

**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

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 Polδ 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.

Palabras clave: *Efectos transgeneracionales; Arabidopsis thaliana; Mutante termosensible; GIS-5; Gigantea Suppressor 5; Temperatura materna; Germinación; Plasticidad fenotípica; Ácido abscísico (ABA); Regulación epigenética; Generación de híbridos; Dormición.*

Keywords: *Transgenerational effects; Arabidopsis thaliana; Thermosensitive mutant; GIS-5; Gigantea Suppressor 5; Maternal temperature; Germination; Phenotypic plasticity; Absciscic acid (ABA); Epigenetic regulation; Hybrid generation; Dormancy.*