

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

Origen y función del ARN largo no codificante *APOLO* de *Arabidopsis thaliana*

María Florencia Mammarella

Director de Tesis: Dr. Federico D. Ariel

Co-director de Tesis: Dr. Leandro E. Lucero

Laboratorio de Epigenética y ARNs no codificantes

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2024-

AGRADECIMIENTOS

Después de estos 5 años de recorrido quiero agradecer...

a la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por darme la posibilidad de realizar mis estudios de posgrado.

a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y el CONICET por haber financiado este posgrado.

al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por haberme brindado un espacio de trabajo y acercarme a la comunidad científica.

al Dr. Federico Ariel por confiar en mí desde el principio para formar parte de su grupo, por compartir sus conocimientos y su pasión por la ciencia. Gracias por la motivación y el apoyo de siempre. Sin dudas no hubiese podido tener mejor director.

al Dr. Leandro Lucero por aportar siempre a la discusión y codirigir este trabajo de tesis.

al resto del EPILAB por los aportes no sólo científicos, por el compañerismo y la buena onda diaria, por las charlas y los mates.

a mis amigos de siempre, de la facu y del IAL por el aguante de siempre y por hacer este camino más fácil. Gracias por cada momento compartido y por festejar como propio cada logro.

a mi familia por apoyarme y acompañarme siempre. Gracias por demostrarme que puedo lograr lo que me proponga.

a Lautaro por bancarme en las malas y acompañarme y festejar conmigo las buenas. Gracias por hacer que sea todo más fácil y divertido.

APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis dieron lugar a la siguiente publicación científica:

MF Mammarella, L Lucero, N Hussain, A Muñoz-Lopez, Y Huang, L Ferrero, GL Fernandez-Milmanda, P Manavella, M Benhamed, M Crespi, CL Ballaré, J Gutiérrez Marcos, P Cubas, F Ariel. (2023) Long noncoding RNA-mediated epigenetic regulation of auxin-related genes controls shade avoidance syndrome in Arabidopsis. *EMBO J.* 42(24):e113941.

Además, durante el desarrollo de la tesis participé en las siguientes publicaciones:

F Ariel, L Lucero, A Christ, **MF Mammarella**, T Jegu, A Veluchamy, K Mariappan, D Latrasse, T Blein, C Liu, M Benhamed, M Crespi. (2020) R-Loop Mediated *trans* Action of the *APOLO* Long Noncoding RNA. *Molecular Cell.* 77:1–11.

L Gonzalo, I Tossolini, T Gulanicz, DA Cambiagno, A Kasprowicz-Maluski A, DJ Smolinski, **MF Mammarella**, F Ariel, S Marquardt, Z Szweykowska-Kulinska, A Jarmolowski, P Manavella. (2022) R-loops at microRNA encoding loci promote co-transcriptional processing of pri-miRNAs in plants. *Nature Plants.* 8:402–418

Y Huang, J An, S Sircar, C Bergis, C Dias Lopes, X He, B Da Costa, FQ Tan, J Bazin, J Antunez-Sanchez, **MF Mammarella**, RS Devani, R Brik-Chaouche, A Bendahmane, F Frugier, C Xia 4, C Rothan, AV Probst, Z Mohamed, C Bergounioux, M Delarue, Y Zhang, S Zheng, M C, S Fragkostefanakis, MM Mahfouz, F Ariel, J Gutierrez-Marcos, C Raynaud, D Latrasse, M Benhamed. (2023) HSF1a modulates plant heat stress responses and alters the 3D chromatin organization of enhancer-promoter interactions. *Nat Commun.* 14(1):469.

J Rodríguez Melo, **MF Mammarella**, F Ariel. (2023) Exogenous RNAs: promising tools for the second green revolution. *Journal of Experimental Botany.* 74(7):2323–2337.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	8
Resumen	13
Introducción	16
Epigenética: el control de los genes por sobre la genética	16
Los ARNs no codificantes	18
ARNs largos no codificantes	20
Función fisiológica de los ARNlnc	22
El ARN largo no codificante <i>APOLO</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Uso de ARNs exógenos como potencial herramienta biotecnológica	25
Origen de los ARNlnc y conservación entre especies	26
Objetivos	28
Objetivos específicos	28
Capítulo 1. Función molecular y fisiológica del ARNlnc <i>APOLO</i>	29
Introducción	29
La ramificación del tallo como respuesta a la disponibilidad de luz depende del gen <i>BRC1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
La respuesta de hiponastía al sombreado depende de las fitohormonas auxinas	31
Objetivos	33
Materiales y métodos	34
Material vegetal	34
Caracterización del fenotipo de ramificación	34
Caracterización del fenotipo de hiponastía	35

Tinción histoquímica (guses)	35
Extracción de ARN y tratamiento con DNAsa	35
Retrotranscripción y cuantificación por PCR en tiempo real	36
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	36
Aislamiento de la cromatina por purificación de ARN (ChIRP)	37
Ensayo de inmunopurificación de dúplex ADN-ARN (DRIP)	37
Ensayo de Captura de Conformación de la Cromatina (3C)	37
Transcripción <i>in vitro</i> de ARN y ensayo de spray	38
Resultados	39
Estudio de la regulación de la ramificación mediada por el ARNinc <i>APOLO</i>	39
El control del número de ramas también depende de LHP1 y de la deposición de H3K27me3	42
<i>APOLO</i> regula epigenéticamente la expresión del gen <i>BRANCHED1 (BRC1)</i>	43
<i>APOLO</i> regula la expresión de <i>BRC1</i> en el contexto de sombreado	49
<i>APOLO</i> modula la respuesta de hiponastía de las hojas ante la exposición al rojo lejano	53
La aplicación exógena del ARN <i>APOLO</i> transcripto <i>in vitro</i> altera la homeostasis de auxinas de las plantas y la respuesta al rojo lejano	54
Discusión y conclusiones	58
Capítulo 2. El origen de <i>APOLO</i>	64
Introducción	64
Objetivos	68
Materiales y métodos	69
Material vegetal	69
Cepas bacterianas	69

Vectores	69
Medios de cultivos para <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	70
Búsqueda de secuencias	70
Análisis filogenéticos	70
Análisis bioinformáticos	71
Inmunoprecipitación del ARN (RIP)	71
Ensayo de inmunoprecipitación de dúplex ADN-ARN (DRIP)	72
Extracción de ADN genómico	72
Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	72
Electroforesis de ADN en gel de agarosa	73
Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa	73
Minipreparación de ADN plasmídico	73
Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	74
Ligación de moléculas de ADN	74
Generación de las construcciones génicas	74
Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	75
Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación	75
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico por electroporación	75
Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
Selección de plantas transformadas	76
Análisis del fenotipo de tiempo de floración	76
Resultados	77
<i>APOLO</i> pertenece a una familia de ARNinc que solo se encuentra en el género <i>Arabidopsis</i>	77

Los ARNInc pertenecientes al clado 1 A presentan características similares en cuanto a sus secuencias	79
Existe una correlación entre la expresión de los <i>Aly_APOLOs</i> y sus genes vecinos, al igual que entre <i>Ath_APOLO1</i> y <i>PID</i>	85
Los miembros de APOLO integrarían complejos moleculares similares entre especies	86
La función fisiológica de los miembros de APOLO estaría conservada entre especies	89
Discusión y conclusiones	91
Conclusiones generales	94
Anexo	95
Bibliografía	97

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

35S Promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (también denominado CaMV35S)

3C Captura de la conformación de la cromatina

3D Tres dimensiones/tridimensional

°C grados Celsius

µg microgramo/s

µl microlitro/s

µm micrómetro

µmol micromol/es

A Adenina

AA aminoácido/s

A. thaliana/ lyrata/ haleri Arabidopsis thaliana/ lyrata/haleri

ABA Ácido Abscísico

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc ADN copia

ADNdc ADN doble cadena

ARN Ácido ribonucleico

ARNlinc ARN largo no codificante intergénico

ARNlnc ARN largo no codificante

ARNm ARN mensajero

ARNP II ARN Polimerasa II

ARNP IV ARN Polimerasa IV

ARNP V ARN Polimerasa V

ATP adenosín trifosfato

C citosina

ChIP Inmunoprecipitación de la cromatina

ChIRP Aislamiento de la cromatina por purificación de ARN

CK citoquininas

cm centímetro

col. colaboradores

Col-0 ecotipo Columbia

dNTPs desoxirribonucleótidos trifosfato

DRIP Inmunoprecipitación del dúplex ADN:ARN

DR5 promotor de respuesta a auxinas

FR *far red*, rojo lejano

g fuerza centrífuga relativa

g gramo

G guanina

GA Giberelinas

GFP proteína fluorescente verde

GR24 Estrigolactona sintética

GUS β -glucuronidasa

h hora

IGB del inglés, Integrated Genome Browser

IgG Inmunoglobulina G

Kb kilobases

l litro

LB medio de cultivo Luria Bertani

LINE del inglés, long interspersed elements

LTR long terminal repeat

m metro

M Molar

mg miligramo

MgCl₂ Cloruro de magnesio

miARN microARN

ml mililitro

mM miliMolar

NAA 1-Naphthaleneacetic acid, Auxinas sintéticas

NaCl Cloruro de sodio

NaOH Hidróxido de sodio

ND No detectado

ng nanogramo

nt nucleótidos

ORF marco abierto de lectura

p/v peso en volumen

pb pares de bases

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PRC1 Complejo represivo Polycomb1

PRC2 Complejo represivo Polycomb2

PTGS regulación post-transcripcional de la expresión génica

qPCR PCR en tiempo real

R red, rojo

RdDM metilación del ADN dirigida por ARN

RDR2 ARN Polimerasa dependiente de ARN

RIP Inmunoprecipitación del ARN

RNAi ARN de interferencia

rpm revoluciones por minuto

rRNA ARN ribosomal

RT Transcripción reversa

s segundo

sARN ARN pequeño

SAS shade avoidance syndrome, síndrome de sombreado

siARN ARN pequeño de interferencia

SL estrigolactona

T Timina

T6P Trehalosa 6-fosfato

TAE Solución Tris-acético-EDTA

TAIR The Arabidopsis Information Resource

TE elemento transponible

TF factor de transcripción

TGS regulación transcripcional de la expresión génica

Tm temperatura de fusión

tRNA ARN de transferencia

U unidad internacional de actividad enzimática

UTR untranslated region

UV luz ultravioleta

V voltios

VLP virus like particles

v/v volumen en volumen

WT genotipo salvaje

X-Gluc 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido

RESUMEN

La luz es indispensable para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es por esto que presentan diferentes sistemas de captación y señalización que les permite ser capaces de modificar su arquitectura en función de alcanzar la absorción necesaria. Un mecanismo muy estudiado por el cual las plantas que perciben sombra pueden modificar su morfología y de esta manera dejar de ser sombreadas, se conoce como *shade avoidance syndrome* o síndrome de sombreado. Este mecanismo genera diferentes modificaciones fenotípicas dependiendo del estadio de la planta y es altamente regulado por numerosos actores.

Analizando el fenotipo integral que presentan las plantas de *Arabidopsis thaliana* cuando se desregula la expresión del ARN largo no codificante *APOLO* se observó que presentan similitudes con algunos de los fenotipos observados durante el síndrome de sombreado, como son la alteración en el número de ramificaciones y en la respuesta de hiponastía, que consiste en el movimiento de las hojas hacia arriba, en busca de luz. Por este motivo es que se planteó analizar si *APOLO* se encuentra involucrado en la regulación del síndrome de sombreado. Para ello se estudió tanto su expresión como el mecanismo molecular mediante el cual actúa, en condiciones de luz normal y en condiciones simulando el sombreado. Se observó que, en condiciones de sombreado, *APOLO* regula la expresión de *BRC1*, el principal regulador de la ramificación, a través de la formación de *R-loops* y la modulación de un *loop* o bucle de cromatina que abarca y regula su región promotora. Además, en estas mismas condiciones se vio que *APOLO* modula la expresión de genes involucrados en la síntesis y transporte de auxinas y, de esta forma, regula la respuesta de hiponastía.

Por otro lado, se observó que el fenotipo de alteración en la respuesta de hiponastía, generado por la desregulación de los niveles de expresión de *APOLO*, también se consigue con el agregado exógeno de este ARNinc. Con este resultado se abre la puerta a nuevas estrategias para modular el desarrollo de las plantas y sus respuestas al ambiente mediante la aplicación de ARNinc epigenéticamente activos.

Además de lo relacionado con la función de *APOLO*, en este trabajo de tesis se intentó ahondar acerca de su origen y evolución. Existen pocos estudios sobre el origen de los ARNinc en plantas y su evolución. Algunos se enfocan en las secuencias nucleotídicas, a pesar de que estos ARNs son muy variables. Otros, considerando la poca conservación de secuencias que existe entre especies y lo altamente estructurados que son, analizan las estructuras que adoptan al plegarse. Sin embargo, a pesar de que algunos autores sugieren que es la estructura y no la secuencia lo que determina la función de estos ARNs, existen pocas estructuras de ARNinc de plantas resueltas hasta el momento y las predicciones bioinformáticas no suelen ser muy confiables. Para el caso de *APOLO*, no se conoce por el momento la estructura secundaria que adopta. Es por esto que, para comenzar, el estudio se

basó en su secuencia. Se observó que existe una familia de ARNlnc *APOLO* que está presente sólo en el género *Arabidopsis*, con distinta cantidad de miembros por especie. Además, se sugirió que existe conservación de función, al menos entre algunos miembros de *APOLO* de *A. lyrata* y *A. thaliana* más cercanos filogenéticamente.

Light is essential for plant growth and development. This is why they rely on different uptake and signaling systems that allow them to modify their architecture to achieve the necessary absorption. A well-studied mechanism by which plants sense shade and modify their morphology in order to stop being shaded is the shade avoidance syndrome. This response triggers different phenotypic modifications depending on the plant age and is highly regulated by numerous actors.

Analyzing the phenotype that *Arabidopsis thaliana* plants present when the long noncoding RNA *APOLO* is deregulated, it was observed that they present similarities with some of the phenotypes observed during the shade avoidance syndrome, such as the alteration in the number of branches and hyponasty. For this reason, it was proposed to analyze whether *APOLO* is involved in the regulation of shade avoidance syndrome. To this end, both its expression and the molecular mechanism by which it acts were studied, in normal light conditions and in conditions simulating shade. It was observed that, under shade conditions, *APOLO* regulates the expression of *BRC1*, the main regulator of shoot branching, through R-loop formation and the modulation of a chromatin loop that encompasses its promoter. Furthermore, under the same conditions, it was seen that *APOLO* modulates the expression of genes involved in auxin synthesis and transport and, in this way, regulates the hyponasty response.

On the other hand, it was observed that the phenotype of hyponasty alteration, generated by *APOLO* deregulation, was also achieved with the exogenous addition of this lncRNA. This result opens wide perspectives to new strategies to modulate plant growth and their responses to the environment through the application of epigenetically active lncRNAs.

In addition to *APOLO* function, in this thesis we attempted to delve into its origin and evolution. There are few studies on the origin of lncRNAs in plants and their evolution. Some focus on nucleotide sequences, even though these RNAs are highly variable. Others, considering the poor sequence conservation that exists across species and how highly structured they are, analyze the structures they adopt when folding. However, although some authors suggest that it is the structure and not the sequence what determines the function of these RNAs, there are few plant lncRNA structures solved to date and bioinformatic predictions are usually not very reliable. For *APOLO*, the secondary structure it adopts remains unknown. Thus, we began our study based on its sequence. It was observed that there exists an *APOLO* lncRNA family that is present only in *Arabidopsis* genus, with different numbers of

members per species. Furthermore, it was suggested that there is function conservation, at least between the phylogenetically closest members of *APOLO* in *A. lyrata* and *A. thaliana*.

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados en las últimas décadas han señalado la presencia de grandes cantidades de ARN transcrito que no codifica proteínas (ENCODE Project Consortium, (Dunham et al., 2012)). Se estima que el 97% del genoma humano es transcrito a ARN, mientras que sólo un 2% aproximadamente de esta fracción contiene exones que codifican proteínas. Este porcentaje de genes codificantes, relativo al tamaño total del genoma, varía dependiendo de las especies. Por ejemplo, la planta modelo *Arabidopsis thaliana* presenta un genoma en donde alrededor del 25% codifica proteínas. Este porcentaje es alto comparado con humanos, pero también es alto comparado con otras especies de plantas como trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*) y *Arabidopsis lyrata* que es una especie cercana (Chorostecki et al., 2023). Durante muchos años, a esta porción del genoma que puede ser transcrita en ARN, pero luego no es traducida se la llamó “ADN basura” o “materia oscura” y se creyó que no cumplía ninguna función, más allá de representar un posible reservorio de potenciales mutaciones que contribuyan a la aparición de genes funcionales a lo largo de la evolución (Mattick, 1994). Más recientemente, y con el surgimiento de nuevas tecnologías de secuenciación, se conformó un nuevo campo de estudio dedicado a la biología y la bioquímica de los ARNs no codificantes, con el fin de dilucidar sus funciones biológicas y los mecanismos moleculares en los que participan.

Epigenética: el control de los genes por sobre la genética

La mayoría de las estructuras celulares, incluido el núcleo, fueron descubiertas y descritas morfológicamente mediante microscopía (Rodríguez-Granados et al., 2016). Sin embargo, los ácidos nucleicos fueron tradicionalmente estudiados desde una perspectiva fisiológica y molecular, ignorando inicialmente su distribución y organización espacial en el núcleo (Cavalli & Misteli, 2013). En la última década, varios trabajos han contribuido a dilucidar los principios y las funciones de la topología del genoma. Se determinó que el ADN se encuentra altamente plegado formando un complejo con proteínas histonas en el núcleo celular. Este complejo, dinámico pero estable, se denomina cromatina. La compactación y conformación que adopta la cromatina permite o no la accesibilidad al ADN afectando así la disponibilidad de los genes para ser transcritos (Kakoulidou et al., 2021).

La epigenética es el campo de estudio de aquellos cambios en la expresión génica que no están asociados con cambios en la secuencia de ADN, es decir, de la información genética. El término epigenética (epi, en griego, significa “por sobre”), fue inicialmente acuñado con el fin de describir aquellas características que son heredables y estables, aunque en la actualidad, el término se ha resignificado y se refiere de manera general a las modificaciones que generan cambios en el estado de la cromatina que permite que esta esté más o menos compacta y determinan así cuándo y dónde se

expresan o silencian los genes (Agarwal et al., 2020). Dentro de esas modificaciones, denominadas modificaciones o marcas epigenéticas se encuentra la metilación del ADN y la modificación postraduccional de histonas, que se conjugan con las proteínas remodeladoras de la cromatina y los ARNs.

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a una citosina llevada a cabo por enzimas ADN metiltransferasas sin alterar la secuencia del ADN. La metilación se puede dar en 3 contextos dependiendo de qué metiltransferasa actúe, a saber: CG, CHG y CHH (H = A, T, o C). Se ha observado mayor metilación del ADN en regiones de alta densidad de elementos repetitivos (Zhang et al., 2006), por lo que se asocia a una configuración cerrada de la cromatina, con baja actividad transcripcional. Por otro lado, el ADN puede ser demetilado por la acción de enzimas demetilasas y de esta forma la cromatina adopta una conformación más laxa (Agarwal et al., 2020).

En cuanto a las histonas, existen variantes específicas que son intercambiadas con las canónicas para regular respuestas transcripcionales durante el desarrollo o bajo diferentes condiciones ambientales (Agarwal et al., 2020). Además, las histonas contienen colas de algunos aminoácidos que pueden sufrir modificaciones postraduccionales como metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, biotilación, ribosilación y deaminación. Dentro de las más estudiadas se encuentran la metilación y acetilación de residuos de lisina en las histonas H3 y H4. La acetilación neutraliza las cargas induciendo una conformación abierta de la cromatina, facilitando el acceso de los factores de transcripción y otras proteínas de unión al ADN como las polimerasas para activar la transcripción en esa región. Este proceso es llevado a cabo por enzimas acetiltransferasas (HATs), mientras que el proceso contrario es realizado por deacetilasas (HDACs). La metilación puede darse de 3 formas dependiendo de la cantidad de grupos metilos que se agreguen: mono (1), di (2) o trimetilación (3). Los resultados de este proceso pueden ser la activación de la transcripción o el silenciamiento, que dependen de la combinación de cuál es el residuo metilado y el grado de metilación. Las marcas más estudiadas son H3K9me_{2/3} y H3K27me₃ que son represivas y H3K4me₃ y H3K36me_{2/3} que son activadoras (Agarwal et al., 2020).

En lo que respecta a las proteínas remodeladoras, las proteínas del grupo Polycomb (PcG) actúan como coordinadores esenciales del desarrollo en eucariotas. En animales, estas proteínas son conocidas por regular la expresión de genes homeóticos y la arquitectura del genoma modificando la conformación de la cromatina de una manera específica en el espacio y el tiempo. Las proteínas PcG forman Complejos Represivos Polycomb (PRC) que, en general, catalizan diferentes modificaciones de histonas y regulan el estado transcripcional de los genes blanco (Rodríguez-Granados et al., 2016). Existen dos complejos principales, el PRC1 y el PRC2. El PRC1 participa en el agregado de ubiquitina a una lisina de la histona H2A. El complejo PRC2 se encarga del agregado de grupos metilo en la lisina 27 de la histona H3. Si bien existe conservación de la actividad enzimática de estos complejos entre

animales y plantas, el complejo PRC1, tal como fue descrito en animales, no está conservado en plantas dado que no se han encontrado proteínas homólogas para todos los componentes. Sin embargo, se ha propuesto un complejo de tipo PRC1 en plantas que está formado por proteínas con funciones similares a las del de animales y la proteína específica de plantas LIKE-HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) (Hennig & Derkacheva, 2009). Además, en plantas no existen muchas proteínas accesorias confirmadas y se desconoce si pueden formar distintas variantes de complejos como ocurre en vertebrados. Sin embargo, se estima que de esta forma podrían existir complejos especializados que actúen en diferentes tejidos o etapas de desarrollo. En cuanto al complejo PRC2, en *Arabidopsis* se han encontrado homólogos para todas las subunidades. Siendo la proteína CURLY LEAF (CLF) la metiltransferasa de histona encargada de depositar la marca H3K27me3 y la demetilasa de histona RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6) la encargada de remover esta marca (Baile et al., 2022).

Se sabe que la proteína de *Arabidopsis thaliana* LHP1 está involucrada en reconocer, mantener y expandir la marca epigenética H3K27me3 e interactúa con miembros de los complejos PRC1 y PRC2. Además, se ha demostrado que LHP1 reconoce ARNs *in vitro* e *in vivo* (Ariel et al., 2014; Berry et al., 2017; Roulé et al., 2022) y que participa en la organización de la cromatina a diferentes niveles, desde las compactaciones locales más simples hasta las configuraciones tridimensionales, afectando la disponibilidad de los genes para la maquinaria transcripcional (Veluchamy et al., 2016).

Todas estas modificaciones, junto con la acción de los ARNs, están altamente relacionadas y actúan de forma conjunta para coordinar la actividad génica a nivel transcripcional y, de esta manera, regular diferentes procesos celulares como la replicación y reparación del ADN, el establecimiento de la identidad de una célula, el desarrollo y diferenciación de tejidos y órganos, así como también responder frente a estímulos ambientales. La estabilidad de estos cambios es esencial para mantener una memoria epigenética, mientras que su naturaleza reversible le confiere plasticidad para responder adecuadamente y adaptarse a estímulos internos o ambientales (Kakoulidou et al., 2021).

Los ARNs no codificantes:

El genoma no codificante abarca una abundante cantidad de ARNs no codificantes con demostradas funciones biológicas. Estos pueden ser clasificados en dos grupos principales, de acuerdo con su longitud: en ARNs pequeños (sARN) y ARNs largos (ARNlnc) (Waseem et al., 2021).

En plantas, los sARNs están involucrados en la regulación del crecimiento y la reproducción, el control de la actividad de transposones y en la respuesta adaptativa frente a estreses bióticos y abióticos.

Este grupo, a su vez, se puede subdividir en dos clases: los microARNs (miARNs) de 20-22 nucleótidos (nt) y los ARNs pequeños de interferencia (siARN) de 21 a 24 nt.

La transcripción de loci endógenos genera precursores de ARN doble cadena que pueden ser procesados en miRNAs, capaces de regular ARNs mensajeros (ARNm) específicos por silenciamiento génico post transcripcional (PTGS). En las plantas, este silenciamiento consiste, principalmente, en el clivaje y degradación del ARN asociado. Por otro lado, ARNs doble cadena producidos por ARN Polimerasa dependiente de ARNs pueden generar siARNs que median el silenciamiento génico post transcripcional (PTGS) actuando en *trans* o transcripcional (TGS) a través de la metilación del ADN dependiente de ARN (RdDM). Además de estos roles en el silenciamiento génico, también están involucrados en la reparación del ADN y el splicing de pre-ARNm (Chorostecki et al., 2023).

Los ARNs largos no codificantes (ARNlnc) tienen una longitud superior a 200 nt y poseen poco o nulo potencial de codificación de proteínas. Pueden ser clasificados según su posición con respecto a genes codificantes (Figura 1). Los antisentido comienzan dentro o en el extremo 3' de un gen codificante, se transcribe en la dirección opuesta y se superpone al menos con un exón del gen. Los intrónicos comienzan dentro de un intrón en cualquier dirección y terminan sin superponerse con ningún exón. Los ARNlnc de promotor se ubican en regiones promotoras de genes codificantes. Los ARNs intergénicos son unidades transcripcionales separadas por una distancia de al menos 1 kb de genes codificantes (Ariel et al., 2015).

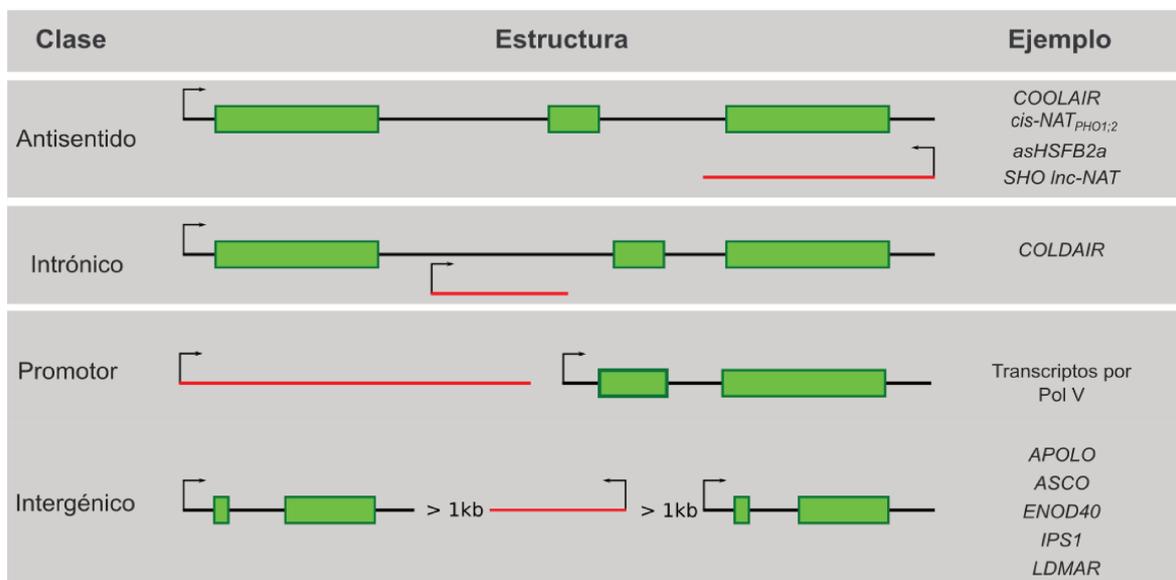


Figura 1. Clasificación de los ARNlnc. En color verde se representan los exones de genes codificantes. En negro, los intrones. Los ARNlnc se representan en color rojo. Las flechas indican el sentido de la transcripción de genes y ARNs. En el extremo derecho se muestran ejemplos de ARNlnc de cada clase (Figura modificada de Ariel et al., 2015).

ARNs largos no codificantes:

En plantas, estos ARNs de más de 200 nt son transcritos por distintas ARN Polimerasas (ARNP). Los productos transcripcionales de la ARNP_{II} presentan algunas similitudes con los ARNm (que sí codifican para proteínas) como la estructura del cap en el extremo 5', la cola de poli A en el extremo 3' y que pueden sufrir splicing. Además de la ARNP_{II}, los ARN_{lnc} pueden ser transcritos por las ARNP_{IV} y la ARNP_V y dependiendo de esto actúan a través de diferentes mecanismos (Figura 2).

En el caso de los productos de ARNP_{IV} y V, forman parte de un mecanismo conocido como Metilación del ADN dependiente del ARN (o RdDM, del inglés), que modula la compactación de la cromatina (Ariel et al., 2015; Zhai et al., 2015). Luego de ser transcritos por la ARNP_{IV}, estos ARNs son transformados en ARNs doble cadena por la acción de una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR2). Luego, estos ARNs doble cadena son procesados por DICER-LIKE3 (DCL3) en ARNs pequeños de 24 nt que son cargados en AGO4. Estos complejos son guiados por ARN_{lnc} transcritos por la ARNP_V hacia el ADN por complementariedad de secuencia, induciendo la metilación de esa región a través del reclutamiento de enzimas ADN metiltransferasas. Además, los ARNs transcritos por ARNP_V son capaces de reclutar proteínas remodeladoras de la cromatina hacia regiones promotoras de genes. Por su parte, los transcritos por ARNP_{II} pueden adoptar estructuras secundarias que pueden ser precursoras de ARNs pequeños de 24 nt que, dependiendo qué proteína DICER lo procese, va a desencadenar TGS o PTGS.

Por otro lado, los ARN_{lnc} también pueden ejercer roles moleculares sin ser procesados en pequeños ARNs. Se ha demostrado que algunos ARN_{lnc} transcritos por ARNP_{II} actúan como esponjas secuestrando miARNs evitando así el PTGS que estos generan sobre su/s gen/es blanco. Otros pueden formar dúplex de ARN_{lnc}-ARNm y conducir a la degradación del ARNm asociado o promover su traducción por el reclutamiento de polisomas. Otros ARN_{lnc} son capaces de actuar como moléculas transportadoras de proteínas asociadas entre el núcleo y citoplasma (Ariel et al., 2015). Algunos ARN_{lnc} participan en la regulación del proceso de splicing alternativo a través de (i) la interacción con factores de splicing específicos, (ii) la remodelación de la cromatina, o (iii) la formación de dúplex ARN_{lnc}-preARNm donde el ARN se une a un intrón del mensajero favoreciendo su procesamiento y remoción (Fonouni-Farde et al., 2021).

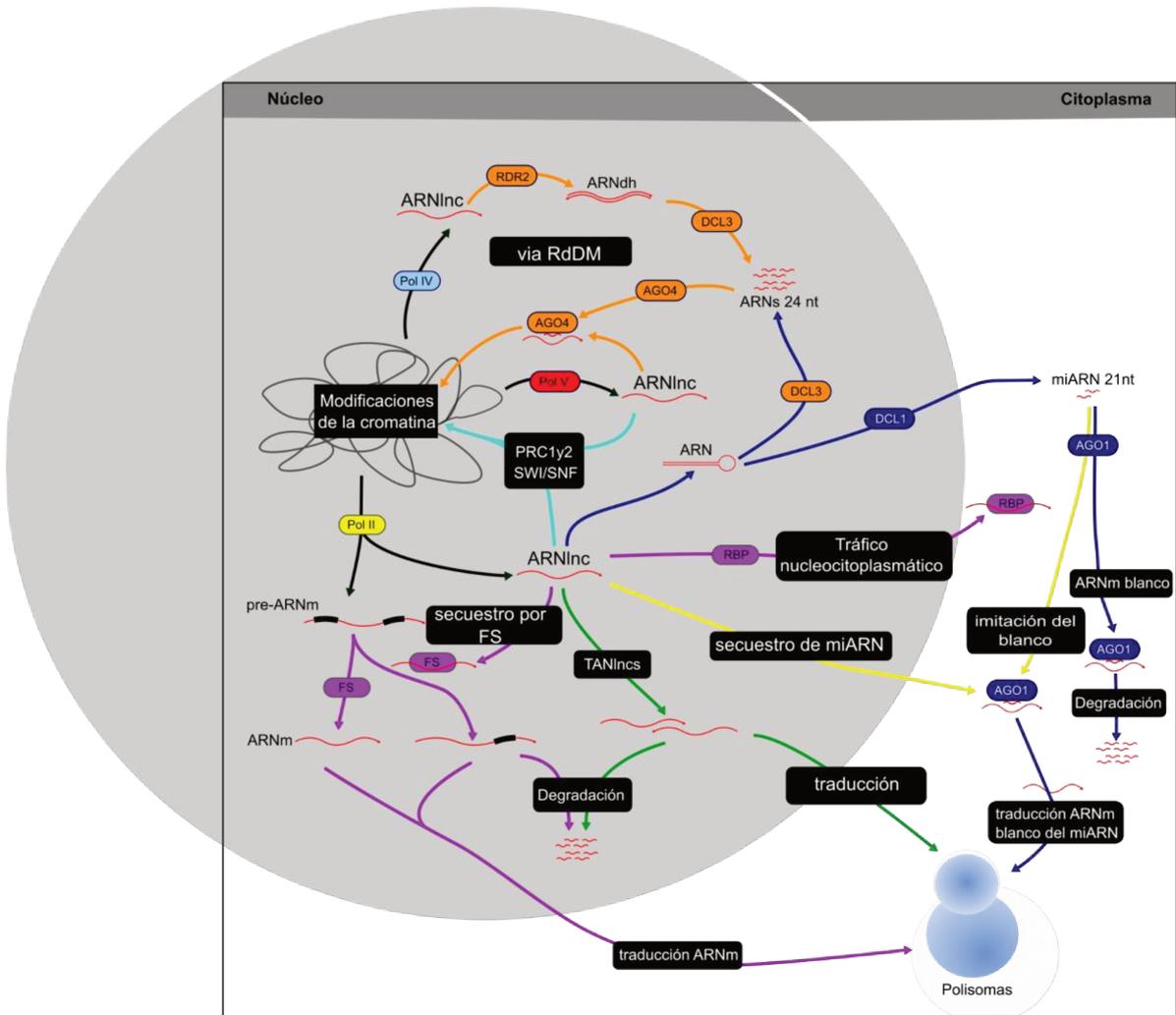


Figura 2. Modo de acción de los ARNinc. Las flechas Naranjas muestran el mecanismo de metilación del ADN dependiente del ARN. Las flechas celestes indican el reclutamiento de proteínas remodeladoras de la cromatina (PRC1 y 2, SNF/SWI). Las flechas azules muestran el proceso de generación de miRNAs a partir de ARNinc con estructura de *hairpin*. Las flechas amarillas señalan el secuestro de miRNAs por parte de ARNinc. Las flechas verdes muestran ARNinc que pueden promover la degradación de otro ARN o la traducción por reclutamiento de polisomas. Las flechas violetas muestran ARNinc que pueden interactuar con factores de *splicing* secuestrándolos y de esta manera afectando el *splicing* alternativo de los ARNm. Los ARNs están representados como flechas rojas. (Figura modificada de Ariel et al., 2015)

Además de poder sufrir splicing alternativo, los ARNinc son capaces de plegarse y adoptar estructuras secundarias complejas. Estas estructuras suelen estar más conservadas que las secuencias nucleotídicas por lo que se piensa que la forma que adoptan es lo que les permite cumplir su función. De esta manera, la regulación de estos ARNs está dada principalmente por cambios en la estructura, que a su vez pueden estar dados por cambios en la temperatura, interacciones con proteínas, con

iones, con ADN o ARN, modificaciones post transcripcionales y mutaciones en la secuencia. (Chorostecki et al., 2023). Respecto a las interacciones con el ADN, proteínas u otros ARNs, existen muchos factores que contribuyen. En primer lugar, el patrón de expresión y la localización subcelular limitan las potenciales asociaciones. En segundo lugar, la secuencia, las modificaciones post transcripcionales y la estructura secundaria y terciaria que adoptan los ARNinc determinan la capacidad de interacción. Por último, el interactoma resultante del ARNinc participa en las vías regulatorias del desarrollo y adaptación de las plantas al ambiente ya que todos estos factores pueden responder a señales ambientales (Figura 3) (Manavella et al., 2022).

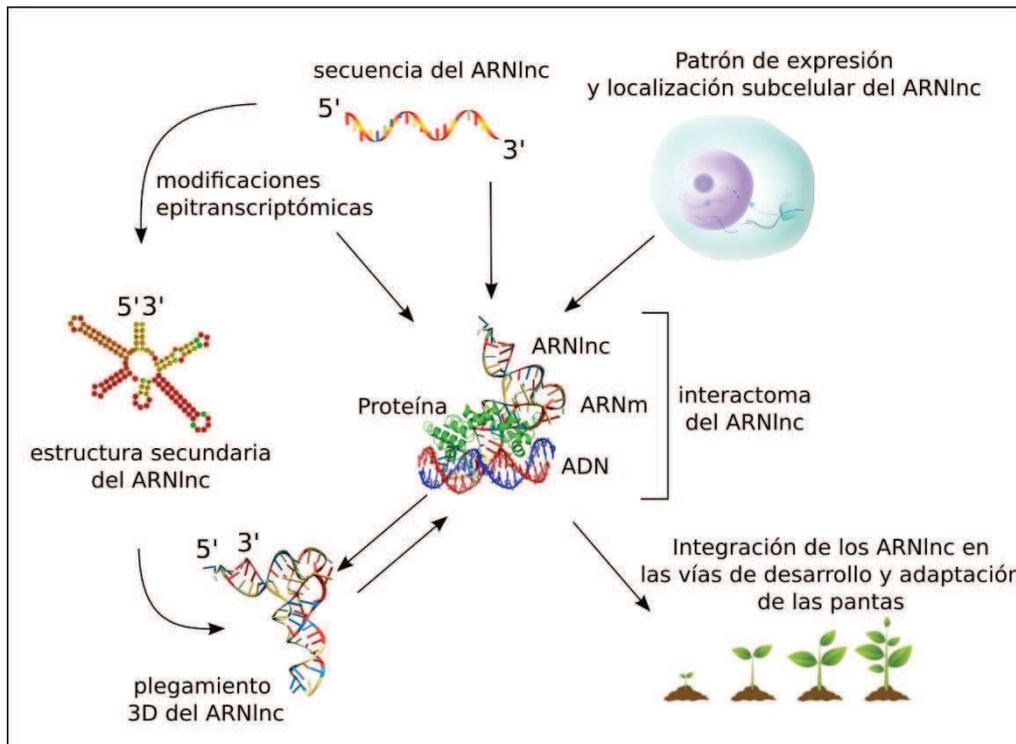


Figura 3. La función de los ARNinc está determinada por el interactoma de ese transcripto (Figura modificada de Manavella et al., 2022)

Función fisiológica de los ARNinc:

Los ARNinc de plantas participan en numerosos procesos del desarrollo y de respuesta al ambiente. En *Arabidopsis*, uno de los procesos altamente regulados por la acción de ARNinc es la vernalización y transición a floración, donde están involucrados *COOLAIR*, *COLDAIR*, *COLDWRAP* y *AG-intron-4*. Estos ARNs regulan la expresión de *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *AGAMOUS (AG)*, factores de transcripción claves en el proceso de floración (Heo & Sung, 2011; Ietswaart et al., 2012; Kim & Sung, 2017; Wu et al., 2018). En el desarrollo de las raíces laterales participan *APOLO* y *ASCO* (Ariel et al., 2014, 2020; Bardou et al., 2014), además *APOLO* está involucrado en el crecimiento de los pelos

radiculares (Moison et al., 2021; Pacheco et al., 2021). *MARS* está involucrado en la germinación de las semillas (Roulé et al., 2022). En frutilla, el ARN *FRILAIR* regula la maduración del fruto (Tang et al., 2021). En cuanto a las respuestas al ambiente, se conocen ARNInc involucrados en respuesta a la vernalización, como *COOLAIR* (Csorba et al., 2014), o al calor y el frío, como *APOLO* (Fonouni-Farde et al., 2022; Moison et al., 2021). También se han reportado regulando la homeostasis de nutrientes como es el caso de *IPS2* que participa en el equilibrio de fosfato (Franco-Zorrilla et al., 2007). Existen, además, ARNInc como *ELENA1* en *Arabidopsis* o *MSTRG18363* en tomate que están involucrados en la resistencia contra *Pseudomonas syringae* y *Botrytis cinerea* respectivamente (Seo et al., 2017; Zhou et al., 2021). Respecto a los estreses abióticos, un ejemplo es *DAN1*, un ARNInc de algodón que participa en la regulación del estrés por sequía (Tao et al., 2021). En cuanto a ARNInc de respuesta a la luz, se ha reportado a *HID1* participando en el proceso de fotomorfogénesis en condiciones de luz roja continua (Y. Wang et al., 2014) y *BLIL1* bajo condiciones de luz azul (Sun et al., 2020).

En el presente trabajo de tesis se estudió al ARNInc *APOLO* y su interacción con la proteína LHP1 para modular la conformación tridimensional de la cromatina en el contexto de sombreado. Además, se realizó un análisis para determinar el origen y la conservación entre especies de este.

El ARN largo no codificante *APOLO* de *Arabidopsis thaliana*:

APOLO (del inglés, *AUXIN REGULATED PROMOTER LOOP RNA*) es un ARNInc intergénico presente en *Arabidopsis thaliana*. Está codificado 5 kb corriente arriba de su gen vecino, *PID* (Kakar et al., 2013), involucrado en el transporte polar de auxinas en la raíz. Es transcrito por las ARNP_{II}, IV y V y tiene una longitud de 1 kb. Previamente, se ha demostrado que la transcripción de *APOLO* por complejos alternativos de Polimerasas modula la formación dinámica de un bucle de la cromatina (Figura 4). Este bucle comprende la región promotora de *PID*, regulando su actividad transcripcional (Ariel et al., 2014). En respuesta a las auxinas, el locus de *APOLO* se desmetila, provocando la apertura del bucle. Una vez abierto, la región promotora intergénica queda accesible para el reconocimiento por factores de transcripción y tiene lugar la transcripción en ambas direcciones, de *PID* y *APOLO*, respectivamente. Como consecuencia, ambos transcritos se acumulan. El ARNm *PID* es exportado al citoplasma para su traducción, mientras el de *APOLO* es acumulado en el núcleo. *APOLO* recluta al complejo PRC1, particularmente a través de la interacción directa con LHP1, para comenzar el proceso de reformación del bucle de cromatina. Además, la transcripción del locus de *APOLO* por ARNP IV/V conlleva a su remetilación, restableciendo el perfil epigenético de la región. De manera similar ocurre un restablecimiento de modificaciones postraduccionales de histonas, como ser H3K27me3 (dependiente de PRC2). Como resultado, el bucle de cromatina vuelve a formarse, reprimiendo la transcripción de *PID*, además de la de *APOLO*. Así, pues, la transcripción del ARNInc

APOLO influye en la regulación de la expresión de su gen vecino, *PID*, mediante la modulación de la conformación tridimensional local de la cromatina (Ariel et al., 2014).

Además de la regulación de la expresión de *PID* en *cis*, se ha demostrado que *APOLO* es capaz de regular la expresión de otros genes en *trans* a través del reconocimiento por complementariedad de secuencia, formación de *R-loops* (dúplex de ARN-ADN) y modulación de la formación de bucles de cromatina en los loci de estos genes (Figura 4). En su mayoría, se trata de genes de respuesta a auxinas que están involucrados en el desarrollo de la raíz lateral (Ariel et al., 2020).

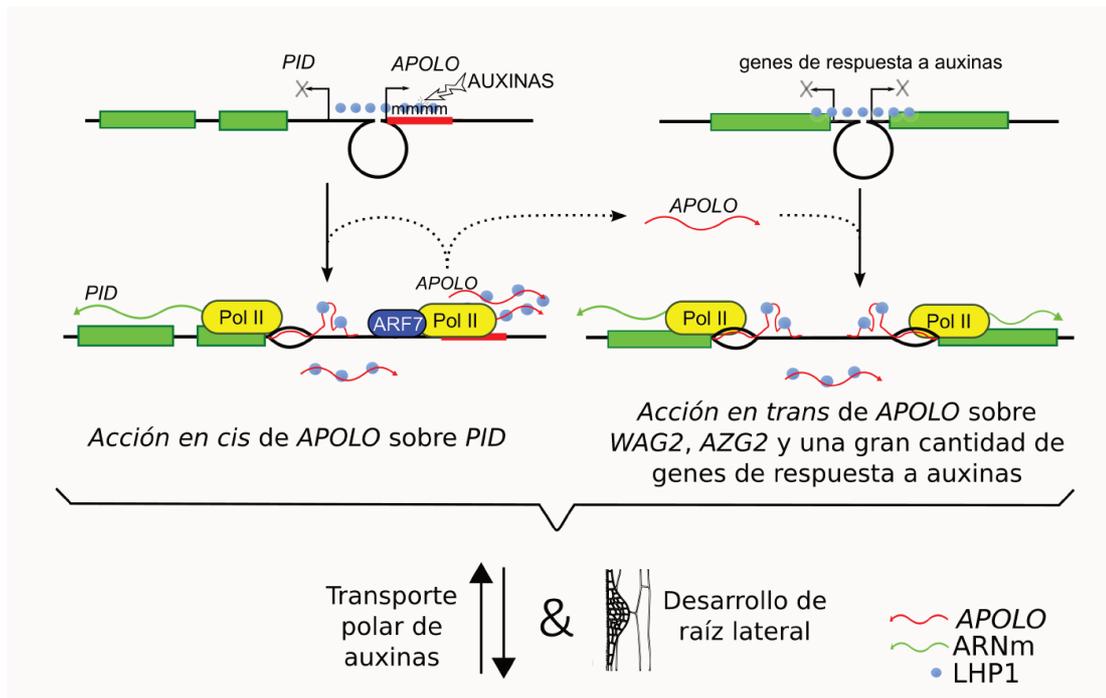


Figura 4. *APOLO* regula la expresión de genes en *cis* y en *trans*. Del lado izquierdo se muestra la regulación en *cis* del gen *PID* y del derecho, la regulación en *trans* de otros genes. En rojo se muestra a *APOLO* y en verde a *PID* y demás ARNm. Los círculos celestes representan a LHP1. En amarillo se muestra la ARNPII. mmmm indica metilación del ADN. (Figura modificada de Ariel et al., 2020)

Además, se ha visto que *APOLO* es capaz de interactuar directamente con otras proteínas, además de LHP1. Entre ellas, se identificó al factor de transcripción WRKY42. La formación de este complejo permite reconocer y regular la expresión de *RHD6* (*ROOT HAIR DEFECTIVE 6*) y, de esta manera, modular la expansión de los pelos radiculares en respuesta al frío (Moison et al., 2021), entre otros genes involucrados en el mismo proceso (Moison et al., 2021). Otra proteína asociada a *APOLO* es VIM1 (*VARIANT IN METHYLATION 1*), con demostrada capacidad de unión a ADN hemi-metilado (Hye et al., 2007). Además, se ha demostrado que VIM1 y LHP1 pueden interactuar entre ellas. El complejo *APOLO*-VIM1-LHP1 regula de manera directa la transcripción del gen *YUCCA2* (involucrado

en la biosíntesis de auxinas) a través de la metilación del ADN y deposición de la marca H3K27me3 en el promotor de este gen durante la respuesta de termomorfogénesis (Fonouni-Farde et al., 2022).

Uso de ARNs exógenos como potencial herramienta biotecnológica

En los últimos años hubo una explosión de tecnologías basadas en ARNs, que se acrecentó durante la pandemia de COVID-19 con el desarrollo de las vacunas de ARNm (Damase et al., 2021). Además, con el crecimiento acelerado de la población mundial, la disminución de los terrenos aptos para la producción de alimentos y el calentamiento global que genera nuevos y mayores estreses bióticos y abióticos, se acentúa la necesidad de desarrollar insumos agrícolas más amigables con el ambiente. En este contexto, el potencial del ARN como molécula bioactiva para una agricultura sustentable está tomando gran relevancia. El ARN es, en definitiva, un lenguaje universal, como molécula intermediaria del dogma central de la biología. Se puede ofrecer información a las plantas de manera codificada en ARN, y de esta manera modular su respuesta al ambiente (Rodríguez Melo et al., 2023).

A lo largo de los años, el control de las enfermedades de los cultivos se ha basado en el uso de una amplia variedad de pesticidas sintéticos. Estos tienen las ventajas de estar altamente disponibles, y ser baratos y de rápida acción. Sin embargo, existen efectos secundarios como el surgimiento de patógenos resistentes, la acción inespecífica sobre organismos benéficos y el potencial riesgo a la salud de las personas que lo aplican, así como también de las poblaciones rurales cercanas al cultivo y los consumidores (Rodríguez Melo et al., 2023). Si bien han surgido cultivos transgénicos o de mejoramiento clásico que son resistentes a ciertas plagas o que son capaces de crecer en condiciones o ambientes adversos, su obtención requiere de tiempos muy largos. Además, la tecnología transgénica depende de protocolos muy extensos de transformación y desregulación que dificultan la generación de variedades capaces de superar la constante aparición de amenazas ambientales a la agricultura. También existe mucha controversia alrededor del consumo de organismos transgénicos, que complica su aceptación social. Es por esto que han surgido numerosas investigaciones sobre el uso de moléculas de ARNs como soluciones no transgénicas para la protección de cultivos, capaces de garantizar una alta productividad, pero sin modificar genéticamente a las plantas.

Las plantas cuentan con un mecanismo de defensa ante infecciones virales basado en ARNs de interferencia. Esta maquinaria, reconoce ARNs doble cadena provenientes de una infección y los procesa en ARNs pequeños que luego sirven como guía para el silenciamiento de un gen blanco por homología de secuencia. Este mecanismo complejo ha sido estudiado durante muchos años, lo cual permitió que se proponga como base para desarrollos tecnológicos que mejoren las respuestas de los cultivos frente a determinados patógenos. Como resultado, se generaron plantas transgénicas capaces de producir los ARNs doble cadena y de esta forma conferir resistencia o tolerancia a un

amplio rango de patógenos. Estos ARNs doble cadena expresados por la planta presentan secuencias relevantes para el desarrollo o la infección de los patógenos. De esta manera, los ARNs pequeños producidos dentro de las plantas son luego los responsables de producir el silenciamiento del gen o los genes blanco del patógeno. La eficiencia de este sistema depende de la capacidad y estabilidad de estos ARNs pequeños. Existen numerosos ejemplos de plantas transgénicas en la bibliografía que son resistentes a virus, hongos e insectos (Rodríguez Melo et al., 2023). Debido a lo comentado anteriormente, a pesar de la eficiencia de esta tecnología, se comenzaron en los últimos años a estudiar la posibilidad del uso directo de los ARNs en los cultivos sin necesidad de transformarlos. Se sabe que las plantas son capaces de absorber estas moléculas a través de sus tejidos por lo que se desarrollaron varias estrategias para el *delivery* de los ARN doble cadena o ARNs pequeños maduros entre las cuales se incluyen el rociado, infiltración e inoculación mecánica entre otras. Además, se han estudiado numerosas formas de estabilizar los ARNs como son las modificaciones químicas, el uso de nanopartículas de distinto origen, de vesículas lipídicas o bacterianas y de partículas similares a virus (VLPs) (Rodríguez Melo et al., 2023).

Hasta el momento, sólo se ha estudiado el uso exógeno de ARNs doble cadena para modular la expresión de genes de la planta o de patógenos. Sin embargo, no hay antecedentes del agregado exógeno de ARNs largos no codificantes (Dalakouras et al., 2020). En este trabajo de tesis se diseñó un protocolo para el agregado del ARN *APOLO* y se estudió la respuesta de las plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Origen de los ARNinc y conservación entre especies

Durante los últimos años, el avance de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de ácidos nucleicos ha permitido la identificación y anotación de numerosos nuevos ARNinc en distintas especies y se ha determinado la función de varios de ellos. Sin embargo, muy pocas investigaciones se han llevado a cabo con el fin de determinar el origen de estos ARNinc en plantas y su conservación entre especies. Entre los estudios realizados, algunos se enfocan en determinar conservación de secuencias (Sang et al., 2021), donde se analizan los ARNinc de 25 especies de plantas con flores; o donde estudian ARNinc intergénicos en 4 especies pertenecientes a la familia *Brassicaceae* (Palos et al., 2022). De manera alternativa, otros trabajos utilizan la estructura secundaria para determinar conservación. Es el caso de los trabajos de Hawkes (Hawkes et al., 2016) y de Gulyaev (Gulyaev et al., 2023) donde analizan y comparan la estructura de *COOLAIR* y *ENOD40* respectivamente.

En cuanto al origen de los ARNinc, no existe un consenso hoy en día. Algunas hipótesis sugieren que derivan de elementos transponibles (TE), otras que surgen a partir de la duplicación de otros ARNinc, que se originan mediante la transformación de un gen codificante, o que lo hacen de *novο* a partir de

secuencias que no eran transcritas anteriormente (Kapusta et al., 2013). Se han encontrado algunos ejemplos para algunas de estas hipótesis por lo que no serían mutuamente excluyentes. Debido a esto, es necesario hacer un análisis puntual para cada ARNInc o familias de ellos.

En este trabajo de tesis se analizó la conservación del ARNInc *APOLO* en la familia Brassicaceae mediante una comparación de secuencias y similitudes funcionales. Además, se indagó acerca del posible origen de este.

OBJETIVOS

Este proyecto tiene como objetivo general identificar y caracterizar los complejos involucrados en la regulación de la expresión génica formados por los ARNs largos no codificantes (ARNlnc) *APOLO*s y proteínas asociadas a la cromatina en *Arabidopsis thaliana* y *Arabidopsis lyrata*.

Objetivos Específicos:

1. Profundizar los conocimientos acerca del rol del complejo formado por LHP1 y el ARNlnc *APOLO* en la regulación de genes específicos en *Arabidopsis thaliana*.
2. Caracterizar la función fisiológica y los mecanismos moleculares en los que participa el complejo LHP1-*APOLO* en respuesta al ambiente.
3. Desarrollar una estrategia para el tratamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el agregado exógeno de un ARNlnc epigenéticamente activo.
4. Analizar del impacto fisiológico del tratamiento de plantas con el ARNlnc *APOLO*.
5. Determinar el origen evolutivo y molecular de *APOLO*.
6. Si *APOLO* existe en otras especies de la familia *Brassicaceae* u otras familias de plantas, determinar su función y mecanismo de regulación.

CAPÍTULO 1. Función molecular y fisiológica del ARNInc *APOLO*

INTRODUCCIÓN

Las plantas son capaces de adaptar su arquitectura y fisiología en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y señales endógenas a lo largo de su ciclo de vida. Esta plasticidad incrementa la eficiencia de acceso y uso de recursos y es determinante para su adaptación en ambientes variables (Sultan, 2010). Uno de los casos mejores estudiados de plasticidad fenotípica en plantas es el síndrome de sombreado o *shade avoidance syndrome* (SAS) (Smith, 1995). Este síndrome se caracteriza por respuestas morfológicas y fisiológicas que les permiten a las plantas evitar ser sombreadas por plantas vecinas y, de esta manera, incrementa la captación de luz. Se trata de respuestas a señales lumínicas que indican proximidad de otras plantas, particularmente la reducción de la relación de radiación rojo (R) y rojo lejano (FR; relación R/FR), causada por la absorción de fotones rojo y la reflexión de rojo lejano por tejidos que contienen clorofila (Ballaré & Pierik, 2017; Casal, 2012; Fiorucci & Fankhauser, 2017). Los cambios en la relación R/FR son percibidos por el fotorreceptor fitocromo B (phyB), que controla numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Legris et al., 2019). Las respuestas morfológicas que permiten a las plantas evitar el sombreado se manifiestan y dependen en gran medida de la arquitectura y el estadio de desarrollo de las plantas. Entre las respuestas morfológicas mejor caracterizadas se encuentra el incremento de la tasa de elongación del tallo, el incremento de la dominancia apical (con reducción de la ramificación) y el reposicionamiento de las hojas adoptando una orientación más vertical (hiponastía) (Fernández-Milmanda & Ballaré, 2021). La combinación de estas respuestas resulta en una configuración de la arquitectura de la planta que incrementa la intercepción de fotones en un ambiente densamente ocupado por otras plantas. En este trabajo de tesis hemos abordado las respuestas de ramificación y de hiponastía en condiciones de sombreado.

La ramificación del tallo como respuesta a la disponibilidad de luz depende del gen *BRC1* en *Arabidopsis thaliana*

La ramificación en las plantas depende de la capacidad de las yemas axilares de crecer y formar una nueva rama. Este proceso es inhibido como parte del SAS, mientras se prioriza el crecimiento del tallo principal, de forma que la planta crezca hacia arriba en busca de la luz y no hacia los costados. En *Arabidopsis thaliana*, el crecimiento de las yemas axilares está regulado de manera negativa por

BRANCHED1 (*BRC1*), que es un gen que codifica un factor de transcripción de la familia TCP de clase II y solamente se expresa en yemas axilares. Se ha observado que las plantas mutantes *brc1* presentan mayor cantidad de ramas axilares que plantas salvajes (Aguilar-Martínez et al., 2007). Además, *BRC1* es considerado un regulador clave de la ramificación porque integra numerosas señales tanto endógenas como exógenas, incluyendo el balance hormonal y la relación R/FR (Aguilar-Martínez et al., 2007; González-Grandío et al., 2013; Rameau et al., 2015) (Figura 5).

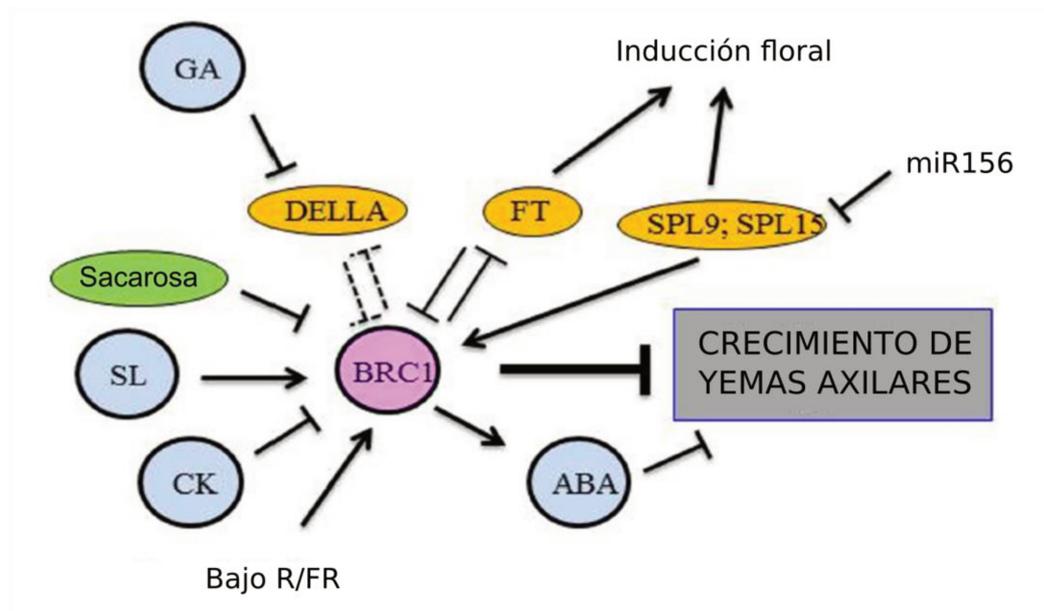


Figura 5. *BRC1* integra señales internas y externas para regular el crecimiento de yemas axilares. En círculos celeste se representan las fitohormonas: GA (giberelinas), SL (estrigolactonas), CK (citoquininas) y ABA (ácido abscísico). En Amarillo se muestran proteínas: DELLA, FT (factores de transcripción), SPL9 y SPL15. En verde, sacarosa representando azúcares. El sombreado está representado como una baja relación R/FR. Las flechas indican inducción, mientras que la represión se muestra con barras. Las líneas punteadas indican que la relación no es directa. Figura modificada de Rameau et al., 2015.

En el contexto del SAS, se ha reportado que los niveles de expresión de *BRC1* aumentan cuando las plantas son expuestas a luz blanca enriquecida con rojo lejano (simulando sombra) y que *BRC1* es necesario para detener el crecimiento de las yemas axilares en respuesta al sombreado. Además, *BRC1* estaría regulado negativamente por phyB (González-Grandío et al., 2013). En conclusión, la regulación y la acción de *BRC1* integra señales del desarrollo con aquellas derivadas de la percepción del ambiente, contribuyendo a la plasticidad del desarrollo de esta especie en función del entorno. A

pesar de todo lo estudiado, hasta el momento de comenzar este trabajo de tesis se desconocía si este gen era regulado a nivel epigenético.

La respuesta de hiponastía al sombreado depende de las fitohormonas auxinas

La hiponastía es una respuesta típica del SAS, particularmente en plantas con roseta como *Arabidopsis thaliana*, y es una respuesta muy importante para optimizar la captación de luz en zonas donde la vegetación es densa (Pantazopoulou et al., 2017). Este fenómeno es desencadenado por una baja relación R/FR percibida por phyB, lo cual ocurre más efectivamente en la punta de la hoja (Michaud et al., 2017; Pantazopoulou et al., 2017). Las hojas responden a esta señal con un crecimiento asimétrico entre las caras abaxial y adaxial del pecíolo, lo que resulta en un movimiento hacia arriba de la lámina de la hoja (Figura 6). Las auxinas juegan un rol central en esta respuesta. Estudios recientes han demostrado que una baja relación R/FR percibida en la punta de la hoja promueve la acumulación de auxinas derivadas de ese punto en la cara abaxial del pecíolo. Esta acumulación local de auxinas es responsable del crecimiento asimétrico que causa la respuesta de hiponastía en respuesta a la baja relación R/FR, y está determinada por la proteína transportadora de auxinas PIN3 (Küpers et al., 2023).



Figura 6. El FR, o la baja relación R/FR resulta en la elevación de las hojas. La primera imagen muestra una planta WT bajo condiciones normales de luz. La imagen del medio muestra una planta WT a la que se le iluminó la punta de una hoja con luz enriquecida en FR y se puede ver cómo se eleva sólo esa hoja. La tercera muestra una planta WT a la cual se iluminó completamente con luz enriquecida en FR y se puede observar como todas las hojas se elevan. Figura modificada de Pantazopoulou et al., 2017.

Además de la respuesta al sombreado, las plantas de *Arabidopsis* muestran una respuesta hiponástica al calor. Durante la termomorfogénesis, las hojas de la roseta también se mueven hacia arriba, separándolas del suelo y permitiendo una disminución corporal de la temperatura. Se ha demostrado que la hiponastía en respuesta al calor también es señalizada por phyB y genes clave corriente abajo, como el factor de transcripción PIF4. Notablemente, esta cascada de señalización incluye la activación directa de la transcripción de *PID* por PIF4 (Park et al., 2019a), lo que involucra un reconocimiento del factor de transcripción a la región intergénica entre *PID* y *APOLO*. Teniendo en cuenta que *APOLO* participa en la respuesta termomorfogénica de *Arabidopsis* (Fonouni-Farde et al., 2022), en particular en el contexto de elongación del hipocotilo, y la regulación de la región *PID-APOLO* en el proceso de hiponastía, surge la hipótesis de que *APOLO* participe en SAS.

OBJETIVOS

1. Profundizar los conocimientos acerca del rol del complejo formado por LHP1 y el ARNinc *APOLO* en la regulación de genes específicos en *Arabidopsis thaliana*.
2. Caracterizar la función fisiológica y los mecanismos moleculares en los que participa el complejo LHP1-*APOLO* en respuesta al ambiente.
3. Desarrollar una estrategia para el tratamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el agregado exógeno de un ARNinc epigenéticamente activo.
4. Analizar el impacto fisiológico del tratamiento de plantas con el ARNinc *APOLO* aplicado de manera exógena.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los ensayos realizados durante esta tesis se llevaron a cabo utilizando *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col 0) como planta salvaje. Las líneas denominadas 35S:*APOLO1* y 35S:*APOLO2* que sobre expresan a *APOLO* contienen el ARNinc clonado bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Las líneas con niveles reducidos de *APOLO* (RNAi *APOLO1* y RNAi *APOLO2*) han sido obtenidas mediante el uso de un ARN de interferencia. Las líneas CRISPR *APOLO 1* y *2* han sido generadas a partir de la deleción del locus completo de *APOLO*, usando la metodología de Durr y col. (Durr et al., 2018).

También se utilizaron plantas mutantes *clf*, *ref6*, *lhp1* y sobre expresantes 35S:LHP1.

Las semillas de todas estas plantas estaban disponibles en el laboratorio.

Además se utilizaron las líneas pro*APOLO*:GFP-GUS reportada por (Ariel et al., 2020) y *otsA* y *otsB* descritas por Schluempmann y col. (Schluempmann et al., n.d.).

Las plantas fueron crecidas en macetas, en cámaras de cultivo, bajo condiciones de luz de día largo (16 horas de luz, 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 8 horas de oscuridad) a 23° C.

Para los siguientes tratamientos se utilizaron plantas en estadio reproductivo que tuvieran una altura de tallo principal de entre 1 y 1,5 cm.

-Con estrigolactonas (SL): se adicionó directamente a las yemas axilares 50 μL de una solución de 10 μM GR24^{5DS} y 0,1% (v/v) de Tween-20. Las muestras fueron tomadas 6 horas después.

-Con auxinas: las plantas fueron decapitadas y se agregó en el extremo 500 μL de una solución 0,6% (p/v) de agarosa y 50 μM NAA o 0,005% de NaOH 1N (control). Las muestras fueron tomadas 24 horas después de la decapitación.

-Con rojo lejano: las plantas fueron expuestas durante algunas horas a luz blanca suplementada con luz rojo lejano (R/FR=0,11; control R/FR=2,7)

Caracterización del fenotipo de ramificación:

Para determinar el fenotipo de ramificación, las plantas se crecieron individualmente en macetas en cámara de cultivo. Luego de 15 días del pasaje de estado vegetativo al estado reproductivo, se

contaron las ramas primarias (las que se generan desde la roseta) mayores a 0,5 cm y las hojas de roseta. Se utilizaron 24 plantas de cada genotipo. Los resultados se expresan como la relación entre el número de ramas y el número de hojas de roseta.

Para el fenotipado en rojo lejano, las plantas se crecieron en condiciones normales de luz (R/FR=2.7) hasta el pasaje a estadio reproductivo, cuando la inflorescencia era visible. Luego se crecieron durante 15 días en luz blanca enriquecida con rojo lejano (R/FR=0.11). Al finalizar los 15 días se contaron las ramas y hojas. Se utilizaron 24 plantas de cada genotipo.

Caracterización del fenotipo de hiponastía

Para determinar el fenotipo de hiponastía, se utilizaron plantas de los distintos genotipos de 3 semanas a las que se expuso a luz blanca enriquecida con rojo lejano durante 8 horas. Durante ese periodo se tomaron fotos cada 30 minutos, las cuales se usaron luego para medir el ángulo formado entre la tierra y la hoja que más se había elevado con el software ImageJ. El ensayo se realizó de 10 a 18 hs, teniendo en cuenta que con el fotoperíodo de día largo la luz de la cámara de cultivo se encuentra prendida entre las 6 y las 22 hs.

Tinción histoquímica (guses)

Para determinar en qué órganos y tejidos es activo el promotor de *APOLO*, se utilizaron plantas de 3 semanas que poseen el promotor de *APOLO* controlando la expresión del gen reportero *GUS*. A estas plantas se las sumergió en la solución de tinción (fosfato 0,1 M pH 7.5, 20% tritón X100, k-ferricianuro 100 mM, k-ferricianuro 100 mM, X-Gluc 50 mM) y se realizó vacío durante 30 minutos. Luego se incubaron a 37° C es oscuridad durante toda la noche para dar lugar a la reacción de GUS. Posteriormente, se procedió a la decoloración de los tejidos con etanol 70% el tiempo necesario y por último se fotografiaron con lupa.

Extracción de ARN y tratamiento con DNAsa

Para la extracción de ARN, todas las muestras fueron tomadas y congeladas en nitrógeno líquido para su posterior uso. Para las muestras enriquecidas en yemas axilares, se tomaron plantas de 3 semanas a las que, con un sacabocados, se les cortó el centro de la roseta. Cada muestra contiene 3 centros de roseta.

Una vez congeladas, se procedió a la pulverización de los tejidos usando mortero y nitrógeno líquido. La extracción del ARN se llevó a cabo usando aproximadamente 1 µg de tejido pulverizado y trizol casero seguido de una precipitación con cloruro de litio y una precipitación con etanol. Por último, al ARN obtenido se lo resuspendió en agua y se lo trató con DNAsa I de NEB siguiendo el protocolo del fabricante.

Retrotranscripción y Cuantificación por PCR en tiempo real:

Para la retrotranscripción (RT) se utilizó aproximadamente 1 µg de ARN con un cebador oligo (dT) y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó en un aparato StepOne (Applied Biosystems) usando los oligonucleótidos específicos enumerados en la tabla 1 del anexo y el reactivo SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad). Se usaron protocolos estándar (40 a 45 ciclos, 60° C de *annealing*) y el análisis se realizó utilizando el método de delta Ct. La expresión fue normalizada usando Actina.

Finalmente, el análisis de los datos y la producción de los gráficos se realizaron con el software Graphpad Prism 8.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para estos ensayos se utilizaron plantas WT, 35S:*APOLO1*, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1* de 3 semanas crecidas en macetas en condiciones de día largo y 23°C. Para el estudio en hojas se usaron aproximadamente 5 plantas por muestra, mientras que para yemas axilares se usaron 24 plantas por muestra. Los experimentos fueron realizados como se describe en (Ariel et al., 2020) usando 2 réplicas biológicas para cada genotipo y/o condición.

Las muestras se crosslinkearon usando formaldehído 1%. Luego de la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode: 10 ciclos de 30 s prendido y 30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con Proteína A Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos anti-H3K27me3 (Diagenode pAb-195-050) o anti-IgG (Abcam ab6702; control negativo). Los fragmentos de ADN inmunoprecipitados se recuperaron mediante una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y posterior precipitación con etanol. La cuantificación de las regiones genómicas inmunoprecipitadas se realizó mediante qPCR como se describió anteriormente y usando los oligos enumerados en la tabla 1 del anexo. Para el análisis de los resultados se utilizó, de cada muestra, una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar a la que se procesó paralelamente a las demás y se consideró como la muestra de entrada (input).

Aislamiento de cromatina por purificación de ARN (ChIRP)

Para este ensayo se utilizaron plantas WT, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1* de 3 semanas, crecidas en maceta en condiciones de día largo y 23°C. Las muestras se crosslinkaron con formaldehído 1% y el experimento fue realizado como describe (Ariel et al., 2020).

Luego de la extracción y lisis de núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (10 ciclos de 30 s y 30 s). Después se procedió a la hibridación de los oligos biotinilados con los fragmentos de ADN durante 4 horas a 37°C y posteriormente se agregó las beads con estreptavidina y se incubó 1 hora a 50°C. Finalmente se realizaron varios lavados, la elución de los fragmentos purificados, una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. La cuantificación de los fragmentos aislados se realizó mediante qPCR como se describió anteriormente y usando los oligos enumerados en la tabla 1 del anexo.

Ensayo de inmunopurificación de dúplex ADN-ARN (DRIP)

Para este ensayo se utilizaron plantas WT, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1* de 3 semanas, crecidas en maceta en condiciones de día largo y 23°C. Las muestras se tomaron y congelaron en nitrógeno líquido, sin crosslinkar. El experimento se realizó como describe (Fonouni-Farde et al., 2022).

Luego de la extracción y lisis de núcleos, se purificó el ADN-ARN con fenol:cloroformo:isoamílico. Luego se sonicó (4 ciclos: 30 s prendido y 30 s apagado) y se procedió a la inmunoprecipitación usando el anticuerpo S9.6 que reconoce ADN-ARN. Se realizaron lavados, elución y una nueva purificación con fenol:cloroformo:isoamílico. Por último, se precipitó con etanol y se realizó la cuantificación mediante qPCR con los oligos enumerados en la tabla 1 del anexo. Como control negativo se trató las muestras con RNAsaH que digiere el ARN.

Ensayo de Captura de Conformación de la Cromatina (3C)

Este ensayo se realizó como se describe en (Ariel et al., 2014). Se utilizaron 2 gramos de tejido pulverizado tanto de hojas como de yemas axilares previamente crosslinkados con formaldehído 1%. Luego de extraer núcleos se realizó la digestión durante toda la noche a 37°C con 400 U de DpnII (NEB). El ADN digerido se ligó mediante incubación en shaker a 16°C, 100 rpm, por 5 horas usando 100 U de T4 ADN ligasa (NEB). Luego de un *reverse crosslinking* y un tratamiento con proteinasa K (Invitrogen), el ADN fue recuperado con una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico y precipitación

con etanol. La frecuencia de interacción relativa fue calculada por qPCR y una región libre de sitios DpnII fue usada para normalizar la cantidad de ADN.

Transcripción *in vitro* de ARN y ensayo de spray

Para las transcripciones *in vitro* de los ARNs *APOLO* y *GFP* se usó 1 µg de ADN purificado de cada molde, incluyendo el promotor de la T7 en el extremo 5' (previamente agregado por PCR usando los oligos de la tabla 1 del anexo), con la enzima HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis kit (NEB) y siguiendo el protocolo del fabricante. Las plantas fueron rociadas con 1 µg de ARN transcripto en agua. Al día siguiente, las plantas rociadas fueron expuestas a luz blanca enriquecida con rojo lejano durante 8 horas (entre las 10 y las 18 hs; mitad del fotoperíodo de 6 a 22 hs).

Para el fenotipado de hiponastía, las plantas fueron rociadas y durante el tratamiento con rojo lejano se fotografiaron para medir el ángulo de elevación de las hojas.

La tinción histoquímica de las plantas rociadas con ARN se realizó luego de la exposición con rojo lejano.

Para la medición de transcriptos, las plantas fueron rociadas con los ARNs y al día siguiente se tomaron las muestras y congelaron con nitrógeno líquido. Luego se realizó la extracción de núcleos y posterior extracción de ARN como se mencionó anteriormente. El nivel relativo de transcriptos fue medido por RT-qPCR como se indicó anteriormente.

RESULTADOS

Estudio de la regulación de la ramificación mediada por el ARNInc *APOLO*

La ramificación de las plantas determina su forma final y por ende la capacidad de uso de los recursos como la luz. Es un proceso de desarrollo que está altamente regulado tanto por señales internas de la planta como por señales del entorno que la rodea.

En el laboratorio contamos con plantas de *Arabidopsis thaliana* que tienen niveles elevados o reducidos del ARNInc *APOLO* (Ariel et al., 2014, 2020; Fonouni-Farde et al., 2022). Creciendo estas plantas individualmente en macetas observamos que tienen afectado el número de ramificaciones secundarias, también llamadas de roseta, con respecto al que presentan las plantas salvajes. Para determinar si esta diferencia era significativa, se crecieron en maceta plantas salvajes junto con 2 líneas independientes que sobreexpresan *APOLO* (35S:*APOLO*1 y 2), 2 líneas independientes *knockdown* que tienen los niveles de *APOLO* reducidos considerablemente por la acción de un ARN de interferencia (RNAi *APOLO*1 y 2) y 2 líneas independientes *knockout* que tienen deletado el locus completo de *APOLO* mediante CRISPR/Cas9 por lo cual la expresión de este es casi nula (CRISPR *APOLO*1 y 2). A estas plantas se les contaron las ramas secundarias (que nacen de yemas axilares de la roseta) 15 días después de la aparición de la inflorescencia principal. Sorprendentemente, todas las líneas estudiadas exhiben un número mayor de ramas secundarias que las plantas salvajes (Figura 7).

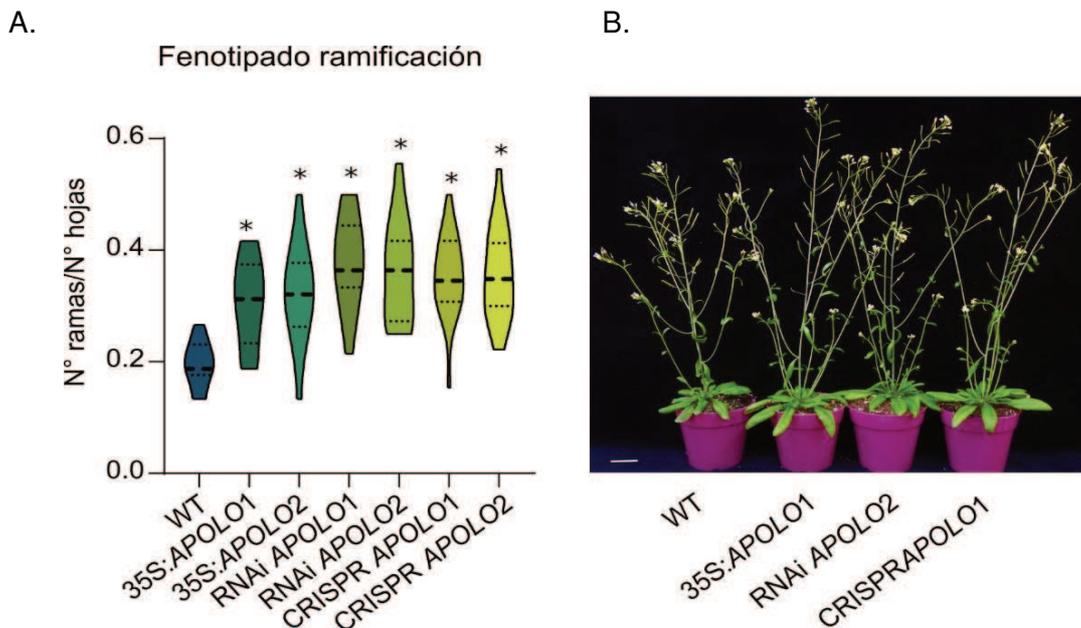


Figura 7. Análisis del número de ramificaciones de las plantas con distintos niveles de *APOLO*. WT indica plantas salvajes. A) Relación entre el número de ramas laterales y el número de hojas de

roseta de las distintas plantas contadas a los 15 días de aparición del tallo principal. El asterisco indica diferencias significativas con las plantas WT ($P \leq 0,05$; t Student, $n=24$). B) Foto de las plantas. La línea blanca de escala corresponde a 2,5 cm.

Teniendo en cuenta que el fenotipo observado se repite en las dos líneas independientes de cada genotipo, se decidió disminuir el número de líneas para las caracterizaciones moleculares. Para esto se midieron los niveles de expresión de *APOLO* en todas las plantas (Figura 8) y se decidió continuar con la línea 35S:*APOLO1* (que tiene niveles moderados de sobre expresión), la RNAi *APOLO2* (que presenta los menores niveles de expresión) y a la CRISPR *APOLO1*.

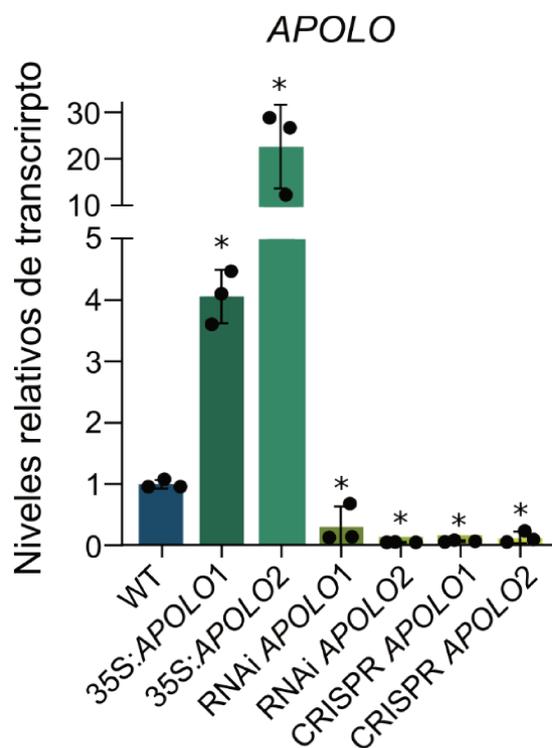


Figura 8. Análisis de la expresión de *APOLO*. Niveles relativos de expresión de *APOLO* en las distintas líneas. WT indica plantas salvajes. Los asteriscos indican diferencias significativas con las plantas salvajes ($P \leq 0,05$; t Student; $n=3$). Las mediciones individuales de cada replicado biológico se muestran con los puntos negros.

Considerando el fenotipo observado de ramificación, lo primero que nos preguntamos fue si *APOLO* se encuentra presente en las yemas axilares de donde luego surgen ramas. Para responder este interrogante, analizamos plantas de *Arabidopsis* salvajes que fueron transformadas con la construcción que contiene la región intergénica entre *PID* y *APOLO* dirigiendo la expresión del gen

reportero *GUS*. Esta construcción permite observar en qué órganos y tejidos es activa esta región promotora. Realizando la tinción histoquímica, pudimos determinar que la región promotora proximal de *APOLO* es inactiva en yemas axilares, al menos en las condiciones en que se realizó el experimento. Por otro lado, en el peciolo se observa coloración, es decir que, al menos en esas condiciones el promotor conduce a la transcripción del gen de la β -glucuronidasa (Figura 9. A). De acuerdo con esto, vimos también que los niveles de transcripto de *APOLO* medidos por qPCR son más elevados en hojas que en muestras enriquecidas en yemas axilares y, además, en ambos órganos los niveles son mayores que en raíces (órgano donde fue previamente caracterizado, (Ariel et al., 2014, 2020)) (Figura 9. B). El hecho de que no se vea tinción en yemas, pero sí se midan los transcriptos en muestras enriquecidas en yemas podría deberse a que para realizar la tinción se utiliza solo la región promotora dirigiendo la expresión del gen *GUS*. Cabe destacar que la región del cuerpo del gen normalmente se encuentra muy metilada a nivel del ADN, y se ha demostrado que la activación de la transcripción de *APOLO* está asociada a una desmetilación del locus (Ariel et al., 2014). Es decir, que la construcción reportera podría no evidenciar el control epigenético y otro tipo de regulaciones, como podría ser la estabilidad del transcripto.

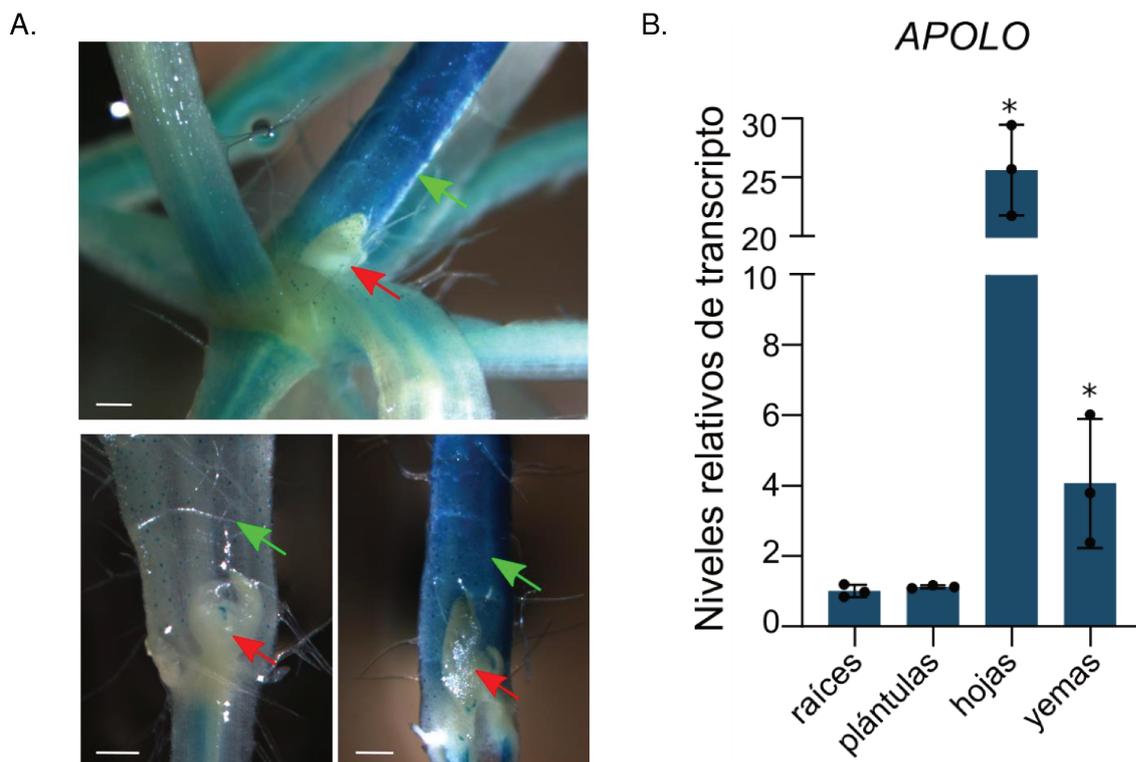


Figura 9. Análisis del patrón de expresión de *APOLO*. A) Tinción de GUS de plantas pro*APOLO*:GFP-GUS. Las flechas rojas indican las yemas axilares y las flechas verdes los peciolos. Las líneas blancas corresponden a 100 μ m. B) Niveles de expresión de *APOLO* medidos por RT-qPCR en diferentes órganos de plantas salvajes. Las mediciones individuales de cada replicado biológico se muestran con los puntos negros. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a raíces que fue el primer órgano donde se describió la presencia de *APOLO* (Ariel et al., 2014) ($P \leq 0,05$; t Student; $n=3$).

El control del número de ramas también depende de LHP1 y de la deposición de H3K27me3

Considerando los casos reportados anteriormente en que *APOLO* actúa junto con LHP1 en la regulación de genes diana, decidimos analizar el fenotipo de ramificación de plantas que tienen sobre expresados y reprimidos los niveles de *LHP1* en las mismas condiciones en las que estudiamos las plantas con distintos niveles de *APOLO*. En este análisis se pudo observar que las plantas mutantes *lhp1* presentan mayor cantidad de ramificaciones que una planta salvaje. Además, se observó que las que sobreexpresan *LHP1* también presentan afectado el número de ramificaciones, pero en el sentido contrario a la mutante, es decir, tienen menor cantidad de ramificaciones que las plantas salvajes (Figura 10). Estos resultados indicarían que tanto *APOLO* como LHP1 están involucrados en la regulación de la ramificación de las plantas de *Arabidopsis thaliana*. Además, nuestros resultados indican que la desregulación de cada uno por separado es suficiente para observar el fenotipo diferencial.

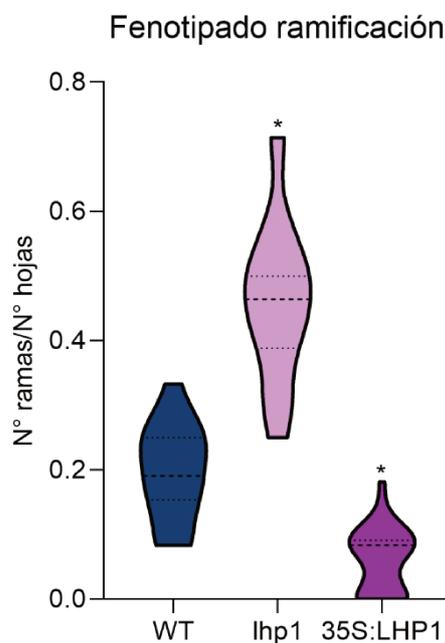


Figura 10. Análisis del número de ramificaciones de las plantas con distintos niveles de LHP1. Relación entre el número de ramas laterales y el número de hojas de roseta de las distintas plantas contadas a los 15 días de aparición de la inflorescencia principal. WT indica plantas salvajes. El asterisco indica diferencias significativas con las plantas salvajes ($P \leq 0,05$; t Student, $n=24$).

Por otro lado, considerando que LHP1 está involucrada en reconocer, mantener y expandir la marca epigenética H3K27me3 (Veluchamy et al., 2016), analizamos también el fenotipo de ramificación de plantas mutantes en *clf*, la metil-transferasa de histonas del complejo PRC2, encargada de depositar

esa marca. Además, caracterizamos a las plantas mutantes *ref6* la proteína encargada de removerla. Para el caso de *clf* no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de ramas comparado con las plantas salvajes. Lo que sugiere que una baja en la deposición de H3K27me3 no afectaría la ramificación, o que la redundancia con sus proteínas homólogas MEDEA y/o SWINGER (Chanvivattana et al., 2004; Grossniklaus et al., 1998) es suficiente para suplir la ausencia de CLF en este evento del desarrollo. Sin embargo, en el caso de *ref6* sí se vieron diferencias significativas. Estas plantas, que presentan un incremento general de la deposición de la marca H3K27me3, presentan menor cantidad de ramas que las plantas salvajes (Figura 11). Estos resultados sostienen la idea de que existe una regulación del proceso de ramificación de tipo epigenética.

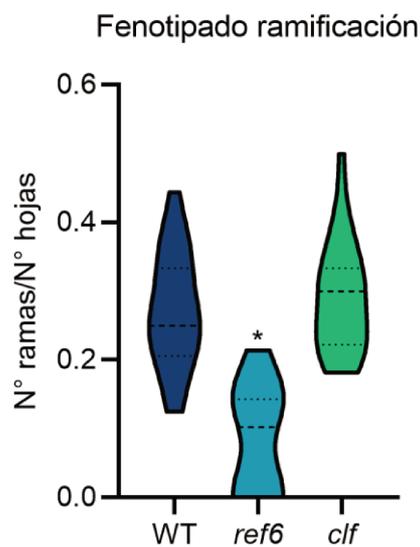


Figura 11. Análisis del número de ramificaciones de las plantas mutantes *ref6* y *clf*. Relación entre el número de ramas laterales y el número de hojas de roseta de las distintas plantas contadas a los 15 días de aparición de la inflorescencia principal. WT indica plantas salvajes. El asterisco indica diferencias significativas con las plantas salvajes ($P \leq 0,05$; t Student, $n=24$).

APOLO regula epigenéticamente la expresión del gen *BRANCHED1 (BRC1)*

Sabiendo que *APOLO* es capaz de reconocer y regular distintos genes en *trans* a lo largo del genoma de *Arabidopsis*, lo siguiente que realizamos fue una búsqueda entre los genes blanco de *APOLO* (obtenidos en un ChIRP-seq, (Ariel et al., 2020)) de aquellos que pudieran explicar las diferencias observadas en la ramificación de las plantas con niveles desregulados de *APOLO*. Entre ellos, identificamos a *BRC1*, un regulador negativo crucial de la ramificación en *Arabidopsis thaliana* (Aguilar-Martínez et al., 2007). Para determinar si *APOLO* tiene un rol en la modulación de la expresión de *BRC1* se realizó la medición de niveles de transcritos mediante RT-qPCR, usando las

plantas con niveles de *APOLO* desregulados. Este análisis reveló que los niveles basales de transcritos de *BRC1* son significativamente menores en yemas axilares de plantas que expresan ectópicamente *APOLO* (*35S:APOLO*) o que tienen su expresión silenciada por ARN de interferencia (RNAi-*APOLO*, (Ariel et al., 2014)) o incluso anulada por remoción del locus completo (CRISPR-*APOLO*, (Fonouni-Farde et al., 2022)) (Figura 12) lo que podría explicar el fenotipo observado de mayor cantidad de ramas.

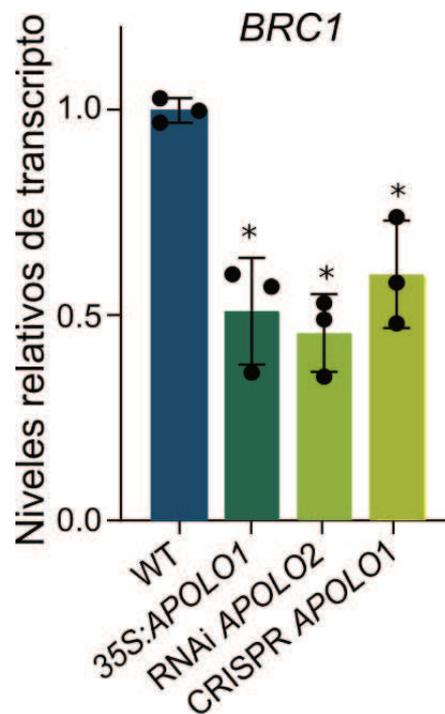


Figura 12. Los niveles de expresión de *BRC1* están disminuidos en las plantas con distintos niveles de *APOLO*. Niveles relativos de *BRC1* medidos por RT-qPCR en las distintas líneas. Las mediciones individuales de cada replicado biológico se muestran con puntos negros. WT indica plantas salvajes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ($P \leq 0,05$; t Student; $n=3$).

Usando información epigenómica públicamente disponible (Ariel et al., 2020; Veluchamy et al., 2016; Xu et al., 2017), encontramos que el perfil epigenético del locus de *BRC1* se asemeja al de un típico gen blanco de *APOLO*: con alta deposición de la marca H3K27me3 a lo largo de todo el cuerpo del gen, unión de LHP1, interacción con *APOLO* y formación de R-loop. Además, vimos que *APOLO* se une 6277 pb corriente arriba de *BRC1*, cerca del extremo 5' del gen vecino (Figura 13).

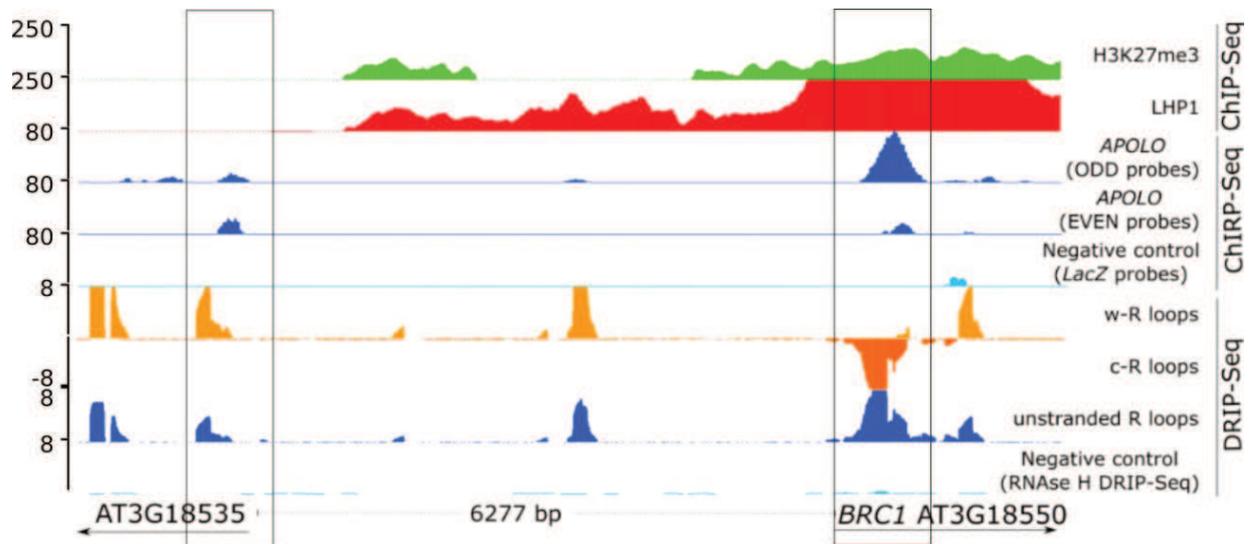
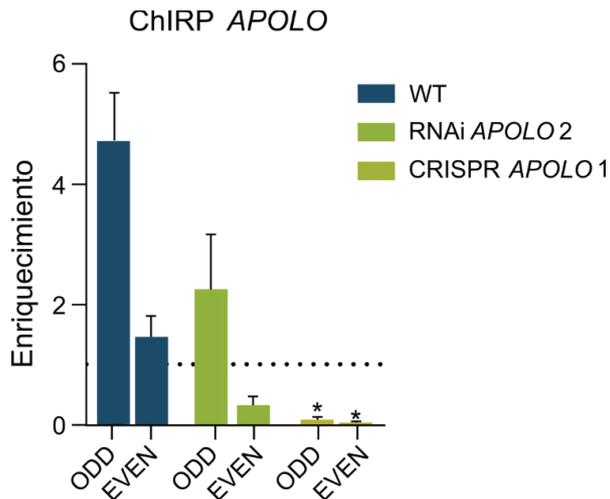


Figura 13. El perfil epigenético del locus de *BRC1* es idéntico al de otros genes blanco de *APOLO*. Perfil epigenético del locus de *BRC1* de plántulas de 14 días crecidas en condiciones de día largo obtenido de información pública disponible. Fila 1: deposición de la marca H3K27me3 determinada por ChIP-seq. Fila 2: deposición de LHP1 por ChIP-seq (Veluchamy et al., 2016). Filas 3-5: unión de *APOLO* determinada por ChIRP-seq (fila 3 y 4, usando las series de oligos contra *APOLO* denominadas ODD y EVEN respectivamente; fila 5 control negativo usando oligos contra LacZ) (Ariel et al., 2014). Filas 6-9: formación de R-loops determinada por DRIP-seq en la hebra Watson (fila 6), hebra Crick (fila 7), o sin distinción de hebra (fila 8). El control negativo del DRIP luego del tratamiento con RNaseH se muestra en la fila 9 (Xu et al., 2017). En la parte inferior se muestra la anotación de los genes.

Como la información disponible de la literatura provenía de experimentos realizados en plántulas, decidimos validar la interacción entre *APOLO* y el locus de *BRC1* en yemas axilares. Para esto realizamos un ChIRP-qPCR y DRIP-qPCR en plantas salvajes vs. CRISPR *APOLO1* y RNAi *APOLO2*. Con el ChIRP confirmamos que *APOLO* interacciona con el locus de *BRC1* en plantas WT (Figura 14. A). Tanto para el set de oligos ODD como para el EVEN se detecta enriquecimiento. Se puede observar además que cuando los niveles de *APOLO* son muy bajos, en la línea RNAi, el enriquecimiento disminuye considerablemente. Sólo para la inmunoprecipitación usando los oligos ODD se puede detectar algo de enriquecimiento, mientras que para el otro grupo de oligos no. Y en las plantas CRISPR, que carecen del locus completo de *APOLO*, no se observa enriquecimiento. Con el DRIP demostramos que el R-loop es mediado por *APOLO* ya que en plantas salvajes puede detectarse el dúplex de ADN-ARN, mientras que cuando hay bajos niveles de *APOLO*, la detección del R-loop es significativamente menor. En la línea CRISPR-*APOLO*, por su parte, la señal detectada para R-loops es similar a la del control negativo (Figura 14. B).

A.



B.

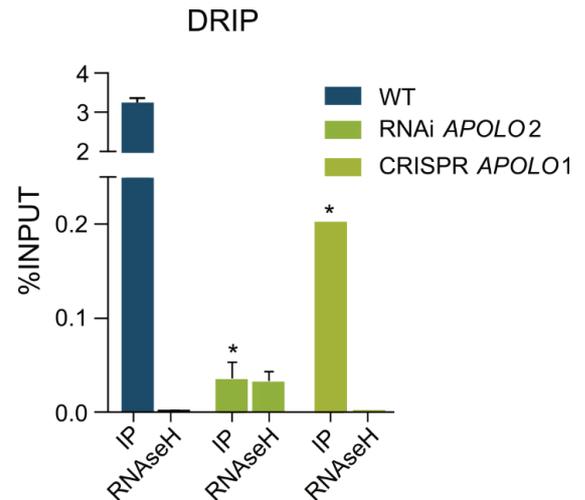


Figura 14. Unión de *APOLO* al locus de *BRC1*. WT indica plantas salvajes. A) Interacción de *APOLO* medida por ChIRP-qPCR en plantas WT vs CRISPR *APOLO1* y RNAi *APOLO2*. Se expresa la media para los 2 sets independientes de oligos denominados ODD y EVEN. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; t Student; $n=2$). La línea punteada determina el nivel de *background* definido usando oligos contra LacZ. B) Formación de R-loop determinada por DRIP-qPCR en plantas salvajes vs RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1*. IP indica los valores obtenidos luego de la inmunoprecipitación de las muestras. RNaseH indica los valores para el control negativo, determinado luego de la inmunoprecipitación de las muestras tratadas con RNaseH. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; t Student; $n=2$).

De la misma manera, considerando que la información epigenómica analizada anteriormente (Figura 13) había sido generada en plántulas, realizamos un ChIP-qPCR para determinar el perfil de la marca H3K27me3 en el locus de *BRC1* en hojas maduras y yemas axilares en plantas salvajes. Encontramos que los niveles de la marca represiva de la transcripción H3K27me3 en ese locus son más elevados en hojas que en yemas, en concordancia con el patrón de expresión de *BRC1* (Figura 15. A). Además, realizamos un ChIP-qPCR de H3K27me3 en yemas axilares de las plantas con distintos niveles de *APOLO*. Notablemente, la represión parcial de *BRC1* en estas líneas (Figura 12) se correlaciona con una elevada deposición de H3K27me3 en yemas axilares de estas plantas respecto de las salvajes (Figura 15. B). En conjunto, los resultados sugieren que *APOLO* participa en la regulación epigenética de *BRC1*.

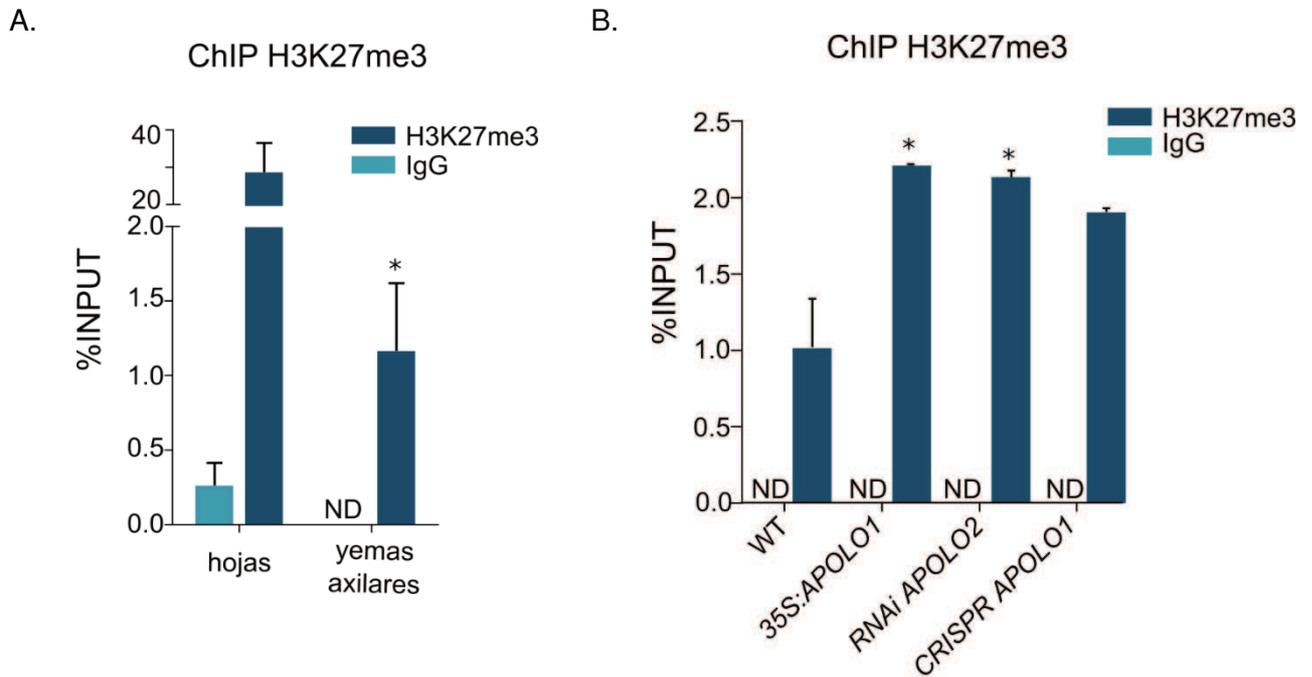


Figura 15. Variación en la deposición de H3K27me3. A) Deposición de H3K27me3 en el locus de *BRC1* determinado por ChIP-qPCR en hojas vs yemas axilares de plantas salvajes. El asterisco indica diferencia significativa entre los porcentajes recuperados de hojas y yemas ($P \leq 0,05$; t Student; $n=2$). B) Deposición de H3K27me3 en el locus de *BRC1* determinado por ChIP-qPCR en yemas axilares de plantas salvajes, 35S:*APOLO1*, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1*. WT indica plantas salvajes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las plantas salvajes ($P \leq 0,05$; t student; $n=2$). ND indica muestras no detectadas. En ambos experimentos se usaron 2 replicados biológicos independientes por línea.

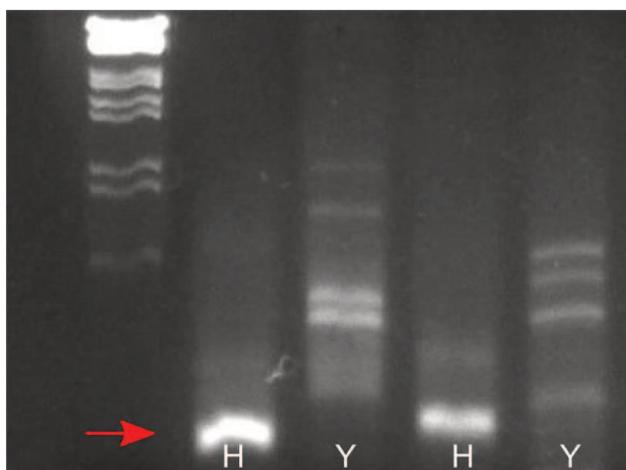
Anteriormente se ha reportado que *APOLO* modula la conformación tridimensional de la cromatina al reconocer genes blanco (Ariel et al., 2020). Por lo tanto, nos propusimos analizar qué bucles de cromatina habían sido identificados por capture-HiC tanto en parte aérea como en raíz (Huang et al., 2021). Este análisis reveló que existe un bucle de cromatina que une a *BRC1* con su gen vecino, precisamente en las regiones de unión de *APOLO* que habían sido identificadas por el ChIRP-seq (Ariel et al., 2020). Este bucle de cromatina está presente en parte aérea y es dependiente de la actividad de *CLF*, la metiltransferasa de histona de PRC2 (Figura 16), dado que deja de ser detectado en plantas mutantes *clf*. Esto sugiere que la marca H3K27me3 actúa como una característica regulatoria clave para la disposición tridimensional de la cromatina en este locus. En muestras de raíces si bien se detectaron algunos bucles de cromatina, no se observó presencia de alguno que uniera al locus de *BRC1* con el de su gen vecino.



Figura 16. Contexto tridimensional del locus de *BRC1*. Capture HiC en parte aérea y raíces de plantas salvajes y parte aérea de plantas mutantes *clf*. La primera fila muestra la anotación de los genes. La fila 2 muestra los bucles de cromatina en el locus de *BRC1* en parte aérea de plantas salvajes. Las flechas negras indican los sitios donde se une *APOLO* mostrados en la figura 10. En la tercera fila, los bucles detectados en raíces de plantas salvajes. En la cuarta fila, el bucle detectado en parte aérea de plantas *clf*. WT indica plantas salvajes.

Nos preguntamos entonces cómo está organizada la conformación local de la cromatina en este locus en yemas axilares. Para responder esta pregunta realizamos un 3C-PCR, seguida de electroforesis y posterior secuenciación del amplicón. Este análisis reveló que el bucle de cromatina en el locus de *BRC1* sólo se encuentra formado en hojas, lo que se correlaciona con una alta expresión de *APOLO* y represión de *BRC1* (Figura 17. A). Luego, realizamos el mismo ensayo en muestras enriquecidas en yemas axilares de las plantas con niveles desregulados de *APOLO* (Figura 17. B). Notablemente, este ensayo reveló que la interacción identificada en hojas de plantas salvajes también fue encontrada en yemas axilares de plantas que sobreexpresan *APOLO*. Sin embargo, en las plantas *knockdown* y *knockout* de *APOLO* no se encontró esta interacción. En conjunto, estos resultados indican que los transcritos de *APOLO* son necesarios y suficientes para modular la disposición tridimensional de la cromatina en el locus de *BRC1* y regular su expresión en diferentes tejidos.

A.



B.

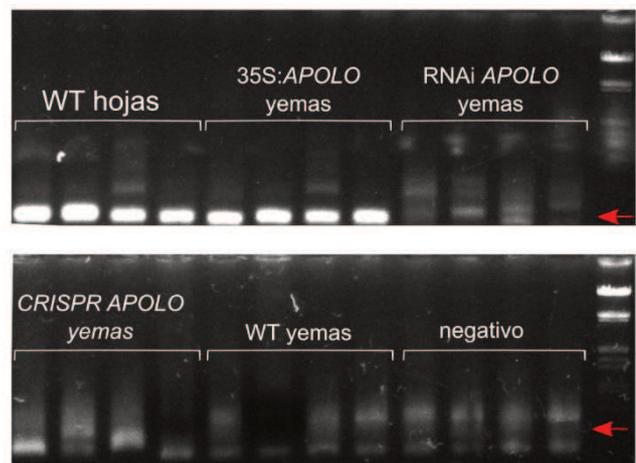


Figura 17. *APOLO* regula un bucle de cromatina que abarca la región intergénica entre *BRC1* y su vecino *AT3G18353*. A) Foto de gel de agarosa 1%. 3C-PCR en muestras de hojas (H) vs yemas axilares (Y). Se muestran 2 replicados. La flecha roja indica las bandas correspondientes a la religación y amplificación del bucle de cromatina. B) Foto de gel de agarosa 1 %. 3C-PCR en hojas de plantas salvajes y yemas axilares de plantas salvajes, 35S:*APOLO1*, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1*. Se muestran 4 replicados. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a la religación y amplificación del bucle de cromatina. WT indica plantas salvajes

APOLO regula la expresión de *BRC1* en el contexto de sombreado

Para determinar cuál o cuáles condiciones están involucradas en la variación de la disposición de la cromatina en el locus de *BRC1*, nos propusimos investigar si las vías conocidas que controlan la expresión de *BRC1* también controlan los niveles de transcritos de *APOLO* en yemas axilares. Para esto, medimos los niveles de expresión de *APOLO* en plantas tratadas con hormonas que intervienen en este proceso (auxinas y estrigolactonas, (Rameau et al., 2015)), luz blanca suplementada con rojo lejano que simula una condición de sombreado (baja relación R/FR, (González-Grandío et al., 2013)) y plantas con el metabolismo de azúcares alterado (Schluepmann et al., 2003) (Figura 18. A). De acuerdo con reportes previos (Ariel et al., 2014, 2020), *APOLO* fue inducido por auxinas. Por otro lado, no se observaron cambios en los niveles de expresión de *APOLO* en respuesta a estrigolactonas o en las plantas con metabolismo de azúcares alterado. Los niveles de transcritos de *APOLO* en yemas axilares se vieron reducidos en respuesta a 2 horas de baja relación R/FR. Además, esta respuesta es dependiente del fotoreceptor phyB dado que los niveles de *APOLO* en mutantes *phyB* son significativamente más bajos que en plantas salvajes y no se observó represión cuando las plantas fueron expuestas a una baja relación R/FR (Figura 18. B).

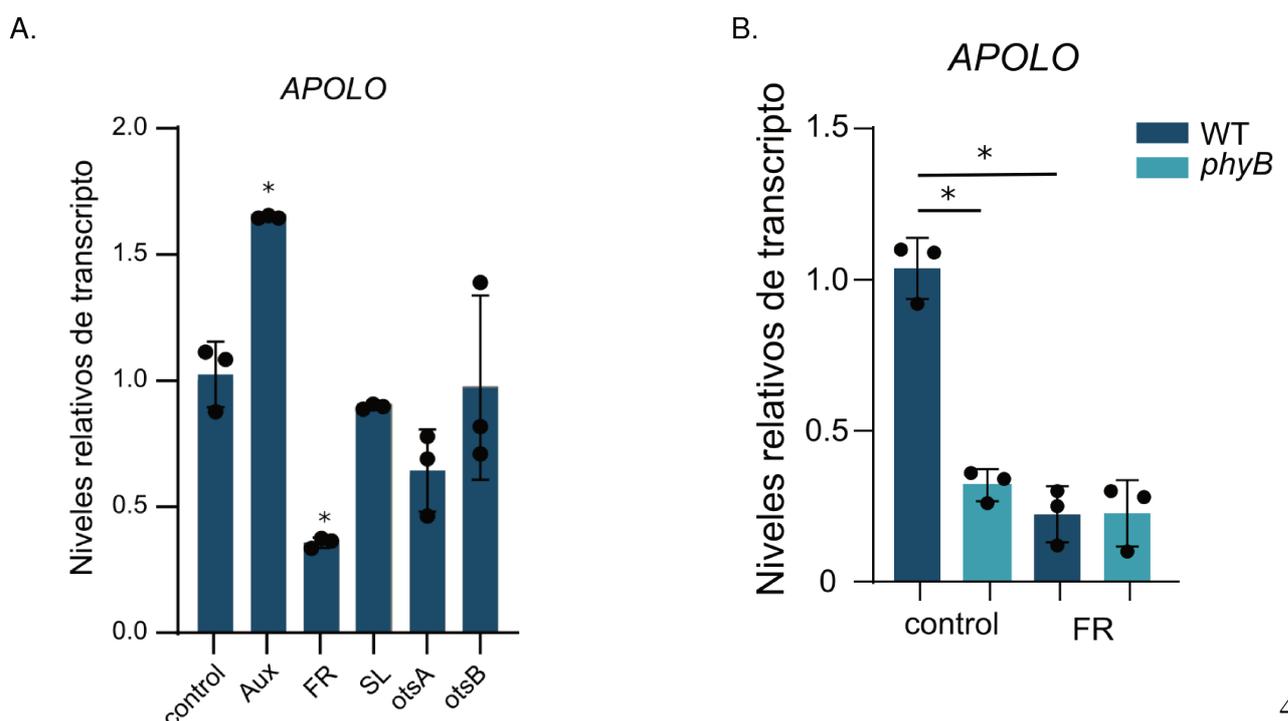


Figura 18. Regulación de *BRC1* mediada por *APOLO* en el contexto de sombreado. A) Niveles de expresión relativos de *APOLO* en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas salvajes y mutantes *phyB* en condiciones control y tratadas con luz blanca enriquecida con rojo lejano (FR). Las medidas individuales se muestran con puntos negros. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de plantas salvajes en condiciones control ($P \leq 0,05$; t student, $n=3$). B) Niveles de expresión relativos de *APOLO* en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas salvajes sin tratamiento (control), tratadas con auxinas (Aux), expuestas a luz blanca enriquecida en rojo lejano (FR), con aplicación de estrigolactonas (SL) y en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas *otsA* (una sobre expresante de la T6P sintasa, que acumula más trehalosa 6 fosfato) y *otsB* (sobre expresante de T6P fosfatasa, que tiene menos trehalosa 6 fosfato que una WT). Todas las mediciones individuales se muestran con puntos negro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($P \leq 0,05$; t student; $n=3$). WT indica plantas salvajes.

Considerando el comportamiento dinámico de *APOLO* en respuesta a auxinas (Ariel et al., 2014), caracterizamos su respuesta a las condiciones de baja relación R/FR. En un experimento a distintos tiempos a lo largo del día se observó que los niveles de *APOLO* en yemas axilares primero decrecen y luego se incrementan gradualmente hasta alcanzar niveles basales. Interesantemente, los transcritos de *BRC1* presentaron un comportamiento opuesto (Figura 19. A). En plantas que sobre expresan *APOLO* y las que tienen niveles reducidos, los niveles de transcritos de *BRC1* tienen el mismo comportamiento que en plantas salvajes, primero se incrementan y luego decrecen. Sin embargo, estos fueron más bajos que en plantas salvajes a lo largo de todo el tratamiento con luz enriquecida en FR (Figura 19. B).

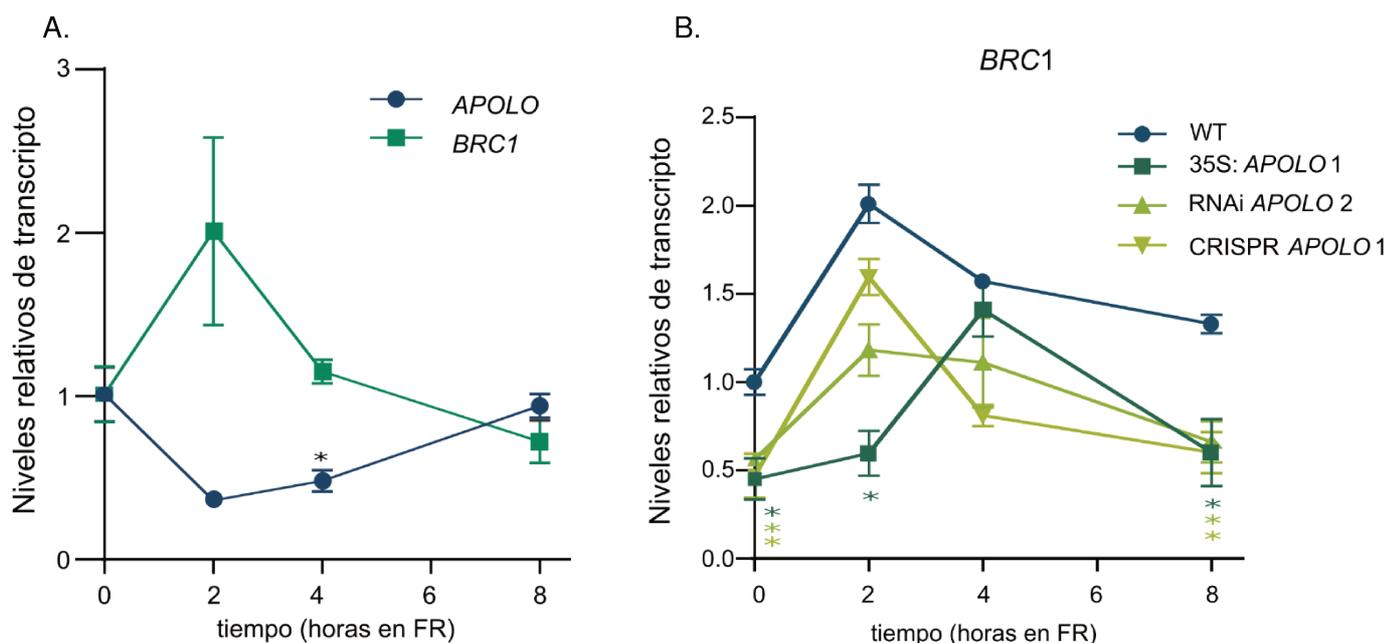


Figura 19. La respuesta de *APOLO* al FR varía a lo largo del día y es opuesta a la de *BRC1*. A) Niveles de expresión relativos de *APOLO* y *BRC1* en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas salvajes a las que se expuso durante 0, 2, 4 y 8 horas a luz blanca enriquecida en rojo lejano (FR). El asterisco indica diferencia significativa ($P \leq 0,05$; t student, $n=3$). B) Niveles relativos de expresión de *BRC1* en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas salvajes, 35S:*APOLO1*, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1* que fueron expuestas a luz blanca enriquecida con FR durante 0, 2, 4 y 8 horas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de la WT ($P \leq 0,05$; t student; $n=3$). WT indica plantas salvajes.

Luego caracterizamos la ramificación axilar en respuesta al tratamiento con luz enriquecida en FR. Como era de esperar (Holalu et al., 2020), una baja relación R/FR reprimió la ramificación en plantas salvajes. En las plantas sobre expresantes de *APOLO* que presentan más ramificaciones que las plantas salvajes en condiciones de luz control, se mantuvo una respuesta significativa al tratamiento con FR. En cambio, las plantas RNAi *APOLO* y CRISPR *APOLO* exhibieron un alto número de ramas en condiciones controladas, y además respondieron deficientemente al FR, sin verse afectadas en el número de ramas (Figura 20). En conjunto, estos resultados indican que los transcritos de *APOLO* son necesarios para la inhibición del crecimiento de yemas axilares inducido por luz enriquecida en FR.

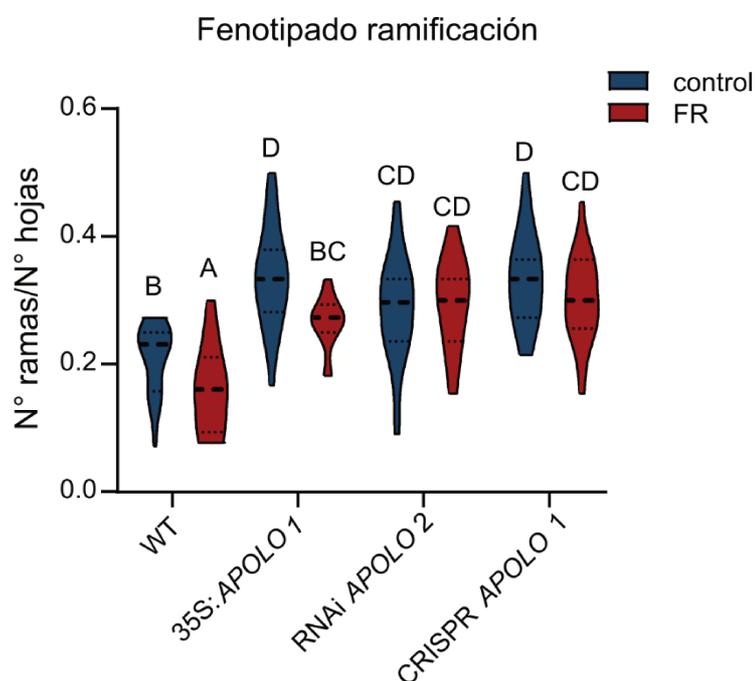


Figura 20. Las líneas con niveles reducidos de *APOLO* fallan en reprimir la ramificación en FR. Fenotipado de ramificación. Relación entre el número de ramas y de hojas de plantas salvajes, 35S:*APOLO1*, RNAi *APOLO2* y CRISPR *APOLO1* crecidas en condiciones control vs plantas tratadas durante 15 días con luz blanca enriquecida en FR. El término interacción "genotipo x

tratamiento de luz” del two-way ANOVA fue significativo ($P=0,019$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre las medias ($P\leq 0,05$; test de Tukey). WT indica plantas salvajes

Considerando el rol clave de la marca H3K27me3 en la formación de bucles de cromatina, nos preguntamos si esta marca está modulada por FR. Se realizó un ChIP-qPCR en muestras enriquecidas en yemas axilares y se observaron niveles normales de H3K27me3 en control vs. 8 hs de FR (Figura 21. A). Sin embargo, luego de 8 horas de tratamiento, cuando los niveles de *APOLO* retornan a niveles basales, el bucle de cromatina observado en hojas también fue detectado en yemas axilares (Figura 21. B).

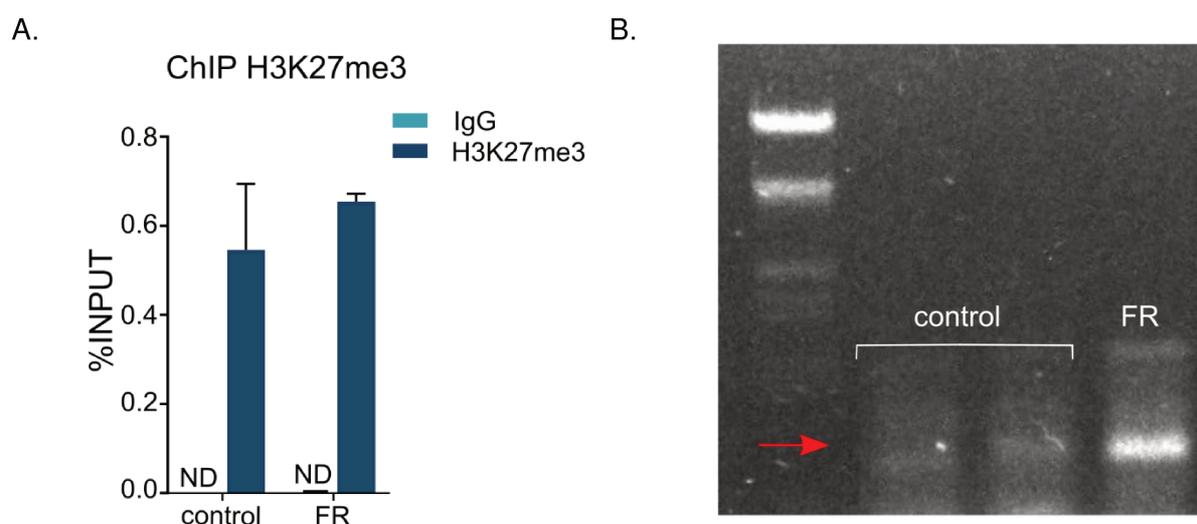


Figura 21. La formación del bucle de cromatina responde al tratamiento con FR, pero es independiente de H3K27me3. A) Deposition de H3K27me3 en el locus de *BRC1* determinada por ChIP-qPCR en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas salvajes luego de un tratamiento de 8 horas con luz blanca enriquecida en FR vs control con luz blanca. ND significa no detectado. Se usaron 2 replicados biológicos para cada línea y condición. B) Foto de gel de agarosa 1%. 3C-PCR en muestras enriquecidas en yemas de plantas salvajes con y sin tratamiento con FR. La flecha indica la banda correspondiente a la religación y amplificación del bucle de cromatina en el locus de *BRC1*. WT indica plantas salvajes.

En conjunto, los resultados indican que *APOLO* participa en la formación de un bucle de cromatina que responde a FR sobre el locus de *BRC1*. El comportamiento del bucle de cromatina parece alinearse con la abundancia de transcritos de *APOLO*, incluso en presencia de niveles invariables de H3K27me3. Esto sugiere la posibilidad de un mecanismo mediado por un ARNInc que ejerce una influencia alternativa en la expresión de genes en distintos contextos celulares. El FR reprime dinámicamente la expresión de *APOLO* e induce a *BRC1*. Considerando el rol significativo de *APOLO*

en la formación del bucle de cromatina en el locus de *BRC1*, los resultados apuntan a un rol de estos transcritos en la regulación epigenética de *BRC1* en respuesta al FR.

APOLO modula la respuesta de hiponastía de las hojas ante la exposición al rojo lejano

Habiendo establecido que el FR modula la expresión de *APOLO*, nos pareció interesante investigar si *APOLO* está involucrado en otra respuesta del SAS en *Arabidopsis thaliana*, tal como el control de la hiponastía de las hojas.

Estudios previos han mostrado que *APOLO* regula directamente en *cis* la expresión de su gen vecino *PID* (Ariel et al., 2014) y en *trans* al homólogo de *PID*, *WAG2* (Ariel et al., 2020). *PID* y *WAG2* codifican 2 quinasas que se encargan de determinar la posición de los transportadores de auxinas PIN en la membrana celular, y así modulan el flujo de auxinas (Benjamins et al., 2001; Dhonukshe et al., 2010). Además, otros estudios han demostrado que *APOLO* también controla la expresión de *YUCCA2* a través de la coordinación de la acción de LHP1 y VIM1 en la metilación de histonas y del ADN (Fonouni-Farde et al., 2022). Entre los genes *YUCCA*, *YUCCA2* es un factor clave en la biosíntesis de auxinas (Mashiguchi et al., 2011). Considerando que la síntesis, la acumulación y la distribución de las auxinas controlan la hiponastía en respuesta al FR (de Wit et al., 2015; Keuskamp et al., 2010; Küpers et al., 2023; Michaud et al., 2017; Pantazopoulou et al., 2017) proponemos que *APOLO* estaría involucrado en esta respuesta. Para demostrar nuestra hipótesis, expusimos las plantas a luz blanca suplementada con FR y medimos los cambios de ángulo de la hoja que más se levantó al finalizar el experimento durante un periodo de 8 horas. La misma hoja de cada planta fue considerada durante todo el experimento. En plantas salvajes, el ángulo máximo que alcanzaron fue a las 4 horas y varía entre 30 y 40 grados. En cambio, las plantas *knockdown* y *knockout* de *APOLO* exhibieron un movimiento retrasado y presentaron un ángulo final de entre 20 y 30 grados. Finalmente, las plantas sobre expresantes de *APOLO* presentaron el efecto más drástico en términos de retraso y ángulo final, que no excedió los 20 grados (Figura 22). Este resultado indica que, además de la ramificación, la desregulación de *APOLO* compromete la respuesta de hiponastía en respuesta al rojo lejano.

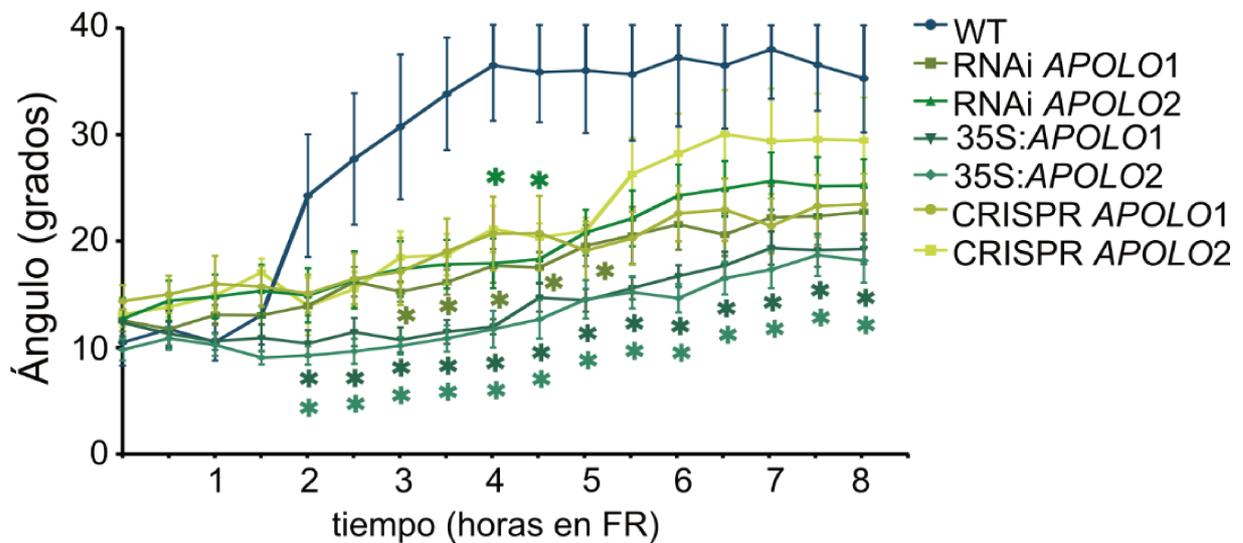


Figura 22. La respuesta de hiponastía está afectada en las líneas con niveles desregulados de *APOLO*. Medición del ángulo de elevación de la hoja más alta cada 30 minutos, durante un tratamiento de 8 horas con luz blanca enriquecida en FR. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas salvajes ($P \leq 0,05$; t student; $n=12$). WT indica plantas salvajes.

La aplicación exógena del ARN *APOLO* transcrito *in vitro* altera la homeostasis de auxinas de las plantas y la respuesta al rojo lejano

El efecto de la sobre expresión de *APOLO* nos llevó a pensar si un tratamiento exógeno con *APOLO* transcrito *in vitro* podría modular la respuesta de la planta al ambiente. Ha sido demostrado que las plantas pueden absorber ARNs exógenos, y con el tiempo ha aumentado el uso de transcritos doble hebra que funcionan como precursores para la producción de ARNs pequeños capaces de silenciar genes endógenos o bloquear infecciones de virus, hongos o incluso insectos (Rodríguez Melo et al., 2023). Sin embargo, el potencial uso de ARNinc epigenéticamente activos como moléculas bioactivas no había sido probado aún. Se realizó la transcripción *in vitro* del ARN *APOLO* y se roció plantas de *Arabidopsis thaliana* a las cuales al día siguiente se les realizó un tratamiento con FR durante 8 horas. Encontramos que luego de esas 8 horas de tratamiento, el ángulo final de la hoja más alta era significativamente menor en las plantas rociadas con *APOLO* que en las rociadas con el ARN *GFP* que fue usado como control (Figura 23).

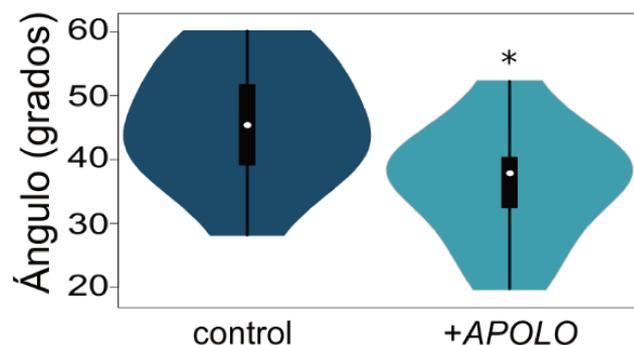


Figura 23. El agregado exógeno de *APOLO* simula una sobre expresión. Medición del ángulo de elevación de la hoja más alta, luego de 8 horas de exposición a la luz blanca enriquecida en FR, en plantas salvajes a las que se roció previamente con ARN transcrito in vitro de *APOLO* y *GFP* (control). El asterisco indica diferencia significativa ($P \leq 0,05$; t student; $n=12$).

Para determinar si el comportamiento diferencial obtenido con el tratamiento de agregado exógeno de *APOLO* estaba relacionado a la homeostasis de auxinas, se roció plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *DR5:GUS* de la misma forma que las plantas anteriores y se realizó la tinción histoquímica. Estas plantas contienen el promotor sintético de respuesta a auxinas *DR5* (Ulmasov et al., 1963) controlando la expresión del gen reportero *GUS*. Anteriormente, se ha descrito que la construcción *DR5:LUC* dirige la expresión del gen *LUC* que codifica para la luciferasa en la vasculatura de las hojas y el pecíolo en respuesta al FR (Pantazopoulou et al., 2017). Sorprendentemente, las plantas rociadas con *APOLO* exhibieron una tinción expandida en el contorno de la lámina de la hoja, indicando un impacto en la síntesis, distribución y/o señalización de auxinas (Figura 24. A). Para determinar si este efecto es mediado por la interacción directa de *APOLO* con la cromatina, usamos una versión de *APOLO* mutagenizada (*APOLOmut*) al cual se le mutagenizaron las 2 cajas TTCTTC, conocidas por ser esenciales para la formación de R-loops y reconocimiento de targets (Ariel et al., 2020). Notablemente, *APOLOmut* fue incapaz de inducir la expresión del reportero de auxinas de la forma que lo había hecho *APOLO* (Figura 24. B), sugiriendo que la interacción ARNinc-ADN es necesaria para desarrollar la respuesta biológica.

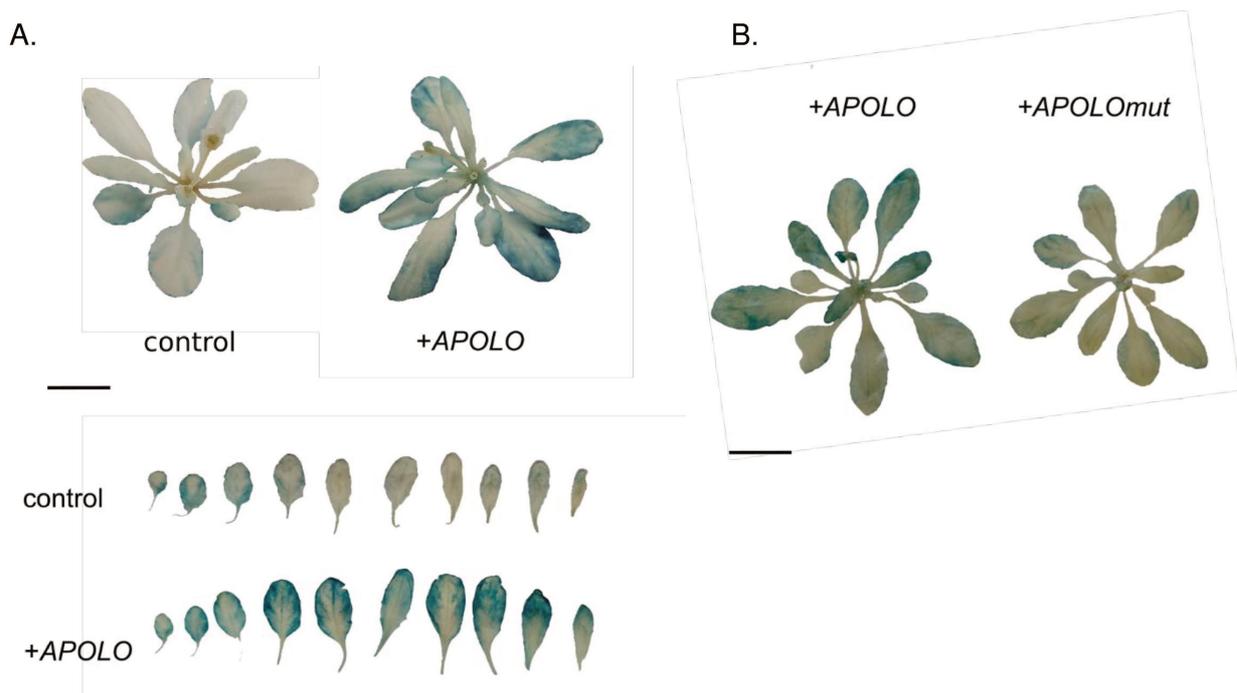


Figura 24. El agregado de *APOLO* exógeno produce una alteración en la homeostasis de las auxinas a través de la unión a sus genes blanco. A) Tinción de GUS de plantas DR5:GUS a las cuales se roció con *GFP* y *APOLO* transcritos *in vitro* y luego se expuso durante 8 horas a luz blanca enriquecida en FR. La barra negra de escala corresponde a 2 cm. B) Tinción de GUS de plantas DR5:GUS a las cuales se roció con *APOLO* y *APOLOmut* (incapaz de formar R-loops) y luego se expuso 8 horas a luz blanca enriquecida en FR. La barra negra de escala corresponde a 2 cm.

Para validar estos resultados, extrajimos núcleos de hojas de plantas salvajes a las que se había rociado con *APOLO* o *GFP* para cuantificar los niveles de transcritos tanto de estos como de genes blanco de *APOLO* involucrados en la homeostasis de las auxinas. A pesar de que se roció con la misma cantidad de ARN transcripto *in vitro* de *APOLO* y *GFP*, solo *APOLO* fue detectado acumulado en núcleo. Posiblemente esto haya ocurrido por una falta de reconocimiento de este ARN por parte de proteínas asociadas capaces de transportarlo al núcleo.

Considerando la relación entre SAS y la homeostasis de auxinas y el control de *APOLO* sobre los genes relacionados a auxinas, nos preguntamos cómo responden estos genes en las plantas rociadas con ARNs. Interesantemente, en las hojas que habían sido rociadas con *APOLO* (+*APOLO*) la abundancia de transcritos de *PID*, *WAG2* y *YUCCA2* fue aumentada (Figura 25), indicando que altos niveles de *APOLO* desencadenan la transcripción de genes blanco, desregulando así la homeostasis de auxinas. También se pudo observar que el agregado de FR en las plantas rociadas con *APOLO* (+*APOLO*+FR) no genera ningún efecto adicional al que genera *APOLO* por sí solo. En conjunto, los datos muestran que la aplicación exógena de un ARNinc es suficiente para desencadenar una activación mediada epigenéticamente de genes que modulan la homeostasis de auxinas y están involucrados en SAS.

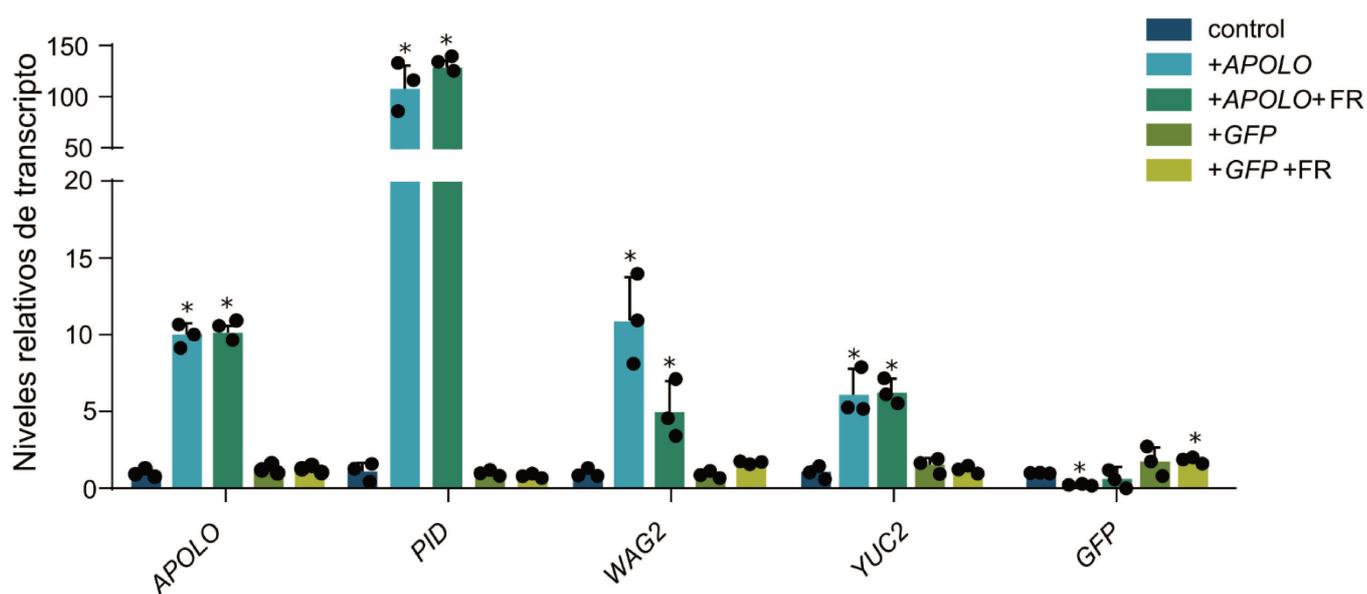


Figura 25. *APOLO* está involucrado en la respuesta de hiponastía frente al sombreado. Niveles de expresión relativos de *APOLO*, *PID*, *WAG2*, *YUC2* y *GFP* en núcleos extraídos de plantas salvajes sin tratamiento (control), rociadas con *APOLO* transcripto in vitro (+*APOLO*), rociadas con *APOLO* transcripto in vitro y expuestas durante 8 horas a luz blanca enriquecida con FR (+*APOLO*+FR), rociadas con *GFP* (+*GFP*) y rociadas con *GFP* y expuestas a FR 8 horas (+*GFP*+FR). Todas las mediciones individuales se muestran con puntos negro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y su control ($P \leq 0,05$; t student; n=3)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La luz controla el crecimiento y desarrollo de las plantas, permitiendo a estos organismos sésiles optimizar la captación y utilización de los recursos ambientales. Análisis fisiológicos y moleculares realizados en *Arabidopsis thaliana* y otras especies de plantas indican que la plasticidad de las respuestas frente a cambios en la intensidad y calidad de la luz se basan en la integración de señales de una amplia gama de actores hormonales (Fernández-Milmanda & Ballaré, 2021) siendo las auxinas quienes juegan un rol clave en las respuestas para evitar el sombreado (Li et al., 2012; Tao et al., 2008). En este contexto, el núcleo resulta un centro importante para la integración de señales a nivel cromatina (Patitaki et al., 2022), incluyendo la reorganización de la información genética en tres dimensiones. En este trabajo de tesis se mostró que el ARNinc *APOLO* participa en el SAS a través de la modulación de la conformación local de la cromatina en los loci de distintos genes blanco en yemas axilares y hojas, regulando la homeostasis de las auxinas y coordinando del desarrollo vegetal (Figura 26). Los diferentes niveles de transcritos de *APOLO* en estos órganos regulan la expresión de genes clave involucrados en las respuestas del SAS. Previamente ha sido reportado en un trabajo de nuestro laboratorio que *APOLO* es capaz de reconocer múltiples loci de respuesta a auxinas en *trans* a lo largo del genoma de *Arabidopsis thaliana* a través de la complementariedad de secuencia, formando R-loops. Como resultado de esto, *APOLO* afecta la dinámica de formación de bucles de cromatina y la actividad transcripcional de estos genes (Ariel et al., 2020). Entre ellos, se identificaron a su gen vecino *PID* (Ariel et al., 2014) y su homólogo *WAG2* (Ariel et al., 2020), involucrados en el transporte polar de auxinas, además del gen *YUCCA2* (Fonouni-Farde et al., 2022), involucrado en la síntesis de esta hormona vegetal. Más recientemente, se descubrió en células de mamíferos que existe una relación entre la formación de R-loops mediada por ARNinc y la conformación 3D de la cromatina (Luo et al., 2022), lo que señala que el mecanismo estaría conservado entre plantas y animales, conectando la transcripción no codificante, las estructuras no canónicas del ADN y la actividad génica.

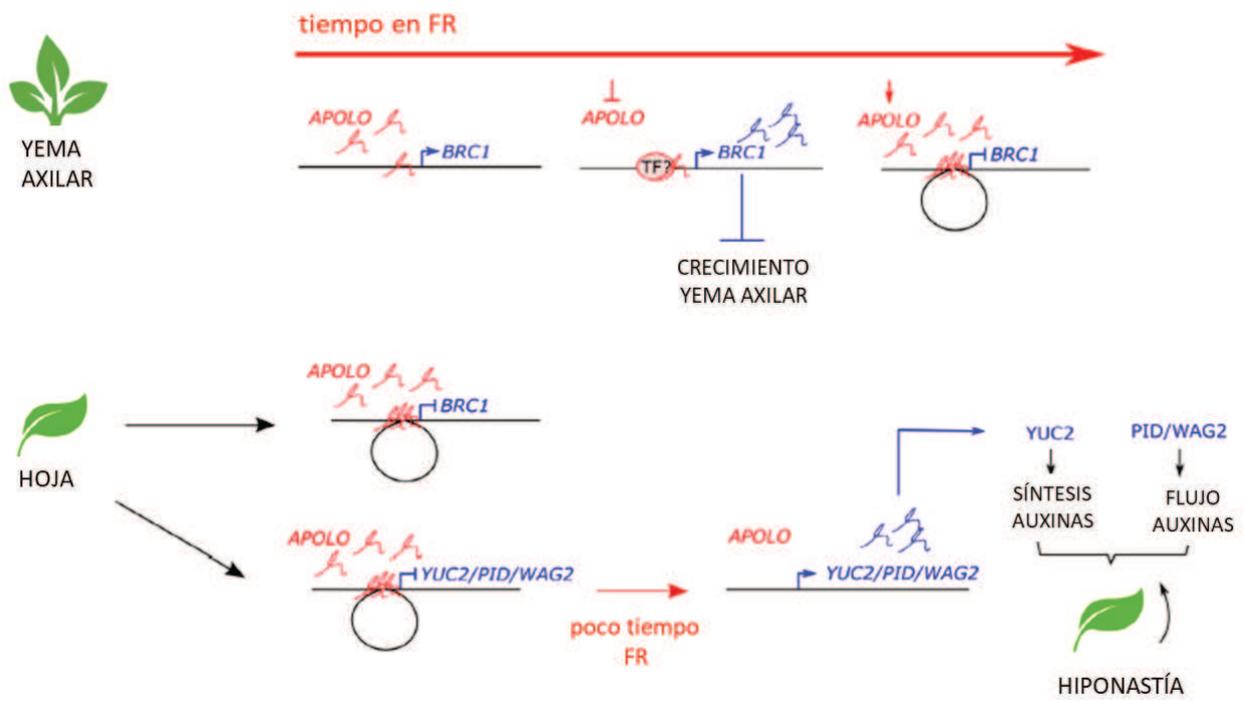


Figura 26. *APOLO* participa en las respuestas de *shade avoidance*. Los niveles de transcritos de *APOLO* son más altos en hojas que en yemas axilares. En condiciones basales, *APOLO* participa en la formación de un loop de cromatina que abarca el promotor de *BRC1*, *YUC2*, *PID* y *WAG2* en hojas. En respuesta a una baja relación R/FR, los niveles de *APOLO* disminuyen. En yemas axilares, esto permite la apertura del loop de cromatina sobre el promotor de *BRC1*, y por lo tanto se produce una inducción dinámica de este gen, probablemente a través de la interacción con proteínas como factores de transcripción (TF). Como resultado, la expresión de *BRC1* bloquea el crecimiento de las yemas axilares frenando la ramificación. A medida que transcurre el tiempo, los niveles de *APOLO* se incrementan y se produce nuevamente el cierre del loop, disminuyendo así los niveles de *BRC1*. En hojas, la activación de *YUC2*, *PID* y *WAG2* promueve la síntesis de auxinas y su transporte, dando lugar a la respuesta de hiponastía.

Durante este capítulo del trabajo de tesis se describió que *APOLO* se expresa en bajos niveles en las yemas axilares, en contraste con su alta expresión en hojas. En respuesta a una baja relación R/FR simulando el sombreado, la expresión de *APOLO* y *BCR1* siguen un patrón opuesto sugiriendo que el FR podría inducir la expresión de *BCR1* aliviando la represión causada por el bucle de cromatina dependiente de *APOLO* en el locus de *BCR1*. Interesantemente, en las líneas RNAi y CRISPR, la suplementación del FR falló al suprimir la ramificación (Figura 20), sugiriendo que los transcritos de *APOLO* son necesarios para esta respuesta a la sombra mediada por *BCR1*. En este sentido, el hecho de que la reducción de los niveles de *APOLO* y la sobreexpresión resulten en fenotipos fisiológicos similares (como la reducción de la dominancia apical y la hiponastía de las hojas) surgen como observaciones desconcertantes. Sin embargo, una situación similar fue observada con otro fenotipo

del desarrollo relacionado a las auxinas como la expansión de los pelos radiculares (Moison et al., 2021). Se ha propuesto que bajos y altos niveles de *APOLO* tendrían similares efectos moleculares sobre los genes blanco. En raíces, se ha demostrado que tanto el *knockdown* como la sobreexpresión de *APOLO* perjudican el reconocimiento del ADN del factor de transcripción WRKY42. Como resultado, la activación del gen blanco por frío por acción del complejo *APOLO*-WRKY42, *RHD6*, se ve afectada, así como también la elongación de los pelos radiculares. De manera similar, bajos niveles de *APOLO* imposibilitan la formación del complejo compuesto por LHP1 y VIM1 sobre el locus de *YUCCA2* en calor. Notablemente, la sobreexpresión de *APOLO* también impide la unión de LHP1 y VIM1 al locus del gen blanco, acción que fue reproducida con la sobreexpresión del ARNinc de humanos *UPAT* (Fonouni-Farde et al., 2022). En este trabajo se observó que bajos niveles de *APOLO* (tanto en las líneas *knockdown* como en las *knockout*) resultan en un fenotipo similar al de las plantas que sobreexpresan *APOLO*, teniendo en cuenta la ramificación y la respuesta de hiponastía. En yemas axilares, los niveles de *BRC1* son significativamente más bajos en todos los fondos genéticos comparados con las plantas salvajes. Sin embargo, las razones que explicarían la desregulación de *BRC1* serían diferentes. Por un lado, los altos niveles de *APOLO* estimulan la formación de un bucle de cromatina que comprende la región promotora de *BRC1*, parecido a lo que ocurre en una respuesta tardía frente a una baja relación R/FR. Por el otro, el *knockdown* o *knockout* de *APOLO* podría fallar en la activación de *BRC1* a través de la interacción con otras proteínas, de forma similar al mecanismo descrito para WRKY42 en el control de la expresión de *RHD6* (Moison et al., 2021). En conclusión, los resultados expuestos anteriormente se alinean con hallazgos precedentes sobre el papel de *APOLO* en respuesta al frío (Moison et al., 2021) y al calor (Fonouni-Farde et al., 2022). Además, nuestros estudios apoyan la base estequiométrica de la acción de *APOLO*, dilucidando cómo integra la formación de bucles de cromatina con la participación de las proteínas asociadas.

Entre las angiospermas, la supresión del crecimiento de las yemas axilares depende de un mecanismo altamente conservado que involucra genes del tipo *BRC1*. En *Nicotiana tabacum*, una serie de ARNinc han sido propuestos como participantes del crecimiento de las yemas axilares (Wang et al., 2022). Al menos 4 ARNinc fueron presentados como actores corriente abajo de *NtTB1* (el ortólogo de *BRC1* en *Nicotiana*), mientras que *MSTRG.28151.1* fue identificado como un ARNinc antisentido de *NtTB1*. La reducción de los niveles de *MSTRG.28151.1* atenúan significativamente la expresión de *NtTB1* y resulta en mayor cantidad de ramificaciones. No obstante, el mecanismo molecular involucrado es desconocido. En hojas de maíz, se han identificado varios bucles de cromatina sobre el locus de *TB1* en concordancia con la deposición de H3K27me3, insinuando un silenciamiento epigenético del gen *TB1* en este órgano (Ricci et al., 2019). Sin embargo, aún se desconoce si la deposición de H3K27me3 y/o la conformación tridimensional de la cromatina en el locus de *TB1* está controlada por la acción de algún ARNinc. En este trabajo de tesis se muestra cómo un ARNinc intergénico regula la ramificación en *Arabidopsis thaliana* a través de la modulación directa de la expresión de *BRC1* en *trans*. La desregulación de *APOLO* afecta la deposición de la marca H3K27me3, aunque una

recuperación tardía de los niveles de *APOLO* por la baja relación R/FR (8 hs) parece impulsar la formación de un bucle de cromatina abarcando el promotor de *BRC1*, causando la represión transcripcional, independientemente de la deposición de H3K27me3. Los resultados sugieren que la respuesta transcripcional del ARNlnc podría modular la conformación de la cromatina más rápidamente que las modificaciones de las histonas. La notoria abundancia de H3K27me3 sobre el locus de *BRC1* en hojas sugiere que la represión mediada por el complejo PRC2 juega un rol importante en el control de la expresión tejido-específica de *BRC1*. Además, este estudio remarca la importancia de caracterizar el rol de los ARNlnc en diferentes órganos, considerando que altos niveles de *APOLO* desencadenan la adopción de conformaciones tridimensionales alternativas sobre el mismo locus.

Asimismo, las observaciones realizadas a partir de estos resultados sugieren el rol de *APOLO* en la respuesta de hiponastía a la baja relación R/FR a través de la modulación de genes blanco previamente reportados. El FR modula la síntesis de auxinas (Michaud et al., 2017), su dinámica (Pantazopoulou et al., 2017) y redistribución (Keuskamp et al., 2010; Küpers et al., 2023), las cuales son necesarias para desencadenar la hiponastía de las hojas. Además, el FR inactiva a *phyB*, lo que resulta en un incremento en la actividad del factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR7 (PIF7) (Li et al., 2012). PIF7 controla la redistribución de las proteínas PIN y las auxinas (Michaud et al., 2017) y, en conjunto con otros miembros de la familia PIF, regula la respuesta de hiponastía en respuesta al FR (Küpers et al., 2023). Considerando que PIF7 activa la síntesis de auxinas a través de los genes *YUCCA* (Li et al., 2012), y que *APOLO* es inducido por auxinas, es posible que la redistribución de las PIN se deba a la activación epigenética mediada por *APOLO* de *PID* y *WAG2* (Ariel et al., 2020), que pueden fosforilar a las proteínas PIN en respuesta al FR, produciendo la hiponastía. Además, *APOLO* regula directamente el gen de síntesis de auxinas *YUCCA2* (Fonouni-Farde et al., 2022), señalando un *feedback* positivo mediado por el ARNlnc en respuesta a la baja relación R/FR. Por otro lado, el impacto opuesto de la baja relación R/FR y el agregado exógeno de auxinas en la acumulación de *APOLO* (Figura 18 A) podría explicar la respuesta dinámica de *APOLO* durante el transcurso del tiempo bajo FR, es decir, una represión inicial seguida de un incremento gradual en los niveles de expresión de *APOLO* (Figura 19 A). En plantas mutantes en *phyB* con el balance de auxinas alterado, *APOLO* exhibe niveles de expresión basales bajos y una sensibilidad alterada al FR (Figura 18 B).

APOLO coordina la metilación de histonas y del ADN para bloquear la transcripción de *YUCCA2* en condiciones basales, a través de la interacción directa con LHP1 y la proteína de unión al ADN hemimetilado VIM1. En respuesta al calor, los niveles de *APOLO* decrecen, el complejo ribonucleoproteico se desarma y la transcripción de *YUCCA2* se incrementa, desencadenando la respuesta de termomorfogénesis dependiente de auxinas (Fonouni-Farde et al., 2022). Temperaturas altas promueven la elongación del hipocotilo y pecíolos y la hiponastía de las hojas (Casal & Balasubramanian, 2019; Quint et al., 2016). Estos patrones de crecimiento son similares a los que se

activan durante el SAS y, de hecho, ambas respuestas comparten importantes actores moleculares, incluyendo phyB y algunos factores de transcripción (Burko et al., 2022; Chung et al., 2020; Fiorucci et al., 2020; Koini et al., 2009; Li et al., 2012; Quint et al., 2016).

La baja relación R/FR o temperaturas elevadas activan las vías de auxinas (Bellstaedt et al., 2019; Kohnen et al., 2016) mediante la regulación transcripcional dependiente de PIF de los genes *YUCCA*. Ha sido demostrado que PIF4 modula el movimiento hiponástico de las hojas bajo temperaturas elevadas a través de la señalización de auxinas de dos vías (Park et al., 2019b). Por un lado, PIF4 activado por una elevada temperatura induce directamente la transcripción de *PID* en células del pecíolo, resultando en una acumulación polar de las auxinas. Por el otro, PIF4-YUC8 promueve la producción de auxinas en la lámina de las hojas, que es transportada al pecíolo y funciona como sustrato para la maquinaria PIN3. La transcripción de *PID* mediada por PIF4 ocurre mayormente en la cara abaxial del pecíolo produciendo la hiponastía de la hoja mediada por PIF4 (Park et al., 2019b). Interesantemente, PIF4 reconoce el promotor de *PID*, es decir, la región intergénica entre *PID* y *APOLO*. La desregulación de *APOLO* también afecta la elongación de hipocotilos en respuesta al calor, y el transcriptoma de las plántulas que sobreexpresan *APOLO* se asemeja al de una planta salvaje crecida en calor (Fonouni-Farde et al., 2022). En conjunto, estos estudios y los datos obtenidos en este trabajo de tesis muestran que la desregulación de *APOLO* impacta en la ramificación y la hiponastía, planteando la posibilidad de que *APOLO* integre las vías de señalización de temperatura y luz mediante la modulación de la vía de las auxinas.

Recientemente, se identificaron ARNlnc regulados por FR en *Dendrobium officinale*, y se sugirió que podrían estar involucrados en SAS a través de la transducción de señales hormonales y metilación del ADN (Li et al., 2021). Sin embargo, los potenciales roles dentro de estas vías siguen siendo desconocidos. En *Arabidopsis thaliana*, el ARNlnc *HIDDEN TREASURE 1 (HID1)* regula positivamente la fotomorfogénesis bajo una relación R/FR baja, desregulando los niveles de expresión de PIF3 (Y. Wang et al., 2014). Se ha sugerido que *HID1* participa de un complejo ribonucleoproteico y se asocia con el primer intrón del locus de *PIF3*. Otro ARNlnc de *Arabidopsis thaliana* involucrado en la fotomorfogénesis es *BLUE LIGHT INDUCED LNCRNA 1 (BLIL1)*, que participa en la regulación de este proceso bajo condiciones de luz azul y en respuesta a estrés por manitol a través del secuestro del miR167 (Sun et al., 2020). De manera similar, nuestros datos muestran que el ARNlnc de respuesta a auxinas *APOLO* está también involucrado en SAS. Interesantemente, hemos descubierto un rol órgano específico de *APOLO*, dependiente de la acumulación relativa de transcritos. Además, la aplicación exógena del ARN *APOLO* transcrito *in vitro* desencadena respuestas mediadas por auxinas. *APOLO* es un ARNlnc enriquecido en el núcleo (Ariel et al., 2014), y hasta la fecha, su presencia no ha sido detectada en polisomas. Estas observaciones, junto con su bajo potencial codificante, apoyan el rol de *APOLO* como un transcrito no codificante, aunque tenga un pequeño ORF potencialmente traducible. En este trabajo se mostró que a partir del agregado mediante spray de *APOLO* transcrito *in vitro* (sin CAP ni cola de poli A) este se acumula en el núcleo en contraste con el

ARN de *GFP* usado como control. Como resultado, *APOLO* activa la transcripción de los genes blanco y modula el fenotipo de hiponastía de las plantas frente al FR (Figura 22). Por lo tanto, estos resultados proveen fuerte evidencia que apoya la idea de que *APOLO* funciona como un transcripto no codificante en vez de un ARNm traducible.

Un número creciente de reportes en plantas indican que la aplicación exógena de ARNs doble cadena desencadenan cambios en la expresión génica, a veces dirigiéndose a genes endógenos o genes específicos de patógenos resultando en resistencia a la infección (Rodríguez Melo et al., 2023). Este trabajo muestra que la aplicación exógena de *APOLO* activa la expresión de blancos específicos a través de la interacción directa con la cromatina y que esta respuesta está sustentada por motivos específicos de la secuencia que son las cajas TTCTTC con la que forma los R-loops. Esto abre la puerta a nuevas estrategias para modular el crecimiento de las plantas y sus respuestas al ambiente mediante la aplicación de ARNinc epigenéticamente activos.

CAPÍTULO 2. EL ORIGEN DE APOLO

INTRODUCCIÓN

En los últimos años han surgido numerosos estudios con el objetivo de identificar nuevos ARNInc y sus funciones. Sin embargo, y sobre todo en plantas, poco se conoce sobre el origen y la evolución de estos. En vertebrados, según Kapusta y colaboradores (Kapusta et al., 2013), existen 4 hipótesis no mutuamente excluyentes acerca del origen de los ARNInc. Estas son:

- a partir de la transformación de un gen codificante
- a través de la duplicación de otro ARNInc
- de novo* a partir de secuencias previamente no transcriptas o sin exones
- a partir de transposones.

En el caso de *Xist*, un ARNInc que controla la inactivación del cromosoma X en mamíferos, se observó que se origina en el ancestro euteriano a partir de una mezcla de exones de genes que codificaban anteriormente proteínas, en conjunto con TEs que se fueron acumulando progresivamente en ese locus. Se ha observado también que, en humanos, ratón y zebrafish existe una gran cantidad de ARNInc que presentan al menos una parte de origen TE, lo que apoya estas hipótesis. Y, además, se cree que los TEs al ser elementos repetitivos podrían estar involucrados en la estructura secundaria de los ARNInc, contribuyendo a su plegamiento (Kapusta et al., 2013). Sin embargo, exceptuando algunos ARNInc muy estudiados, el origen de la mayoría sigue siendo desconocido.

Por otro lado, estudiando la conservación de los ARNInc entre especies y comparándola con la conservación de genes codificantes, se observó que los ARNInc están menos conservados que las regiones UTR y se vio que en humanos acumulan mutaciones a tasas elevadas. De este tipo de estudios surge la hipótesis de que los ARNInc son destacadamente plásticos y no requieren un alto grado de conservación para funcionar (Palazzo & Koonin, 2020). Lo que se sugiere es que la función dependería fundamentalmente de la estructura y no de la secuencia específica.

En plantas, la baja calidad de los genomas junto con la disparidad en los esquemas de identificación, sumado a los diferentes estadios de desarrollo y condiciones ambientales en los que se realizan los experimentos, al alto grado de divergencia de secuencias entre los ARNInc y la falta de buena anotación y caracterización de estos, hace difícil la comparación de secuencias o estructuras de los ARNInc entre especies (Palos et al., 2022; Sang et al., 2021). Es por esto que, hasta el momento, se

han realizado pocos análisis de conservación evolutiva de ARNlnc en plantas. En ellos se observó que la conservación de estos entre diferentes especies de plantas es menor que la que se puede encontrar en animales (Deng et al., 2018). Sin embargo, se han reportado algunos ARNlnc homólogos en diferentes especies (Sang et al., 2021), lo que sugiere que podrían participar en mecanismos moleculares y eventos del desarrollo similares en especies diferentes.

En un estudio realizado por Sang y colaboradores (Sang et al., 2021), donde analizaron las secuencias anotadas de los ARNlnc de 25 especies de plantas con flores, se observó que algunos de ellos se encuentran desde el inicio de las angiospermas. Además, se observó que un pequeño porcentaje (6.79%) de los ARNlnc analizados están conservados en el reino vegetal y se determinó que el porcentaje de conservación de ARNlnc entre *A. thaliana* y las demás especies es de 15.56%, un porcentaje elevado en comparación con las otras especies analizadas donde éste ronda el 7%. Además, analizando y clasificando estos ARNlnc en conservados y no conservados, observaron que los conservados tienen secuencias más largas, más exones y niveles de expresión más altos que los no conservados. También presentan especificidad de tejido más baja, lo que implica que los ARNlnc conservados son más propensos a la expresión constitutiva. En esta investigación concluyen que los ARNlnc conservados podrían estar involucrados en las relaciones regulatorias establecidas tempranamente en la evolución de las plantas. Además, la expresión específica de los ARNlnc en diferentes tejidos refleja que podrían desempeñar funciones importantes en diversas etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas (Sang et al., 2021).

Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Palos y colaboradores donde se analizaron las secuencias de los ARNlnc intergénicos (ARNlinc) anotados en 4 especies pertenecientes a la familia Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana*, *Camelina sativa*, *Brassica rapa* y *Eutrema salsugineum*) se ha observado que estos presentan ciertas características comunes como ser: menor contenido GC que los genes codificantes, los transcriptos son en promedio más cortos que los ARNm y los exones suelen ser más largos que los de genes codificantes. Sin embargo, en algunas especies existen excepciones. Por ejemplo, la mayoría de los ARNlnc en *Arabidopsis* son monoexónicos (Palos et al., 2022). En este mismo estudio se observó que en *Arabidopsis* el 7.8% de los ARNlinc anotados son específicos de la especie y un 29% están restringidos al género. Además, se analizaron específicamente 5 ARNlinc muy estudiados en *Arabidopsis*: *HID1* de respuesta a luz, *DRIR* de respuesta a sal, *APOLO*, *ELENA* asociado a resistencia a patógenos y *SVALKKA* de respuesta al frío. Para *HID1*, se encontró que existe el locus en las 4 Brassicaceae estudiadas. Además, se identificó un parálogo de este en *Arabidopsis* que no había sido reportado hasta el momento y se encontraron otros en otras Brassicaceae. Se identificaron homólogos de secuencia para *ELENA* y *SVALKKA* en *Camelina*, pero no se encontraron en las especies relacionadas más distantes. A pesar de esto, fue posible identificar 4 ARNlinc adyacentes a múltiples loci *CBF1* en *Brassica rapa*, en una orientación y distancia similar a la de *SVALKKA* a *CBF1* en *Arabidopsis* que podrían estar cumpliendo la misma función.

También se identificaron 2 parálogos de *APOLO* en *Arabidopsis thaliana* y múltiples parálogos en *A. lyrata*, pero no se pudieron identificar secuencias homólogas en otras especies. Ninguno de los homólogos de *APOLO* en *A. lyrata* está adyacente a *PID1* por lo que sugieren que la función podría no estar conservada. En cuanto a *DRIR*, no se encontraron secuencias homólogas en ninguna Brassicaceae de las analizadas. Sin embargo, se identificó un locus *DRIR* putativo en *Brassica rapa*, lo que sugiere que este ARNlinc podría estar conservado funcionalmente fuera del género *Arabidopsis*.

Sin embargo, a pesar de haberse encontrado parálogos de estos ARNlinc, se desconoce si las funciones y los mecanismos moleculares están conservados o no.

Por otro lado, y teniendo en cuenta la existencia de ARNlinc parálogos, también se analizó la frecuencia de expansión o contracción de familias de ARNlinc y si esta dinámica es coincidente con los eventos de duplicación genómica. De este análisis se observó que para *Arabidopsis* y *Eutrema*, que no tienen duplicaciones recientes, las familias de ARNlinc son predominantemente estables, mientras que para *Camelina* y *Brassica*, que sufrieron recientemente triplicación del genoma, la mayoría de los ARNlinc se encuentran en 1 o 2 copias en vez de 3, indicando que los parálogos fueron removidos por fraccionamiento durante la duplicación del genoma (Palos et al., 2022).

Además de los estudios comparando secuencias y, sabiendo que los ARNlinc son muy estructurados y su función podría depender de dicha estructura, se realizaron algunos análisis evolutivos centrados en la conservación de estructuras secundarias. Este tipo de análisis no es tan común debido a que, en plantas, son pocos los ARNlinc que tienen estructuras resueltas (Bugnon et al., 2022). Sin embargo, se sugiere que se podrían determinar conservaciones estructurales que puedan definir su función y que, estudiando por comparación de secuencia, se perderían.

A diferencia de los ARNlinc, *COOLAIR* es un transcrito antisentido del locus *FLC* en *Arabidopsis thaliana* (Swiezewski et al., 2009), lo cual facilitó su identificación en otras especies vegetales. Se observó que sus exones corresponden a secuencias no codificantes de la hebra sentido y están pobremente conservados en plantas evolutivamente distantes. Sin embargo, analizando químicamente la estructura secundaria de estos exones en distintas especies de la familia *Brassicaceae*, se observó la conservación estructural desde *Arabidopsis thaliana* a *Brassica rapa*. Esto podría sugerir una misma función en las distintas especies. Además, se pudo observar que algunas alteraciones dentro de esta estructura serían las que permitirían explicar diferencias en su función como ocurre entre los ecotipos *Col0* y *Var2-6* que presenta fenotipo de retardo en la floración (Hawkes et al., 2016).

EARLY NODULIN 40 (ENOD40) fue el primer ARNlinc identificado en plantas, y fue caracterizado en el marco de la nodulación simbiótica de las plantas leguminosas (Crespil et al., 1994; Ganguly et al., 2021; Röhrig et al., 2002), y es capaz de relocalizar a su proteína asociada, el factor de splicing RBP1, del núcleo al citoplasma (Campalans et al., 2004). Analizando sus estructuras, también se encontró

que aparentemente *ENOD40* está conservado en las angiospermas y se encontraron homólogos no anotados previamente por la baja homología de secuencia. Sin embargo, las estructuras secundarias identificadas presentan alta diversidad de elementos estructurales, combinados con características conservadas. Esto sugiere que durante su evolución podría haberse mantenido el núcleo principal, potencialmente encargado de la localización y/o afinidad con proteínas, mientras que se generaron otras estructuras menos conservadas que podrían ser las encargadas de determinar con qué proteínas va a interactuar o qué patrones de splicing alternativo va a beneficiar (Gulyaev et al., 2023).

Al comienzo de esta tesis doctoral, y previo a la publicación del trabajo de Palos y colaboradores, ya se había realizado en el laboratorio una búsqueda de secuencias usando la herramienta BLAST utilizando como secuencia *query* a *APOLO* (AT2G34655; (Ariel et al., 2014)) de *Arabidopsis thaliana* y se evaluaron secuencias similares dentro de la familia *Brassicaceae* (Tesis de Licenciatura de Virginia Ibarra, 2019). Exclusivamente, se encontraron secuencias similares en *A. thaliana*, *A. lyrata* y *A. halleri*, todas ellas pertenecientes al género *Arabidopsis*. Sin embargo, no hubo secuencias similares en ninguna de las demás especies analizadas de la familia. Se aclara que se estableció como límite inferior un tamaño de 200 bp para la búsqueda de potenciales homólogos, que es lo esperado para que un transcripto largo no codificante sea considerado como tal. Habiendo identificado otros ARNinc similares a *APOLO* se decidió analizar si todos cumplen la misma función y si actúan a través del mismo mecanismo que lo hace el ya estudiado de *A. thaliana*, al que denominamos *Ath_APOLO 1*.

OBJETIVOS

1. Indagar sobre el origen evolutivo y molecular de *APOLO*.
2. Si existe(n) otra(s) copias de *APOLO* en la familia Brassicaceae u otras familias de plantas con flores, determinar su función y mecanismo de regulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los ensayos realizados durante esta tesis se llevaron a cabo utilizando *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) y *Arabidopsis lyrata* cuyas semillas fueron provistas por *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC).

Las plantas fueron crecidas en macetas bajo condiciones de luz de día largo (16 horas de luz, 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 8 horas de oscuridad) a 23° C.

Cepas bacterianas

Los clonados fueron realizados utilizando la cepa de *Escherichia coli* DH5 α [supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1r) thi-1 relA1]. Para la transformación de *Arabidopsis* se empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina.

Vectores

pENTR3C: es un vector de entrada (Entry Vector) diseñado para el clonado mediante el sistema Gateway (Life Technologies). Este vector permite el clonado de una secuencia de ADN de interés dado que cuenta con un sitio de múltiple clonado entre los sitios denominados attL. La secuencia clonada entre estos sitios puede recombinarse con los sitios attR del vector binario de destino (Destination Vector). Este vector genera resistencia a kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) en bacterias.

35S:6XMS2:GW: es un vector de destino (Destination Vector) binario diseñado para el clonado mediante sistema Gateway que dirige la expresión constitutiva de la secuencia de interés clonada en plantas. El vector posee los sitios de recombinación attR que se encuentran corriente abajo del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) y de las secuencias MS2 x 6. Contiene además un cassette de selección en plantas (BaR: resistencia a Basta® (glufosinato de amonio, Bayer, CropScience)) para conferir resistencia a las plantas transformadas.

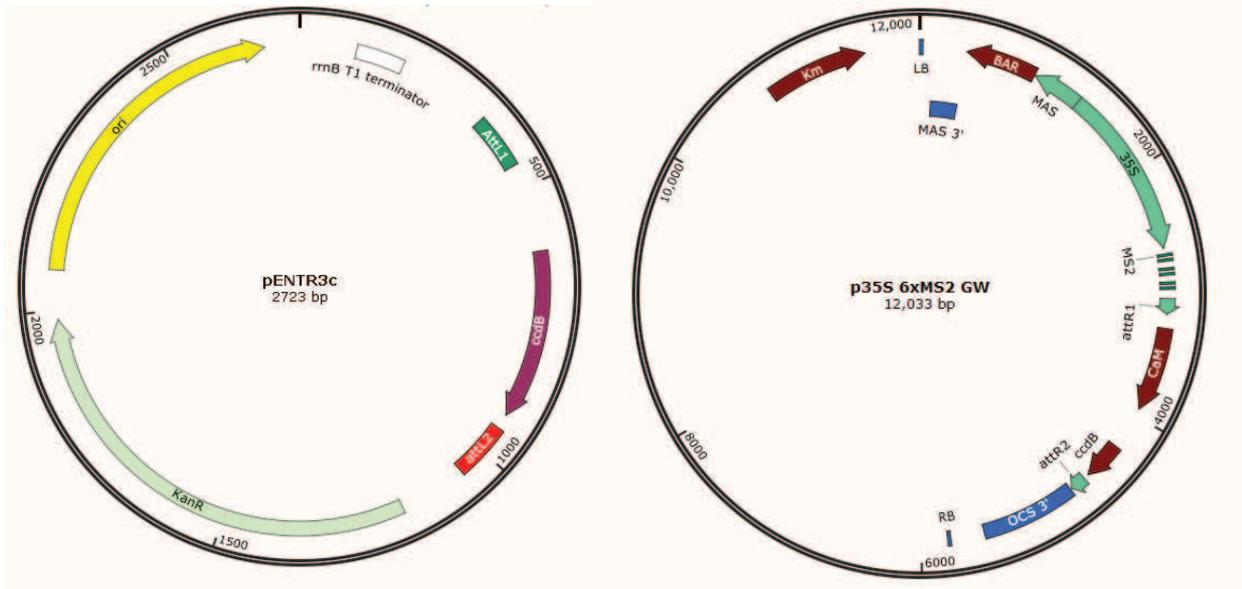


Figura 27. Representación de los vectores utilizados. A. Vector pENTR3C. B. Vector p35S:6XMS2:GW

Medios de cultivo para *E. coli* y *A. tumefaciens*

Medio Luria-Bertani (LB): Peptona de carne 10 g/l; NaCl 5 g/l; extracto de levadura 5 g/l.

Para preparar medio LB sólido se adicionó agar-agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l (1,5% p/v).

Búsqueda de secuencias

Para la búsqueda de secuencias similares a *APOLO* se utilizó la herramienta BLAST consultando la base de datos Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov; versión V12.1.6). Como secuencia query se utilizó la del ARNinc *APOLO* (AT2G34655; (Ariel et al., 2014)) de *Arabidopsis thaliana* y se evaluaron secuencias similares de más de 200pb dentro de la familia *Brassicaceae*. A partir de las secuencias obtenidas se construyeron con ellas archivos en formato FASTA. Con estos archivos se llevaron a cabo los alineamientos de secuencias con Muscle y ClustalW (Edgar, 2004; Larkin et al., 2007), utilizando parámetros estándar.

Análisis filogenéticos

Para la realización de los análisis filogenéticos se utilizaron los alineamientos realizados como se indicó anteriormente. Dichos análisis se realizaron usando el criterio de máxima verosimilitud (MV) y por medio de inferencia bayesiana (IB), implementados en los programas RaxML (Versión 8; (Stamatakis, 2014)) y Mr Bayes (3.1.2; (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)), respectivamente. El valor de

soporte de las ramas se obtuvo con 1000 réplicas de Bootstrap, para el análisis de MV, y mediante probabilidad posterior para IB.

Análisis bioinformático

Para caracterizar *in silico* si las secuencias encontradas son también ARNinc, se consultaron las siguientes bases de datos de acceso público a través de internet:

-Coding Potential Calculator (<http://cpc.pku.edu.cn>; (Kong et al., 2007)), es una base de datos que evalúa el potencial codificante de una determinada secuencia, y de esta forma permite discriminar entre secuencias codificantes y no codificantes.

-UniProt (<http://uniprot.org>), es una base de datos que almacena información sobre secuencias, estructuras y funciones de proteínas y péptidos.

-Rfam 14.1 (<http://rfam.xfam.org>), es una base de datos de ARNs estructurales como tRNA, rRNA, snRNA.

-Plant non-coding RNA database (PLncDB) (<http://chualab.rockefeller.edu/gbrowse2>; (Jin et al., 2013)), esta base de datos contiene datos aportados por distintos ensayos de tiling array y se utiliza para verificar la existencia de transcritos en determinadas regiones del genoma de *A. thaliana*.

-The Arabidopsis Information Resource TAIR (<https://www.arabidopsis.org>) y Araport (<https://www.araport.org>) permiten evaluar la identidad de los genes de potencial interés. Además, Araport permite verificar la presencia de TEs.

Además, se utilizó el software Integrated Genome Browser (IGB; (Nicol et al., 2009)). Esta herramienta permite analizar los datos obtenidos de experimentos a escala genómica. En este trabajo se analizaron datos de Hi-C obtenidos por (C. Liu et al., 2016) y (Veluchamy et al., 2016); de metilación del ADN obtenidos de (Zhu et al., 2017) y (Seymour et al., 2014); de deposición de H3K27me3 mediante ChIP-Seq de (Cui et al., 2016; J. Liu et al., 2015; Veluchamy et al., 2016; H. Wang et al., 2016; Yang et al., 2016). Para *A. lyrata* se utilizaron datos de RNA-Seq de (Rawat et al., 2015); de ChIP-Seq de H3K27me3 de (Göbel et al., 2018; Zhu et al., 2017) y patrones de metilación de [106] y [107].

Inmunoprecipitación del ARN (RIP)

Para este ensayo se utilizaron hojas de roseta de *A. lyrata* de 4 semanas, crecidas en maceta en condiciones de día largo y 23°C. Las muestras se crosslinkaron con formaldehído 1% y el experimento fue realizado como se describe en Ariel y col., 2014. Luego de la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se fragmentó por sonicación en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode: 5 ciclos de 30 s prendido y 30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con Proteína A Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos anti-IgG (Abcam ab6702; control negativo) y

anti LHP1 comercial (Covalab pab0923-P) que reconoce de forma específica el dominio CHROMO de la proteína LHP1 que se encuentra conservado en especies del género *Arabidopsis*. Los fragmentos de ARN inmunoprecipitados se recuperaron mediante una extracción con trizol y cloroformo y posterior precipitación con isopropanol. Posteriormente, se realizó un tratamiento con DNAsa seguido de la reacción de retrotranscripción. La cuantificación de los fragmentos inmunoprecipitados se realizó mediante qPCR como se describió anteriormente (capítulo 1) y usando los oligos enumerados en la Tabla 1 del anexo. Para el análisis de los resultados se utilizó, de cada muestra, una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar a la que se procesó paralelamente a las demás y se consideró como la muestra de entrada (input).

Ensayo de inmunoprecipitación de dúplex ADN-ARN (DRIP)

Para este ensayo también se utilizaron hojas de plantas *A. lyrata* de 4 semanas, crecidas en maceta en condiciones de día largo y 23°C. Las muestras se tomaron y congelaron en nitrógeno líquido, sin crosslinkar. El experimento se realizó como describe Fonouni-Farde y colaboradores (Fonouni-Farde et al., 2022).

Luego de la extracción y lisis de núcleos, se purificó el ADN-ARN con fenol:cloroformo:isoamílico. Luego se sonicó (4 ciclos: 30 s prendido y 30 s apagado) y se procedió a la inmunoprecipitación usando el anticuerpo S9.6 que reconoce ADN-ARN. Se realizaron lavados, elución y una nueva purificación con fenol:cloroformo:isoamílico. Por último, se precipitó con etanol y se realizó la cuantificación mediante qPCR con los oligos enumerados en la tabla. Como control negativo se trató las muestras con RNAsaH que digiere el ARN que está unido a ADN y por ende esta muestra no presenta R-loops.

Extracción de ADN genómico

Se utilizaron hojas de *A. lyrata* a las cuales se congeló en nitrógeno líquido y luego se pulverizó. La extracción se llevó a cabo según el protocolo de Murray y Thompson, usando aproximadamente unos 100 mg de tejido a los cuales se les agregó solución CTAB previamente calentada a 65°C. Las muestras fueron incubadas a esa temperatura durante 30 minutos y luego se adicionó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló por agitación y luego se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos. Se separó la fase superior, la cual se precipitó con isopropanol. Luego se centrifugó, descartando el sobrenadante, y se resuspendió en agua. Por último, se realizó un tratamiento con RNAsa A (Biodynamics) con 0,4 U a 37°C durante 15 minutos.

Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 o 20 µl, según el caso. Para cada fragmento de interés se empleó solución amortiguadora, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,25 mM,

oligonucleótidos específicos (500 ng) y 1,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa. A esta mezcla de reacción se le adicionó el ADN molde, o se picó una colonia con un escarbadiante estéril en caso de PCR de colonias, y se procedió a la reacción de amplificación. En todos los casos se realiza un control negativo, sin la incorporación del ADN molde, y se lleva a volumen final con agua destilada estéril. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador (BioRAD) utilizando los programas apropiados para cada caso, donde la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo con la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$].

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de acuerdo con lo descrito por Sambrook y col., 1989. Para esto, se preparó agarosa en solución amortiguadora TAE 1x a la concentración correspondiente al tamaño del ADN que debía separarse. Los productos de amplificación se diluyeron en solución amortiguadora de siembra de ADN con el agente intercalante Gel Red, se sembraron en la matriz de agarosa y se corrieron a 80 V hasta obtener buena resolución de las bandas. Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se empleó ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas EcoRI y HindIII. Finalizada la corrida electroforética, se procedió a la visualización del ADN mediante exposición a luz UV en un transiluminador ENDURO GDS (Labnet, CA, USA).

Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

La purificación de los fragmentos de ADN se realizó empleando el kit comercial de purificación de geles (Transbionovo), utilizando el protocolo recomendado por el fabricante.

Minipreparación de ADN plasmídico

Para la obtención de los vectores de clonado depositados en *E. coli* se utilizó el kit de Miniprep comercial Puro Plásmido de PBL, siguiendo las instrucciones brindadas por el fabricante. Para la preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* para realizar PCR de chequeo y confirmar la transformación de una colonia se utilizó el método de lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (Birnboim & Doly, 1979). Para ello, las células transformadas de *E. coli* se cultivaron en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a 37°C y en agitación continua a 180 rpm, durante toda la noche. Luego, se tomó 1 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 5000 rpm durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 μ l de solución I (Solución GTE) y se incubó en hielo durante 5 minutos. Luego, se agregó 200 μ l de solución II (Solución de lisis), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, se agregó 150 μ l de solución III y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, y se realizó una extracción utilizando fenol:cloroformo 1:1 (v/v), centrifugando a 8000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el

ADN plasmídico mediante el agregado de 1 ml de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 15 minutos, y a continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente y luego de un lavado con etanol 70%, se resuspendió en 30 µl de agua Milli-Q estéril. Finalmente, se realizó tratamiento con RNasa A (Biodynamics) con 0,4 U de dicha enzima a 37°C durante 15 minutos, según las indicaciones del fabricante.

Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de los fragmentos de ADN y del vector de entrada se realizaron empleando las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (Promega), en la solución reguladora H, agregando 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir. La reacción se realizó a 37°C durante 3 horas y se detuvo inactivando la enzima a 65°C durante 10 minutos. Luego, se realizó una precipitación alcohólica con el fin de eliminar sales y reactivos que pudiesen interferir en las siguientes reacciones y se resuspendió en agua estéril Milli-Q en 40 µl finales.

Ligación de moléculas de ADN

Para los clonados en los que se utiliza el vector pENTR-3C, la ligación de los fragmentos, previamente escindidos con las enzimas de restricción, se realizó utilizando 0,2 U de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en un volumen de reacción final de 10 µl empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante. Se utilizan las cantidades adecuadas de inserto y vector escindido tales que la relación molar entre ellos sea 5 a 1 respectivamente. La incubación se realiza durante toda la noche a 4°C.

Generación de las construcciones génicas

Con el fin de obtener las construcciones 35S:Aly_APOLO3 y 35S:Aly_APOLO8, se amplificaron las regiones codificantes para ambos usando ADN genómico de *A. lyrata* como molde y los oligonucleótidos específicos (Tabla 1 del anexo) y el fragmento obtenido se clonó en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector de entrada pENTR-3C (Thermo Fisher Scientific) previamente cortado con esas enzimas de restricción. Luego se realizó una recombinación LR en el vector binario p35S:6XMS2:GW, según recomienda el proveedor de la enzima. La recombinación se realizó utilizando la enzima LR Clonasa (Invitrogen). Debido a que el vector de entrada y de destino poseen un gen de resistencia al mismo agente de selección (kanamicina), hubo que realizar una reacción de PCR a tiempo final usando como molde el vector de entrada y los oligonucleótidos AHL1/AHL2 tal como se describió anteriormente y luego se debió purificar el producto como ya se detalló. Finalmente, la reacción de recombinación se realizó usando LR clonasa, Buffer TE 10x, el producto de PCR, y el vector de destino, en un volumen final de 5 µl, durante toda la noche a temperatura ambiente. Por último, se

utilizaron 2 μ l del producto de esta reacción para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5 α .

Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio provisto por MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Para ello se enviaron 10 μ l de plásmido (100 ng/ μ l) y 5 μ l de un oligonucleótido específico (5 μ M). Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron recibidos en forma electrónica.

Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas son las recomendadas por el fabricante del equipo BioRad Micro Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La electroporación se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) aplicando una diferencia de potencial de 2,5 kV. Inmediatamente después de la descarga se agregó 1 ml de medio de cultivo LB fresco a la suspensión de células para su recuperación, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego de centrifugar a 4000 g durante 5 minutos y descartar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 100 μ l de medio LB. A continuación, se sembraron en placas de Petri que contienen medio LB suplementado con los agentes de selección adecuados, según corresponda. Las placas se incuban a 37°C durante toda la noche. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR de colonia, como se describió anteriormente. Cuando la PCR fue positiva (presencia de un amplicón del tamaño adecuado) se procedió al repique de la colonia correspondiente para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico. Además, esa colonia se hizo crecer nuevamente en LB líquido para guardar un stock en glicerol a -80°C.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación. Luego del disparo eléctrico las bacterias se recuperaron en 1 ml de LB, se incubaron durante 2 h a 28°C y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 μ l de LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con rifampicina (50 μ g/ml) y el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se procedió a la transformación. Las placas se incubaron durante 2 días (o hasta la aparición de colonias) a 28°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR de colonia, como se describió anteriormente. Además, esa colonia se hizo crecer nuevamente en LB líquido para guardar un stock en glicerol a -80°C.

Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*

El método que se usó para transformar plantas de *A. thaliana* es el de inmersión floral (floral dip) descrito por Clough y Bent (Clough & Bent, 1998). Para ello se crecieron plantas en macetas hasta la floración (aproximadamente 4 semanas) en un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 23°C. A partir de este momento, se empezaron a cortar las inflorescencias para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron las células de *A. tumefaciens*, que poseían el vector específico de interés, en frascos con 10 ml de medio LB suplementado con los agentes de selección adecuados. El cultivo se incubó a 28°C durante toda la noche en agitación continua. Y luego se utilizó para inocular 200 ml del mismo medio suplementado con los mismos antibióticos, contenido en un Erlenmeyer. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, a 28°C, en agitación continua). Luego se cosecharon por centrifugación a 4500 g durante 15 minutos a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron cuidadosamente en 500 ml de una solución de infiltración que contiene sacarosa (50 g/l) a la que se agregó 500 µl de detergente Silwet. Las plantas se sumergieron en la solución durante 30 a 60 segundos, tratando de evitar que el líquido entrara en contacto con la tierra. Luego, las macetas se ubicaron en posición horizontal en una bandeja, que se tapó con papel de nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevó a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se colocaron las plantas en posición vertical permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de las semillas (4-5 semanas aproximadamente para nuestras condiciones de cultivo). Finalmente, se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron de los restos de vainas y tierra y se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis.

Selección de plantas transformadas

Las semillas provenientes de las plantas transformadas fueron sembradas en tierra y se trataron mediante aspersión con una dilución (1/500) de la solución comercial del herbicida BASTA® (glufosinato de amonio) (0,25 g/l). La aplicación del herbicida se repitió una vez por semana hasta completar los 15 días de crecimiento con el agente de selección.

Las plántulas que son sensibles a BASTA se tornan amarillas y su crecimiento se detiene, dando lugar a la muerte de las mismas. Sólo las plantas transformadas, que presentan resistencia, sobreviven. Éstas son cosechadas individualmente y sometidas a una nueva ronda de selección hasta obtener plantas T3 o T4 homocigotas.

Análisis del fenotipo de tiempo de floración

Las plantas se crecieron individualmente en macetas en cámara de cultivo. Una vez ocurrido el pasaje de estado vegetativo al estado reproductivo, donde comienza a hacerse visible el tallo principal, se contaron las hojas de roseta. Se utilizaron 24 plantas de cada genotipo.

RESULTADOS

APOLO pertenece a una familia de ARNlnc que sólo se encuentra en el género *Arabidopsis*

Utilizando la herramienta BLASTN y los genomas de plantas pertenecientes a la familia *Brassicaceae*, depositados en la base de datos Phytozome, se exploró la posible existencia de secuencias similares a la del ARNlnc *APOLO* (AT2G34655; (Ariel et al., 2014)) de *Arabidopsis thaliana* y se seleccionaron aquellas cuya longitud era igual o mayor a 200 pb. De un primer análisis se obtuvieron 8 secuencias similares en *Arabidopsis thaliana*, 31 en *A. lyrata* y 11 en *A. halleri*. No hubo resultados de secuencias similares para las demás especies analizadas por lo que estas copias conformarían una familia que exclusivamente está presente en el género *Arabidopsis*.

Luego de una segunda exploración, donde se indagó sobre el grado de identidad entre las secuencias encontradas en *A. thaliana*, se decidió descartar 4 copias que presentaban un porcentaje de disimilitud elevado con respecto a *Ath_APOLO1*. Se usó como valor de corte un 60%, es decir, todas las secuencias que presentaban un porcentaje de disimilitud superior a este fueron descartadas por considerarse que no son suficientemente similares. Con respecto a las 4 secuencias que no fueron descartadas, se observó que están distribuidas en diferentes cromosomas y ocupando exclusivamente regiones intergénicas.

Tabla 1. Copias de *APOLO* pertenecientes a *A. thaliana*

<i>APOLO</i>	Cromosoma	Gen corriente arriba	Gen corriente abajo	Tamaño (pb)
<i>Ath_APOLO1</i>	2	AT2G34650.1	AT2G34660.1	880
<i>Ath_APOLO3</i>	5	AT5G49460.1	AT5G49470.2	867
<i>Ath_APOLO4</i>	1	AT1G58300.1	AT1G58310.1	525
<i>Ath_APOLO5</i>	3	AT3G47350.2	AT3G47360.1	520
<i>Ath_APOLO9</i>	5	AT5G42500.1	AT5G42510.1	270

Además de las secuencias descartadas para *A. thaliana*, y en función del mismo criterio, se descartaron secuencias identificadas en los genomas de *A. lyrata* y *A. halleri*. Finalmente, con las secuencias seleccionadas (5 de *A. thaliana*, 20 de *A. lyrata* y 8 de *A. halleri*), que resultaron ser todas intergénicas, se realizó un árbol filogenético empleando el software RAXML (Figura 28).

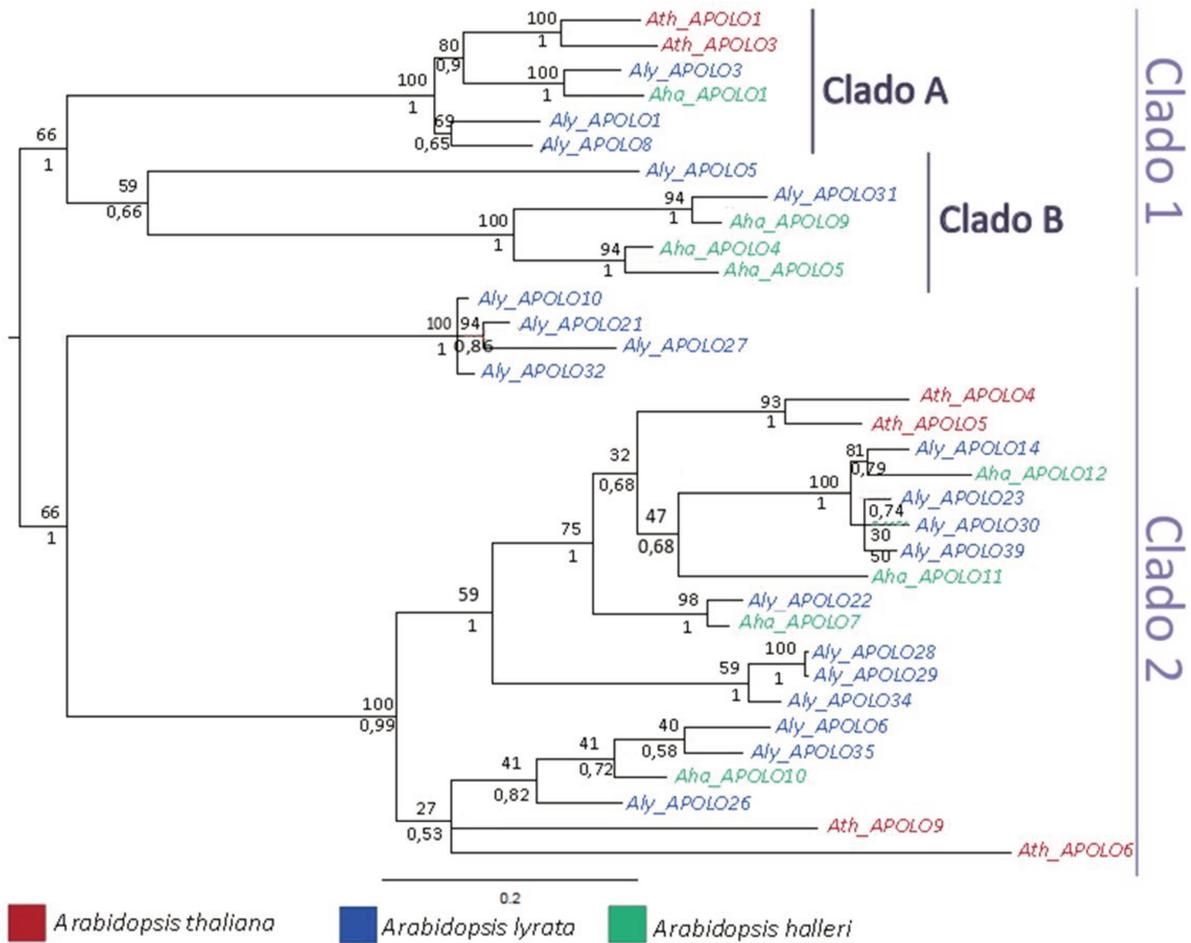


Figura 28. Existe una familia *APOLO* presente en el género *Arabidopsis*. Árbol de Máxima Verosimilitud de los miembros de *APOLO* en el género *Arabidopsis*. Los números que se encuentran por encima de cada rama indican el soporte obtenido con 1000 réplicas de Bootstrap. Los números ubicados por debajo indican los valores de probabilidad posterior (PP) obtenidos del análisis bayesiano. En color rojo se muestran los miembros pertenecientes a *A. thaliana*, en azul los de *A. lyrata* y en verde los de *A. halleri*.

De la observación del árbol filogenético se puede deducir que las secuencias utilizadas efectivamente están relacionadas filogenéticamente. Los valores de bootstrap y PP obtenidos, permiten concluir que la mayoría de las ramas se encuentran soportadas en el análisis. Además, se puede observar que se distinguen 2 grandes clados, a los que denominamos 1 y 2, en los que hay presentes copias de las 3 especies.

Para la construcción del árbol se incluyó a la secuencia *Ath_APOLO6* dado que se encuentra muy cerca del valor de corte establecido para el descarte. Sin embargo, en el árbol se puede observar que

diverge del resto de las copias de *APOLO* y la longitud de la rama indica elevada tasa de cambio por lo que se descartó de los siguientes análisis.

También se puede observar que el clado 1 se subdivide en dos clados que fueron denominados A y B. Dentro del clado 1 A se encuentra *Ath_APOLO1* (la secuencia utilizada como *query*) y la secuencia más cercana es la que corresponde a *Ath_APOLO3*. En ese mismo clado están presentes las copias de *A. lyrata* *Aly_APOLO3*, *Aly_APOLO1* y *Aly_APOLO8* y la copia de *A. halleri* *Aha_APOLO1*. En el clado 1 B sólo se encuentran copias de *A. lyrata* y *A. halleri*. Las demás copias de *A. thaliana* se encuentran en el clado 2.

Los ARNinc pertenecientes al clado 1 A presentan características similares en cuanto a sus secuencias

Para determinar si estas secuencias similares a *Ath_APOLO1* encontradas podrían ser en definitiva ARNinc lo primero que se evaluó, haciendo foco en el clado 1 A, fue el potencial codificante utilizando la base de datos Coding Potential Calculator (<http://cpc.pku.edu.cn/>; (Kong et al., 2007)). Esta base de datos brinda un valor denominado CPC Value que es negativo para las secuencias no codificantes. Además, se utilizó Uniprot (<http://www.uniprot.org>), que clasifica una secuencia como no codificante cuando presenta marcos abiertos de lectura (del inglés, ORFs) para menos de 120 aminoácidos (360 pb), y Rfam (<http://rfam.xfam.org/>), que corrobora que las secuencias no correspondan a ARNs estructurales como ARNt, ARNr o ARNsn. La información obtenida se resume en la siguiente tabla:

Tabla 2. Las copias de *APOLO* del clado 1 A son ARNinc.

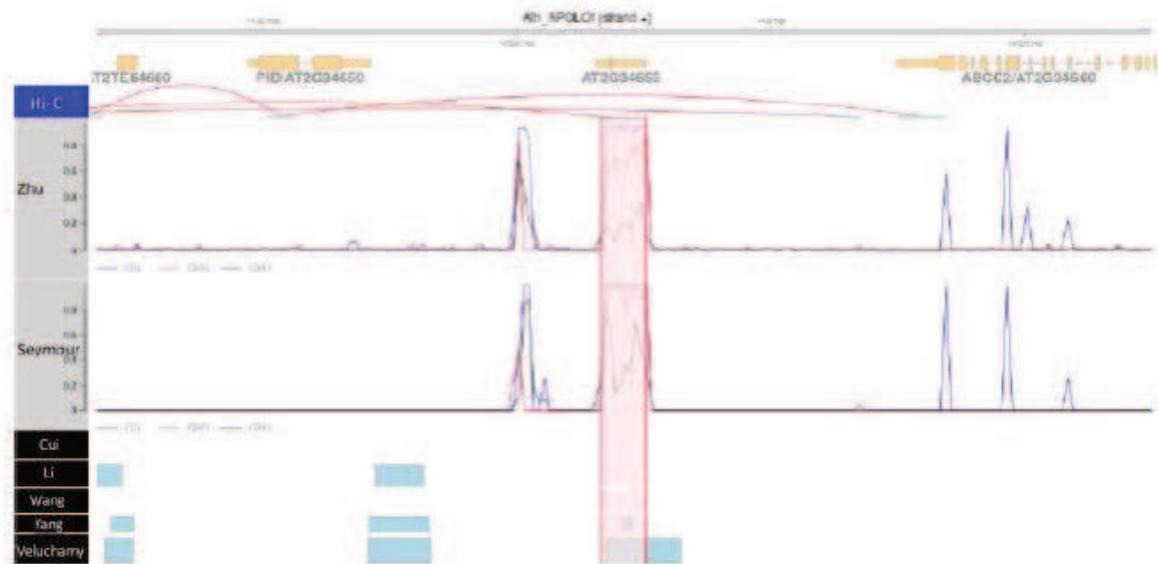
<i>APOLO</i>	UniProt (Hits)	Rfam	CPC	CPC Value
<i>Ath_APOLO1</i>	*	No hits	ORF (62 AA)	184666
<i>Ath_APOLO3</i>	*	No hits	ORF (33 AA)	115312
<i>Aly_APOLO3</i>	*	No hits	No coding	-0.938009
<i>Aha_APOLO1</i>	*	No hits	No coding	-1.18121
<i>Aly_APOLO1</i>	No hits	No hits	No coding	-1.21316
<i>Aly_APOLO8</i>	No hits	No hits	No coding	-1.03798

En la tabla se puede ver marcadas con un asterisco (*) aquellas secuencias que aparecen en UniProt por superar los 120 aa. Esta base de datos permite ver proteínas caracterizadas o conocidas que son similares, sin embargo, al comparar los resultados dados por UniProt con las secuencias de las copias de *APOLO*, no presentan un porcentaje de identidad elevado (mayor a 60%). Además, para el caso de *Ath_APOLO1* y *Ath_APOLO3* el valor de CPC sugiere que se trata de secuencias codificantes. Esto podría deberse a que la base de datos detecta la presencia de un pequeño ORF. Sin embargo, *Ath_APOLO 1* ya ha sido caracterizado como ARNlnc de acumulación nuclear (Ariel et al., 2014), lo cual fue respaldado en el Capítulo 1 de este trabajo de Tesis, al hacer un tratamiento con *APOLO* exógeno, sin CAP ni cola de poliA, y conservando su actividad sin poder ser traducido. Esto sugiere que el caso de *Ath_APOLO3* podría ser similar.

Teniendo en cuenta el perfil epigenético del ARNlnc *Ath_APOLO1* ya caracterizado, se decidió analizar la información disponible públicamente tanto para *A. thaliana* como para *A. lyrata* con el objetivo de determinar si los ARNlnc del clado 1 A pertenecientes a estas dos especies presentan un perfil similar. Para *A. thaliana* se utilizaron datos de interacciones intragenómicas (Hi-C; (C. Liu et al., 2016; Veluchamy et al., 2016)), patrones de metilación del ADN (Bis-seq; (Seymour et al., 2014; Zhu et al., 2017)) y el perfil de H3K27me3 (ChIP-Seq; (Cui et al., 2016; J. Liu et al., 2015; Veluchamy et al., 2016; H. Wang et al., 2016; Yang et al., 2016)). Para *A. lyrata* se utilizaron datos de transcriptómica (RNA-Seq; (Rawat et al., 2015)), perfil de H3K27me3 (Göbel et al., 2018; Zhu et al., 2017) y patrones de metilación teniendo en consideración los tres contextos posibles (CG/CHG/CHH; donde H es A, T o C) (Seymour et al., 2014; Zhu et al., 2017).

De este análisis se pudo observar que, como ya se sabía, el locus de *Ath_APOLO1* presenta metilación del ADN tanto simétrica (CG/CHG) como asimétrica (CHH). También hay deposición de la marca H3K27me3 sobre ese locus. Además, existe un loop de cromatina que abarca toda la región intergénica entre el locus del ARN y el de su gen vecino *PID* (Figura 29. A). Para el caso de *Ath_APOLO3*, que es el miembro más cercano de la familia en *Arabidopsis thaliana*, se observó que también presenta metilación del ADN de los dos tipos en su locus, aunque no se observa deposición de H3K27me3. También se pudo observar la presencia de un loop de cromatina que abarcaría a los genes AT5G49450 y AT5G49460. Además, se vio que, a diferencia de *Ath_APOLO1*, la copia 3 está superpuesta al TE AT5TE72235, perteneciente a la familia de retrotransposones LINE (*Long interspersed nuclear elements*) (Figura 29. B). Según la base de datos PLncDB (Plant long non-coding RNA database <http://chualab.rockefeller.edu/gbrowse2/>; (Jin et al., 2013)) este ARN se transcribe y se encuentra clasificado como ARNlnc según la base de datos de Matsui y col. (Matsui et al., 2008).

A.



B.

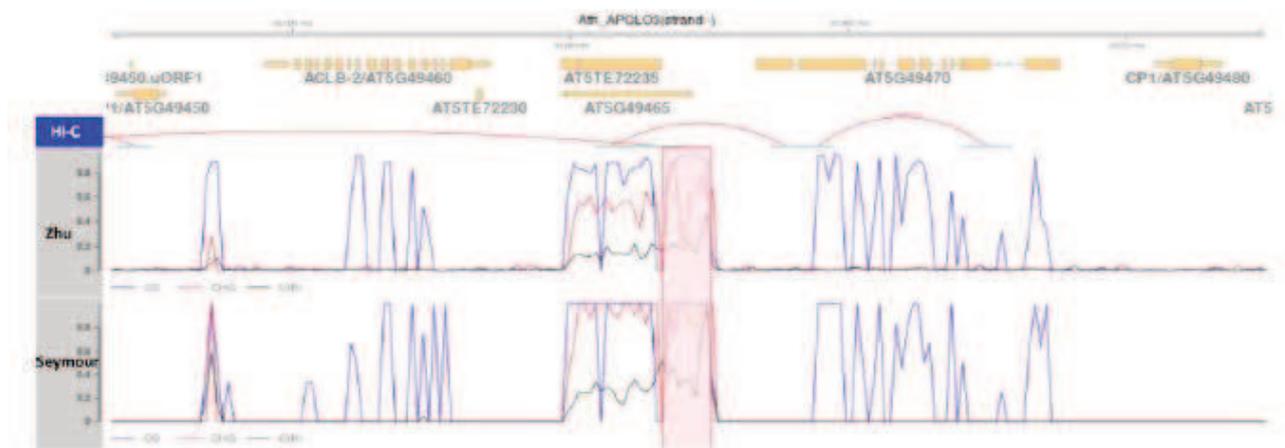


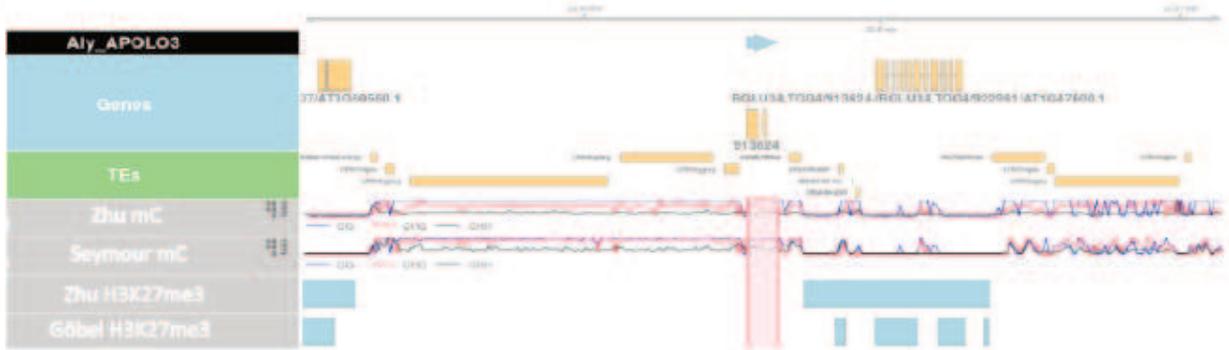
Figura 29. A. Análisis bioinformático del locus de *Ath_APOLO1*. B. Análisis bioinformático del locus de *Ath_APOLO3*. Se puede observar en la parte superior la anotación de los genes. Por debajo se encuentran graficados los loops de cromatina detectados en el ensayo de HiC utilizado. Los gráficos correspondientes a Zhu [106] y Seymour [107] muestran la metilación del ADN en los distintos contextos (azul para CG, rojo para CHG y verde para CHH) utilizando datos públicos de estos dos autores. Los rectángulos celestes indican presencia de la marca H3K27me3 obtenida de los datos publicados de cada uno de los autores mencionados en el extremo izquierdo (Cui, Li, Wang, Yang y Veluchamy).

De la información disponible para *A. lyrata* se pudo observar que los 3 ARNInc pertenecientes al clado 1 A (*Aly_APOLO1*, *Aly_APOLO3* y *Aly_APOLO8*) presentan metilación simétrica y asimétrica en su locus, aunque ninguno presenta deposición de la marca H3K27me3 (Figura 30 A, B y C). Los 3 se encuentran próximos a un TE, aunque de distinto tipo. *Aly_APOLO1* se ubica adyacente a un TE del tipo DNA/TcMar-Stowaway, *Aly_APOLO3* a uno LTR/Gypsy y *Aly_APOLO8* a uno DNA/TcMar-Stowaway y un LINE. Además, de datos de RNAseq se observa que las 3 copias se expresan [117,118].

A.



B.



C.

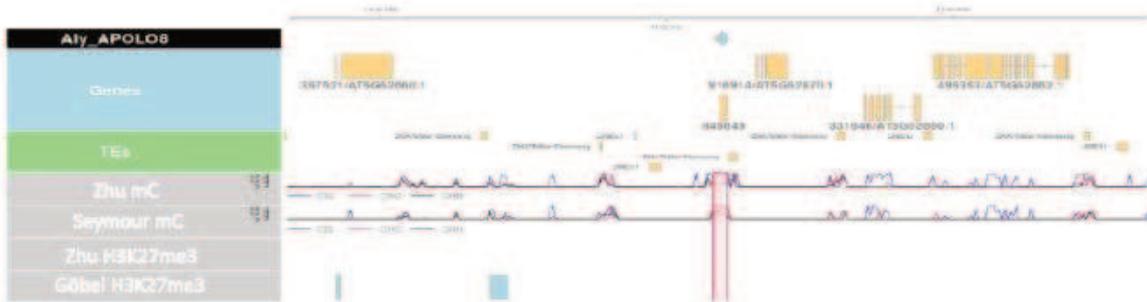


Figura 30. A. Análisis bioinformático del locus de *Aly_APOLO1*. B. Análisis bioinformático del locus de *Aly_APOLO3*. C. Análisis bioinformático del locus de *Aly_APOLO8*. Se puede observar en la parte superior la anotación de los genes. Por debajo se encuentran graficados los TEs. Los gráficos correspondientes a Zhu [2016] y Seymour [107] muestran la metilación del ADN en los distintos contextos (azul para CG, rojo para CHG y verde para CHH) utilizando datos públicos de estos dos autores. Los rectángulos celestes indican la presencia de la marca H3K27me3 obtenida de los datos publicados de Zhu y Göbel (2017; 2018).

Con la información obtenida de estas bases de datos y teniendo todas las secuencias más de 200 pb, se sugiere que todas ellas efectivamente son ARNInc.

Además de la caracterización epigenética y, considerando que todos estos ARNInc son intergénicos, se realizó un análisis de sintenia comparando los genes que se ubican corriente arriba y abajo de estos loci. Se puede observar que no existe sintenia aunque hay algunas copias que se encuentran entre un gen que codifica una ATPasa y otro que codifica una quinasa, al igual que *Ath_APOLO1* que se encuentra flanqueado por la quinasa PID y una ATPasa transportador ABC (Figura 31). Este es el caso de *Aly_APOLO8* que está rodeado de un gen que codifica una ATPasa transportadora de maltosa de un lado y una quinasa asociada a membrana del otro. También *Ath_APOLO3*, por su parte, se encuentra entre un gen codificante de una ATP-citrato liasa y uno de una tirosin-quinasa. En un principio, esta disposición entre ATPasa y quinasa podría suponer un caso de sintenia, es decir, que la conservación refiera también al contexto genómico y a la orientación de los genes y no solo a la similitud de secuencias. Para determinar esto, se alinearon las secuencias aminoacídicas de los genes que codifican para las ATPasas que flanquean *Ath_APOLO1*, *Ath_APOLO3* y *Aly_APOLO8* por un lado (Figura 32) y los que codifican para las quinasas que flanquean estas copias por el otro (Figura 33). Este análisis permitió observar que las proteínas no se encuentran relacionadas filogenéticamente por lo que no se trata de un caso de sintenia sino de convergencia evolutiva.

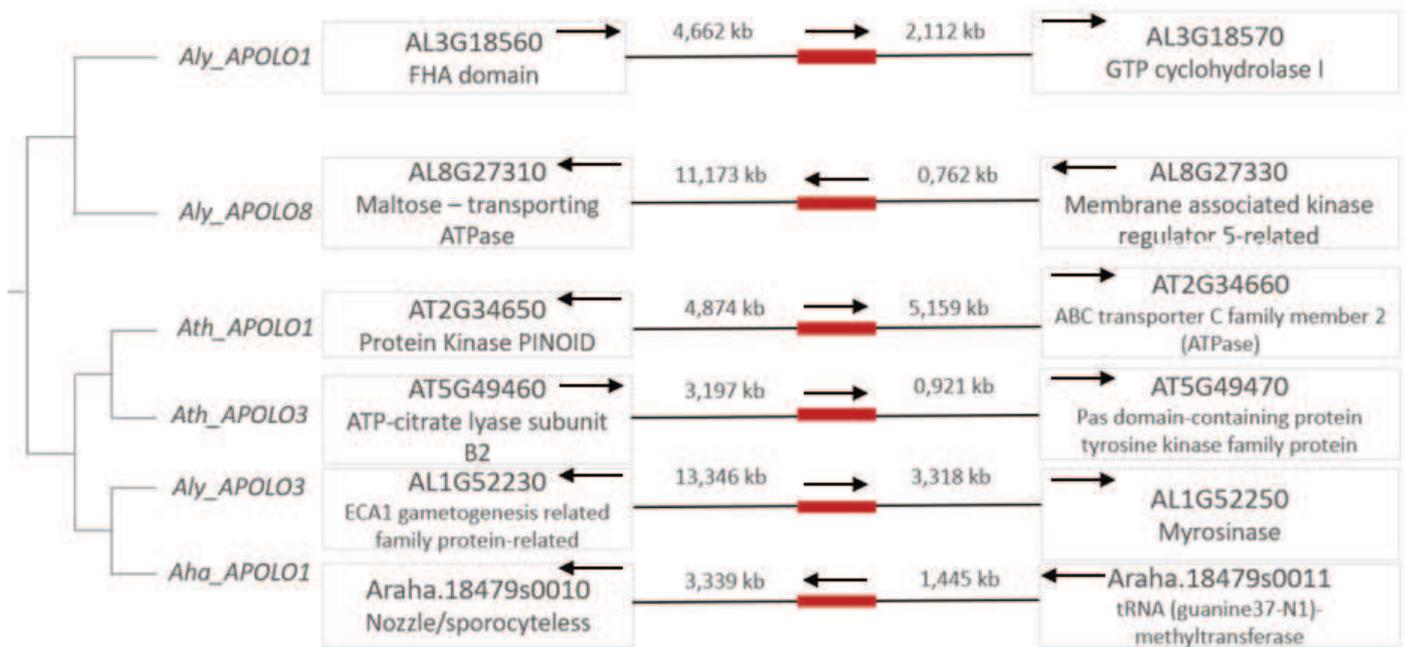


Figura 31. Contexto genómico de los miembros de *APOLO* del clado 1 A. Con un rectángulo rojo se representan los miembros de *APOLO*. Las líneas negras representan las regiones intergénicas y sobre ellas se indica la distancia en kb. Los rectángulos grises muestran los genes corriente arriba y corriente abajo de cada ARNInc. Se muestra además el tipo de proteína que codifican.

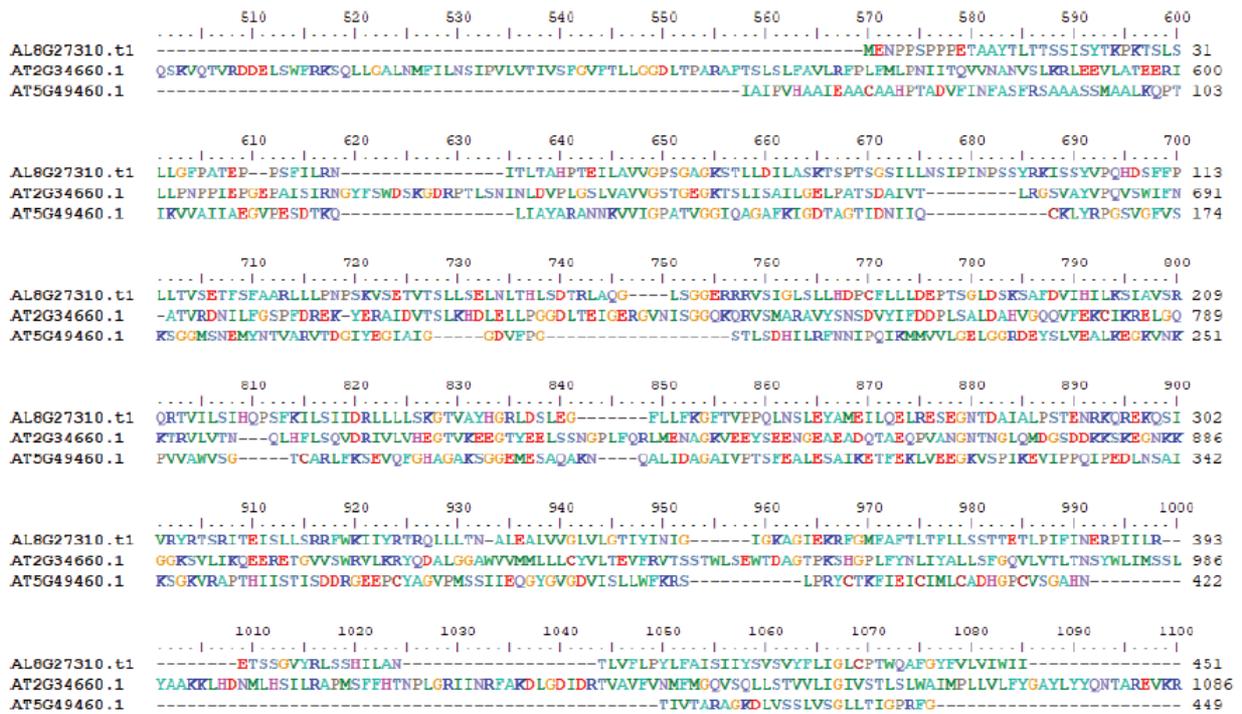


Figura 32. Las ATPasas no se encuentran relacionadas. Región del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las ATPasas adyacentes a los miembros *Aly_APOLO8*, *Ath_APOLO1* y *Ath_APOLO3*.

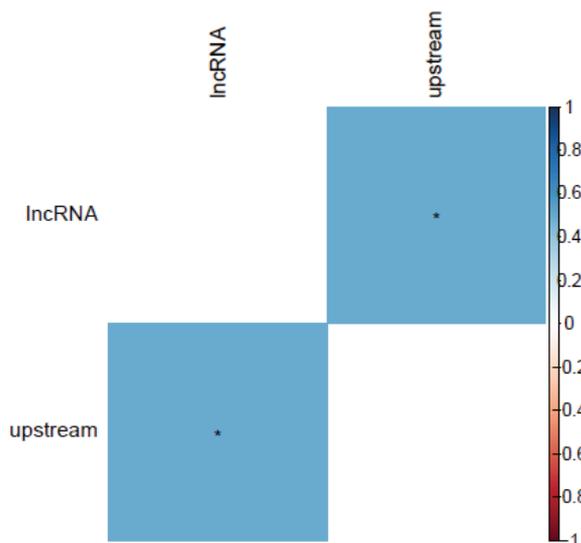


Figura 33. Las quinasas no se encuentran relacionadas. Región del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las proteínas quinasas adyacentes a los miembros *Aly_APOLO8*, *Ath_APOLO1* y *Ath_APOLO3*.

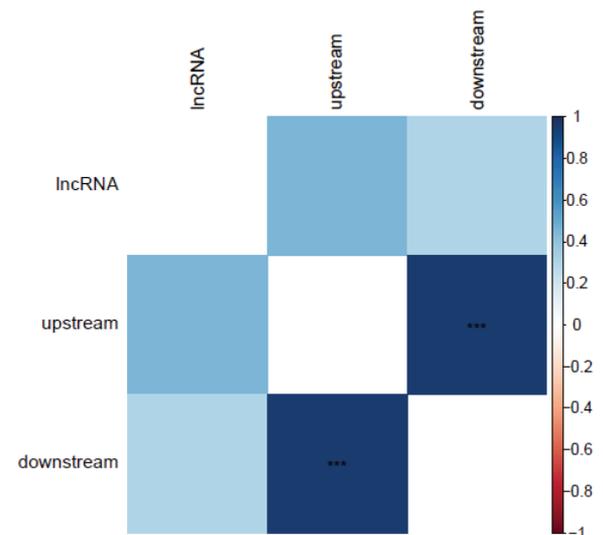
Existe una correlación entre la expresión de los *Aly_APOLOs* y sus genes vecinos, al igual que entre *Ath_APOLO1* y *PID*

En trabajos previos del laboratorio se ha observado que la expresión de *Ath_APOLO1* en respuesta a las auxinas se correlaciona con la expresión de su gen vecino *PID* (Ariel et al., 2014). Habiendo analizado los ARNlnc pertenecientes al clado 1 A del árbol filogenético, y sabiendo que éstos se expresan, se examinó si existía alguna correlación entre la expresión de las copias de *A. lyrata* con sus genes vecinos. Usando datos de RNAseq disponibles (Klosinska et al., 2016; Muino et al., 2016) se observó que la expresión del ARNlnc *Aly_APOLO1* se correlaciona positivamente con la expresión del gen corriente arriba, es decir que cuando este se expresa también lo hace el gen de al lado (Figura 34 A). Para el caso de *Aly_APOLO8* se observó una tendencia, pero la correlación no es significativa con ninguno de los dos genes vecinos. Sin embargo, se puede observar que sí la hay entre ellos (Figura 34 B). Por otro lado, la expresión del ARNlnc *Aly_APOLO3* se correlaciona positivamente con la expresión del gen corriente abajo (Figura 34 C).

A.



B.



C.

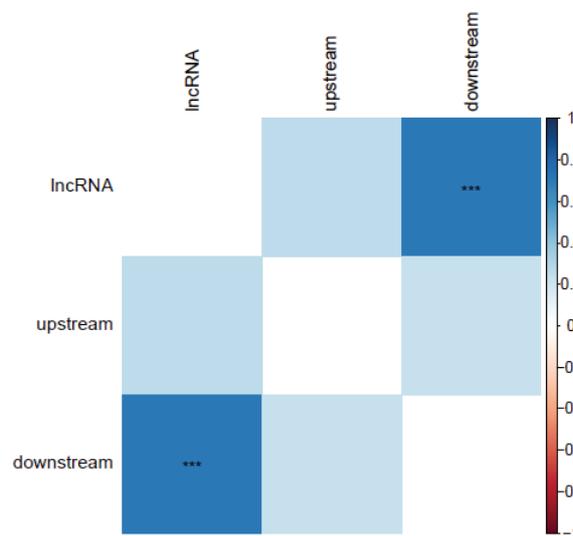


Figura 34. La expresión de los *Aly_APOLOs* está correlacionada con la expresión de alguno de sus genes vecinos. A. Análisis de la correlación de expresión de *Aly_APOLO1* y el gen que lo flanquea corriente arriba. B. Análisis de *Aly_APOLO8* y ambos genes flanqueantes. C. Análisis de *Aly_APOLO3* y ambos genes flanqueantes. A mayor intensidad del color azul, mayor es la correlación. Los asteriscos indican diferencias significativas.

Los miembros de *APOLO* integrarían complejos moleculares similares entre especies

Además del análisis de similitud de secuencias y la búsqueda de características particulares conservadas, se analizó si existe conservación de la función entre estos ARNlnc. Para ello, y conociendo que *Ath_APOLO1* se une a la proteína LHP1, lo primero que se estudió fue si esta interacción molecular se encuentra conservada entre los ARNlnc *APOLOs* de *A. thaliana* y *A. lyrata*. Se sabe de estudios previos que la proteína LHP1 está conservada dentro de la familia *Brassicaceae* y que además presenta un dominio CHROMO que reconoce y se une a la marca H3K27me3, conservado entre *A. thaliana* y *A. lyrata*. Es por esto que se realizó un ensayo de inmunoprecipitación del ARN (RIP) seguido de qPCR en *A. lyrata* para determinar si estos ARNlnc se unen a LHP1. Para tal fin, se utilizó un anticuerpo comercial (Covalab pab0923-P) desarrollado para reconocer el dominio CHROMO de AtLHP1, que podría reconocer a AlyLHP1, por conservación de secuencia. Para este ensayo se incluyó a *Aly_APOLO5* dado que se observó en datos de RNAseq que también se expresa. Los resultados muestran que a partir de la inmunoprecipitación se obtuvo un enriquecimiento en los miembros *Aly_APOLO1*, *Aly_APOLO3* y *Aly_APOLO5*. Sin embargo, no se observa enriquecimiento significativo para *Aly_APOLO8* (Figura 35). Estos resultados indican que LHP1 de *A. lyrata* también es capaz de unir miembros de *APOLO* al igual que ocurre en *A. thaliana*. Esto sugiere que podría existir una conservación del mecanismo molecular entre ambas especies. El hecho de que no se detecte enriquecimiento para *Aly_APOLO8*, a pesar de ser cercano filogenéticamente al resto y a *Ath_APOLO1*, podría deberse a una cuestión tejido-específica (por lo cual al tomar hojas enteras el resultado se vea enmascarado o diluido), o a que AlyLHP1 no presente preferencia por todos los miembros de *APOLO*.

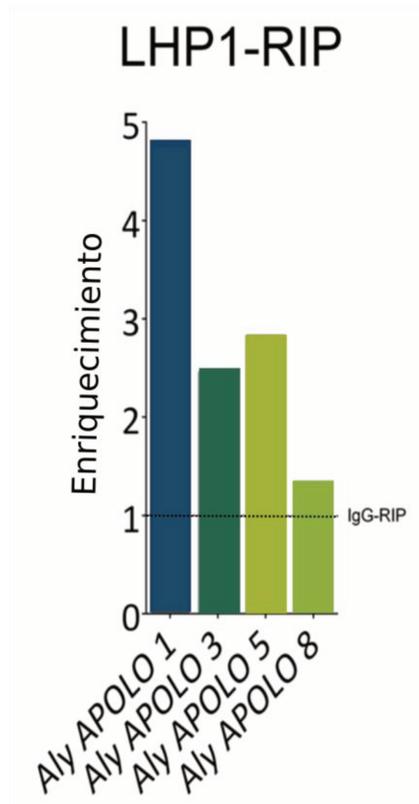


Figura 35. LHP1 de *A. lyrata* es capaz de unir algunas copias de *AlyAPOLO*, al igual que ocurre con *Ath_APOLO1* de *A. thaliana*. Nivel de enriquecimiento de *Aly_APOLO1*, *Aly_APOLO3*, *Aly_APOLO5* y *Aly_APOLO8* luego de la inmunoprecipitación de ARN (RIP) en *A. lyrata*. Los valores fueron relativizados al control negativo realizado contra IgG que se muestra en línea punteada.

El siguiente análisis que se efectuó fue para determinar si estos ARNlnc de *A. lyrata* eran capaces de formar *R-loops* al igual que *Ath_APOLO1*. En *A. thaliana* hemos demostrado que *APOLO* es capaz de formar *R-loops* a través de dos cajas UUCUUC que hibridan con el ADN en su secuencia GAAGAA (Ariel et al., 2020). Para ello primero se analizó si los ARNlnc de *A. lyrata* del clado 1 A y *Aly_APOLO5* presentaban cajas para formar estos dúplex. Se observó que, en las secuencias genómicas, *Aly_APOLO3* presenta una sola caja TTCTTC mientras que *Aly_APOLO5* presenta tres. En el caso de *Aly_APOLO1* y *Aly_APOLO8* se encontraron cajas que presentaban una mutación en una de sus bases (Figura 36).

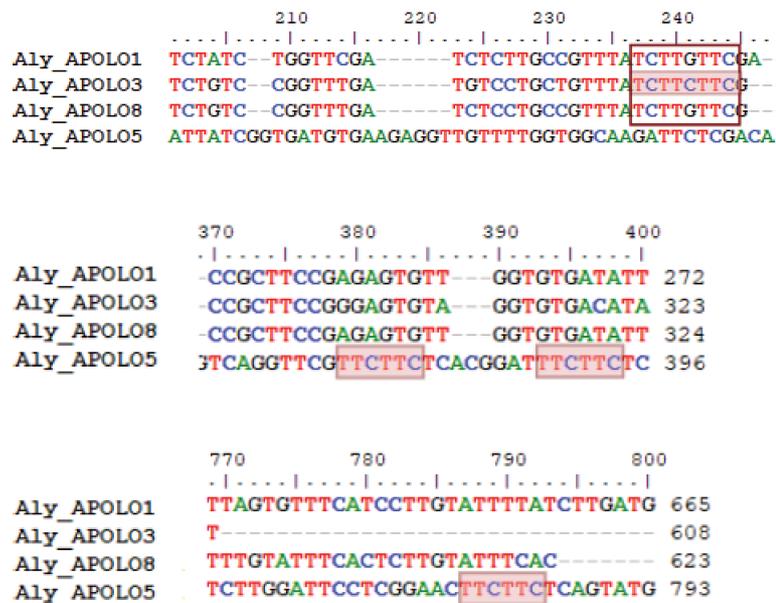


Figura 36. Las copias de *APOLO* de *A. lyrata* pertenecientes al clado 1 A y *Aly_APOLO5* presentan cajas para formar *R-loops*. Alineamiento de secuencias de los miembros de *A. lyrata* *Aly_APOLO1*, *Aly_APOLO3*, *Aly_APOLO8* y *Aly_APOLO5*. Con los rectángulos sombreados se señalan, en las secuencias genómicas, las cajas TTCTTC para formar *R-loops*. Con el rectángulo negro se indican las cajas presentes en *Aly_APOLO1* y *Aly_APOLO8* que presentan una mutación.

Seguidamente se realizó un ensayo de DRIP donde se inmunoprecipitaron los duplex ADN-ARN, seguido de la purificación del ARN asociado, RT y qPCR. Los resultados de este ensayo muestran enriquecimiento de todos los ARNinc, principalmente para *Aly_APOLO3* que es el más cercano filogenéticamente a *Ath_APOLO1* (Figura 37). En conjunto estos resultados parecerían indicar que las copias de *APOLO* en *A. lyrata* forman *R-loops* al igual que lo hace *Ath_APOLO1* y por lo tanto el mecanismo de acción estaría conservado entre ambas especies.

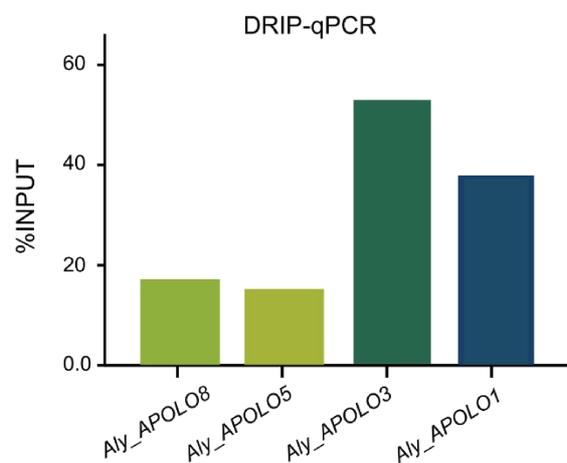


Figura 37. Las copias de *APOLO* de *A. lyrata* son capaces de formar *R-loops*. Determinación de la capacidad de formación de *R-loops* mediante DRIP-qPCR.

La función fisiológica de los miembros de *APOLO* estaría conservada entre especies

Teniendo en cuenta los resultados mostrados anteriormente donde al parecer el mecanismo de acción estaría conservado, nos resultó interesante analizar si los ARNinc de *A. lyrata* eran capaces de cumplir su función en *A. thaliana*. Para este análisis decidimos enfocarnos en un fenotipo de relevancia adaptativa, como es el tiempo de floración, que habíamos observado preliminarmente en el laboratorio. Es por esto que se realizó dicho estudio donde se cuantificó el número de hojas al momento de la aparición de la inflorescencia principal de plantas *Arabidopsis thaliana* salvajes y de las plantas con niveles desregulados de *APOLO* (sobre expresante, *knockdown* y *knockout*). Los resultados mostraron que, al igual que habíamos observado para el patrón de ramificación, la desregulación de *APOLO* presenta el mismo fenotipo en todas las líneas (Figura 38). Estas plantas presentaron una floración adelantada respecto a las plantas salvajes, representada como un menor número de hojas de roseta al momento del pasaje de estado vegetativo al estadio reproductivo.

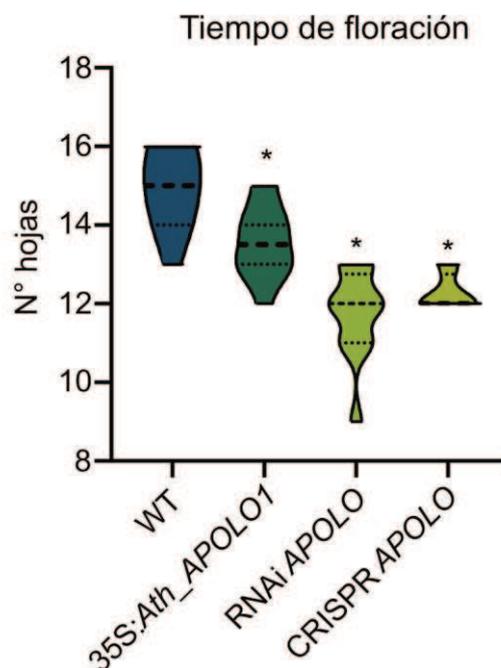


Figura 38. Las plantas con niveles desregulados de *APOLO* presentan la floración adelantada. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada línea y las plantas salvajes (WT) ($P \leq 0,05$; t student; $n=12$)

Habiendo determinado el fenotipo diferencial producido por la desregulación de los niveles de *APOLO*, se decidió transformar las plantas de *A. thaliana* *CRISPR APOLO1* (que tienen deletado el locus completo de *Ath_APOLO1*) con las construcciones *35S:Aly_APOLO3* y *35S:Aly_APOLO8*. Con estas plantas se realizó nuevamente la caracterización fenotípica del tiempo de floración donde se observó que también presentan adelantada la floración respecto de las plantas salvajes, es decir, tienen menor cantidad de hojas de roseta a la hora de pasar de estadio vegetativo a estadio reproductivo, cuando comienza a hacerse visible la inflorescencia principal (Figura 39). Si bien las plantas *CRISPR APOLO* presentaban una floración adelantada, el número de hojas que presentaron las líneas transformadas con las copias de *A. lyrata* fue menor. Esto podría sugerir que estas copias estarían involucradas en la regulación de este proceso.

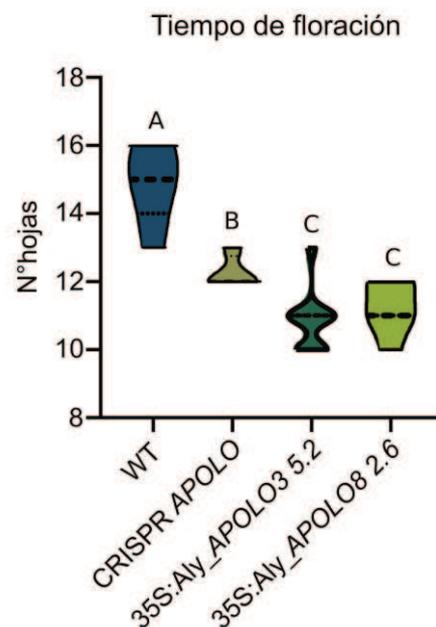


Figura 39. Las plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes de los *APOLOs* de *A. lyrata* presentan adelantada la floración respecto de las plantas salvajes (WT) y esta diferencia es aún mayor de la que presentan las plantas *CRISPR APOLO*. Las letras indican diferencia determinada por un ANOVA.

Con los resultados obtenidos se sugiere que la función de estos ARNinc está conservada entre especies.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Durante los últimos años se han identificado numerosos ARNlnc en plantas, pero solo algunos fueron caracterizados funcionalmente y se conoce muy poco acerca del origen de estos y la conservación entre especies.

Si bien existen algunas teorías acerca del posible origen de los ARNlnc, aún no hay un consenso entre los científicos sobre las generalidades y es necesario el estudio de cada uno en particular. Este análisis puede realizarse a partir del estudio de las secuencias nucleotídicas o, dado que las secuencias son muy variables, de la estructura secundaria. Si bien las estructuras pueden predecirse con análisis bioinformático, en los últimos años han surgido distintas técnicas experimentales para determinarlas y esto ha dado origen a algunas investigaciones donde se observó que existen ARNlnc que, a pesar de no tener la secuencia conservada, presentan conservación de su estructura en diferentes especies (Gulyaev et al., 2023; Hawkes et al., 2016). Esto podría reforzar la idea de que el plegamiento que adoptan los ARNlnc es lo que determina su función y no tanto la secuencia.

En este trabajo de tesis se estudió al ARNlnc *APOLO* de *Arabidopsis thaliana* que hasta el momento no presenta estructura resuelta experimentalmente. Es por esto que el estudio se abordó a partir de la comparación de secuencias. De este análisis surgió la existencia de secuencias similares, de igual o mayor longitud a 200 pb, en *A. thaliana*, *A. lyrata* (como había observado Palos y col) y en *A. haleri*, todas plantas pertenecientes a la familia Brassicaceae y del género *Arabidopsis*. La diferencia entre el número de secuencias encontradas por nosotros y el hallado por Palos y col. podría deberse a los criterios utilizados para realizar esa búsqueda. Estas secuencias encontradas corresponden a una familia de ARNlnc en la que todos los miembros son intergénicos. Visto que esta familia de ARNlnc sólo se encontró en el género *Arabidopsis* se podría sugerir que son secuencias que han aparecido recientemente en el genoma. Sin embargo, no se puede descartar que existan secuencias similares en especies filogenéticamente más alejadas dado que algunos genomas no presentan aún versiones completamente “curadas”. Además, podrían existir ARNlnc en otras especies que, a pesar de tener secuencia muy variable a la de *APOLO*, presenten conservación de estructura y de ese modo cumplan las mismas funciones. Esto se ha observado en el trabajo realizado por Fonouni-Farde en nuestro laboratorio (Fonouni-Farde et al., 2022) donde se mostró que el ARNlnc de humanos *UPAT*, que interactúa con una proteína homóloga a la que interactúa *APOLO* en *Arabidopsis*, es capaz de reemplazar a este último pesar de la gran diferencia de secuencia que presentan. En concordancia con esto, estamos esperando obtener la estructura de *APOLO* para poder seguir con este estudio.

En cuanto a la función, Palos y col. sugieren que al no haber sintenia la función podría no estar conservada. Sin embargo, durante este trabajo de tesis se ha podido comprobar que los ARNlnc de *A. lyrata* más cercanos filogenéticamente a *Ath_APOLO1* presentan al igual que este una expresión

correlacionada con la de sus genes vecinos, significativa al menos para *Aly_APOLO1* y *Aly_APOLO3*. El análisis de la orientación de estos ARNlnc respecto de esos genes nos permitirá definir si esta correlación de expresión está dada por la utilización de una misma región promotora divergente, como sucede en el caso de *Ath_APOLO1* y *PID*, o si es consecuencia de la apertura de la cromatina en esa región dada por otra razón. Además, hemos podido determinar que estos ARNlnc se unen a LHP1 al igual que lo hace el de *A. thaliana*. En conjunto, estas observaciones podrían sugerir una conservación de función. También se ha visto que son capaces de formar R-loops, lo que sugeriría que la función en *trans* también podría estar conservada.

Por otro lado, la sobreexpresión de estos ARNlnc de *A. lyrata* en plantas de *A. thaliana* a la que se ha deletado el locus completo de *Ath_APOLO1* presenta un fenotipo más marcado del que presentan las líneas con niveles desregulados de *APOLO*, lo que podría indicar que cumplen la misma función o al menos están involucrados en el mismo proceso. Sin embargo, al presentar las plantas *CRISPR APOLO* una floración adelantada, no se puede descartar que el efecto observado sea producto de la desregulación de *Ath_APOLO1*. Próximamente se realizará el mismo estudio, pero utilizando plantas salvajes para transformar. De esta forma se podrá confirmar si el fenotipo observado se debe exclusivamente a la acción de estos ARNlnc. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que *APOLO* integra una familia de ARNlnc. Resta evaluar si son capaces de modular la conformación tridimensional de la cromatina y analizar qué gen o genes estarían regulando para explicar el fenotipo observado, y si las vías están conservadas entre *A. thaliana* y *A. lyrata*. Además, se habría que determinar si todos los miembros presentan igual patrón de expresión o si tienen una expresión tejido-específica determinada y si todos actúan bajo las mismas condiciones o lo hacen bajo diferentes estímulos.

Con respecto a la conservación entre ecotipos, se ha observado para *COOLAIR* (Hawkes et al., 2016) que, a pesar de tener una estructura conservada, existen algunas diferencias que serían las encargadas de determinar cambios en la función de este ARNlnc, dando como resultado un fenotipo diferencial que permite un mejor desarrollo de la planta en el ambiente en el cual se encuentra. Durante este trabajo de tesis se realizaron los análisis en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0 y no en otros ecotipos. La razón por la cual no se utilizaron otros ecotipos, a pesar de la existencia del proyecto 1001 Genomes (Kwak et al., 2016), fue que esos genomas no están bien curados. Para su ensamblado se han alineado fragmentos cortos usando Col 0 como referencia y, por lo tanto, se ha perdido mucho detalle del genoma no codificante. Sin embargo, recientemente se han re secuenciado los genomas de más de 400 ecotipos usando fragmentos más largos (Pacbio) (Kornienko et al., 2023). La información ahora disponible nos permitirá, en un futuro próximo, evaluar si el ARNlnc *Ath_APOLO1* está conservado en otros ecotipos al igual que los demás miembros analizados en este trabajo de tesis. Además, será posible determinar si estos miembros se expresan y si se co regulan con genes vecinos.

Por otro lado, en cuanto al origen de esta familia de ARNInc no está claro cómo han surgido. Dado que todas las copias del clado 1A presentan metilación del ADN y que varias de ellas están superpuestas o se encuentran muy cercanas a TEs, se podría sugerir un origen de este tipo. Más específicamente, la familia *APOLO* podría provenir de un retrotransposón de la familia LINE. Además, aquellos miembros que se encuentran cercanos a TE o restos de TE podrían ser miembros evolutivamente más recientes. No obstante, la información disponible no es suficiente para realizar una conclusión sobre esto.

CONCLUSIONES GENERALES

La investigación que se realizó en el marco de este trabajo de tesis permitió concluir que, a las funciones ya estudiadas del ARNlnc *APOLO*, se le suma la regulación de la ramificación y de la respuesta de hiponastía en el contexto del síndrome de *shade avoidance*. El mecanismo molecular a través del cual *APOLO* cumple esta función es el mismo mediante el cual regula el crecimiento de las raíces en presencia de auxinas (Ariel et al., 2020). Sin embargo, en este estudio se remarca la importancia de caracterizar el rol de los ARNlnc en diferentes órganos, considerando que altos niveles de *APOLO* desencadenan la adopción de conformaciones tridimensionales alternativas sobre el mismo locus.

Además, los resultados de este estudio respaldan el modelo antes propuesto acerca de la base estequiométrica de la acción de *APOLO* (Moison et al., 2021), dilucidando cómo integra la formación de bucles de cromatina con la participación de las proteínas asociadas.

También hemos demostrado que la aplicación exógena de *APOLO* modula la expresión de genes blanco específicos a través de la interacción directa con la cromatina y que esta respuesta está dada por motivos UUCUUC presentes en la secuencia. Esto abre la puerta al diseño de nuevas estrategias para modular el crecimiento de las plantas y sus respuestas al ambiente mediante la aplicación de ARNlnc epigenéticamente activos.

Por otro lado, los resultados sugieren que el ARNlnc estudiado pertenece a una familia de ARNlnc presentes en el género *Arabidopsis* cuyos miembros son todos intergénicos. El hecho de que sólo estén presentes en este género podría sugerir que su origen es reciente, sin embargo, no se puede concluir fehacientemente acerca de cómo fue el origen molecular.

En cuanto a la función de los ARNlnc miembros de esta familia, se observó que los miembros de *A. lyrata* *Aly_APOLO3* y *Aly_APOLO8* (los más cercanos filogenéticamente al de *A. thaliana* estudiado) se unen a LHP1 y son capaces de formar R-loops. Es por esto que se sugiere que existe conservación de la función. Además, se vio que la sobreexpresión de estos ARNlnc en plantas de *A. thaliana* genera un fenotipo más marcado que el de la desregulación de *Ath_APOLO1*, lo que apoyaría la hipótesis acerca de la conservación de función.

ANEXO

Tabla 1: lista de oligos

nombre	gen	secuencia	experimento
<i>ACTIN</i> Fw	<i>ACTIN</i>	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	qPCR
<i>ACTIN</i> Rev	<i>ACTIN</i>	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	qPCR
<i>APOLO</i> Fw	<i>APOLO</i>	CTTCGAGGCGCTAAACAATC	qPCR
<i>APOLO</i> Rev	<i>APOLO</i>	ACAGCGGTGCCACCTATTAC	qPCR
<i>BRC1</i> Fw	<i>BRC1</i>	GATTAACCACCATCGCAGCC	qPCR, ChIP, ChiRP, DRIP
<i>BRC1</i> Rev	<i>BRC1</i>	TTTCGCGCCGAAGGAGTAAT	qPCR, ChIP, ChiRP, DRIP
<i>BRC1</i> loop Fw	<i>BRC1</i>	CCCAATTCGACATTGTGTGA	3C qPCR
<i>BRC1</i> loop Rev	<i>BRC1</i>	ATGGTGAGAAAGGGTTGTCG	3C qPCR
<i>APOLO</i> T7 Fw	<i>APOLO</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTCTAA ACTAGTTTTTTTTGGG	in vitro transcription
<i>APOLO</i> R	<i>APOLO</i>	ATCGTCTGAAAGTTTATTATAG	in vitro transcription
<i>GFP</i> T7 Fw	<i>GFP</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATGGT GAGCAAGGGCGAGGA	in vitro transcription
<i>GFP</i> R	<i>GFP</i>	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	in vitro transcription
<i>PID</i> Fw	<i>PID</i>	TGAGGCGAAAATCTCGGAAG	qPCR
<i>PID</i> Rev	<i>PID</i>	TCAGCCGGTTATCATTTCGAC	qPCR
<i>WAG2</i> Fw	<i>WAG2</i>	TCTTCATCTCCGTCGCTTCG	qPCR
<i>WAG2</i> Rev	<i>WAG2</i>	GAACGCCACCAGTCTACTC	qPCR

<i>YUC2</i> Fw	<i>YUC2</i>	TCGGCAGAGTTTGTGATGGGAGA	qPCR
<i>YUC2</i> Rev	<i>YUC2</i>	TCCCTTTAGCCACATGGGTACGTT	qPCR
<i>GFP</i> Fw	<i>GFP</i>	TCAAGGAGGACGGAAACATC	qPCR
<i>GFP</i> Rev	<i>GFP</i>	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC	qPCR
<i>Aly_APOLO3</i> Fw	<i>Aly_APOLO3</i>	GGGGAATTCTTTGATTTGGTCTTAG ATGGCTT	clonado
<i>Aly_APOLO3</i> Rev	<i>Aly_APOLO3</i>	CCCCTCGAGAAAGAAAGGGAAACA ACAAGGC	clonado
<i>Aly_APOLO8</i> Fw	<i>Aly_APOLO8</i>	CCCGAATTCATCTTTGATTTGTTCTT AGATG	clonado
<i>Aly_APOLO8</i> Rev	<i>Aly_APOLO8</i>	CCCCTCGAGGTGAAATACAAGAGT GAAATA	clonado
<i>Aly3</i> Fw	<i>Aly_APOLO3</i>	CGGTCTTTTGTGTTTTAGCTC	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly3</i> Rev	<i>Aly_APOLO3</i>	GAAGAAGATAAACAGCAGGAC	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly8</i> Fw	<i>Aly_APOLO8</i>	TCTTAGATGGCTTCTGTGCGTA	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly8</i> Rev	<i>Aly_APOLO8</i>	GAATCTAAAGCAATCACCACAT	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly1</i> Fw	<i>Aly_APOLO1</i>	TACTCTAAAGATCTGGTCCAAA	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly1</i> Rev	<i>Aly_APOLO1</i>	GTACTACCTATTACGATGAAGACT	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly5</i> Fw	<i>Aly_APOLO5</i>	ATAAAAGAAGCCAGCGACGA	qPCR, RIP, DRIP
<i>Aly5</i> Rev	<i>Aly_APOLO5</i>	GGTTCCCAAGTGTCTCGTGT	qPCR, RIP, DRIP

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, G., Kudapa, H., Ramalingam, A., Choudhary, D., Sinha, P., Garg, V., Singh, V. K., Patil, G. B., Pandey, M. K., Nguyen, H. T., Guo, B., Sunkar, R., Niederhuth, C. E., & Varshney, R. K. (2020). Epigenetics and epigenomics: underlying mechanisms, relevance, and implications in crop improvement. *Functional and Integrative Genomics* 20(6)739–761. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00756-7>
- Aguilar-Martínez, J. A., Poza-Carrión, C., & Cubas, P. (2007). Arabidopsis *BRANCHED1* acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell*, 19(2), 458–472. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048934>
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, 55(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>
- Ariel, F., Lucero, L., Christ, A., Mammarella, M. F., Jegu, T., Veluchamy, A., Mariappan, K., Latrasse, D., Blein, T., Liu, C., Benhamed, M., & Crespi, M. (2020). R-Loop Mediated trans Action of the *APOLO* Long Noncoding RNA. *Molecular Cell*, 77(5), 1055-1065.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.015>
- Ariel, F., Romero-Barrios, N., Jégu, T., Benhamed, M., & Crespi, M. (2015). Battles and hijacks: Noncoding transcription in plants. *Trends in Plant Science* 20(6)362–371. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.003>
- Baile, F., Gómez-Zambrano, Á., & Calonje, M. (2022). Roles of Polycomb complexes in regulating gene expression and chromatin structure in plants. *Plant Communications* 3(1). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100267>
- Ballaré, C. L., & Pierik, R. (2017). The shade-avoidance syndrome: Multiple signals and ecological consequences. *Plant Cell and Environment* 40(11)2530–2543. <https://doi.org/10.1111/pce.12914>
- Bardou, F., Ariel, F., Simpson, C. G., Romero-Barrios, N., Laporte, P., Balzergue, S., Brown, J. W. S., & Crespi, M. (2014). Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 30(2), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.017>
- Bellstaedt, J., Trenner, J., Lippmann, R., Poeschl, Y., Zhang, X., Friml, J., Quint, M., & Delkera, C. (2019). A mobile auxin signal connects temperature sensing in cotyledons with growth responses in hypocotyls. *Plant Physiology*, 180(2), 757–766. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01377>

- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. & Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* 128, 4057-4067. <https://doi.org/10.1242/dev.128.20.4057>
- Berry, S., Rosa, S., Howard, M., Bühler, M., & Dean, C. (2017). Disruption of an RNA-binding hinge region abolishes LHP1-mediated epigenetic repression. *Genes and Development*, 31(21), 2115–2120. <https://doi.org/10.1101/gad.305227.117>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* (Vol. 7).
- Bugnon, L. A., Edera, A. A., Prochetto, S., Gerard, M., Raad, J., Fenoy, E., Rubiolo, M., Chorostecki, U., Gabaldón, T., Ariel, F., Di Persia, L. E., Milone, D. H., & Stegmayer, G. (2022). Secondary structure prediction of long noncoding RNA: review and experimental comparison of existing approaches. *Briefings in Bioinformatics* 23(4). <https://doi.org/10.1093/bib/bbac205>
- Burko, Y., Willige, B. C., Seluzicki, A., Novák, O., Ljung, K., & Chory, J. (2022). PIF7 is a master regulator of thermomorphogenesis in shade. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32585-6>
- Campalans, A., Kondorosi, A., & Crespi, M. (2004). Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 16(4), 1047–1059. <https://doi.org/10.1105/tpc.019406>
- Casal, J. J. (2012). Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book*, 10, e0157. <https://doi.org/10.1199/tab.0157>
- Cavalli, G., & Misteli, T. (2013). Functional implications of genome topology. *Nature Structural and Molecular Biology* 20(3) 290–299. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2474>
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y. H., Sung, Z. R., & Goodrich, J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*, 131(21), 5263–5276. <https://doi.org/10.1242/dev.01400>
- Chorostecki, U., Bologna, N. G., & Ariel, F. (2023). The plant noncoding transcriptome: a versatile environmental sensor. *The EMBO Journal*, 42(20). <https://doi.org/10.15252/embj.2023114400>
- Chung, B. Y. W., Balcerowicz, M., Di Antonio, M., Jaeger, K. E., Geng, F., Franaszek, K., Marriott, P., Brierley, I., Firth, A. E., & Wigge, P. A. (2020). An RNA thermoswitch regulates daytime growth in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 6(5), 522–532. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0633-3>

- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *16*(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Crespi, M. D., Jurkevitch, E., Poiret, M., D'aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., & Kondorosi, A. (1994). *ENOD40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. In *The EMBO Journal* *13*(21).
- Csorba, T., Questa, J. I., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *PNAS*, *111*(45), 16160–16165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419030111>
- Cui, X., Lu, F., Qiu, Q., Zhou, B., Gu, L., Zhang, S., Kang, Y., Cui, X., Ma, X., Yao, Q., Ma, J., Zhang, X., & Cao, X. (2016). REF6 recognizes a specific DNA sequence to demethylate H3K27me3 and regulate organ boundary formation in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, *48*(6), 694–699. <https://doi.org/10.1038/ng.3556>
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2020). Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiology*, *182*(1), 38–50. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- Damase, T. R., Sukhovshin, R., Boada, C., Taraballi, F., Pettigrew, R. I., & Cooke, J. P. (2021). The Limitless Future of RNA Therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628137>
- de Wit, M., Ljung, K., & Fankhauser, C. (2015). Contrasting growth responses in lamina and petiole during neighbor detection depend on differential auxin responsiveness rather than different auxin levels. *New Phytologist*, *208*(1), 198–209. <https://doi.org/10.1111/nph.13449>
- Deng, P., Liu, S., Nie, X., Weining, S., & Wu, L. (2018). Conservation analysis of long non-coding RNAs in plants. *Science China Life Sciences*, *61*(2), 190–198. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9174-9>
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C. S., Mähönen, A. P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., & Offringa, R. (2010). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development*, *137*(19), 3245–3255. <https://doi.org/10.1242/dev.052456>
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., Khatun, J., Lajoie, B. R., Landt, S. G., Lee, B. K., Pauli, F., Rosenbloom, K.

- R., Sabo, P., Safi, A., Sanyal, A., ... Lochovsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, *489*(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Durr, J., Papareddy, R., Nakajima, K., & Gutierrez-Marcos, J. (2018). Highly efficient heritable targeted deletions of gene clusters and non-coding regulatory regions in Arabidopsis using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22667-1>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fernández-Milmanda, G. L., & Ballaré, C. L. (2021). Shade Avoidance: Expanding the Color and Hormone Palette. *Trends in Plant Science* *26*(5)509–523. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.006>
- Fiorucci, A. S., & Fankhauser, C. (2017). Plant Strategies for Enhancing Access to Sunlight. *Current Biology* *27*(17)R931–R940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.085>
- Fiorucci, A. S., Galvão, V. C., Ince, Y. Ç., Boccaccini, A., Goyal, A., Allenbach Petrolati, L., Trevisan, M., & Fankhauser, C. (2020). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 is important for early responses to elevated temperature in Arabidopsis seedlings. *New Phytologist*, *226*(1), 50–58. <https://doi.org/10.1111/nph.16316>
- Fonouni-Farde, C., Ariel, F., & Crespi, M. (2021). Plant long noncoding rnas: New players in the field of post-transcriptional regulations. *Non-Coding RNA*, *7*(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ncrna7010012>
- Fonouni-Farde, C., Christ, A., Blein, T., Legascue, M. F., Ferrero, L., Moison, M., Lucero, L., Ramírez-Prado, J. S., Latrasse, D., Gonzalez, D., Benhamed, M., Quadrana, L., Crespi, M., & Ariel, F. (2022). The Arabidopsis *APOLO* and human *UPAT* sequence-unrelated long noncoding RNAs can modulate DNA and histone methylation machineries in plants. *Genome Biology*, *23*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02750-7>
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J. A., & Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, *39*(8), 1033–1037. <https://doi.org/10.1038/ng2079>
- Ganguly, P., Roy, D., Das, T., Kundu, A., Cartieaux, F., Ghosh, Z., & DasGupta, M. (2021). The natural antisense transcript DONE40 derived from the lncRNA ENOD40 locus interacts with SET domain protein ASHR3 during inception of symbiosis in arachis hypogaea. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *34*(9). <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-20-0357-R>

- Göbel, U., Arce, A. L., He, F., Rico, A., Schmitz, G., & De Meaux, J. (2018). Robustness of transposable element regulation but no genomic shock observed in interspecific Arabidopsis hybrids. *Genome Biology and Evolution*, *10*(6), 1403–1415. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy095>
- González-Grandío, E., Poza-Carrión, C., Sorzano, C. O. S., & Cubas, P. (2013). *BRANCHED1* promotes axillary bud dormancy in response to shade in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*(3), 834–850. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108480>
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J. P., Hoepfner, M. A. & Gaglianot, W. B. (1998). Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group Gene in Arabidopsis. *Science* *280*(5362):446-50. <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.446>.
- Gulyaev, A. P., Koster, C., Van Batenburg, D. C., Siermans, T., Van Belle, N., Vijfinkel, D., & Roussis, A. (2023). Conserved structured domains in plant non-coding RNA enod40, their evolution and recruitment of sequences from transposable elements. *NAR Genomics and Bioinformatics*, *5*(4). <https://doi.org/10.1093/nargab/lqad091>
- Hawkes, E. J., Hennelly, S. P., Novikova, I. V., Irwin, J. A., Dean, C., & Sanbonmatsu, K. Y. (2016). COOLAIR Antisense RNAs Form Evolutionarily Conserved Elaborate Secondary Structures. *Cell Reports*, *16*(12), 3087–3096. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.045>
- Hennig, L., & Derkacheva, M. (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? In *Trends in Genetics* (Vol. 25, Issue 9, pp. 414–423). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.07.002>
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*, *331*(6013), 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>
- Holalu, S. V., Reddy, S. K., Blackman, B. K., & Finlayson, S. A. (2020). Phytochrome interacting factors 4 and 5 regulate axillary branching via bud abscisic acid and stem auxin signalling. *Plant Cell and Environment*, *43*(9), 2224–2238. <https://doi.org/10.1111/pce.13824>
- Huang, Y., Sicar, S., Ramirez-Prado, J. S., Manza-Mianza, D., Antunez-Sanchez, J., Brik-Chaouche, R., Rodriguez-Granados, N. Y., An, J., Bergounioux, C., Mahfouz, M. M., Hirt, H., Crespi, M., Concia, L., Barneche, F., Amiard, S., Probst, A. V., Gutierrez-Marcos, J., Ariel, F., Raynaud, C., ... Benhamed, M. (2021). Polycomb-dependent differential chromatin compartmentalization determines gene coregulation in Arabidopsis. *Genome Research*, *31*(7), 1230–1244. <https://doi.org/10.1101/gr.273771.120>

- Hye, R. W., Pontes, O., Pikaard, C. S., & Richards, E. J. (2007). VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes and Development*, 21(3), 267–277. <https://doi.org/10.1101/gad.1512007>
- Ietswaart, R., Wu, Z., & Dean, C. (2012). Flowering time control: Another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends in Genetics* 28(9)445–453. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.06.002>
- Jin, J., Liu, J., Wang, H., Wong, L., & Chua, N. H. (2013). PLncDB: Plant long non-coding RNA database. *Bioinformatics* 29(8) 1068–1071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt107>
- Jorge Casal, T. J., & Balasubramanian, S. (2019). Annual Review of Plant Biology. *Annu. Rev. Plant Biol*, 70, 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718>
- Kakar, K., Zhang, H., Scheres, B., & Dhonukshe, P. (2013). CLASP-mediated cortical microtubule organization guides PIN polarization axis. *Nature*, 495(7442), 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature11980>
- Kakoulidou, I., Avramidou, E. V., Baránek, M., Brunel-muguet, S., Farrona, S., Johannes, F., Kaiserli, E., Lieberman-lazarovich, M., Martinelli, F., Mladenov, V., Testillano, P. S., Vassileva, V., & Maury, S. (2021). Epigenetics for crop improvement in times of global change. *Biology* 10(8). <https://doi.org/10.3390/biology10080766>
- Kapusta, A., Kronenberg, Z., Lynch, V. J., Zhuo, X., Ramsay, L. A., Bourque, G., Yandell, M., & Feschotte, C. (2013). Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>
- Kawakatsu, T., Huang, S. C., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Castanon, R., Nery, J. R., Barragan, C., He, Y., Chen, H., Dubin, M., Lee, C., Wang, C., Bemm, F., Becker, C., O'Neil, R., O'Malley, R. C., Quarless, D. X., The 1001 Genomes Consortium, Schork, N. J., Weigel, D., Nordborg, M. & Ecker, J. R. (2016) Epigenomic diversity in a global collection of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Cell* 166(2): 492–505.
- Keuskamp, D. H., Pollmann, S., Voeselek, L. A. C. J., Peeters, A. J. M., & Pierik, R. (2010). Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *PNAS* 107(52), 22740–22744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013457108>
- Kim, D. H., & Sung, S. (2017). Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by Long Noncoding RNAs. *Developmental Cell*, 40(3), 302–312.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.021>

- Klosinska, M., Picard, C. L., & Gehring, M. (2016). Conserved imprinting associated with unique epigenetic signatures in the *Arabidopsis* genus. *Nature Plants*, 2(10). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.145>
- Kohnen, M. V., Schmid-Siegert, E., Trevisan, M., Petrolati, L. A., Sénéchal, F., Müller-Moulé, P., Maloof, J., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2016). Neighbor detection induces organ-specific transcriptomes, revealing patterns underlying hypocotyl-specific growth. *Plant Cell*, 28(12), 2889–2904. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00463>
- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitelam, G. C., & Franklin, K. A. (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology*, 19(5), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.046>
- Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z. Q., Liu, X. Q., Zhao, S. Q., Wei, L., & Gao, G. (2007). CPC: Assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm391>
- Kornienko, A. E., Nizhynska, V., Molla Morales, A., Pisupati, R., & Nordborg, M. (2023). Population-level annotation of lncRNAs in *Arabidopsis* reveals extensive expression variation associated with transposable element-like silencing. *The Plant Cell*, 36(1), 85–111. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad233>
- Küpers, J. J., Snoek, B. L., Oskam, L., Pantazopoulou, C. K., Matton, S. E. A., Reinen, E., Liao, C. Y., Eggermont, E. D. C., Weekamp, H., Biddanda-Devaiah, M., Kohlen, W., Weijers, D., & Pierik, R. (2023). Local light signaling at the leaf tip drives remote differential petiole growth through auxin-gibberellin dynamics. *Current Biology*, 33(1), 75-85.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.11.045>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Legris, M., Ince, Y. Ç., & Fankhauser, C. (2019). Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nature Communications* (Vol. 10, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13045-0>
- Li, H., Ye, W., Wang, Y., Chen, X., Fang, Y., & Sun, G. (2021). RNA sequencing-based exploration of the effects of far-red light on lncRNAs involved in the shade-avoidance response of *D. officinale*. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.10769>

- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R. J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B. J., Ivans, L. J., Pedmale, U. V., Jung, H. S., Ecker, J. R., Kay, S. A., & Chory, J. (2012). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes and Development*, *26*(8), 785–790. <https://doi.org/10.1101/gad.187849.112>
- Liu, C., Wang, C., Wang, G., Becker, C., Zaidem, M., & Weigel, D. (2016). Genome-wide analysis of chromatin packing in *Arabidopsis thaliana* at single-gene resolution. *Genome Research*, *26*(8), 1057–1068. <https://doi.org/10.1101/gr.204032.116>
- Liu, J., Wang, H., & Chua, N. H. (2015). Long noncoding RNA transcriptome of plants. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(3), 319–328. <https://doi.org/10.1111/pbi.12336>
- Luo, H., Zhu, G., Eshelman, M. A., Fung, T. K., Lai, Q., Wang, F., Zeisig, B. B., Lesperance, J., Ma, X., Chen, S., Cesari, N., Cogle, C., Chen, B., Xu, B., Yang, F. C., So, C. W. E., Qiu, Y., Xu, M., & Huang, S. (2022). HOTTIP-dependent R-loop formation regulates CTCF boundary activity and TAD integrity in leukemia. *Molecular Cell*, *82*(4), 833-851.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.01.014>
- Manavella, P. A., Godoy Herz, M. A., Kornblihtt, A. R., Sieburth, L. E., Nakaminami, K., Seki, M., Sun, Q., Kang, H., Ariel, F. D., Crespi, M., Giudicatti, A., Cai, Q., Jin, H., Feng, X., & Qi, Y. (2022). Beyond transcription: compelling open questions in plant RNA. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac346/6883923>
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K. I., Kamiya, Y., & Kasahara, H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *PNAS* *108*(45), 18512–18517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108434108>
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T. A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J. M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K., & Seki, M. (2008). *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant and Cell Physiology*, *49*(8), 1135–1149. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn101>
- Mattick, J. S. (1994). Introns: evolution and function. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 4).
- Michaud, O., Fiorucci, A. S., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2017). Local auxin production underlies a spatially restricted neighbor-detection response in *Arabidopsis*. *PNAS* *114*(28), 7444–7449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702276114>

- Moison, M., Pacheco, J. M., Lucero, L., Fonouni-Farde, C., Rodríguez-Melo, J., Mansilla, N., Christ, A., Bazin, J., Benhamed, M., Ibañez, F., Crespi, M., Estevez, J. M., & Ariel, F. (2021). The lncRNA APOLO interacts with the transcription factor WRKY42 to trigger root hair cell expansion in response to cold. *Molecular Plant*, *14*(6), 937–948. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.03.008>
- Muino, J. M., De Bruijn, S., Pajoro, A., Geuten, K., Vingron, M., Angenent, G. C., & Kaufmann, K. (2016). Evolution of DNA-binding sites of a floral master regulatory transcription factor. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(1), 185–200. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv210>
- Nicol, J. W., Helt, G. A., Blanchard, S. G., Raja, A., & Loraine, A. E. (2009). The Integrated Genome Browser: Free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics*, *25*(20), 2730–2731. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp472>
- Pacheco, J. M., Mansilla, N., Moison, M., Lucero, L., Gabarain, V. B., Ariel, F., & Estevez, J. M. (2021). The lncRNA APOLO and the transcription factor WRKY42 target common cell wall EXTENSIN encoding genes to trigger root hair cell elongation. *Plant Signaling and Behavior*, *16*(8). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1920191>
- Palazzo, A. F., & Koonin, E. V. (2020). Functional Long Non-coding RNAs Evolve from Junk Transcripts. *Cell* *183*(5)1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.047>
- Palos, K., Nelson Dittrich, A. C., Yu, L., Brock, J. R., Railey, C. E., Wu, H. Y. L., Sokolowska, E., Skirycz, A., Hsu, P. Y., Gregory, B. D., Lyons, E., Beilstein, M. A., & Nelson, A. D. L. (2022). Identification and functional annotation of long intergenic non-coding RNAs in Brassicaceae. *Plant Cell*, *34*(9), 3233–3260. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac166>
- Pantazopoulou, C. K., Bongers, F. J., Küpers, J. J., Reinen, E., Das, D., Evers, J. B., Anten, N. P. R., & Pierik, R. (2017). Neighbor detection at the leaf tip adaptively regulates upward leaf movement through spatial auxin dynamics. *PNAS* *114*(28), 7450–7455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702275114>
- Park, Y. J., Lee, H. J., Gil, K. E., Kim, J. Y., Lee, J. H., Lee, H., Cho, H. T., Vu, L. D., Smet, I. De, & Park, C. M. (2019). Developmental programming of thermonastic leaf movement. *Plant Physiology*, *180*(2), 1185–1197. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00139>
- Patitaki, E., Schivre, G., Zioutopoulou, A., Perrella, G., Bourbousse, C., Barneche, F., & Kaiserli, E. (2022). Light, chromatin, action: nuclear events regulating light signaling in Arabidopsis. *New Phytologist* *236*(2) 333–349. <https://doi.org/10.1111/nph.18424>

- Quint, M., Delker, C., Franklin, K. A., Wigge, P. A., Halliday, K. J., & Van Zanten, M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants* 2. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.190>
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., & Sakr, S. (2015). Multiple Pathways Regulate Shoot Branching. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00741>
- Rawat, V., Abdelsamad, A., Pietzenek, B., Seymour, D. K., Koenig, D., Weigel, D., Pecinka, A., & Schneeberger, K. (2015). Improving the annotation of *Arabidopsis Lyrata* using RNA-Seq data. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137391>
- Ricci, W. A., Lu, Z., Ji, L., Marand, A. P., Ethridge, C. L., Murphy, N. G., Noshay, J. M., Galli, M., Mejía-Guerra, M. K., Colomé-Tatché, M., Johannes, F., Rowley, M. J., Corces, V. G., Zhai, J., Scanlon, M. J., Buckler, E. S., Gallavotti, A., Springer, N. M., Schmitz, R. J., & Zhang, X. (2019). Widespread long-range cis-regulatory elements in the maize genome. *Nature Plants*, 5(12), 1237–1249. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0547-0>
- Röhrig, H., Rgen Schmidt, J., Miklashevichs, E., Schell, J., & John, M. (2002). Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *PNAS* 99(4)1915–1920 <https://doi.org/10.1073pnas.022664799>
- Rodriguez-Granados, N. Y., Ramirez-Prado, J. S., Veluchamy, A., Latrasse, D., Raynaud, C., Crespi, M., Ariel, F., & Benhamed, M. (2016). Put your 3D glasses on: Plant chromatin is on show. *Journal of Experimental Botany*, 67(11), 3205–3221. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw168>
- Rodríguez Melo, J., Mammarella, F., & Ariel, F. (2023). Exogenous RNAs: promising tools for the second green revolution. *Journal of Experimental Botany* 74(7)2323–2337. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad023>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Roulé, T., Christ, A., Hussain, N., Huang, Y., Hartmann, C., Benhamed, M., Gutierrez-Marcos, J., Ariel, F., Crespi, M., & Blein, T. (2022). The lncRNA MARS modulates the epigenetic reprogramming of the maternal cluster in response to ABA. *Molecular Plant*, 15(5), 840–856. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.02.007>
- Sang, S., Chen, W., Zhang, D., Zhang, X., Yang, W., & Liu, C. (2021). Data integration and evolutionary analysis of long non-coding RNAs in 25 flowering plants. *BMC Genomics*, 22. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08047-6>

- Schluepmann, H., Van Dijken, A., Smeekens, S., & Paul, M. (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 100(11) 6849–6854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1132018100>
- Seo, J. S., Sun, H. X., Park, B. S., Huang, C. H., Yeh, S. D., Jung, C., & Chua, N. H. (2017). ELF18-INDUCED LONG-NONCODING RNA associates with mediator to enhance expression of innate immune response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 29(5), 1024–1038. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00886>
- Seymour, D. K., Koenig, D., Hagmann, J., Becker, C., & Weigel, D. (2014). Evolution of DNA Methylation Patterns in the Brassicaceae is Driven by Differences in Genome Organization. *PLoS Genetics*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004785>
- Smith, H. (1995). Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 46, Issue 5). www.annualreviews.org
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Sultan, S. E. (2010). Plant developmental responses to the environment: eco-devo insights. *Current Opinion in Plant Biology* 13(1) 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.021>
- Sun, Z., Huang, K., Han, Z., Wang, P., & Fang, Y. (2020). Genome-wide identification of *Arabidopsis* long noncoding RNAs in response to the blue light. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63187-1>
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., & Dean, C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 462(7274), 799–802. <https://doi.org/10.1038/nature08618>
- Tang, Y., Qu, Z., Lei, J., He, R., Adelson, D. L., Zhu, Y., Yang, Z., & Wang, D. (2021). The long noncoding RNA FRILAIR regulates strawberry fruit ripening by functioning as a noncanonical target mimic. *PLoS Genetics*, 17(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009461>
- Tao, X., Li, M., Zhao, T., Feng, S., Zhang, H., Wang, L., Han, J., Gao, M., Lu, K., Chen, Q., Zhou, B., & Guan, X. (2021). Neofunctionalization of a Polyploidization-Activated Cotton Long intergenic non-coding RNA DAN1 During Drought Stress Regulation. *Plant Phys* 186(4):2152-2168 <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab179/6237502>
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C. L., Sandberg, G., Noel, J. P., & Chory, J.

(2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133(1).

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1963). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell* 9, 1963-1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>.

Veluchamy, A., Jégu, T., Ariel, F., Latrasse, D., Mariappan, K. G., Kim, S. K., Crespi, M., Hirt, H., Bergounioux, C., Raynaud, C., & Benhamed, M. (2016). LHP1 Regulates H3K27me3 Spreading and Shapes the Three-Dimensional Conformation of the Arabidopsis Genome. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158936>

Wang, H., Liu, C., Cheng, J., Liu, J., Zhang, L., He, C., Shen, W. H., Jin, H., Xu, L., & Zhang, Y. (2016). Arabidopsis Flower and Embryo Developmental Genes are Repressed in Seedlings by Different Combinations of Polycomb Group Proteins in Association with Distinct Sets of Cis-regulatory Elements. *PLoS Genetics*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005771>

Wang, L., Gao, J., Wang, C., Xu, Y., Li, X., Yang, J., Chen, K., Kang, Y., Wang, Y., Cao, P., & Xie, X. (2022). Comprehensive Analysis of Long Non-coding RNA Modulates Axillary Bud Development in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.809435>

Wang, Y., Fan, X., Lin, F., He, G., Terzaghi, W., Zhu, D., & Deng, X. W. (2014). Arabidopsis noncoding RNA mediates control of photomorphogenesis by red light. *PNAS* 111(28), 10359–10364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409457111>

Waseem, M., Liu, Y., & Xia, R. (2021). Long non-coding RNAs, the dark matter: An emerging regulatory component in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22(1)1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22010086>

Wu, H. W., Deng, S., Xu, H., Mao, H. Z., Liu, J., Niu, Q. W., Wang, H., & Chua, N. H. (2018). A noncoding RNA transcribed from the AGAMOUS (AG) second intron binds to CURLY LEAF and represses AG expression in leaves. *New Phytologist*, 219(4), 1480–1491. <https://doi.org/10.1111/nph.15231>

Xu, W., Xu, H., Li, K., Fan, Y., Liu, Y., Yang, X., & Sun, Q. (2017). The R-loop is a common chromatin feature of the Arabidopsis genome. *Nature Plants*, 3(9), 704–714. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0004-x>

- Yang, M., Wang, X., Huang, H., Ren, D., Su, Y., Zhu, P., Zhu, D., Fan, L., Chen, L., He, G., & Deng, X. W. (2016). Natural variation of H3K27me3 modification in two *Arabidopsis* accessions and their hybrid. *Journal of Integrative Plant Biology*, *58*(5), 466–474. <https://doi.org/10.1111/jipb.12443>
- Zhai, J., Bischof, S., Wang, H., Feng, S., Lee, T. F., Teng, C., Chen, X., Park, S. Y., Liu, L., Gallego-Bartolome, J., Liu, W., Henderson, I. R., Meyers, B. C., Ausin, I., & Jacobsen, S. E. (2015). A one precursor one siRNA model for pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell*, *163*(2), 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.032>
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W. L., Chen, H., Henderson, I. R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E., & Ecker, J. R. R. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, *126*(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.003>
- Zhou, C., Zhu, J., Qian, N., Guo, J., & Yan, C. (2021). *Bacillus subtilis* SL18r Induces Tomato Resistance Against *Botrytis cinerea*, Involving Activation of Long Non-coding RNA, MSTRG18363, to Decoy miR1918. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.634819>
- Zhu, W., Hu, B., Becker, C., Doğan, E. S., Berendzen, K. W., Weigel, D., & Liu, C. (2017). Altered chromatin compaction and histone methylation drive non-additive gene expression in an interspecific *Arabidopsis* hybrid. *Genome Biology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1281-4>