W., et al. (2003). The role of HSP101 in thermotolerance of *Arabidopsis* seeds during germination. *Plant Physiology*, 132(2), 948-956. DOI: 10.1104/pp.103.024158
- Hoyle RB, Ezard THG. 2012. The benefits of maternal effects in novel and in stable environments. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 2403–2413.
- Huang Z, Footitt S, Finch-Savage WE. 2014. The effect of temperature on reproduction in the summer and winter annual *Arabidopsis thaliana* ecotypes Bur and Cvi. *Annals of Botany* 113: 921–929.
- Iglesias FM, Bruera NA, Dergan-Dylon S, et al. 2015. The *Arabidopsis* DNA Polymerase δ Has a Role in the Deposition of Transcriptionally Active Epigenetic Marks, Development and Flowering. *PLOS Genetics* 11: e1004975.

- Iwasaki M, Penfield S, Lopez-Molina L. 2022. Parental and Environmental Control of Seed Dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 73: 355–378.
- Jaeger KE, Wigge PA. 2007. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current biology: CB* 17: 1050–1054.
- Kesavan M, Song J T, Seo H S, 2013 Seed size: a priority trait in cereal crops. *Physiol. Plant.* 147: 113–120.
- Larios E, Búrquez A, Becerra JX, Venable DL. 2014. Natural selection on seed size through the life cycle of a desert annual plant. *Ecology* 95: 3213–3220.
- Leung J., Merlot S. & Giraudat J. (1997) The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* 9, 759–771.
- Li R, Chen L, Wu Y, et al. . 2017. Effects of cultivar and maternal environment on seed quality in *Vicia sativa*. *Frontiers in Plant Science* 8: 1411.
- Lu JJ, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM. 2016. Effects of germination season on life history traits and on transgenerational plasticity in seed dormancy in a cold desert annual. *Scientific Reports* 6: 25076.
- Ma Y., Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A. & Grill E. (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068.
- MacGregor DR , Kendall SL , Florance H , Fedi F , Moore K , Paszkiewicz K , Smirnov N , Penfield S. 2015. La regulación de la temperatura de producción de semillas durante la latencia primaria se produce a través del control del metabolismo de fenilpropanoides en la cubierta de la semilla . *New Phytologist* 205 : 642 – 652 .
- Mathieu J, Warthmann N, Küttner F, Schmid M. 2007. Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current biology: CB* 17: 1055–1060.
- Nesi N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. y Lepiniec, L. (2000). El gen TT8 codifica una proteína con dominio hélice-bucle-hélice básico, necesaria para la expresión de los genes DFR y BAN en silicuas de *Arabidopsis* . *The Plant Cell*, 12 (10), 1863-1878. <https://www.plantcell.org>
- Nesi N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M. y Lepiniec, L. (2001). El gen TT2 de *Arabidopsis* codifica una proteína con el dominio R2R3 MYB que actúa como determinante clave para la acumulación de proantocianidinas en las semillas en desarrollo. *The Plant Cell*, 13 (9), 2099–2114. <https://www.plantcell.org>
- Nesi N., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, AJ, Jenkins, GI, Caboche, M. y Lepiniec, L. (2002). El locus TRANSPARENT TESTA16 codifica la proteína del dominio MADS de *ARABIDOPSIS* BSISTER y es necesario para el correcto desarrollo y pigmentación de la testa. *The Plant Cell*, 14 (10), 2463–2479. <https://www.plantcell.org>
- Nonogaki, H. (2017). Seed biology updates–highlights and new discoveries in seed dormancy and germination research. *Frontiers in Plant Science*, 8, 524.
- Park S.Y., Fung P., Nishimura N., et al. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.

- 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: 291–297.
- Postma FM, Ågren J. 2022. Effects of primary seed dormancy on lifetime fitness of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Annals of Botany* 129: 795–808.
- Sadras V O, 2007 Evolutionary aspects of the trade-off between seed size and number in crops. *Field Crops Res.* 100: 125–138.
- Salez, MA, González, JM, Bernacchini, JC et al. Sb TT8, un nuevo factor de transcripción bHLH de sorgo que rescata el fenotipo de la cubierta marrón de la semilla en plantas mutantes tt8 de *Arabidopsis* . *J. Plant Biol.* 65 , 473–485 (2022).
- Sajeev N, Maarten Koornneef, Leónie Bentsink, A commitment for life: Decades of unraveling the molecular mechanisms behind seed dormancy and germination, *The Plant Cell*, Volume 36, Issue 5, May 2024, Pages 1358–1376, <https://doi.org/10.1093/plcell/koad328>
- Suter L, Widmer A. 2013a. Environmental heat and salt stress induce transgenerational phenotypic changes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8: e60364.
- Turk F, Fornara F, Coupland G. 2008. Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annual Review of Plant Biology* Volume 59. 573-594. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755>
- Tzafrir I, Pena-muralla R, Dickerman A, Berg M, Rogers Ret al. , 2004 Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 1206–1220.
- Valencia-Díaz S, Montaña C. 2005. Temporal variability in the maternal environment and its effect on seed size and seed quality in *Flourensia cernua* DC (Asteraceae). *Journal of Arid Environments* 63: 686–695.
- Van Daele I, Gonzalez N, Vercauteren I, de Smet L, Inzé Det al. , 2012 A comparative study of seed yield parameters in *Arabidopsis thaliana* mutants and transgenics. *Plant Biotechnol. J.* 10: 488–500.
- Whittle CA, Otto SP, Johnston MO, Krochko JE. 2009. Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. *Botany* 87: 650–657.
- Wang Yo,Wang HL,Zhang K,Tian CI. 2015.Efectos de la disponibilidad materna de nutrientes y agua sobre la producción, tamaño y germinación de semillas de *Atriplex aucheri* heterocárpica.*Ciencia y tecnología de las semillas* 43:71–79.
- Wolfe MD, Tonsor SJ. 2014. Adaptation to spring heat and drought in northeastern Spanish *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* 201: 323–334.
- Zacchello G, Vinyeta M, Ågren J. 2020. Strong stabilizing selection on timing of germination in a Mediterranean population of *Arabidopsis thaliana*. *American Journal of Botany* 107: 1518–1526.
- Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany* 61: 1959–1968.

Anexo

Tabla 1. Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada (variable respuesta) a los distintos días de incubación a 37°C (‘día’) para semillas de cada uno de los genotipos (‘geno’) provenientes de plantas madre crecidas bajo condiciones de 18°C y 23°C (‘mat’) e incubadas también a 18 y 23°C (‘inc’). Se muestran el estadístico X^2 , los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas 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 ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

	X^2	Df	P-valor	
geno	344.648	1	6.20×10^{-77}	***
día	107.236	1	3.95×10^{-25}	***
mat	533.132	1	5.88×10^{-118}	***
inc.	82.992	1	8.23×10^{-20}	***
geno x día	14.182	1	1.6×10^{-3}	***
día x mat	4.156	1	0.04	*
geno x inc	20.902	1	4.83×10^{-6}	***
día x inc	12.171	1	0.0005	***
mat x inc	3.077	1	0.079	ns

Tabla 2. Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada a los distintos días de incubación a 37°C para semillas de cada uno de los genotipos provenientes de plantas madre crecidas bajo condiciones de 18°C y 23°C. Se muestran el estadístico X^2 , los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas 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 ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Gen: efecto del genotipo, Mat: efecto del tratamiento materno, Df: grados de libertad.

		X^2	Df	P-valor	
18C	geno	105.597	1	$9.03 \cdot 10^{-25}$	***
	mat	231.772	2	$4.69 \cdot 10^{-51}$	***
	geno x mat	16.163	2	$3.09 \cdot 10^{-4}$	***
23C	geno	110.762	1	$6.67 \cdot 10^{-26}$	***
	mat	399.229	2	$2.03 \cdot 10^{-87}$	***
	geno x mat	38.428	2	$4.52 \cdot 10^{-9}$	***

Tabla 3. Tabla de contrastes en la proporción de germinación debido al genotipo (Col-0 vs. *gls-5*) luego de la pre-incubación a 37°C para semillas incubadas a 18°C y 23°C (columna ‘inc’). Se muestran el estadístico X^2 , los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas 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 ns ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

inc.	dia HS	X ²	Df	P-valor	P-valor ajustado	
18	0	0	1	1	1	ns
	1	20.275	1	6.703 x10 ⁻⁶	2.011 x10 ⁻⁵	***
	4	70.959	1	3.646 x10 ⁻¹⁷	1.458 x10 ⁻¹⁶	***
	7	103.565	1	2.519 x10 ⁻²⁴	1.511 x10 ⁻²³	***
23	0	0	1	1	1	ns
	1	114.840	1	8.530 x10 ⁻²⁷	5.971 x10 ⁻²⁶	***
	4	182.589	1	1.318 x10 ⁻⁴¹	1.054 x10 ⁻⁴⁰	***
	7	75.808	1	3.126 x10 ⁻¹⁸	1.563 x10 ⁻¹⁷	***

Tabla 4. Tabla de contrastes en la proporción de germinación debido al tratamiento materno (18°C vs 23°C) luego de la pre-incubación a 37°C para semillas de Col-0 incubadas a 18°C y 23°C (columna ‘inc’). Se muestran el estadístico X², los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas se indican de la siguiente manera: ‘****’ (0≤P-valor<0,001), ‘***’ (0,001≤P-valor<0,01), ‘**’ (0,01≤P-valor<0,05) y ns (0,05≤P-valor).

inc.	dia HS	X ²	Df	P-valor	P-valor ajustado	
18	0	0	1	1	1	ns
	1	20.275	1	6.703 x10 ⁻⁶	2.011 x10 ⁻⁵	***
	4	70.959	1	3.646 x10 ⁻¹⁷	1.458 x10 ⁻¹⁶	***
	7	103.565	1	2.519 x10 ⁻²⁴	1.511 x10 ⁻²³	***
23	0	0	1	1	1	ns
	1	114.840	1	8.530 x10 ⁻²⁷	5.971 x10 ⁻²⁶	***
	4	182.589	1	1.318 x10 ⁻⁴¹	1.054 x10 ⁻⁴⁰	***
	7	75.808	1	3.126 x10 ⁻¹⁸	1.563 x10 ⁻¹⁷	***

Tabla 5. Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada (variable respuesta) para semillas de cada uno de los genotipos (‘geno’) provenientes de plantas madre crecidas bajo las cuatro combinaciones de condiciones de 18°C y 23°C (‘mat’) e incubadas también a 18 y 23°C (‘inc’). Se muestran el estadístico X², los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas se indican de la siguiente manera: ‘****’ (0≤P-valor<0,001), ‘***’ (0,001≤P-valor<0,01), ‘**’ (0,01≤P-valor<0,05) y sin caracteres (0,05≤P-valor).

	X ²	Df	P-valor	
geno	105.60	1	9.03x10 ⁻²⁵	***
mat	231.77	2	4.69x10 ⁻⁵¹	***
inc	21.04	1	4.50x10 ⁻⁰⁶	***
geno x mat	16.16	2	3.09x10 ⁻⁰⁴	***
geno x inc	0.02	1	0.87	ns
mat x inc	8.17	2	0.02	*
geno x mat x inc	3.74	2	0.15	ns

Tabla 6. Tabla de contrastes entre la proporción de germinación observada para semillas de cada uno de los genotipos ('geno') provenientes de plantas madre crecidas las cuatro combinaciones de condiciones de 18°C y 23°C ('mat'). Se muestran el estadístico X^2 , los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas 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 ($0,05 \leq P\text{-valor}$). Geno: efecto del genotipo, Mat: efecto del tratamiento materno, Df: grados de libertad.

inc.		X^2	Df	P-valor	
18°C	geno	105.60	1	9.03×10^{-25}	***
	mat	231.77	2	4.69×10^{-51}	***
	geno x mat	16.16	2	3.09×10^{-04}	***
23°C	geno	110.76	1	6.67×10^{-26}	***
	mat	399.23	2	2.03×10^{-87}	***
	geno x mat	38.43	2	4.52×10^{-09}	***

Tabla 7. Tabla de contrastes en la proporción de germinación debido al tratamiento materno (las cuatro combinaciones de condiciones de 18°C y 23°C) para semillas de ambos genotipos (columna 'geno') incubadas a 18°C y 23°C (columna 'inc'). Se muestran el estadístico X^2 , los grados de libertad (Df) y el p-valor. Las diferencias significativas 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 ns ($0,05 \leq P\text{-valor}$).

geno	inc	X^2	Df	P-valor	
Col-0	18	231.77	2	4.69×10^{-51}	***
	23	399.23	2	2.03×10^{-87}	***
<i>gis-5</i>	18	5.06	2	0.08	ns
	23	48.54	2	2.88×10^{-11}	***

Por medio de la presente, se deja constancia de que el presente manuscrito corresponde a la versión final de la tesis titulada:

“Mecanismos asociados a los efectos transgeneracionales en *Arabidopsis thaliana*”

Este documento incorpora todas las correcciones y sugerencias realizadas por los jurados evaluadores, en cumplimiento de los requerimientos establecidos por el comité académico y conforme a los criterios de calidad exigidos por el programa.

Firmamos en señal de conformidad:



Firma Autor

Franco Gomez Rodriguez

Aclaración



Firma Directora

Gabriela Auge

Aclaración