



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

LA VÍA RdDM CANÓNICA PARTICIPA EN EL CONTROL DEL TIEMPO DE  
GERMINACIÓN EN RESPUESTA A SALINIDAD EN *ARABIDOPSIS*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

VÍCTOR MIGUEL PALOMAR OLGUÍN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DR. FÉLIX RECILLAS TARGA  
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR  
DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS. JUNIO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

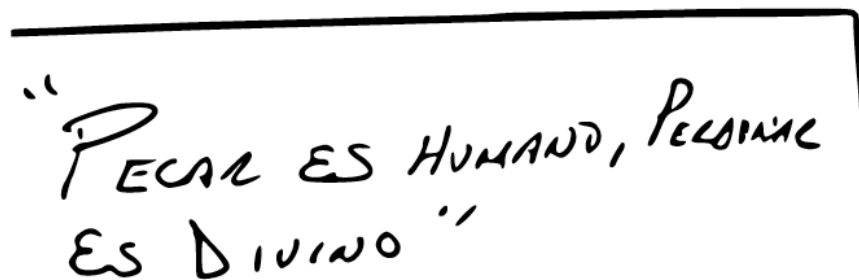
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo es un homenaje póstumo a la memoria de mi madre, Guadalupe Olguín Ángeles, acaecida en la Ciudad de México el 10 de Mayo de 2013.

A rectangular box with a thick black border containing handwritten text in Spanish. The text is written in a cursive, slightly slanted font. The words are arranged in two lines: "PECAR ES HUMANO, PERDONAR" on the top line and "ES DIVINO" on the bottom line. The entire phrase is enclosed in double quotation marks.

"PECAR ES HUMANO, PERDONAR  
ES DIVINO"

Guadalupe Olguín Ángeles  
16/10/1959 - 10/05/2013

## **Agradecimientos**

La realización del presente trabajo no habría sido posible sin la certera y constante dirección de la Dra. Alejandra Covarrubias. Deseo también agradecer enormemente a la UNAM, institución a la que he pertenecido por más de 18 años.

También quiero agradecer por el financiamiento recibido a DGAPA-UNAM, proyecto IN211816, al CONACyT por la beca de posgrado otorgada #239759, al SNI por los apoyos otorgados al final de mis estudios de posgrado, al IBt, a la Universidad de Michigan y a la National Science Foundation de Estados Unidos por todos los apoyos otorgados para la culminación de este proyecto. A mi comité tutorial: Dra. Alejandra Covarrubias, Dr. Félix Recillas y Dr. José Luis Reyes por su infalible dirección en la realización de este proyecto. A mi comité de defensa: la Dra. Alejandra Covarrubias, la Dra. Tzvetanka (Cesy) Dinkova, el Dr. Joseph Dubrovsky, el Dr. Damien Formey y la Dra. Maripaz Sánchez por la revisión crítica de la presente. A los coautores externos de mi artículo, la Dra. Adriana Garay y el Dr. Alejandro Garcarrubio por su importante contribución; y a Rosy Solórzano, Carlos González Chávez, Beatriz Pérez Morales, Verónica Jiménez Jacinto, Karel Estrada, Ricardo Grande, las Unidades de Secuenciación Masiva y Bioinformática, y de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBt, y el Laboratorio Nacional de Microscopía Electrónica, por todo su apoyo técnico.

Agradezco a mis estudiantes (en orden temporal): Inti, Lorena, Claudia, Daniela y Omar, en el IBt, y Zoe, Addie y Sarah en la Universidad de Michigan, continúen con una carrera exitosa. A los miembros del consorcio Covarrubias-Reyes, en especial a Coral, Cesar, Lupita, David, Jenny y Poncho. A mi *'advisor'* posdoctoral, Dr. Andrzej Wierzbicki y a los miembros de su laboratorio por su apoyo.

Y final y más importantemente, quiero agradecer a mis padres Ignacio y Guadalupe (QEPD) por su constante lucha que me ha permitido alcanzar mis sueños, a mi hermano Celso que me ha apoyado en todo lo que he necesitado y a quien deseo mucho éxito en lo que se proponga; y a Jonathan, mi compañero de vida, mi mejor amigo, mi todo, siempre te voy a cuidar.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>14</b>
<b>La semilla y su germinación</b> .....	<b>14</b>
<b>Estrés en plantas</b> .....	<b>16</b>
<b>Estrés por deficiencia de agua</b> .....	<b>19</b>
El ajuste osmótico.....	20
<b>Salinidad</b> .....	<b>21</b>
<b>Participación del ABA y otras hormonas vegetales en la respuesta a estrés</b> .....	<b>23</b>
Respuesta ABA-dependiente.....	24
Respuesta ABA-independiente .....	26
<b>Regulación epigenética</b> .....	<b>27</b>
Estructuración de cromatina .....	28
Modificación post-traducciona l de histonas .....	30
Metilación de DNA.....	32
<b>RNAs pequeños</b> .....	<b>34</b>
microRNAs .....	35
id-miRNAs, ta-siRNAs, phasiRNAs y nat-siRNAs.....	37
siRNAs antivirales.....	38
<b>RdDM (RNA-directed DNA methylation)</b> .....	<b>40</b>
Elementos transponibles.....	46
RdDM no-canónica .....	48
RdDM durante la fertilización, desarrollo de la semilla y la germinación .....	50
<b>Justificación</b> .....	<b>54</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>55</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>55</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>56</b>
<b>Material vegetal y condiciones de crecimiento</b> .....	<b>56</b>
Ecotipos y líneas mutantes .....	57
<b>Cruzas genéticas</b> .....	<b>58</b>
<b>Experimentos para el análisis de la germinación en condiciones de estrés</b> .....	<b>58</b>
<b>Experimentos para determinar la longitud de la raíz en condiciones de estrés</b> .....	<b>59</b>
<b>Estadística aplicada a los datos obtenidos en el análisis fenotípico</b> .....	<b>59</b>
<b>Extracción de proteínas y experimentos de inmunodetección tipo western blot</b> .....	<b>60</b>
<b>Microscopía de fluorescencia</b> .....	<b>62</b>
<b>Extracción de RNA y secuenciación masiva tipo RNA-seq</b> .....	<b>63</b>
Análisis bioinformático de las muestras RNA-seq.....	64
<b>Extracción de DNA y secuenciación genómica por bisulfito de sodio (WGBS)</b> .....	<b>66</b>
Análisis bioinformático tipo WGBS.....	67
<b>Acceso a los repositorios de secuencias</b> .....	<b>69</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>70</b>
<b>Los elementos de RdDM se acumulan durante la desecación de la semilla</b> .....	<b>70</b>
<b>La vía RdDM canónica se requiere para una germinación óptima en condiciones de salinidad</b> .....	<b>71</b>
<b>La ausencia de la proteína AGO4 desencadena una germinación acelerada</b> .....	<b>73</b>
<b>El fenotipo asociado a la pérdida de AGO4 es dosis-dependiente a las condiciones de salinidad</b> .....	<b>78</b>
<b>La proteína AGO6 tiene un efecto sobre la germinación en ausencia de AGO4</b> .....	<b>80</b>
<b>La abundancia de AGO4 cambia durante la germinación y crecimiento temprano</b> .....	<b>82</b>
<b>AGO4 se localiza diferencialmente en respuesta a salinidad</b> .....	<b>85</b>
<b>La pérdida de RdDM no repercute en la abundancia global de la metilación de DNA</b> .....	<b>90</b>
<b>El alelo <i>ago4-2</i> genera una proteína AGO4 con baja actividad</b> .....	<b>97</b>
<b>La vía RdDM controla la metilación CHH locus-específica en respuesta a salinidad</b> .....	<b>99</b>

<b>RdDM participa en el control del tiempo de germinación .....</b>	<b>103</b>
<b>El control de RdDM sobre la germinación involucra la regulación de blancos secundarios.....</b>	<b>106</b>
<b>La participación de RdDM en la respuesta a estrés durante la germinación se extiende a otras etapas del desarrollo.....</b>	<b>109</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>111</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>120</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>121</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>122</b>
<b>Tablas .....</b>	<b>143</b>
<b>Anexo 1. Artículo producto de este trabajo .....</b>	<b>146</b>
<b>Anexo 2. Artículos con participación por análisis bioinformáticos .....</b>	<b>163</b>
<b>Anexo 3. Artículos con participación en el establecimiento de condiciones de estrés.....</b>	<b>181</b>
<b>Anexo 4. Participación en una revisión sobre RNAs pequeños.....</b>	<b>189</b>

## índice de figuras

Figura 1. Diversidad en la biogénesis de los RNAs pequeños en plantas.....	35
Figura 2. Las tres fases de la vía RdDM .....	44
Figura 3. La metilación de DNA tipo CHH (mCHH) se incrementa gradualmente, desde el desarrollo de la semilla, hasta la germinación .....	52
Figura 4. Interpretación gráfica de la acumulación de RNA mensajero de los elementos núcleo de RdDM durante el desarrollo y maduración de la semilla .....	71
Figura 5. Perfil de germinación de las mutantes deficientes en la actividad de RdDM.....	73
Figura 6. Germinación de las mutantes nulas en AGO4 ( <i>ago4-3</i> y <i>ago4-6</i> ) bajo fondo Col-0 .....	74
Figura 7. Germinación de las mutantes nulas de AGO4 bajo distintos fondos genéticos .....	75
Figura 8. Inmunodetección mediante Western Blot de la proteína AGO4 en las líneas usadas para los experimentos fenotípicos.....	76
Figura 9. Perfil de germinación de las retro-cruzas y líneas de introgresión de <i>ago4-3</i> .....	77
Figura 10. Efecto dosis-dependiente de la sal sobre los fenotipos de las mutantes de RdDM ....	79
Figura 11. Niveles de acumulación del RNA-mensajero de los genes <i>AGO4</i> , <i>AGO6</i> y <i>AGO9</i> durante el proceso de germinación.....	81
Figura 12. Germinación de la doble mutante <i>ago4</i> x <i>ago6</i> .....	82
Figura 13. Acumulación de la proteína AGO4 durante la germinación .....	84
Figura 14. Distribución tejido-específica de la proteína de fusión GFP-AGO4 durante la germinación .....	87
Figura 15. Localización de AGO4 en la región apical de la raíz .....	89
Figura 16. Localización intracelular de AGO4 durante germinación .....	90
Figura 17. Niveles globales de metilación de DNA en las diferentes mutantes de RdDM .....	92
Figura 18. Distribución de la metilación en los cinco cromosomas de <i>Arabidopsis</i> .....	94
Figura 19. Regiones diferencialmente hipo-metiladas identificadas en las mutantes de RdDM	96
Figura 20. Superposición de las DMRs hipo-metiladas en CHH entre las mutantes de AGO4.....	98
Figura 21. Perfil de metilación de las DMRs específicas de <i>ago4-2</i> y <i>ago4-3</i> sobre otros fondos mutantes .....	98
Figura 22. Metilación CHH de las DMRs hiper-metiladas por salinidad en Col-0.....	101
Figura 23. Metilación de las DMRs hiper-metiladas específicas de <i>ago4-2</i> en los genomas las diferentes líneas.....	102
Figura 24. Control de RdDM sobre la expresión de genes blanco directos identificados en <i>ago4-2</i> .....	104
Figura 25. Control de RdDM sobre la expresión de genes blanco directos identificados en <i>ago4-3</i> .....	105
Figura 26. Cambios transcripcionales en las mutantes de AGO4 durante la germinación .....	107
Figura 27. Proporción de los transcritos de respuesta a sal en las mutantes <i>ago4-2</i> y <i>ago4-3</i> .	108
Figura 28. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de la raíz en las mutantes de AGO4.....	110
Figura 29. Modelo propuesto acerca de la participación de RdDM en el control de la germinación en respuesta a estrés salino .....	118

## Abreviaciones y nombres de genes

5meC	5-metil citosina
ABA	Ácido abscisico
ABF	ABRE Binding Factor
ABRC	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center
ABRE	ABA Responsive Element
AGI	<i>Arabidopsis</i> Gene Identifier
AGL	Agamous-like
AGO	Argonaute
AHG	ABA – hypersensitive germination
AREB	ABA – Responsive Element Binding Factor
ATAF	<i>A. thaliana</i> Transcription Activator Factor
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
bHLH	basic Helix-loop-helix
bZip	Proteinas basicas con cierre de leucinas
CAM	Crassulacean Acid Metabolism (Metabolismo acido de las crasulaceas)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CBF	C-repeat Binding Factor
Chr	Cromosoma
CLSY	Classy
CMM	Celula Madre de la Megaespora
CMT3	Chromomethylase 3
CMV	Citomegalovirus
Col-0	Columbia-0
CRT	C repeated
CTD	Carboxy-terminal Domain
CUC	Cup-shaped cotyledon
DAI	Days after imbibition (Dias despues de la imbibición)
DBP	DNA-bound protein
DCL	Dicer-like
DMR	Differentially Methylated Regions (Regiones diferencialmente metiladas)
DNA	Desoxirribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
DNMT	DNA methyltransferase
DOG1	Delay of Germination 1
DRB4	Double-stranded RNA Binding Protein 4
DRE	Drought Responsive Element
DREB	Dehydration-Responsive Element-Binding protein
DRM	Domains Rearranged Methyltransferase
DSB	Double-strand Break
dsRNA	Double-stranded RNA
DTT	Ditiotreitol
EBC	Epidermal Bladder Cell (Celulas epidermicas tipo vejiga)
EBF	EIN3 Binding F-Box
EDTA	Acido etilendiaminatetracético
ET	Elemento Transponible
FDR	False Discovery Rate (Tasa de descubrimiento de falsos)
FT	Factor de transcripcion
GA	Acido giberélico
GEO	Gene Expression Omnibus
GFP	Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente)
g1	Glabra 1
HAT	Histone Acetil Transferase

hc-siRNA	Heterochromatic siRNA
HDA	Histone deacetylase
HEN1	Hua Enhancer 1
HR4	Homolog of RPW8 4
HRP	Horseradish Peroxidase
Id-miRNA	Intron-derived microRNA
IDN2/IDP	In De Novo 2 / IDN2 paralogue
ILA	Ilithya
JMJC	Jumonji C
KTF	Kow Domain-containing transcription factor
KYP	Kryptonite
LEA	Late Embryogenesis abundant (Abundante en la embriogenesis tardía)
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
lncRNA	Long non-coding RNA
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1
LTR	Long-terminal repeat
MES	Acido 2-(N morfolino)etanesulfónico
MET1	Methyltransferase 1
miRNA	microRNA
miRNA*	microRNA estrella
MOPS	3-(n-morfolino) acido propanesulfónico
mRNA	RNA mensajero
MS	Sales Murashige and Skoog, tambien hace referencia a condiciones control
MYB	MYC-Binding factor
MYC	Myelocytomatosis
MYMIV	Mungbean Yellow Mosaic Virus
NaCl	Cloruro de sodio
NAM	No Apical Meristem
NAT	Natural antisense transcript
Nat-siRNA	Natural antisense derived siRNA
NERD	Needed for RDR2-independent DNA methylation
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDLP7	Plasmodesmata-located Protein 7
phasiRNA	phased siRNA
PI	Yoduro de propidio
PIWI	P-element Induced Wimpy Testis
PLE	PiggyBac-like
Pol	RNA Polimerasa
PP2C	Protein Phosphatase 2 C
PRC	Polycomb Repressive Complex
premiRNA	Precursor de microRNA
PTGS	Post-transcriptional Gene Silencing (Silenciamiento Génico Post-transcripcional)
PXV	Potexvirus
PYL	Pyr-like
PYR	Pyrabactin Resistance
Ran	Ras-Related Nuclear Protein
RCAR	Regulatory Components of ABA Receptors
RD29A	Response to Dessication 29 A
RdDM	RNA-directed DNA methylation (Metilación de DNA dirigida por RNA)
RDR	RNA-dependent RNA polymerase

RIP	RNA immunoprecipitation (Inmunoprecipitación de RNA)
RISC	RNA-interference Silencing Complex
RITS	RNA-induced Transcriptional Silence
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)
RSYV	Rice Stripe Yellowing Virus
RWC	Relative Water Content (Contenido relativo de agua)
S.D.	Desviación estándar
S.E.	Error estándar
SDN	Small RNA Degrading Nuclease
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SGS	Suppressor of Gene Silencing
SHH	Sawadee Homeodomain Homolog
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
siRNA	Small interfering RNA
SKU6	Sku5 similar 6
SnRK	Sucrose nonfermenting 1-Related Kinase
SPCSV	Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus
SPTL	Serine Palmitoyltransferase like
SUVH	Suppressor of Variegation – Homolog
SWI/SNF	Switch/Sucrose Non-Fermentable
ta-siRNA	Trans-acting siRNA
TBSV	Tomato Bushy Stunt Virus
TCV	Turnip Crinkle Virus
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGS	Transcriptional Gene Silencing (Silenciamineto Génico Transcripcional)
TIR	Terminal Inverted Repeat
UBP26	Ubiquitin Carboxyl-terminal hydrolase 26
vsRNA	viral siRNA
WGBS	Whole Genome Bisulfite Sequencing (Secuenciación genómica por bisulfito de sodio)
Ws	Wassilewskija



## Resumen

Las plantas están expuestas prolongadamente a condiciones ambientales adversas por lo que poseen mecanismos que les permiten contender con el estrés y asegurar su supervivencia. Dichos mecanismos actúan a múltiples niveles, desde la respuesta epigenética, hasta ajustes metabólicos, fisiológicos y del desarrollo.

La germinación es uno de los estadios más críticos en el desarrollo vegetal; es un proceso irreversible en el cual la semilla tiene que tomar la decisión de germinar dependiendo de las condiciones del ambiente. El estrés en el medio provoca que la planta ajuste una respuesta controlada para asegurar una germinación exitosa. Sin embargo, los mecanismos que participan en este control no han sido explorados en su totalidad.

RdDM (RNA-directed DNA methylation) o la vía de metilación de DNA dirigida por RNA, es un mecanismo que participa en el establecimiento y mantenimiento del silenciamiento de elementos transponibles (ET) a nivel transcripcional a través de metilación de DNA. La represión de ET es esencial para mantener la integridad genómica en momentos clave del desarrollo vegetal y en la respuesta al estrés.

En este trabajo se analiza la participación de ARGONAUTA 4 (AGO4, un componente esencial para el establecimiento de la metilación mediada por RdDM) y de RdDM en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* al estrés salino durante la germinación. Se encontró que esta vía es necesaria para la óptima germinación de las semillas sometidas a condiciones de alta salinidad, ya que, en su ausencia, se presentan defectos en el tiempo de germinación comparado con lo que ocurre en plantas de tipo silvestre. La proteína AGO4 responde a la presencia de la sal durante la germinación al acumularse y distribuirse diferencialmente en los embriones expuestos a este estrés, una función hasta ahora desconocida para AGO4 y para RdDM. Adicionalmente, en ausencia de AGO4, ARGONAUTA 6 (AGO6), una proteína clasificada dentro de la familia

“Argonauta”, adquiere una función adicional que modifica el fenotipo observado en *ago4*.

Por otra parte, la metilación de DNA establecida por RdDM es indispensable para una óptima respuesta al estrés, y es requerida para la represión de ET y genes en respuesta a la sal; ya que, en ausencia de una vía RdDM funcional, los niveles de metilación en ciertas regiones del DNA se ven reducidos, en concordancia con una expresión aumentada de los genes cercanos. La activación ectópica de genes normalmente reprimidos por RdDM provoca una alteración multi-génica que afecta varios mecanismos que participan en el control del tiempo de la germinación, desde la acumulación de proteínas con función osmoprotectora, hasta la señalización mediada por hormonas como ácido abscísico y etileno, afectando su función en la dormancia, germinación y el crecimiento temprano.

Estos hallazgos revelan un papel hasta ahora desconocido para RdDM, y exhiben lo complejo que es el control de la expresión genética en momentos clave del desarrollo. Pero además abre camino a nuevas y excitantes preguntas que permitirán descubrir nuevos mecanismos de control que las plantas utilizan para contender con los insultos ambientales.

## Abstract

Plants are exposed to adverse environmental conditions for long periods of time such they have protection mechanisms to ensure their survival. These mechanisms function at multiple levels, from an epigenetic response, to metabolic, physiological, and developmental adjustments.

Germination is one of the most critical stages during plant life, it is an irreversible process where the seed has to make a decision to germinate or not depending on the environment. Stress causes a fine-tuned adjustment response for the germination success. Although, the mechanisms that participate in such control have not been fully explored.

RdDM (RNA-directed DNA methylation) is a mechanism that participates in the establishment and maintenance of transposable elements silencing at transcriptional level using small RNA molecules to direct DNA methylation. Transposon repression is essential to keep genome integrity at key stages of the plant development.

In this work, I analyze the participation of RdDM in *Arabidopsis thaliana* response to salinity during germination. I found that this pathway is essential for optimal germination of seeds subjected to high salinity conditions so, when absent, germination time is affected. ARGONAUTE 4 (AGO4), a key component of RdDM, responds to salt presence during germination by accumulating and differentially distributing in embryos exposed to this condition. These results are a novel finding for AGO4 and RdDM. Additionally, ARGONAUTE 6 (AGO6), another protein classified within the 'Argonaute' group, acquires a gain-of-function activity that misleads the phenotype observed in *ago4*.

The RdDM activity is required for an optimal stress response and for repression of transposon and stress responsive genes given that, in the absence of a functional RdDM pathway, some genomic regions loss DNA methylation levels in accordance with an increased expression of the neighboring genes. Ectopic

activation of genes normally repressed by RdDM triggers a multi-gene alteration that affects a plethora of mechanisms that modulate the germination timing, including osmo-protective protein accumulation and hormone signaling pathways; such failure affects dormancy, germination, and young seedling growth.

These findings reveal a yet unknown role for RdDM and exhibit the complexity of the gene expression control at key stages of plant development. It also opens new exciting questions that will allow the discovery of new control mechanisms that plants use to confront environmental insults.

## **Introducción**

### **La semilla y su germinación**

Las semillas son un elemento esencial para la humanidad, estas poseen reservas de proteínas, almidones, aceites y otros nutrientes necesarios para la alimentación humana y la domesticación de los animales. La capacidad de producción y propagación de las semillas permitieron el desarrollo de la agricultura, un punto de inflexión en la historia del desarrollo humano.

Las semillas vienen en muchas formas y tamaños, desde las diminutas semillas de *Arabidopsis*, hasta las semillas gigantes de las palmas. A pesar de su gran diversidad, todas tienen la misma función, el desarrollo y la maduración de un embrión para asegurar el éxito de la nueva generación vegetal (Bewley et al., 2013). Es por ello que, para tener éxito en su dispersión, las semillas tienen que resistir los insultos medioambientales al que están expuestas.

La semilla de angiospermas está compuesta de cuatro estructuras principales: un embrión, un endospermo con los nutrientes de reserva, y una testa, que es el integumento que brinda protección. El embrión se deriva de la fertilización de uno de los núcleos de la célula huevo dentro el saco embrionario con un núcleo de una célula espermática masculina proveniente del tubo polínico. El endospermo, por su parte, es producto de la fusión de los dos núcleos polares de la ovocélula central, con el otro núcleo del tubo polínico, resultando en un tejido triploide. Finalmente la testa se deriva de los integumentos del óvulo materno (Bewley et al., 2013).

El embrión maduro posee tres estructuras principales, la radícula, que va a dar lugar a la raíz, el hipocotilo, plúmula y cotiledón, mismos que se desarrollarán en la parte aérea de la planta. El número de cotiledones presentes en el embrión es una característica evolutiva que divide plantas monocotiledóneas (un solo cotiledón, como los pastos y cereales), de las dicotiledóneas (dos cotiledones,

como leguminosas y brasicáceas, entre otras), y durante su maduración se desarrollaran en las primeras hojas cotiledonares (Bewley et al., 2013).

Las semillas están sometidas a la quiescencia, un fenómeno que es necesario para que puedan germinar. Durante la quiescencia ocurre una pérdida de humedad de entre el 85 y 95 %, por lo que la actividad metabólica de la semilla en desarrollo se detiene casi en su totalidad, para posteriormente ser re-establecida durante la germinación. En el caso de semillas ortodoxas, estas también pasan por un evento denominado dormancia o latencia, la cuál está definida como una condición adaptativa y pre-programada que limita el conjunto de condiciones en las cuales una semilla puede germinar, y por ende permite la dispersión y supervivencia de las semillas en ambientes adversas por largos periodos de tiempo (Baskin and Baskin, 2004, Shvachko Ncapital A and Khlestkina, 2020). Debido a que la germinación es proceso crítico e irreversible que ocurre una sola vez en la vida de la planta, la dormancia provee a las semillas de una estrategia adicional para asegurar su supervivencia en condiciones hostiles (Bewley et al., 2013, Finkelstein et al., 2008).

La dormancia y la germinación están controladas por balances hormonales específicos; la síntesis y el catabolismo de ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA), son mediadores principales de estos dos procesos. La presencia de ABA inhibe la germinación y promueve la dormancia de la semilla, su síntesis se da desde los primeros estadios de la maduración de la semilla. En contraste, GA promueve la germinación y también está involucrado en el crecimiento vegetativo, floración y producción de polen (Rodríguez-Gacio Mdel et al., 2009, Verma et al., 2016). En el momento de la germinación de las semillas, el ABA acumulado en altos niveles dentro del embrión en dormancia comienza a degradarse, en tanto que aumenta la producción de ácido giberélico (Giberelina) y el ácido indolacético (Auxina), mejor conocidos como las hormonas de germinación y crecimiento. De la misma manera, existen otras hormonas involucradas en el proceso de germinación, como la fitohormona etileno, las citocininas y los brasinoesteroides que, en general, promueven la germinación (Bewley et al., 2013, Shuai et al., 2016, Holdsworth et al., 2008).

La germinación es el proceso fisiológico mediante el cual el embrión contenido dentro de la semilla se desarrolla para convertirse en una planta. En sentido estricto dicho proceso inicia con la entrada de agua en la semilla y culmina con la emergencia del primer eje embrionario (usualmente comenzando por la radícula). Posterior a la emergencia de la radícula, todos los procesos de desarrollo consecuentes forman parte del crecimiento temprano de la plántula como su emergencia y establecimiento (Bewley et al., 2013).

La intercomunicación de las señales hormonales, así como la expresión y represión de una multitud de genes, hacen que la germinación sea un proceso sumamente regulado con la finalidad de asegurar el éxito de la siguiente generación.

Debido a que la germinación *sensu stricto* muchas veces ocurre en lapso muy corto, un método para medirla es el uso del porcentaje de capacidad germinativa, por ejemplo, en una población de semillas, 50 % de germinación se refiere a que la mitad de las semillas ha completado su programa de germinación hasta el momento de la emergencia de su radícula. Este método es muy eficaz para encontrar defectos en la germinación como consecuencia de condiciones biológicas o ambientales (Bewley et al., 2013).

### **Estrés en plantas**

Debido a su naturaleza sésil, las plantas están sometidas durante todo su ciclo de vida a cambios extremos en las condiciones ambientales y, por ello, sus respuestas están finamente moduladas para asegurar su supervivencia.

Aquellos tipos de estrés causados por la interacción con otros organismos se consideran como estrés biótico, mientras que el estrés abiótico está determinado por la interacción del organismo con procesos naturales no vivos. En esta segunda categoría encontramos aquellas condiciones estresantes tales como la sequía, inundaciones, las altas o bajas temperaturas, la salinidad y presencia de

otros componentes químicos en el ambiente, radiación y luz ultravioleta, entre otros (Buchanan et al., 2015, Levitt, 1986).

Como resultado de la exposición a condiciones extremas, las plantas desencadenan respuestas a nivel bioquímico y molecular entre las que destacan la regulación epigenética, transcripcional, post-transcripcional y traduccional, y aquellas modificaciones a nivel estructura-función de proteínas. Esta modulación repercute a nivel metabólico y fisiológico, que a su vez afectan el desarrollo óptimo de la planta (Buchanan et al., 2015).

Una respuesta común en las plantas a la presencia de un estímulo adverso es la disminución en su tasa de crecimiento, consecuencia, entre otras cosas, de una disminución en la síntesis de proteínas como una estrategia para la conservación de recursos. Sin embargo, existe una clase de genes que, en respuesta al estrés, adquieren una alta expresión, y las proteínas resultantes son necesarias para confrontar aquellos ambientes desfavorables; a estos genes se les conoce como genes de respuesta a estrés (Bray, 1993, Skirycz and Inze, 2010).

Entre los genes que aumentan su expresión en respuesta al estrés de tipo abiótico como deshidratación o temperaturas extremas, se encuentran:

- Aquellos que codifican para proteínas de choque térmico y los encargados de la síntesis de osmolitos compatibles (Jacob et al., 2017, Hong and Vierling, 2000, Kannan et al., 2013).
- Genes codificantes para proteínas chaperonas de macromoléculas (Boston et al., 1996).
- Genes que codifican para proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA – Late Embryogenesis Abundant) (Battaglia et al., 2008, Hinch and Thalhammer, 2012).
- Proteínas que participan en el metabolismo de fosfolípidos como la Fosfolipasa C y las proteínas 4:3:3 (Hong et al., 2016).
- Proteasas que median la degradación de proteínas para su reciclaje (Doroodian and Hua, 2021).



- Factores transcripcionales de respuesta a estrés (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).
- Elementos transponibles. Estos elementos fueron descritos como deletéreos para el genoma vegetal por su naturaleza de generar copias de si mismos con capacidad de integrarse al genoma (Joly-Lopez and Bureau, 2014, Oliver et al., 2013, Le et al., 2000a).
- Entre otros, ver (Ingram and Bartels, 1996, Bray, 1993, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Cada tipo de estrés es percibido de diferentes maneras por una planta (Buchanan et al., 2015), y muchos de los mecanismos de percepción no están descritos aún; sin embargo una respuesta común a condiciones estresantes como sequía, salinidad, alta osmolaridad en el suelo, hipoxia, temperaturas extremas y la infección por patógenos es la producción de la fitohormona ABA (Leung and Giraudat, 1998, Finkelstein et al., 2002). Esta hormona funciona como señalizador del estrés tanto para la generación de la respuesta a nivel celular, como para la señalización a larga distancia. Sin embargo, también existen respuestas celulares independientes de ABA que involucran cambios en la regulación genética (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006, Cutler et al., 2010).

El ABA está involucrado principalmente en respuestas al estrés a corto plazo, dichas respuestas pueden participar en estrategias de escape y resistencia, principalmente (Yamaguchi-Shinozaki, 2007); sin embargo, las plantas tienen también la capacidad de generar una respuesta a tiempos más largos, e incluso algunas de ellas pueden ser heredadas a la siguiente generación, principalmente a través de cambios a nivel epigenético, denominados como memoria epigenética, que posiblemente contribuye a una respuesta adaptativa mediante un fenómeno evolutivo (Kinoshita and Seki, 2014, Molinier et al., 2006). Dicha respuesta ha permitido a las plantas diversificarse y colonizar ambientes con condiciones extremas o altamente cambiantes.

## **Estrés por deficiencia de agua**

El estrés por deficiencia de agua, como su nombre lo indica, es consecuencia de la baja disponibilidad de agua para el óptimo desarrollo de la planta. Este estímulo provoca el fenómeno conocido como déficit hídrico. El déficit hídrico es producto de una mayor tasa de transpiración de la parte aérea vegetal con respecto a la capacidad de absorción de agua por las raíces (Ingram and Bartels, 1996). El déficit hídrico es una consecuencia directa de ambientes con sequía, altos niveles de salinidad, altas temperaturas o congelamiento, mismas que generan una baja considerable del agua disponible en el suelo y evita su absorción por las plantas (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Ingram and Bartels, 1996, Zhu, 2002).

El déficit hídrico puede considerarse como moderado cuando la falta de agua no altera sustancialmente los procesos celulares y del desarrollo de la planta, o severo, cuando agua en estado libre está ausente y solamente se conserva el agua asociada a macromoléculas, en este último caso, los procesos celulares, fisiológicos y del desarrollo se ven afectados negativamente (Mouillon et al., 2008); además la presencia crónica de esta condición puede provocar la muerte de la planta.

Algunas de las estrategias fisiológicas y celulares que las plantas utilizan como defensa al déficit hídrico son [Tomado de (Buchanan et al., 2015, Ingram and Bartels, 1996)]:

- La modulación de la apertura y cerrado de estomas.
- La disminución en la capacidad fotosintética y en la tasa de crecimiento.
- La síntesis de osmolitos compatibles para el ajuste osmótico.
- Activación de canales de transporte de agua.
- La síntesis de proteínas chaperonas y proteínas LEA.
- La activación de sistemas de desintoxicación de iones.
- La activación de sistemas de desintoxicación de especies reactivas de oxígeno

Similar a lo que ocurre con otro tipo de estímulos y, como se mencionó anteriormente, el ABA participa en la señalización durante el déficit hídrico. Esta hormona se incrementa en respuesta a la falta de agua en tejidos vegetativos, pero también en aquellos órganos que sufren naturalmente desecación, como las semillas (Cutler et al., 2010, Zhu, 2002).

La deficiencia de agua es una de las principales causas de disminución en el rendimiento agronómico de los cultivos. La mayoría de las especies vegetales domesticadas para la producción alimentaria consumen grandes cantidades de agua. Aunado a lo anterior, a pesar de que existen tecnologías de riego aplicadas a cultivos en países desarrollados, en países en vías de desarrollo no se aplican extensivamente, por lo que los cultivos dependen del riego de temporal – lluvia – limitando tanto en la eficiencia en la producción como el número de cultivos anuales (Boyer, 1982).

En México y en otros países de América Latina gran parte de los cultivos para la producción de granos básicos como maíz y frijol se realizan en zonas áridas y semiáridas y con sistemas de riego de temporal; como consecuencia, la selección activa de variedades resistentes a la deficiencia de agua a través de híbridos es una de las actividades más relevantes dentro del campo agronómico (Hernández Cerda et al., 2007).

### **El ajuste osmótico**

Una de las estrategias que las plantas utilizan en respuesta a la deficiencia de agua es el ajuste osmótico que consiste en la disminución del potencial hídrico de los tejidos vegetales mediante la acumulación controlada de osmolitos hidrofílicos en el citoplasma y la vacuola celular, los cuales también tienen actividad osmoprotectora de moléculas y estructuras celulares (Cress et al., 1998, Ingram and Bartels, 1996). De esta manera se revierte el gradiente del potencial hídrico, haciéndolo más negativo en el interior que en el exterior, promoviendo así la entrada de agua hacia la célula, lo que mantiene su hidratación, turgencia e integridad, además de que se previene una mayor

pérdida de agua (Sinclair and Serraj, 2002, Szegletes et al., 2000, Blum, 2005). Sin embargo, un aumento en la concentración de moléculas en una célula podría ser también consecuencia directa y pasiva de la disminución de agua. La diferencia entre lo anterior y el aumento de osmolitos dado por el ajuste osmótico es que el segundo puede darse sin que exista una disminución en cantidad de agua presente en un órgano con respecto al potencial de absorción, ya que los mecanismos que desencadenan el ajuste osmótico pueden ser activados por una condición moderada de sequía (Sinclair and Serraj, 2002, Szegletes et al., 2000, Blum, 2005). Uno de los parámetros más simples mediante los cuales se puede detectar y medir el ajuste osmótico es el contenido relativo de agua [RWC – Relative Water Content (Smart, 1974)].

En el ajuste osmótico participan una gran variedad de sustancias que actúan como osmolitos compatibles, entre los que destacan carbohidratos y aminoácidos y, en menor medida, ácidos orgánicos e iones (Cress et al., 1998). La acumulación de varios de estos compuestos al mismo tiempo contribuye al ajuste osmótico. Existen solutos cuya acumulación es un indicio claro del ajuste osmótico entre los que destacan la prolina, la glicina-betaína y algunos azúcares como la sacarosa (Saddhe et al., 2021, Handa et al., 1983). Es importante señalar que la acumulación preferencial de algún osmolito es debida a las características adaptativas propias de cada especie (Mullet and Whitsitt, 1996, Allen et al., 1998).

## **Salinidad**

La salinidad es una de las condiciones que generan déficit hídrico en las plantas y es provocada por la presencia de una alta concentración de sales en el suelo. Esta condición es común en zonas costeras y pantanos de composición salobre, pero también puede presentarse junto con la sequía en zonas de cultivo, ya que la evaporación provoca la acumulación de dichos solutos.

La salinidad no desencadena exactamente las mismas respuestas que la falta de agua; en particular, la salinidad por la alta acumulación de cloruro de sodio

(NaCl) produce una respuesta de desintoxicación de iones debido a que altas concentraciones del ion de sodio son tóxicas para muchas especies vegetales (Cachorro et al., 1995, Abogadallah, 2010, Cress et al., 1998).

Algunas plantas tienen mecanismos de defensa contra la salinidad, esto les ha permitido colonizar ambientes con gran concentración de sal. El ejemplo más claro de plantas tolerantes a la salinidad son los manglares que crecen en zonas costeras, dichas plantas poseen raíces que tienen la capacidad de crecer en contra de la gravedad para evitar tocar el agua cuando las concentraciones de sal son muy altas. Posteriormente, cuando la época de lluvias provoca inundación en los pantanos, los manglares pueden reanudar la absorción de agua (Ball and Munns, 1992, Lira-Medeiros et al., 2010). *Mesembryanthemum crystallinum* es otra especie que tiene la capacidad de crecer bien en ambientes con alto nivel de sal; esta planta transporta la sal y la almacena en un tipo de células especiales llamadas células epidérmicas de vejiga (EBC – Epidermal Bladder Cells) para que no afecte las funciones celulares en otros tejidos, y además cambia su metabolismo de C3 al metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) para tener una ventaja adicional ante esta condición. Los ejemplos anteriores son de plantas consideradas halófitas, es decir que tienen la capacidad de vivir en ambientes con alto nivel de sal (Barkla et al., 2002, Shabala and Mackay, 2011).

Por el contrario, las plantas mesófitas – que no toleran altas concentraciones de sal – tienen sistemas de defensa para contender con altas concentraciones de salinidad en el suelo a nivel celular mediante sistemas de almacenamiento y desintoxicación donde las especies reactivas de oxígeno (ROS – Reactive Oxygen Species) juegan un papel relevante en la señalización del estrés y en la activación de los mecanismos de defensa (Farooq et al., 2009, Abogadallah, 2010).

Las ROS, como su nombre lo indica, son moléculas derivadas del oxígeno. En el caso de las plantas, la mayoría de las ROS provienen del metabolismo fotosintético en el cloroplasto, es así que, la falta de agua y la consecuente disminución en la tasa fotosintética, pueden generar la acumulación de ROS (Pitzschke et al., 2006, Farooq et al., 2019, Kuzniak and Kopczewski, 2020,

Czarnocka and Karpinski, 2018). Sin embargo, la mitocondria, peroxisomas y otros compartimentos celulares también participan en la generación de ROS mediante distintos mecanismos (Rosenwasser et al., 2011, Mignolet-Spruyt et al., 2016, Koffler et al., 2014). Debido a que la acumulación de ROS tiene efectos negativos sobre las moléculas y estructuras celulares, las plantas poseen enzimas especializadas encargadas de transformar las ROS en componentes con poca reactividad (Caverzan et al., 2012, Anjum et al., 2016). En ocasiones, un estímulo estresante con alta intensidad provoca una acumulación tan alta de ROS que la actividad de las enzimas que las transforman se ve superada, causando defectos en el desarrollo normal de la planta (Abogadallah, 2010).

### **Participación del ABA y otras hormonas vegetales en la respuesta a estrés**

La señalización en respuesta al estrés originado por sequía, temperaturas extremas, alta concentración de osmolitos e iones en el suelo, hipoxia y depredación es orquestada principalmente por el ABA (Finkelstein et al., 2002). Su nombre proviene de su asociación con el fenómeno de abscisión y caída de las hojas (Addicott et al., 1968); sin embargo, después se encontró que modulaba los niveles de etileno que es la hormona directamente responsable de este proceso (Suttle and Hultstrand, 1993). Posteriormente, se estableció que el ABA - un isoprenoide de 15 carbonos producto del ácido mevalónico a través de la vía de síntesis de terpenos - está involucrado en el proceso de dormancia de las yemas por lo que se le denominó como “Dormina”, nombre que de hecho está más directamente relacionado a sus funciones (Cutler et al., 2010, Bewley et al., 2013, Corbineau et al., 2014).

El ABA tiene la capacidad de modular los niveles de acumulación de otras hormonas vegetales como las giberelinas, el etileno y otras hormonas mencionadas anteriormente. (Bewley et al., 2013). La aplicación de ABA durante el proceso de germinación tiene como consecuencia un retraso de éste en semillas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* y otras especies, lo que comprueba su participación en la regulación del proceso de germinación (Nishimura et al., 2007).

En respuesta al estrés también aumentan los niveles del ABA en tejidos vegetativos. Uno de los casos más estudiados es la participación del ABA en el proceso de la apertura y el cerrado de los estomas en respuesta a la falta de agua. En este caso, el ABA induce el cerrado de los estomas a través de la modulación de transporte iónico en las células guarda (las células encargadas de formar el estoma) (Cai et al., 2017, Buckley, 2019). El turgor de las células guarda es lo que determina el índice de apertura estomática a través de la activación de canales de calcio y potasio, y la inhibición de H<sup>+</sup> ATPasas. Este flujo de iones despolariza el potencial de membrana de las células causando el cerrado del estoma (Stange et al., 2010, Saito and Uozumi, 2019, Eisenach et al., 2012). Un eficiente cerrado de los estomas tiene como consecuencia una menor pérdida de agua por evapotranspiración en plantas sometidas a restricción de agua (Bray, 2002, Blatt et al., 2007, Cutler et al., 2010, Bauer et al., 2013).

Recientemente se ha descrito que la familia de proteínas PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance/Pyr-like/Regulatory Components of ABA Receptors) actúan como receptores del ABA. La unión del ABA a los receptores PYR permiten la unión e inactivación de las fosfatasa tipo PP2C que a su vez inhiben a las proteínas cinasa SnRK (Sucrose nonfermenting 1-Related Kinase); la activación de esta cinasa permite la fosforilación de proteínas que actúan como factores transcripcionales, los cuales, a su vez, son los encargados de la activación de genes ABA-dependientes (Cutler et al., 2010, Lee et al., 2015, Hao et al., 2010, Puli and Raghavendra, 2012).

### **Respuesta ABA- dependiente**

Los factores de transcripción (FT) que participan en la respuesta dependiente de ABA tienen la capacidad de unirse a la región promotora de genes para, en combinación con otros factores proteicos, promover su transcripción; estos genes reciben el nombre de genes de respuesta al ABA (Jin et al., 2010).

Las regiones promotoras de los genes de respuesta al ABA poseen secuencias específicas que pueden ser reconocidas por los FT activados por la vía de

señalización de ABA. Dentro de estas secuencias, las más conocidas son aquellas de tipo ABRE (ABA Responsive Element) (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013, Fujita et al., 2013). El ABRE consiste en una secuencia de 6 a 10 pares de bases que contiene la secuencia central conservada ACGT (Fujita et al., 2013). Sin embargo, no todos los genes cuyos promotores contienen un sitio ACGT pueden activarse por los FT en respuesta al ABA; se requiere más de un sitio y a una distancia determinada para que la transcripción sea modulada por esta fitohormona (Fujita et al., 2013). Aunado a esto, no todos los genes que responden a ABA lo hacen en el mismo tejido y al mismo tiempo, esto está orquestado en conjunto con otros FT que no necesariamente son activados por ABA y que modulan la expresión sitio-específica de los genes blanco (Nishimura et al., 2007, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Yamamoto et al., 2007).

Los FT que se unen a los sitios ABRE poseen un motivo proteico conocido como de cierre de leucinas (bZip) en su extremo amino-terminal (N-terminal); y dada la presencia de este motivo se denominan como FTs de tipo bZIP (Golldack et al., 2009, Sun et al., 2019). Entre las principales familias de proteínas bZIP se encuentran aquellas llamadas AREB (ABA – Responsive Element Binding Factor) y ABF (ABRE Binding Factor) (Golldack et al., 2009). Estos factores se modulan por procesos de fosforilación y des-fosforilación dependiente de las proteínas PP2C y SnRK, implicadas en la vía de señalización por ABA. Entre los miembros de FT más conocidos están AREB, AREB2, AREB3, ABF1 y ABF3. Los genes *RD29A* (Response to Deseccation 29 A) y *RD29B* se regulan por estos FT; sin embargo, cabe señalar que *RD29A* también contiene elementos de respuesta tipo DREB (Dehydration-Responsive Element-Binding protein), indicando que también pueden activarse por una vía independiente de ABA (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2006, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993a, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993b).

Otra gran familia de FTs cuya respuesta depende del ABA son aquellos conocidos como los factores tipo MYC (Myelocytomatosis). Estos se caracterizan por tener un motivo proteico tipo hélice-giro-hélice básico (bHLH), y su secuencia de reconocimiento en los promotores de los blancos transcripcionales es CANNTG



(donde N puede ser intercambiado por cualquier nucleótido). Una familia con características similares a los MYC es la familia MYB (MYC-Binding factor), cuya secuencia de reconocimiento en promotores es TAACNA/G. El gen *RD22* es un blanco muy conocido de respuesta al ABA regulado por los FT tipo MYC / MYB; sin embargo, similar al caso de los factores AREB/ABF, los FT tipo MYC también participan en la regulación de otros genes, no necesariamente implicados en la respuesta a ABA (Urao et al., 1996, Ohta et al., 2018, de Pater et al., 1997).

Los FT de tipo NAC [no apical meristem (NAM), *A. thaliana* transcription activation factor (ATAF1/2) and cup-shaped cotyledon (CUC2)] es otra familia de FT que responden a ABA. Se caracterizan por tener un dominio proteico tipo NAC de cerca de 150 residuos. En esta familia se encuentran los FT ATAF1/2, CUC2, NTS2 y ANAC021 involucrados en división celular y crecimiento secundario, y en la respuesta a estrés, señalizada por ABA y por ácido jasmónico (Sun et al., 2019). Los factores tipo NAC reconocen la secuencia núcleo CGT[A/G] en los promotores de genes blanco, al menos por datos obtenidos en *A. thaliana* (Lee et al., 2017, Mao et al., 2015).

### **Respuesta ABA- independiente**

Como se mencionó anteriormente, existen genes que se activan ante la falta de agua, sin que la vía de señalización por ABA y/o los FT regulados por esta hormona estén involucrados. A este mecanismo se le denomina respuesta ABA-independiente.

Los FT más conocidos que participan en la respuesta ABA-independiente son aquellos de tipo DREB/CBF (Dehydration-Responsive Element Binding / C-repeat Binding Factor). Estos FT pertenecen a una súper-familia muy extensa denominada AP2 (Apetala 2) debido a que contienen un dominio proteico del mismo nombre (Krishnaswamy et al., 2011). Los DREB reconocen una secuencia central (CCGAC) que está contenida en los promotores de genes que se activan por la escasez de agua, a esta secuencia se le llama caja DRE (Drought Responsive Element) (Sakuma et al., 2006). Este motivo también se encuentra en los

promotores de genes que responden a frío y a deshidratación, pero con pequeños cambios en los nucleótidos aledaños al núcleo consenso, por lo que este nuevo sitio de unión se denomina CRT (C-repetidos) (Planchet et al., 2011, Schramm et al., 2008, Sakuma et al., 2006, Krishnaswamy et al., 2011, Liu et al., 2008, Rae et al., 2011).

## **Regulación epigenética**

Las plantas responden ante el estrés con la participación de procesos regulatorios a distintos niveles, entre los más relevantes están los procesos epigenéticos y transcripcionales. La regulación a nivel epigenético se define como aquella variación heredable que ocurre por encima y mas allá de los cambios en la secuencia del DNA. Una marca epigenética es heredable mitótica y meióticamente a la siguiente generación (Zhu and Reinberg, 2011), sin embargo, en algunos casos (comúnmente en plantas y algunos ejemplos aislados en otros organismos), la herencia de una marca epigenética se da a nivel transgeneracional; es decir, se hereda al organismo descendiente; a este fenómeno se le denomina Herencia Epigenética Transgeneracional (Morgan and Whitelaw, 2008, Skinner and Guerrero-Bosagna, 2009, Ho and Burggren, 2010, Cuzin and Rassoulzadegan, 2010, Hauser et al., 2011).

La colocación de algunas marcas epigenéticas está íntimamente relacionada con las condiciones ambientales, de tal manera que este mecanismo se ha asociado a un proceso de ajuste o aclimatación que le permite a la planta tomar una decisión para modular sus actividades metabólicas y su crecimiento acorde a las condiciones imperantes. Esta respuesta puede ser tanto para tolerar una condición estresante en un momento dado, como para adaptarse, por lo que resulta ser un componente esencial en el proceso evolutivo en la respuesta al estrés (Boyko and Kovalchuk, 2008, Chen et al., 2010).

Las principales marcas involucradas en la regulación epigenética son la metilación del DNA, la modificación post-traducciona l de las histonas y la participación de los RNAs no codificantes. Estos últimos, aunque no constituyen

una marca epigenética, participan en el establecimiento de las demás modificaciones tanto en plantas como en otros organismos. (Ahmad et al., 2010, Chinnusamy and Zhu, 2010, Lavrov and Kibanov, 2007, Tariq and Paszkowski, 2004). La participación orquestada de estas marcas, junto con el reclutamiento de otros complejos remodeladores, permiten el correcto ensamble de la cromatina (Budhavarapu et al., 2013).

### **Estructuración de cromatina**

Debido a la extensión del material genético su almacenamiento se controla de una forma fina y eficiente. El DNA está compactado eficazmente en el núcleo celular; esta compactación no solo tiene fines de almacenamiento, sino que también permite regular la transcripción; ya que la accesibilidad de los FT a los promotores depende de que esa región del genoma esté asequible en un determinado momento.

El ordenamiento del DNA dentro del núcleo mediante su asociación con proteínas recibe el nombre de cromatina. La cromatina puede presentarse en dos estados distintos: cuando existe accesibilidad para la entrada de los FT, y por ende, permitiendo que un gen pueda transcribirse, se denomina “Eucromatina”; mientras que, si se encuentra en un estado altamente compacto y, por tanto, inaccesible, se le llama “Heterocromatina” (Razin et al., 2007, Margueron and Reinberg, 2010).

El DNA está ordenado en complejos proteicos denominados “nucleosomas”, mismos que se consideran como la unidad fundamental de la cromatina. Los nucleosomas están compuestos por dos tetrámeros de histonas que reciben el nombre de Histona 2 A y B (H2A y H2B), Histona 3 (H3) e Histona 4 (H4) (Razin et al., 2007). El DNA se asocia alrededor del octámero de histonas, dando un doble giro sobre su superficie. En el caso de la formación de heterocromatina, la histona H1 une múltiples nucleosomas actuando como “liga”, y cada nucleosoma es capaz de asociar entre 136 y 147 pares de bases (pb) del DNA (Singh and Mueller-Planitz, 2021). Por otra parte, para el caso de la eucromatina existe un

espacio de entre 20 a 70 pb de DNA que no se asocia a nucleosomas, al que se le denomina “región espaciadora”, mismo que es accesible a otras proteínas de unión a DNA (p.e. RNA polimerasas o factores de transcripción) (Razin et al., 2007, Wierzbicki, 2002, Korber and Becker, 2010, Zhu et al., 2013, Belch et al., 2010).

La formación de heterocromatina para el silenciamiento transcripcional, se determina por varias señales, una de ellas es la modificación post-traducciona de histonas; un caso específico es la di-metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me2), misma que ocurre a través del complejo de represión Polycomb 2 (PRC2 – Polycomb Repressor Complex 2) (Turck et al., 2007). Este proceso también permite el establecimiento y mantenimiento de este estado de compactación en la cromatina (Zemach et al., 2013, Wierzbicki, 2002, Turck et al., 2007).

Otro nivel de regulación que participa en la formación de heterocromatina es el reclutamiento de variantes de histonas análogas a las histonas canónicas que forman el nucleosoma, con el subsecuente desplazamiento de la histona original. Un ejemplo es el reemplazo de la H2A por una de sus cuatro variantes (H2A.Z); esta histona se asocia directamente a regiones con marcas represivas reconocidas por las histonas y dirige el correcto posicionamiento de los nucleosomas (Shah et al., 2020, Lei and Berger, 2020, Hou et al., 2010). Otro ejemplo es el reclutamiento de H3.1, una de las dos variantes de la histona H3 en *Arabidopsis* (Jacob et al., 2014). Esta variante se encuentra en zonas compactadas, cercanas a los centrómeros, que están enriquecidas en la marca represiva H3K9me2. Interesantemente, la expresión de otra variante de la Histona 3 (H3.3) se activa transcripcionalmente por el estrés generado por altas temperaturas, lo que indica que es esencial para la respuesta de *Arabidopsis* a esta condición. Este ejemplo, contrario a los anteriores, indica que el mantenimiento de la eucromatina también ocurre a través de las variantes de histonas (Jin et al., 2009, Jacob et al., 2014).

## **Modificación post-traducciona de histonas**

La modificación post-traducciona de las histonas está íntimamente relacionada con la regulación transcripcional. Esta modificación se refiere solamente a la adición de compuestos químicos sobre los residuos encontrados generalmente en el extremo N-terminal de la histona, y no así a su variación en estructura primaria (secuencia de aminoácidos) (Tariq and Paszkowski, 2004). Por otro lado, las variantes de histonas, mencionadas anteriormente, están codificadas por genes propios con similitud en secuencia a histonas canónicas (Shahid et al., 2020).

Las histonas están compuestas por un centro proteico con estructura definida y una región N-terminal con estructura flexible, principalmente, de tipo 'random-coil', aunque en algunos casos puede ser altamente ordenada (Baneres et al., 1997). Se cree que cuando los nucleosomas están ensamblados, la estructura flexible del extremo N-terminal de las histonas queda expuesta al ambiente nuclear, por lo que la modificación puede eficientemente establecerse o eliminarse, o bien, existe una mayor accesibilidad a las proteínas "lectoras" de estas modificaciones para establecer el estado transcripcional de esa región (Shahid et al., 2020, Rusk, 2012). La presencia de determinadas marcas de histonas frecuentemente se utiliza para la identificación de sitios con activación o represión transcripcional. (Tariq and Paszkowski, 2004).

Se piensa que la adición de las marcas químicas sobre las histonas promueven o desfavorecen el contacto entre el nucleosoma y los complejos moduladores de la transcripción, provocando una activación o represión transcripcional (respectivamente), por inhibición alostérica (Perry and Chalkley, 1982, Dunn and Griffith, 1980). Un ejemplo de este fenómeno es la inhibición alostérica del complejo Polycomb por la presencia de la marca H3K36me2 en *Drosophila* (Finogenova et al., 2020).

Entre las modificaciones post-traduccionales de histonas se encuentran las siguientes (Fischle et al., 2003):

- Acetilación
- Metilación
- Fosforilación
- Desaminación
- Ubiquitinación
- Sumoilación
- Ribosilación

Siendo las dos primeras las más comúnmente encontradas en el genoma (Shahid et al., 2020).

La acetilación de histonas está íntimamente relacionada con activación transcripcional. Esta modificación está catalizada por proteínas denominadas acetil-transferasas de histonas (HAT – Histone Acetil Transferases); en cambio, la metilación de histonas (que es de las más estudiadas) puede tener un rol dual sobre la transcripción, dependiendo de la posición del residuo de aminoácido y el número de grupos metilo que se añadan al mismo. Es por eso que las marcas H3K4meN (N = 1 monometilación, N = 2 dimetilación y N= 3 trimetilación), en mamíferos, tienen un efecto positivo sobre la transcripción, mientras que la H3K9m2 y su trimetilación tienen un efecto de represión transcripcional, al igual que H3K27me2 y H3K27me3 (Graessle et al., 2001, Tariq and Paszkowski, 2004).

La eliminación de una marca de histonas está catalizada por enzimas denominadas des-acetilasas o des-metiladas, en el caso de acetilación y metilación, respectivamente. Estas enzimas actúan con distintos mecanismos químicos para la remoción de la marca, sin alterar la estructura de la histona (Park and Kim, 2020). Un ejemplo son enzimas con actividad oxidativa como JMJC (Jumonji C), la cual, mediante su función di-oxigenasa, ataca a radicales que constituyen a los grupos metilo; o LSD1 (Lysine-specific histone demethylase 1A), la primer des-metilasa de lisinas descrita que utiliza un nitrógeno protonado, mismo que le confiere la capacidad de actuar sobre grupos mono o di-metilo (Ahmad et al., 2010, Demetriou et al., 2009, Park and Kim, 2020).

Cabe destacar que la presencia de una sola marca de histona en cierta región del genoma no rige por completo su estado transcripcional; es necesaria la deposición de otras marcas epigenéticas dentro de la misma región para así encender o apagar genes, mecanismo conocido como intercomunicación de histonas (histone cross-talk) (Nightingale et al., 2006). Además, también existe una íntima asociación con la metilación del DNA para el reclutamiento de las proteínas con dominios de unión a DNA (DBP) que son las que finalmente dirigen el estado transcripcional (Fischle et al., 2003, Shukla et al., 2009).

En casos específicos, la metilación de las histonas tiene relación directa con el estado de metilación del DNA; la metilación (que en la mayoría de los casos esta relacionada con un fenómeno de represión) desencadena la asociación de proteínas modificadoras de histonas a la misma región regulada en el genoma (Zhou et al., 2016, Trejo-Arellano et al., 2017, Du et al., 2014). En plantas se conoce que la metilación semi-conservativa en contexto CHG (H siendo cualquier nucleótido excepto G) desencadena la unión de proteínas que di-metilan el residuo K9 de la histona 3 (H3K9me2) fortaleciendo el estado reprimido del blanco (Gouil and Baulcombe, 2016).

### **Metilación de DNA**

El DNA es blanco de diversas modificaciones químicas que no afectan su secuencia nucleotídica; la más estudiada es conocida como metilación de DNA. Esta se refiere a la adición de un grupo metilo al carbono-5 de las citosinas (5meC), misma que es catalizada por enzimas denominadas DNA metiltransferasas; en plantas, esta metilación se puede remover activamente mediante un proceso de eliminación y reparación de bases, o pasivamente mediante el proceso de replicación del DNA (Bender, 2004, Martienssen and Richards, 1995).

A diferencia de mamíferos, donde la citosina metilada siempre ocurre en un contexto CG, en plantas cualquier citosina en el DNA puede ser blanco de

metilación; de tal forma que se pueden encontrar en los siguientes contextos CG, CHG y CHH, donde H es A, T o C. Esta metilación se adquiere mediante diferentes mecanismos moleculares dependiendo del contexto de secuencia (Law and Jacobsen, 2010a).

La metilación simétrica semi-conservativa CG está catalizada por la proteína MET1 (Methyltransferase 1), homólogo de la proteína DNMT1 (DNA Methyltransferase 1) de mamíferos. Este tipo de metilación es la más abundante en las plantas y su carácter semi-conservativo proviene de que la metilación se encuentra en ambas cadenas del DNA (Richards et al., 2003). MET1 es específicamente reclutada para re-establecer la metilación en citosinas hemimetiladas presentes en la nueva cadena de DNA producto del proceso de replicación (Wendte and Schmitz, 2018, Law and Jacobsen, 2010b).

El otro tipo de metilación semi-conservativa en plantas es la que se encuentra en el contexto CHG. Esta marca la cataliza la proteína cromo-metilasa CMT3, la cual no tiene homólogos conocidos fuera del reino vegetal. Esta marca, como se mencionó anteriormente, está íntimamente relacionada con la di-metilación de histonas H3K9me2, mediada por la enzima SUVH9/KYP (Suppressor of Variegation Homolog 9 / Kryptonite) para mantener un estado transcripcionalmente reprimido (Jackson et al., 2002, Lindroth et al., 2004, Du et al., 2014).

La última marca de 5meC conocida en plantas se encuentra en el contexto CHH, misma que tiene una baja abundancia en el genoma de *Arabidopsis* (cerca del 4%). Esta marca no es semi-conservativa, ya que ocurre en una sola de las cadenas del DNA y, por tanto, se elimina pasivamente durante la replicación; sin embargo, existe un mecanismo que re-establece esta metilación, mediada por las proteínas DRM (Domains Rearranged Methyltransferase). Las proteínas DRM, con similitud con la enzima DNMT3 de mamíferos, se encargan de establecer la metilación *de novo*, a través de un proceso activo; ya que, de no ser así, esta modificación se perdería durante el proceso de replicación (Yaari et al., 2019, Law and Jacobsen, 2010b). La forma por la que esta marca se establece y se



mantiene en el genoma es a través de RNAs pequeños, mediante la vía de metilación de DNA dirigida por RNA, (RdDM, RNA-directed DNA Methylation) (Dunoyer et al., 2010, Zhang and Zhu, 2011, Mahfouz, 2010, Matzke et al., 2015).

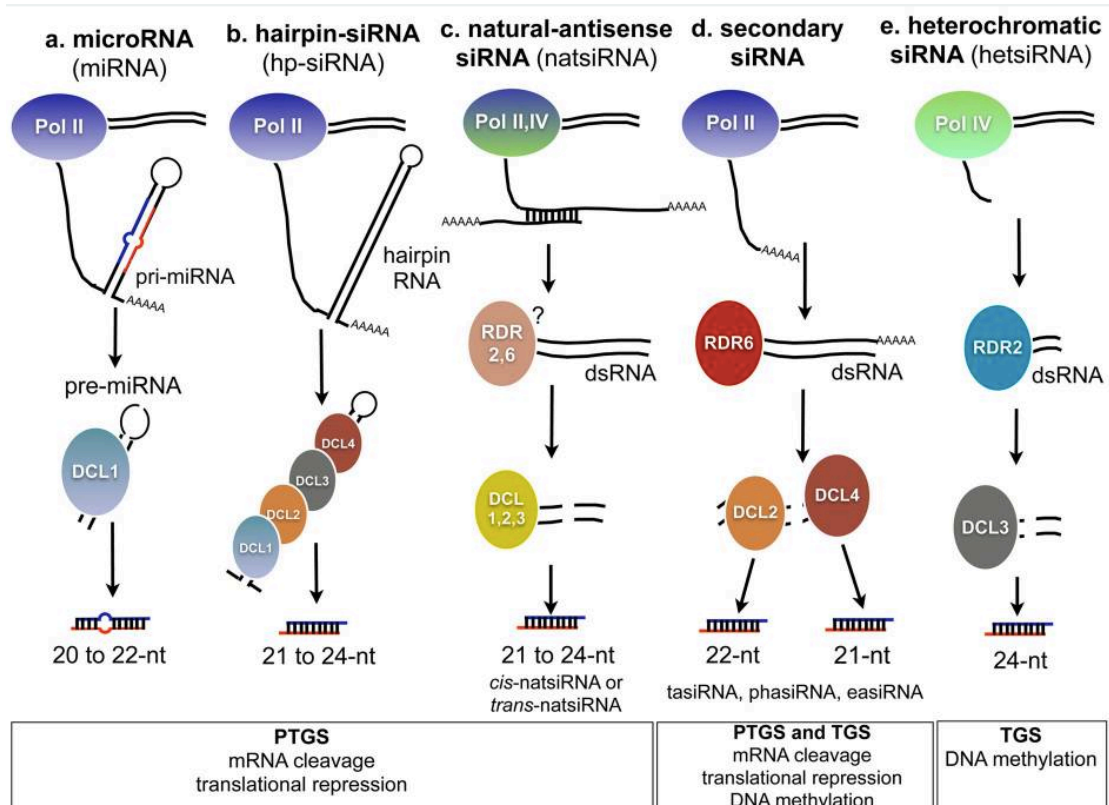
## **RNAs pequeños**

En eucariontes, los RNAs pequeños se definen como moléculas de RNA de cadena sencilla con una longitud corta (generalmente entre 18 a 25 nucleótidos). Estos tienen un papel relevante en la represión de la expresión genética mediante mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (Axtell et al., 2007, Fang and Qi, 2016, Bonnet et al., 2006).

Existe una gran variedad de RNAs pequeños en plantas y cada tipo suele regular negativamente blancos específicos. Entre las principales clases de RNAs pequeños en plantas existen:

- microRNAs
- id-miRNAs (intron-derived microRNAs)
- ta-siRNAs (trans-acting small interfering RNAs)
- phasiRNAs (phased small interfering RNAs)
- nat-siRNAs (natural antisense derived siRNAs)
- siRNAs anti-virales
- hc-siRNAs – RdDM (heterochromatic siRNAs)
- hc-siRNAs no canónicos, entre otros.

La biogénesis de todos los RNAs pequeños en plantas comparte ciertas características, tanto en el proceso de maduración como en la asociación a proteínas efectoras, entre las que se encuentran enzimas tipo Dicer-like [DCL, excepto en el caso específico de los sidRNAs (siRNA independent of DCLs), cuya biogénesis es independiente de DCL3 (Ye et al., 2016)] y Argonauta (AGO), respectivamente (Figura 1) (Axtell et al., 2007, Meyers et al., 2008, Borges and Martienssen, 2015).



**Figura 1. Diversidad en la biogénesis de los RNAs pequeños en plantas.** Se puede observar que tanto los siRNAs que actúan a través de silenciamiento post-transcripcional (PTGS) y transcripcional (TGS) comparten elementos en común durante su biogénesis, como la transcripción por RNA polimerasas (Pol), el procesamiento mediante proteínas DCL y en algunos casos, proteínas RDR (RNA-dependent RNA polymerase). Se pueden observar diferencias claras durante el procesamiento, como la formación de precursores (pre miRNA) y de estructuras tallo-asa (hairpin) o de RNA de cadena doble (dsRNA) (Axtell et al., 2007, Meyers et al., 2008, Borges and Martienssen, 2015).

## microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) canónicos son la especie de RNAs pequeños más estudiada en plantas. Su biogénesis comienza con la transcripción de un gen miR (gen que es transcrito con el propósito de generar miRNAs maduros y que no codifica para una proteína funcional, con ciertas excepciones (Jones-Rhoades et al., 2006, Laressergues et al., 2015)). El RNA que se genera tiene la capacidad de adoptar una estructura de tallo-asa, que es reconocida por Dicer-like 1 (DCL1, Figura 1). El procesamiento por DCL1 produce una doble cadena de RNA de 21 a 22 nucleótidos de longitud, la cual contiene 2 nucleótidos no apareados (colgantes) en el extremo 3' de cada cadena. En este mismo extremo la enzima

HEN1 (Hua Enhancer 1) adiciona un grupo metilo, que le confiere protección a la degradación cuando se exportan al citoplasma celular mediante la asociación con proteínas tipo Hasty / Exportina 5, utilizando como cofactor Ran/GTP (Ras-related Nuclear protein), sin embargo al parecer no todos los miRNAs utilizan este mecanismo para la traslocación (Cambiagno et al., 2021). Una vez en el citoplasma, la proteína Argonauta 1 (AGO1) reconoce y carga la doble cadena de los miRNAs, selecciona y retiene la cadena líder, la cual tiene el extremo 5' menos estable termodinámicamente, mientras que la cadena pasajera - miRNA\* - se degrada mediante las enzimas exo-nucleasas de la familia SDN (Small RNA Degrading Nucleases). Las enzimas SDN también participan en la degradación del miRNA maduro cuando ya no es funcional. La cadena líder del miRNA que queda anclada en AGO1 reconoce a su transcrito blanco a través de complementariedad de bases, evitando su traducción o induciendo su degradación como parte del complejo de silenciamiento mediado por RNA, RISC (RNA-Interference Silencing Complex) (Mallory and Bouche, 2008, Zhang et al., 2006a, Axtell et al., 2011).

Contrario a lo que ocurre en animales, en plantas la complementariedad de bases entre el miRNA y su transcrito blanco es extensa lo que permite una regulación tipo corte a través de la actividad catalítica de AGO1 para la posterior degradación de los fragmentos restantes del RNA mensajero (mRNA). La actividad 'slicer' de AGO1 es más eficiente cuando existe una complementariedad perfecta en los primeros ocho nucleótidos desde el extremo 5' del miRNA con su mRNA blanco (Ding et al., 2012). El corte se realiza cerca del nucleótido 10 u 11 con respecto al mensajero, por lo que esta región también debe ser complementaria a su blanco (Axtell et al., 2011). El extremo 3' del miRNA puede tener algunos des-apareamientos con el mRNA blanco y aún así se ha podido detectar el corte del ultimo. Estas imperfecciones en la complementariedad permiten que, en algunos casos, un mismo miRNA tenga más de un mRNA blanco (Parker et al., 2004, Ronemus et al., 2006, Gu et al., 2012, Kidner and Martienssen, 2005, Mi et al., 2008). Sin embargo, existen casos donde la complementariedad de bases en las regiones necesarias para la de corte es

menor y esto conlleva a una represión de tipo inhibición traduccional. (Peters and Meister, 2007, Mallory and Bouche, 2008).

Los miRNAs están involucrados en la modulación de varios procesos celulares. Debido a la identidad de sus blancos, un miRNA puede estar involucrado en procesos de desarrollo que involucran a factores transcripcionales e incluso a aquellos involucrados en procesos metabólicos y de respuesta a estrés (Jeong et al., 2010, Xie, 2009, Contreras-Cubas et al., 2012).

### **id-miRNAs, tasiRNAs, phasiRNAs y nat-siRNAs**

Los id-miRNAs (intron-derived microRNAs o “miRtron”) tienen un origen y mecanismo de acción similares a los microRNAs canónicos, la diferencia recae en que estos no se producen en una unidad transcripcional independiente, sino que se originan a partir de un intrón localizado dentro de un gen codificante; por esta característica reciben su nombre. Dado lo anterior, su transcripción depende en gran medida de la maquinaria de procesamiento de intrones y maduración del RNA mensajero (“splicing”) (Hube et al., 2017, Shapulatov et al., 2018, Sibley et al., 2012).

Por otro lado, los ta-siRNAs (trans-acting small interfering RNAs, Figura 1) o RNAs pequeños interferentes que actúan en *trans* se generan a partir de un gen específico (*TAS*) producto de la actividad de la RNA polimerasa II. Un miRNA previamente cargado en AGO1 (o AGO7 para miR390) reconoce el RNA mensajero y este se procesa por la actividad catalítica de AGO1, con la ayuda de la proteína accesoria SGS3 (Suppressor of Gene Silencing 3). Después del corte se recluta la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6), que genera un RNA de doble cadena, sustrato de la ribonucleasa DCL4 (Dicer-like 4), que produce los RNAs interferentes de 21 nucleótidos (ta-siRNAs) (Vazquez et al., 2004). Estos RNAs pequeños secundarios pueden, a su vez, tener complementariedad con otros transcritos y silenciarlos a través de AGO1. La capacidad de los ta-siRNAs de regular transcritos que no son blancos primarios de miRNAs es lo que les da su nombre *trans-acting* y, en pocas ocasiones, los transcritos blanco de estos ta-

siRNAs tienen similitud en secuencia al mRNA del cual provienen (Schwab et al., 2009, Vazquez et al., 2004, Vaucheret, 2005, Yoshikawa et al., 2005, Fahlgren et al., 2006, Wu et al., 2012, Garcia et al., 2006).

Los phased siRNAs (phasiRNAs, Figura 1) son un grupo más general de RNAs pequeños que utilizan la maquinaria de biogénesis previamente descrita para los ta-siRNAs, pero que no son generados a partir de un gen *TAS*. A diferencia de los ta-siRNAs, para esta clase de RNAs pequeños se han reportado muy pocos blancos en el genoma de plantas; sin embargo, su abundancia y diversidad es mucho mayor y se predice que un gran número de transcritos blanco de miRNAs de 22 nucleótidos son capaces de generar RNAs pequeños en fase (Axtell, 2010, Allen et al., 2005, Axtell et al., 2006).

Por último, los RNAs pequeños generados mediante RNAs anti-sentido (*natural antisense small interfering RNAs*, nat-siRNAs, Figura 1) son moléculas pequeñas de RNA formadas a partir de un RNA mensajero anti-sentido (NAT) el cual tiene una complementariedad de bases natural con otro transcrito, formando así un dúplex de RNA que puede ser procesado mediante la maquinaria de RNA interferente, descrita anteriormente. La generación de los nat-siRNAs de 24 nucleótidos requiere del procesamiento por DCL2 y de que se carguen en AGO7, aunque también se ha reportado la participación de la RNA polimerasa IV (Pol IV), sustituyendo a la RNA polimerasa II para la generación del transcrito NAT. El RNA producto del corte por AGO7 puede ser reconocido por RDR6 y SGS3 para generar nat-siRNAs adicionales de 21 nucleótidos procesados por DCL1, los cuales pueden silenciar transcritos dado su anclaje en AGO1. Se predice que existen entre 2000 y 8000 genes en *Arabidopsis* capaces de formar transcritos tipo NAT (Ron et al., 2010, Jin et al., 2008, Jen et al., 2005).

### **siRNAs antivirales**

Los RNAs pequeños que actúan contra infecciones virales (vsiRNAs) son moléculas de defensa que utilizan la maquinaria de silenciamiento celular para la inhibición de la integración del genoma viral (Garcia-Ruiz et al., 2010). La

introducción de una doble cadena de RNA en la célula activa esta vía de silenciamiento celular. Este es el caso de los virus que poseen genoma estructurado por dsRNA, o dada la transcripción de genoma viral de DNA que utiliza como intermediario la generación de un dúplex de RNA. Este mecanismo opera mediante tres pasos principales: iniciación, amplificación de la señal y propagación. La iniciación ocurre mediante el reconocimiento del genoma de doble cadena por una proteína con actividad ribonucleasa – generalmente DCL2 o DCL3 – generando pequeños RNAs interferentes que, con la ayuda de proteínas Argonauta, reprimen la expresión del genoma viral a nivel transcripcional o post-transcripcional (Agius et al., 2012). Por otra parte, en el proceso de amplificación de la señal participan las RDR involucradas en la biogénesis de los distintos tipos de RNAs pequeños (ver párrafos anteriores y Figura 1), generando dúplex de RNA que pueden ser reconocidos nuevamente por las proteínas DCL para ser cortados. De esta manera se promueve un círculo de retroalimentación positiva para la amplificación de la señal de silenciamiento. Los vsiRNAs secundarios, provenientes de la amplificación, pueden participar en la última etapa de la respuesta (propagación), causando así una respuesta inmune sistémica en la planta (Yu et al., 2003, Agius et al., 2012, Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009, Xie and Guo, 2006).

Dado que los RNAs pequeños que participan en la respuesta antiviral pueden actuar transcripcional o post-transcripcionalmente, estos tienen identidad de miRNAs y siRNAs (respectivamente), por lo que estas dos vías utilizan sus propias maquinarias en la respuesta antiviral. Sin embargo, se ha descrito que algunos elementos centrales de esta respuesta tienen una actividad redundante debido a la sofisticación de los mecanismos que los virus han utilizado para contender con esta respuesta; este fenómeno podría describirse como una carrera armamentista entre ambos organismos (Brosseau et al., 2016, Vaucheret, 2008, Hamera et al., 2012). Los virus han adquirido y evolucionado proteínas que suprimen la maquinaria de silenciamiento celular, mismas que son denominadas como supresores virales. La eficacia de la infección, así como la severidad de los fenotipos causados, está directamente correlacionada con la

efectividad de estos supresores (Qu et al., 2008, Jaubert et al., 2011, Fang et al., 2016, Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2006b, Fusaro et al., 2012).

Los supresores virales pueden clasificarse en tres grupos principales de acuerdo al momento en que actúan sus blancos de regulación: aquellos que inhiben la biosíntesis de siRNAs, inhibidores de proteínas Argonauta, e inhibidores de la respuesta sistémica (Xie and Guo, 2006). Entre aquellos supresores virales que actúan inhibiendo la síntesis de RNAs pequeños se encuentra la proteína P6 del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), la cual se une a la proteína vegetal DRB4 (Double-stranded RNA Binding protein 4) - necesaria para la actividad de DCL4 - e impide su translocación al citoplasma, reduciendo así los niveles de vsiRNAs dependientes de DCL4 (Love et al., 2007). Otros ejemplos de este mecanismo incluyen a las proteínas del virus SPCSV (Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus) (Weinheimer et al., 2016) y la proteína P19 del virus TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus) (Canto et al., 2006). Por otro lado, entre aquellos supresores virales que actúan sobre proteínas Argonauta, se encuentran las proteínas P25 de Potexvirus (PXV) y P0 de Poleovirus, los cuales promueven la degradación de AGO1; y de 2b de citomegalovirus (CMV) o P38 de TCV (Turnip Crinkle Virus), inhibiendo la asociación de RNAs pequeños con Argonauta (Chiu et al., 2010). Por último, se han identificado las proteínas P6 de RSYV (Rice Stripe Yellowing Virus) y AC2 de MYMIV (Mungbean Yellow Mosaic Virus) que inhiben la actividad de RDR6, por lo cual se impide el proceso de amplificación de la señal de silenciamiento (Vaistij and Jones, 2009, Guo et al., 2013).

### **RdDM (RNA-directed DNA Methylation)**

Los mecanismos de defensa contra la integración de DNA extraño en el genoma vegetal también se utilizan para mantener un control sobre elementos cuya activación puede provocar inestabilidad genómica. Este es el caso de los Elementos Transponibles (ET). Dichos elementos tienen la capacidad de formar copias de sí mismos e insertarse en diversas regiones del genoma de manera cuasi-aleatoria. Las nuevas inserciones, o la eliminación del ET de cierta región provocan roturas de doble cadena de DNA (double-strand breaks), las cuales tienen que repararse mediante otros mecanismos celulares. En el peor de los



casos, la acumulación de roturas de doble cadena puede conllevar a la inestabilidad genómica. Sin embargo, el movimiento de los ET *per se* tiene consecuencias sobre la regulación de otros genes, por esta razón es de suma importancia el control de su actividad, especialmente en momentos clave del desarrollo (Ito, 2011, Choi et al., 2018).

Uno de los mecanismos que participa en el silenciamiento de ET en el genoma vegetal es la vía de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM, RNA-directed DNA Methylation). Esta vía utiliza moléculas pequeñas de RNA cuya identidad es necesaria para dirigir el silenciamiento en compartimentos discretos del genoma mediante complementariedad de bases. Se piensa que esta vía se perfeccionó mediante el silenciamiento de secuencias provenientes de virus, debido a que actúa principalmente en el silenciamiento de ETs nuevos (nuevas inserciones) o de aquellos que han sido reactivados (Zhang and Zhu, 2011, Mahfouz, 2010).

La vía RdDM, como su nombre lo indica, silencia elementos en el genoma estableciendo la metilación sobre el DNA. A diferencia de otros mecanismos celulares que también modulan esta marca, RdDM tiene como blanco directo el contexto CHH. Por ende, la actividad directa de RdDM sobre contextos CHH no se hereda a la siguiente generación, por lo que no se considera *per se* un mecanismo epigenético; sin embargo, su actividad puede promover la asociación de otras marcas (como CHG) que se mantienen y heredan a través de un proceso epigenético transgeneracional (Matzke and Mosher, 2014, Matzke et al., 2015). Esta vía se caracteriza por la participación de dos RNAs polimerasas específicas del reino vegetal: RNA Polimerasa IV (Pol IV) y RNA Polimerasa V (Pol V) (Eamens et al., 2008). El hecho de que la actividad transcripcional sea necesaria para silenciar la misma transcripción (“Transcribir para silenciar”) lleva a una paradoja que hace que RdDM sea uno de los mecanismos más interesantes en el campo de la epigenética y de la regulación de la transcripción en plantas.

Una región repetida y relacionada con ET, o las zonas invertidas repetidas de los mismos (LTR, Long Terminal Repeats) pueden estar sujetas a RdDM al reclutar a Pol IV a esta región mediante el reconocimiento de la marca H3K9me2, que se



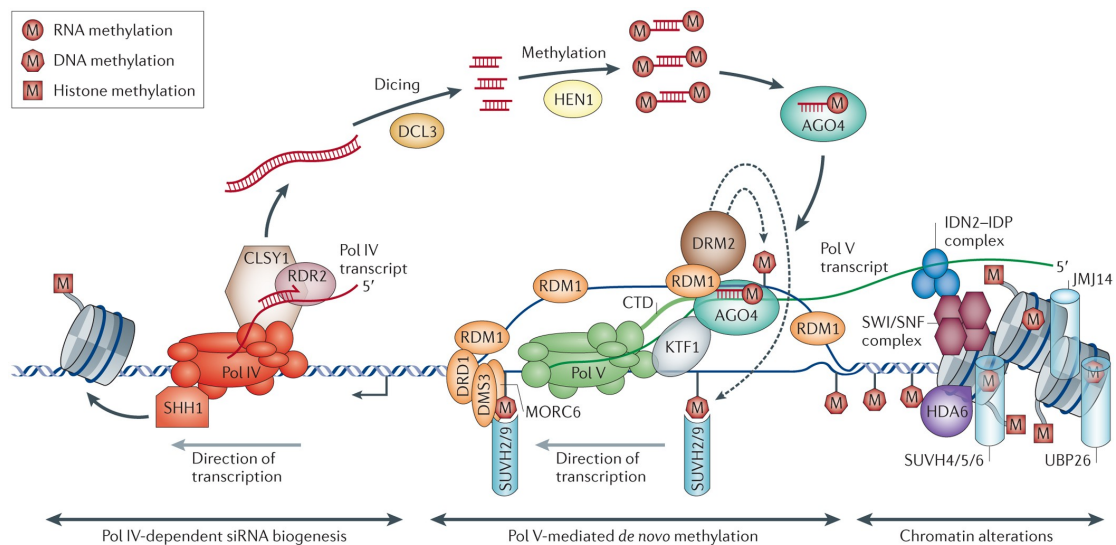
depositó previamente por enzimas tipo SUVH4/5/6 con la ayuda de SHH1 (Sawadee Homeodomain Homolog 1), proteína que tiene un motivo de reconocimiento a histonas metiladas e interacciona físicamente con Pol IV. Pol IV transcribe RNAs de cadena sencilla de aproximadamente 50 nt (Figura 2, región izquierda). RDR2 inmediatamente reconoce los transcritos de Pol IV y genera RNAs de cadena doble (dsRNA) mediante la ayuda de CLSY1. Los dsRNA son procesados por DCL3 en RNAs pequeños de doble cadena de 24 nt de longitud conocidos como hc-siRNAs (*heterochromatic* siRNAs) o simplemente siRNAs. De la misma manera como ocurre con los miRNAs, los siRNAs generados por la actividad de DCL3 se metilan en su extremo 3' por la enzima HEN1, confiriéndoles protección para ser exportados al citoplasma mediante HASTY. En el citoplasma, y por sus características tanto de longitud como por la presencia de una adenina en la posición 1 del extremo 5' de la cadena líder, se asocian a la proteína Argonauta 4 (AGO4), la cual, mediante su actividad de separación ('slicer') libera a la cadena pasajera para, posteriormente, ser degradada. La cadena líder del siRNA, anclada en AGO4, forma el complejo de silenciamiento transcripcional (análogo al complejo RITS (RNA-Induced Transcriptional Silence) en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*). Este complejo se transloca al núcleo donde ejerce la función de RdDM (Matzke et al., 2006, Matzke and Mosher, 2014, Matzke et al., 2009).

En el núcleo, sobre aquellas regiones que son propuestas para ser blanco de RdDM, otra RNA polimerasa específica de plantas, Pol V, transcribe activamente RNAs largos no codificantes (lncRNAs) (Eamens et al., 2008). Aunque se desconoce el mecanismo de reclutamiento de esta polimerasa a la región RdDM, se sabe que son necesarias algunas marcas de represión de la cromatina, y además se cree que Pol V tiene la capacidad de transcribir todo el genoma como un mecanismo de patrullaje en busca de ET (Tsuzuki et al., 2020). El RNA generado por Pol V puede tener complementariedad de bases con el siRNA cargado en el complejo AGO4, si estos se producen en la misma región o en regiones homólogas en el genoma. Se cree que la hibridación del siRNA cargado en AGO4 con el RNA producido por Pol V hace que este último funcione como andamiaje para un contacto físico entre ambas proteínas participantes mediante

la ayuda de SPT5L / KTF1 (Serine Palmitoyltransferase 5-like / Kow Domain-containing Transcription Factor 1), y la región N – terminal de Pol V conocida como AGO-hook, altamente desordenada y necesaria para el contacto físico con AGO4 y el posterior efecto de RdDM (Figura 2, parte media). Esta asociación desencadena el reclutamiento de DRM2 mediante mecanismos aún desconocidos. DRM2 es una metil-transferasa de citosina en contextos CHH, la cual tiene que re-establecerse mediante rondas de amplificación por RdDM. Algunas regiones blanco de RdDM adquieren otro tipo de marcas de represión transcripcional como son metilación semi-conservativa de DNA y marcas de histonas de actividad represiva (Gallego-Bartolome et al., 2019, Zhang and Zhu, 2011, Chinnusamy and Zhu, 2009, Matzke and Mosher, 2014, Matzke et al., 2015).

La represión transcripcional mediada por RdDM se da a múltiples niveles después de su establecimiento. Si bien, estos mecanismos no dependen directamente de RdDM, esta vía es el desencadenante para su actividad (Figura 2, parte derecha). Se sabe que RdDM dirige la modificación de la estructura de la cromatina mediante el re-posicionamiento de los nucleosomas. De la misma manera se ha propuesto que la actividad represiva de RdDM no solamente actúa en sus blancos canónicos, sino que puede participar en la represión de otras regiones (incluso genes) mediante la formación de asas de cromatina, ayudando así en la estructuración 3D del DNA nuclear (Schoft et al., 2009, Rowley et al., 2017, Lavrov and Kibanov, 2007).

Es así que RdDM puede dividirse en tres fases: biogénesis del siRNA, efector del silenciamiento, y remodelación de cromatina, mismas que se ejemplifican en la Figura 2.



Nature Reviews | Genetics

**Figura 2. Las tres fases de la vía RdDM.** Se muestran las fases de biogénesis del siRNA, efectos sobre la metilación de DNA y posteriores alteraciones de la cromatina. En la primer fase, una región blanco de RdDM en el genoma es transcrita por la RNA Polimerasa IV que es reclutada mediante la acción conjunta de SHH1 y la proteína de andamiaje Classy 1, Pol IV genera un transcrito que es inmediatamente reconocido por RDR2 para generar un RNA de doble cadena que es cortado en dsRNAs pequeños de 24 nt por DCL3, mismos que son metilados en el extremo 3' por HEN1 para posteriormente asociarse a AGO4. En la segunda fase, la cadena del siRNA seleccionada en el complejo AGO4, sirve como señal para el reclutamiento del complejo a la misma región del genoma donde se encuentra la RNA Polimerasa V (verde) que con ayuda de varias proteínas accesorias (naranja) transcribe activamente un lincRNA, la interacción física de AGO4 y Pol V a través del dominio carboxilo-terminal (CTD), facilitada por la proteína SPTL5/KTF1, provoca el reclutamiento de DRM2 (café), misma que metila el DNA en contextos CHH. La ultima fase se da cuando la metilación catalizada por DRM2 dirige el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina, como SWI/SNF (Switch/Sucrose Non-Fermentable), IDN2-IDP (In De Novo 2/ IDN2 Paralogue), JMJ14, SUVH4/5/6, UBP26 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26) e histonas desacetilasas como HDA6. Estos complejos dirigen o participan en la deposición de marcas de histonas y en el posicionamiento nucleosomal, aunque su participación exclusiva durante el proceso de RdDM no es totalmente comprendida. Imagen tomada de (Matzke and Mosher, 2014)

A pesar de ser una vía tan importante para el mantenimiento de la estabilidad genómica en las plantas, mutantes en las proteínas clave de la vía canónica de RdDM en *Arabidopsis* no muestran un fenotipo aberrante evidente durante el desarrollo de la planta en condiciones óptimas de crecimiento. Se ha descrito que mutantes en las RNAs polimerasas Pol IV y Pol V tienen un ligero fenotipo de

floración tardía cuando crecen en condiciones de día corto (fotoperiodo 12 h luz / 12 h oscuridad) (Bond and Baulcombe, 2015). Se cree que la ausencia de fenotipos evidentes en *Arabidopsis* se debe a la redundancia funcional de sus elementos participantes, hipótesis soportada experimentalmente mediante ensayos de complementación de las mutantes en DCL3 y AGO4 con otras proteínas de las mismas familias, y por la similitud entre Pol IV y Pol V con la RNA polimerasa II (Havecker et al., 2010, Eamens et al., 2008). Sin embargo, cabe destacar que las proteínas de la misma familia que tienen una actividad redundante, no tienen un patrón de expresión similar en todo el desarrollo de la planta, por lo que la redundancia es limitada a ciertas condiciones. Una hipótesis alternativa para la ausencia de fenotipos evidentes en *Arabidopsis* de mutantes de proteínas de esta vía es que la abundancia de blancos canónicos en *Arabidopsis* es baja (~ 12 % de ET) en su genoma, con respecto a otras plantas como maíz (80 % de regiones repetidas en el genoma). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que mutantes nulas para proteínas de RdDM en maíz tienen fenotipos muy drásticos en el desarrollo, llegando en algunos casos a ser letales, lo cual ha impedido la caracterización funcional de esas proteínas en esta especie (Rabinowicz et al., 2005, Joly-Lopez and Bureau, 2014, Hale et al., 2009).

A pesar de lo anterior, se han descrito fenotipos asociados a la ausencia de RdDM en *Arabidopsis* en respuesta a condiciones ambientales adversas, lo cual refleja la contribución de esta vía en respuesta al estrés. En este sentido, se han descrito fenotipos cuando plantas deficientes en proteínas involucradas en RdDM se exponen a condiciones de estrés biótico, desencadenado por infección de hongos (Lopez et al., 2011, Le et al., 2014), bacterias (Agorio and Vera, 2007, Gohlke et al., 2013, Downen et al., 2012) o virus (Brosseau et al., 2016, Hamera et al., 2012, Yang et al., 2013). Además, se ha caracterizado su participación en la respuesta a estrés de tipo abiótico, principalmente en condiciones de altas temperaturas (Popova et al., 2013, Ito et al., 2011), baja humedad relativa (Tricker et al., 2012), o frío (Chan et al., 2016).

## Elementos transponibles

Los blancos usuales de RdDM son elementos transponibles o regiones asociadas a estos (Matzke and Mosher, 2014). Estos son genes de origen viral con capacidad de generar copias de sí mismos y de insertarse en diversas regiones en el genoma mediante un mecanismo conocido como transposición. A pesar de que la transposición de los ET es mayoritariamente aleatoria, existen zonas en el genoma donde ocurre la transposición con mayor frecuencia, conocidos como focos (*hot spots*) de inserción. Estas regiones se encuentran por lo general en zonas peri-centroméricas, caracterizadas por una baja abundancia de genes codificantes y alta en secuencias repetidas y ET (Joly-Lopez and Bureau, 2014).

Los ET se categorizan de acuerdo con su mecanismo de transposición que, a su vez, se define por su secuencia. Los transposones conocidos como de DNA, o de clase II, transponen mediante corte e inserción. Por otro lado, los transposones de RNA (de clase I), conocidos como retro-transposones, generan copias de sí mismos que, a su vez, pueden ser retro-transcritas a DNA mediante la actividad de proteínas con actividad de transcriptasa reversa, e insertarse en otras regiones del genoma. Ambos mecanismos de transposición provocan un aumento en las regiones repetidas en el genoma. En el caso de los retro-transposones, sus múltiples copias se han clasificado en familias, y estas pueden incluir ET completos o fragmentos de los mismos. Por otro lado, la transposición de ET de DNA puede ser parcial ya que posterior a su salida de su posición original pueden dejar residuos de secuencias, mismos que pueden identificarse como secuencias relacionadas con ET's y pueden ser blancos de maquinarias de silenciamiento transcripcional, como RdDM (Joly-Lopez and Bureau, 2014, Lisch, 2009, Oliver et al., 2013, Le et al., 2000a).

Los transposones de ambas clases pueden subclasificarse de acuerdo a su estructura; por ejemplo, los transposones de clase I se dividen en LTR, LINE (Long Interspersed Nuclear Element), PLE (piggyBac-like) y SINE (Short Interspersed Nuclear Element). Los LTRs, a comparación de los LINE, se caracterizan por tener regiones terminales repetidas largas a cada extremo del

transposón, mientras que los SINE contienen una secuencia derivada de tRNAs o RNA ribosomal 5S en su extremo 5'. A su vez estos mismos grupos pueden dividirse nuevamente de acuerdo con las proteínas que codifican. Por otro lado, los transposones de clase II se dividen en TIR (Terminal Inverted Repeats), Helitron, Crypton, entre otros, acorde a sus características estructurales y propiedades moleculares (Oliver et al., 2013, Le et al., 2000b).

En *A. thaliana*, los ET más abundantes son aquellos transposones pequeños de DNA tipo Helitron, así como los transposones de clase I tipo LTR. Estos últimos se han descrito como los blancos canónicos de silenciamiento mediante la vía RdDM debido a que la naturaleza repetida de sus regiones terminales es ideal para la generación de siRNAs (Matzke et al., 2007, Le et al., 2000a). Por el contrario, en mamíferos (ratón y humano) los transposones más abundantes son aquellos de tipo LINE, constituyendo cerca de 20 % del genoma (Murata et al., 2017).

El proceso de inserción de ET en nuevas regiones del genoma puede tener varias consecuencias. Debido a que proteínas tipo transposasa actúan mediante un mecanismo de corte, las nuevas inserciones pueden provocar roturas de doble cadena en el DNA (DSB, Double-Strand Breaks), las cuales tienen que repararse inmediatamente para evitar inestabilidad genómica, en algunos casos la reparación involucra mecanismos no canónicos de RdDM (Wei et al., 2012). Por otro lado, debido a la naturaleza aleatoria de los sitios de transposición, los ET pueden insertarse en la cercanía de genes o incluso en sus zonas codificantes, alterando así sus patrones de expresión o anulándola, o modificando el marco abierto de lectura, respectivamente (Onozawa et al., 2015). Sin embargo, se han encontrado casos en los que la inserción de un ET cerca de un gen codificante le confiere al último una regulación anormal o nueva, como podría ser su activación transcripcional en respuesta a un estímulo externo. En ocasiones esta co-expresión puede conferir un efecto de resistencia a ciertos tipos de estrés. Un ejemplo de la activación genética mediada por un ET en *Arabidopsis* es el caso de ONSEN, un ET de clase I tipo LTR, que se transcribe en respuesta a calor (Matsunaga et al., 2011). En mutantes nulas de proteínas que participan en la vía

RdDM (Pol IV), la transcripción de este ET aumenta al igual que la generación de DNA extra-cromosómico (producto de transcripción reversa). Algunas de las nuevas inserciones se localizan en regiones promotoras de genes codificantes, los cuales adquieren respuesta a estrés por altas temperaturas que puede heredarse de manera transgeneracional debido a que se modifica la secuencia de DNA (Matsunaga et al., 2011, Ito et al., 2011). Este, entre otros pocos ejemplos, sugiere la existencia de un fenómeno de “domesticación de ET”, es decir, el uso benéfico del mecanismo de transposición como estrategia evolutiva ante un ambiente cambiante siempre y cuando la nueva inserción no sea deletérea (Schrader and Schmitz, 2019, Li et al., 2011, Jangam et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, RdDM tiene como blancos principales a los ET; sin embargo, al ser un mecanismo que utiliza transcripción activa de las regiones a silenciar, debe existir una manera mediante la cual Pol IV y Pol V reconozcan la región para comenzar a transcribir. Es claro que en regiones que requieren mantenimiento del silenciamiento existen algunas marcas de cromatina que permitirían reclutar elementos de RdDM, aunque las nuevas inserciones de ET deben ser reconocidas y silenciadas. Se ha propuesto que estas regiones se identifican mediante RdDM no canónicos para, posteriormente, entrar en el ciclo de silenciamiento mediante RdDM canónico y su ulterior mantenimiento mediante remodelación de la cromatina desencadenada por RdDM a través de la deposición nucleosomal (Schoft et al., 2009, Jia et al., 2009). Otra propuesta novedosa para la identificación de ET por RdDM es mediante la transcripción pervasiva de Pol V, polimerasa que podría tener la capacidad de transcribir todo el genoma a manera patrullaje en busca de elementos extraños (Tsuzuki et al., 2020).

### **RdDM no canónica**

A partir del descubrimiento de la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM), se han descrito vías alternas que utilizan proteínas que sustituyen a los componentes centrales de la RdDM canónica. Los mecanismos que se han propuesto para estas vías alternas varían respecto a los descritos para RdDM



para ejercer el silenciamiento de regiones repetidas en el genoma mediante el uso de RNAs pequeños diferentes a los hc-siRNAs. A estas vías se les ha denominado RdDM no canónicas (Cuerda-Gil and Slotkin, 2016).

Una de las más estudiadas es la vía RdDM/RDR6, la cual es capaz de identificar inserciones nuevas de ET y reprimir a nivel transcripcional y post-transcripcional. Esta vía utiliza a la RNA polimerasa II para la generación de un transcrito que tiene la capacidad de adquirir estructura de doble cadena, este paso es esencial para que sea procesado por DCL2 y DCL4, principalmente, aunque otras proteínas DCL pueden reconocerlo y procesarlo. Posteriormente, los siRNAs generados por las DCLs se asocian a la proteína AGO1, que dirige el corte del transcrito, que a su vez puede generar siRNAs secundarios mediante la actividad de RDR6, en un proceso que promueve la amplificación del silenciamiento. Estos RNAs secundarios pueden asociarse a AGO6 y dirigir el silenciamiento transcripcional asociándose a la proteína Pol V (Zheng et al., 2010, Nuthikattu et al., 2013). Se ha demostrado que la actividad de esta vía es fundamental para el silenciamiento de ET de reciente adquisición en *Arabidopsis thaliana*, identificados mediante estudios de sintenia con *Arabidopsis lyrata* (Cuerda-Gil and Slotkin, 2016, Xie and Yu, 2015).

Adicionalmente se ha descrito una vía similar a la RdDM que utiliza como templado a transcritos generados por la RNA polimerasa II. Dichos transcritos tienen la capacidad de plegarse en sí mismos, para procesarse por la proteína DCL3, y entrar en la vía RdDM canónica, utilizando AGO4 o AGO6, indistintamente, para desencadenar el silenciamiento por metilación del DNA. A esta vía se le conoce como PolII-DCL3 RdDM. De manera similar, se ha descrito que algunos miRNAs pueden dirigir la metilación de DNA en sus regiones blanco mediante el mismo mecanismo que la vía PolII-DCL3 RdDM utilizando a AGO4 como anclaje para reconocer las regiones a silenciar (You et al., 2013). A este mecanismo se le conoce como microRNA-directed DNA methylation y puede actuar tanto en *cis* como en *trans*, dependiendo de la identidad del miRNA (Wu et al., 2010). Se cree que los miRNAs canónicos evolucionaron a través de esta vía para adquirir la capacidad de silenciar post-transcripcionalmente.



Existen vías de RdDM no canónicas menos estudiadas que también tienen la finalidad de silenciar transcripcionalmente regiones blanco en el genoma mediante metilación de DNA. La vía RdDM/DCL3-RDR6 es muy similar a RdDM/RDR6 descrita anteriormente; sin embargo, los dsRNAs generados por la actividad de RDR6 pueden procesarse por DCL3, generando los siRNAs secundarios que pueden asociarse a AGO4 o AGO6 y desencadenar la metilación de DNA por asociación con Pol V (Mari-Ordóñez et al., 2013). El gen *HR4* (Homolog of RPW8 4) se ha descrito como blanco de regulación por esta vía y participa en la respuesta de *Arabidopsis* a condiciones de hipoxia. AGO4 dirige la metilación sobre el segundo exón de *HR4*, y la pérdida de AGO4 correlaciona con una mayor expresión de *HR4*, y una mayor resistencia a hipoxia por sumergimiento (Loreti et al., 2020). Otra vía es la llamada Pol IV – NERD (Needed for RDR2-independent DNA methylation) en la que participan Pol IV y Pol V, pero es independiente de RDR2 y AGO4. Los siRNAs provenientes de la actividad de RDR6 / DCL se asocian a AGO2, cuya interacción con Pol V es mediada por la proteína NERD. Por último, se ha descrito una vía de RdDM no canónica, la cual es independiente de la actividad de DCL3, misma que se denomina Dicer-independent RdDM. En esta vía los RNAs de doble cadena producidos por RDR2 se asocian a AGO4 y se procesan *in situ* mediante exo-nucleasas, produciendo un arreglo de RNAs pequeños de tamaño variable (21 a 24 nt.) que pueden silenciar blancos de RdDM, mediante proteínas participantes en la vía RdDM canónica (Cuerda-Gil and Slotkin, 2016, Xie and Yu, 2015, Pontier et al., 2012, Ye et al., 2015).

### **RdDM durante la fertilización, desarrollo de la semilla y la germinación**

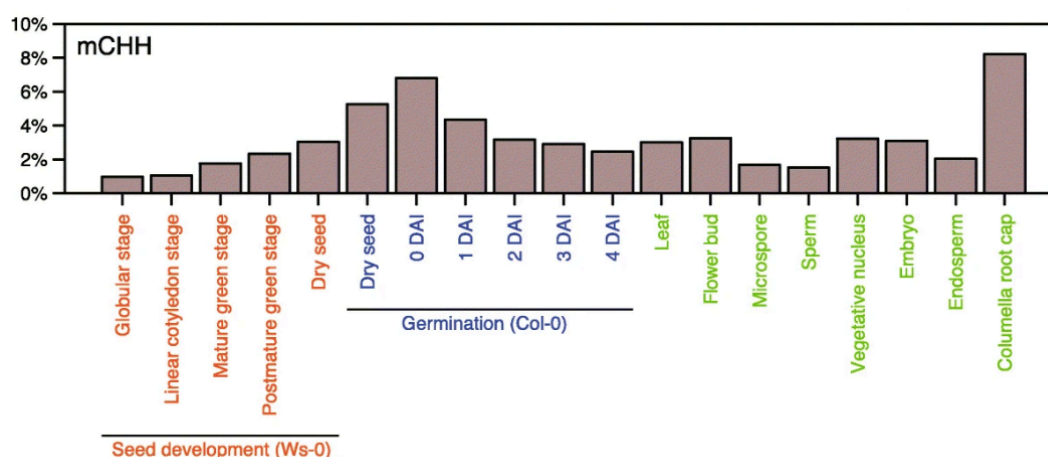
Debido a que los blancos de RdDM son principalmente elementos móviles, la actividad de esta vía es indispensable en momentos clave del desarrollo de las plantas. Como se mencionó anteriormente, la activación de ET puede traer consecuencias deletéreas en la estabilidad del genoma vegetal, por ello el mantenimiento del genoma cobra gran importancia cuando se transmite a la siguiente generación meiótica. Por ende, no es de sorprender que los

mecanismos para el silenciamiento de ET participen activamente tanto en órganos reproductivos como en el desarrollo embrionario.

Los transcritos de las proteínas núcleo de RdDM tienen diferentes patrones de acumulación; sin embargo, todos presentan una alta expresión durante la fertilización y el desarrollo de la semilla, y durante los primeros momentos del proceso de germinación. Dichos cambios en la acumulación sugieren que la participación de esta vía durante estas etapas de desarrollo es esencial para un silenciamiento óptimo de los ET, y la correcta modulación transcripcional sobre genes codificantes.

Durante la reproducción sexual, RdDM es responsable de mantener el silenciamiento de los elementos transponibles en células germinales (Zhang et al., 2019, Matzke et al., 2015). Mutantes en diferentes proteínas Argonauta o DNA metil-transferasas provocan que las células germinales femeninas se desarrollen sin meiosis o se generen muchas células con identidad germinal en los gametofitos, sugiriendo que la contribución de RdDM canónica y no canónica es esencial para el correcto desarrollo de células germinales (Tucker et al., 2012, Olmedo-Monfil et al., 2010, Hernandez-Lagana et al., 2016, Creasey and Martienssen, 2010). AGO9, una proteína que participa en RdDM, se expresa específicamente en células que rodean a la célula madre de la megaspora (CMM), por lo que se sugiere que RdDM tiene una alta actividad en esta región y, posiblemente, los siRNAs generados puedan viajar a la CMM para mantener la estabilidad genómica durante la fertilización (Olmedo-Monfil et al., 2010). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que dichos siRNAs puedan viajar entre estos dos tipos celulares. En el caso del gametofito masculino, existe un decremento en la metilación tipo CHH acompañada de la activación de ET en las células espermáticas contrario a una actividad de RdDM en la célula vegetativa. Se sabe que esta actividad tiene influencia sobre el perfil transcripcional de la célula espermática, de manera similar a como ocurre en el gametofito femenino. En este caso se ha demostrado que RNAs pequeños generados en la célula vegetativa pueden silenciar blancos en la célula espermática (Borges et al., 2012, Slotkin et al., 2009).

Posterior a la fertilización existe un incremento sustancial en la metilación tipo CHH, (blanco de RdDM) durante la maduración de la semilla, cuyos niveles máximos se dan momentos después de la germinación [Figura 3, (Kawakatsu et al., 2017)]. Hasta donde se sabe, el embrión y la semilla en germinación poseen la mayor abundancia de esta marca. A pesar de lo anterior, el endospermo de semillas en desarrollo muestra una des-metilación selectiva, dando la oportunidad a la producción de siRNAs, mismos que podrían tener la capacidad de viajar al embrión y mantener el silenciamiento de ET (Rea et al., 2011). Sin embargo, al igual que en el caso de la fertilización, no se ha demostrado el transporte de RNAs pequeños en tejido embrionario (Chow et al., 2020).



**Figura 3. La metilación de DNA tipo CHH (mCHH) se incrementa gradualmente, desde el desarrollo de la semilla, hasta la germinación.** Se observa el porcentaje global de metilación en el genoma (eje Y), con respecto al número total de citosinas, en muestras obtenidas durante distintas etapas del desarrollo en el eje X: desarrollo y desecación de la semilla (naranja), germinación (azul) y distintos tejidos de semillas y plantas maduras (verde). DAI se refiere a días después de la imbibición. Tomado de (Kawakatsu et al., 2017)

A pesar de que RdDM tiene un rol importante en la represión de ET en semillas en desarrollo, en *Arabidopsis*, mutantes de esta vía carecen de fenotipos evidentes, mientras que en otras especies solo se han descrito fenotipos ligeros (Grover et al., 2020, Grover et al., 2018). Esto sugiere una redundancia genética de múltiples vías para el mantenimiento de la integridad genómica durante la embriogénesis.

Consecuencia de la doble fertilización, el endospermo adquiere una identidad de célula triploide en comparación a otros tejidos de la semilla, esto supone una regulación activa de la dosis parental (Bewley et al., 2013). Muchos laboratorios han abordado esta pregunta, encontrando que RdDM tiene un rol en este balance. Se ha descrito que mutantes en esta vía alteran el tiempo de desarrollo del endospermo. Un ejemplo claro es la activación de los genes AGAMOUS-like (*AGL*) *PHERES*, *AGL35*, *36*, *40* y *90*, producto de un exceso en la contribución del genoma paterno (Walia et al., 2009). Su sobre-expresión resulta en semillas de un mayor tamaño pero también un alto número de semillas abortadas. Consistente con esto, la mutación en Pol IV en células del polen previene que se aborten las semillas en plantas que poseen este desbalance de dosis, sugiriendo fuertemente que RdDM interviene en este fenómeno (Martinez et al., 2018, Schatlowski and Kohler, 2012, Borges et al., 2018, Kradofer et al., 2013, Kirkbride et al., 2019, Stoute et al., 2012, Lu et al., 2012, Walia et al., 2009).

## **Justificación**

La vía RdDM participa en el silenciamiento transcripcional de elementos transponibles, a través de la colocación de marcas de metilación de DNA tipo CHH. Esta vía también participa en el mantenimiento del silenciamiento influenciando así la deposición de marcas de metilación de DNA en otros contextos. Dicho mecanismo de control es necesario para la estabilidad genómica en diversos estadios del ciclo de vida de una planta, como lo son la reproducción y la embriogénesis, y en respuesta a diversas condiciones de estrés biótico y abiótico. Diferentes evidencias indican que existe una íntima relación entre el estrés, la activación controlada de transposones, y la regulación de la expresión genética, misma que es esencial para la óptima respuesta de las plantas ante condiciones adversas. Además, la germinación es uno de los estadios más críticos en el desarrollo de las plantas, en el que se toma una decisión que impactará la supervivencia de la planta a las condiciones adversas del ambiente.

Dado lo anterior, el estudio de la participación de la vía RdDM durante la germinación en condiciones ambientales adversas es esencial para poder dilucidar la compleja red de regulación que las plantas utilizan para contender con las condiciones estresantes, mantener la estabilidad genómica, y asegurar el éxito de su descendencia.

## **Hipótesis**

La vía RdDM canónica participa en respuesta a estrés abiótico durante la germinación de *Arabidopsis thaliana* modulando la expresión genética a través del silenciamiento de genes y elementos transponibles clave en este proceso.

## **Objetivos**

- Determinar el efecto fenotípico de la ausencia de una vía RdDM funcional sobre la germinación ante condiciones de estrés salino.
- Identificar los transcritos cuyos niveles se alteran en mutantes de componentes de la vía RdDM sometidas a condiciones control y de estrés por salinidad.
- Dilucidar el o los mecanismo(s) mediante los cuales RdDM participa en la respuesta a estrés salino durante la germinación.
- Establecer un modelo por el que RdDM podría modular la expresión genética y sus efectos a nivel genómico durante la germinación en presencia de altos niveles de sal.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Para este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) de distintos ecotipos de acuerdo a lo descrito en la sección de resultados. Para su propagación, la superficie de las semillas se desinfectó agitando éstas manualmente durante dos minutos con una solución de etanol absoluto, posteriormente, se centrifugaron brevemente y se re-suspendieron en una solución de cloro comercial al 40 % (considerando la solución comercial como 100 %) y Triton X-100 al 0.02 % (Sigma). Las semillas se agitaron manualmente durante 8 minutos seguido de una breve centrifugación y cinco lavados utilizando agua milliQ (mQ) estéril. Las semillas re-suspendidas en agua se sembraron en placas Petri circulares de 10 cm de diámetro con medio MS sólido [4.3 g/L Murashige and Skoog salts, con macro y micro-nutrientes, sin vitaminas, (Caisson Labs), y con sacarosa al 1% (Research organics), 0.5 g/L de ácido 2-(N morfolino)etanesulfónico (MES, Calbiochem), y 0.65 % agar (Sigma)].

Posterior a la siembra, las placas se sellaron con cinta micropore, se cubrieron en su totalidad con papel aluminio, y se incubaron por 2 a 4 días (dependiendo del ecotipo) a 4 – 8 °C para su estratificación. Pasado este tiempo, se transfirieron a un cuarto de crecimiento con condiciones óptimas para su germinación y crecimiento [fotoperiodo de día largo (16 horas luz – 8 horas oscuridad), 21 °C de temperatura constante, 40-60 % humedad relativa, y 100 fotones  $m^{-2} s^{-1}$  de intensidad luminosa (luz blanca)]. Después de 10 a 14 días, las plantas se transfirieron manualmente a macetas con sustrato Metromix 200 (Hummert Intl.) y se mantuvieron en las mismas condiciones óptimas de crecimiento hasta su estadio de senescencia.

Las semillas de plantas senescentes se colectaron agitando gentilmente las silicuas sobre una hoja de papel para su recolección, se filtraron en una coladera para eliminar el exceso de tejido contaminante, y se almacenaron en un

contenedor con baja humedad relativa <10 % durante dos semanas, finalmente se almacenaron a 4 °C por un mínimo de dos semanas y hasta su uso.

### Ecotipos y líneas mutantes

Las líneas utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana***

Fondo tipo silvestre	Gen alterado	Nombre del alelo	AGI / Tipo (identificador)	Origen
Col-0	Ninguno	Columbia	Ninguno	ABRC
Ler	Ninguno	Landsberg erecta	Ninguno	ABRC
Ws	Ninguno	Wassilewskija	Ninguno	ABRC
Col-0	<i>NRPD1</i> / <i>Pol IV</i>	<i>nRPD1a-1</i>	AT1G63020 / Desconocido	ABRC
Col-0	<i>NRPE1</i> / <i>Pol V</i>	<i>ndpe1-11</i>	AT2G40030 / T-DNA (CS66152)	ABRC
Col-0	<i>RDR2</i>	<i>rdr2-1</i>	AT4G11130 / T-DNA (CS66076)	ABRC
Col-0	<i>DCL3</i>	<i>dcl3-1</i>	AT3G43920 / T-DNA (CS16390)	ABRC
Ler	<i>AGO4</i>	<i>ago4-1</i>	AT2G27040 / T-DNA (CS6364)	ABRC
Col-0	<i>AGO4</i>	<i>ago4-2</i>	AT2G27040 / puntual (EMS)	Pablo Vera
Col-0	<i>AGO4</i>	<i>ago4-3</i> / <i>ago4-5</i>	AT2G27040 / T-DNA (CS9927)	Blake Meyers
Col-0	<i>AGO4</i>	<i>ago4-6</i>	AT2G27040 / T-DNA (SALK_071772)	ABRC
Ws	<i>AGO4</i>	<i>ago4-4</i>	AT2G27040 / T-DNA (FLAG216G02)	Michael Axtell
Col-0	<i>AGO6</i>	<i>ago6-2</i>	AT2G32940 / T-DNA (CS66096)	ABRC



## **Cruzas genéticas**

Para realizar las cruzas genéticas se usaron plantas crecidas en las condiciones descritas anteriormente hasta el desarrollo del primer eje de inflorescencia (4 a 5 semanas). De las plantas receptoras se emascularon diez a quince botones florales removiendo las anteras no desarrolladas y los pétalos hasta que el gineceo estuviera descubierto (dejando los sépalos para protección). Posteriormente, en las plantas donadoras se disectaron flores abiertas y se frotaron gentilmente contra el gineceo de las plantas receptoras. Cada eje floral con flores procesadas se marcó con cinta y las plantas se colocaron nuevamente en condiciones óptimas. Los ejes adicionales se removieron hasta que todas las silicuas de los ejes marcados maduraran naturalmente. Después, las semillas se colectaron y seleccionaron mediante los marcadores de resistencia de las plantas donadoras, o mediante PCR (en el caso de retro-cruzas). Para el análisis fenotípico se utilizaron las semillas de la generación F2 provenientes de las cruzas, previa validación molecular.

## **Experimentos para el análisis de la germinación en condiciones de estrés**

Semillas de las líneas de tipo silvestre y mutantes colectadas en la misma cosecha y almacenadas como se mencionó anteriormente, se desinfectaron y sembraron en medio MS, o medio MS suplementado con cloruro de sodio (NaCl, J.T. Baker), en las concentraciones mencionadas en la sección de resultados. Se estratificaron durante dos (ecotipo Columbia) o cuatro (ecotipos Landsberg *erecta* y Wassilewskija) días, y después se colocaron en una cámara de crecimiento para su germinación.

La germinación se monitoreó cada 4 horas durante el primer día de germinación y, posteriormente, cada 8, 12 y 24 horas, hasta el final del experimento (100% de germinación o 500 horas en el caso de semillas germinando en 250 mM NaCl). Se consideró germinación cuando la radícula había atravesado el endospermo micropilar y roto la testa, correspondiente al término del programa de germinación. El seguimiento de la germinación se realizó bajo el microscopio

estereoscópico, marcando con plumón la posición de la semilla germinada en la parte inferior de la placa. La cantidad de semillas germinadas se anotó en cada tiempo de muestreo para generar las gráficas de germinación.

Los experimentos de germinación incluyeron cinco réplicas técnicas y se repitieron al menos cinco veces (réplicas biológicas), obteniendo resultados similares. Cien semillas de cuatro líneas diferentes se muestrearon en la misma caja Petri (25 semillas por línea) para reducir variabilidad técnica dentro del experimento.

### **Experimentos para determinar la longitud de la raíz en condiciones de estrés**

Semillas previamente desinfectadas se sembraron en placas cuadradas de 10 x 10 cm con medio MS 0.2 X (0.86 g/L sales Murashige and Skoog), sacarosa 1 % y agar 1 %). Las semillas se estratificaron de acuerdo con su genotipo, y se colocaron para su germinación en posición vertical en las condiciones descritas anteriormente. Después de la emergencia de la radícula, las semillas se transfirieron a otra placa con el medio en condiciones control o el medio adicionado con sal (100 mM), se identificó y marcó la posición de la punta de la raíz primaria sobre la parte inferior de la placa con un marcador; esto se realizó diariamente a la misma hora durante ocho días. Posteriormente, se calculó la longitud de la raíz mediante el software imageJ (Fiji). Se utilizaron un mínimo de 15 plantas por cada genotipo en cada réplica biológica, y el experimento se reprodujo en tres ocasiones.

### **Estadística aplicada a los datos obtenidos en el análisis fenotípico**

Como se mencionó, los experimentos de germinación se replicaron al menos en cinco ocasiones. Los datos de cada réplica se acumularon en cada punto de muestreo y se analizaron por medio del programa Prism (Graphpad). Cada curva de germinación se sometió a un ajuste no lineal en una curva sigmoidea dosis –

respuesta con pendiente variable de acuerdo a la siguiente fórmula (también denominada ecuación logística de cuatro parámetros, 4PL):

$$Y = \text{Mínimo} + [ (\text{Máximo} - \text{Mínimo}) / (1 + 10^{(\text{LogEC50} - X) * \text{Pendiente}})]$$

El mínimo es el menor valor del eje Y antes de la cima de la curva (el cual siempre es cero ya que corresponde al punto inicial de la germinación); el máximo es el valor en el eje Y en la cima de la curva; LogEC50 es el valor del eje X, en el cual se encuentra el punto medio entre el mínimo y el máximo y, finalmente, la pendiente mide lo escarpado de la curva. Los parámetros estadísticos toman en cuenta la hipótesis nula de que dos curvas ajustadas a una sigmoidea poseen la misma pendiente y el mismo LogEC50 (Olvera-Carrillo et al., 2010). Las gráficas se generaron representando la curva de ajuste, el valor real de la germinación en cada punto y el error estándar del mismo.

En el caso de los experimentos de crecimiento de la raíz, se determinó diariamente la longitud de la raíz de 15 plantas en condiciones de crecimiento óptimo y 60 en condiciones de salinidad. Los datos se ajustaron de la misma manera que para las curvas de germinación. Las gráficas en la sección de resultados representan, del mismo modo, una curva ajustada, el valor real de cada punto de muestreo y su error estándar.

### **Extracción de proteínas y experimentos de inmunodetección tipo western blot**

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron de semillas secas o durante el proceso de germinación, de acuerdo a lo especificado en la sección de resultados. A excepción de las semillas secas, 100 mg de tejido se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La extracción se inició resuspendiendo el tejido en 400 µL de buffer de extracción [sacarosa 0.7 M, Tris base 0.5 M (Sigma), HCl 30 mM y 2 % β-mercaptoetanol (Millipore)] con una proporción 1:3 (buffer : fenol estabilizado en agua (Fisher)) (Hurkman and Tanaka, 1986). Posteriormente, el tejido se homogenizó en presencia de polivinil-pirrolidona

(10 mg) con la finalidad de ayudar a la ruptura del tejido, después de lo cual se centrifugó. La fase fenólica (usualmente la superior) se re-suspendió en buffer de extracción con fenol sin PVPP en la misma proporción descrita arriba, se mezcló y se centrifugó. La nueva fase fenólica se mezcló con 1 mL de una solución de 0.1 M acetato de sodio (Fisher) disuelto en metanol, y se precipitó entre 2 y 16 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se centrifugó y la pastilla se lavó con una solución de acetona al 80 %, se dejó secar al aire por 5 minutos y, finalmente, se resuspendió en una solución de Tris 20 mM pH 8.0, 50 mM NaCl, y 0.1 % SDS (Sigma) (Hurkman and Tanaka, 1986). La concentración de proteína en los extractos se determinó a través de la técnica colorimétrica reportada por Lowry (Lowry et al., 1951).

Para su análisis electroforético, 30 ó 40  $\mu\text{g}$  de proteína total se resuspendieron o mezclaron en buffer de carga de proteínas Laemli 6 X [SDS 12 %, glicerol 47 %, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.09 g/mL ditioneitol (DTT), y 0.6 mg/mL de azul de bromofenol], hasta llegar a una concentración de buffer 1X. Posteriormente, se incubaron durante 5 minutos a  $99^{\circ}\text{C}$  (ebullición), se enfriaron y se cargaron en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % de concentración [por cada 10 mL: 3.3 mL acrilamida: bis-acrilamida 30:0.8 (Bio-Rad), 0.1 mL SDS 10 %, 3.75 mL Tris-HCl pH 8.8 (pH 6.8 para el gel concentrador), 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio al 10% (Sigma), y 5  $\mu\text{L}$  de tetrametiletilendiamina (TEMED) concentrado (Sigma) (Schagger et al., 1988). El gel concentrador se preparó a una concentración final de 4 % poliacrilamida. Los geles se corrieron a 60 mA hasta que el colorante azul llegara el fondo del gel. Las proteínas se transfirieron durante 2 horas a una membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  sumergidas en buffer de transferencia (Tris-base 3 g/L, glicina 14.4 g/L y metanol 15 %). La membrana se tiñó en una solución rojo Ponceau (0.5 g/L rojo Ponceau, en 1 % ácido acético glaciar) y se escaneó para determinar la carga de proteínas (Gallagher et al., 2001).

Para la inmunodetección, la membrana se bloqueó por dos horas en una solución TBST 1X (2.4 g/L Tris-HCl pH 7.6, 8.8 g/L NaCl, 10 mL/L Tween-20) suplementada con 5 % leche en polvo, y se incubó con el anticuerpo primario

anti-AGO4 (Agrisera AS09617) a una concentración final de 1:2000 ó 1:4000 durante toda la noche. Después de tres lavados con TBST 1X, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo HRP (Zymed), a una concentración final de 1:30,000 por dos horas, y se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST 1X (Gallagher et al., 2001). Para revelar la señal, la membrana se incubó con los reactivos del kit SuperSignal West Pico (Thermo) y se expuso a un film azul de rayos X (Kodak) durante 30 segundos hasta dos horas. Finalmente, las películas ya reveladas se fotografiaron utilizando un equipo ImageQuant 300 (GE).

### **Microscopía de fluorescencia**

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia se utilizaron semillas en germinación de una línea transgénica que expresa la proteína ARGONAUTA 4 (clonada a partir de cDNA) fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en su extremo amino-terminal. La expresión de la proteína de fusión está controlada por el promotor nativo del gen *ARGONAUTA 4* (de una longitud de 3 kpb río arriba del sitio de inicio de la transcripción). Esta línea (*pAGO4::GFP-AGO4*) fue amablemente donada por el Dr. Yijun Qi de la Universidad Tsinghua en China (Ye et al., 2012).

Las semillas se sembraron en placas Petri conteniendo medio MS 1 X o medio MS 1 X adicionado con 100 mM de NaCl, estratificadas durante dos días y, posteriormente, germinadas en las condiciones descritas anteriormente. Los embriones completos se aislaron manualmente bajo el microscopio estereoscópico, durante cada uno de los tiempos de muestreo mencionados en el texto, y se tiñeron inmediatamente en una solución de yoduro de propidio 20 µg/µL (Sigma) (Waring, 1965).

Los embriones teñidos se observaron bajo el microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV1000 upright en Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA, IBt-UNAM) con el objetivo 10 X. Los embriones se fotografiaron generando una pila ('stack') de cortes individuales con un grosor de 6.23 µm y un tamaño de 500 x 456 pixeles. En el caso de las micro-fotografías,

para determinar la localización intracelular de la proteína GFP-AGO4, se utilizó el objetivo 60 X, y se realizaron cortes virtuales con un grosor de 0.8  $\mu\text{m}$ , mismos que también se apilaron para formar las figuras finales. Para ambos tipos de imágenes, la muestra se expuso a un láser con longitudes de onda de 488 y 568 nm para excitar las moléculas de GFP y yoduro de propidio, respectivamente. Los colores rojo y verde de cada canal se añadieron digitalmente posterior a la normalización por autofluorescencia del tejido. El campo claro se fotografió en el mismo momento que las imágenes de fluorescencia.

Las fotografías obtenidas se procesaron utilizando el programa ImageJ. El brillo de la señal de fluorescencia se incrementó al mismo nivel relativo en todas las imágenes con fines de representación y sin alterar los patrones observados.

### **Extracción de RNA y secuenciación masiva tipo RNA-seq**

El RNA total se obtuvo de una población de semillas en germinación, mediante el protocolo de mini-fenol caliente (Mylne et al., 2010), de las líneas *ago4-2* y *ago4-3*, y semillas tipo silvestre Col-0. La integridad del RNA se determinó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa - formaldehído al 1 % [10 g/L agarosa (MPBio), 20 mM de 3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico (MOPS), 10 mM de EDTA, y 50 mM acetato de sodio] teñidos con bromuro de etidio (Waring, 1965). Una muestra se consideró como íntegra en el caso de observar solamente dos bandas con la misma intensidad correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S, y dichas muestras se consideraron para los experimentos de secuenciación.

Para la obtención de los transcritos para cada línea en cada experimento, se envió 1  $\mu\text{g}$  de RNA total a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB, IBt-UNAM). La calidad de la muestra se analizó nuevamente mediante electroforesis capilar utilizando un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) previo a la construcción de bibliotecas de secuenciación. Las bibliotecas de muestras con un RIN > 8 se generaron utilizando el kit True-Seq stranded mRNA Library Prep (Illumina), a partir de la

preparación de cDNA polyA siguiendo las instrucciones del proveedor. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo HiSeq 2500 con una configuración de extremos pareados 'Paired-end' a 75 ciclos (2x75). Se obtuvieron las secuencias de dos réplicas biológicas por cada condición y genotipo en 'multiplex' en un solo carril de la celda de flujo.

### **Análisis bioinformático de las muestras RNA-seq**

Posterior a la secuenciación, todas las bibliotecas de RNA-seq contenían entre 20.5 y 49.2 millones de lecturas de alta calidad (Phred-33 Quality > 36) y carecían de secuencias sobre-representadas. Se procedió a mapear las lecturas utilizando el genoma de *A. thaliana* en su versión 10 (TAIR10, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) como referencia mediante el programa SMALT 0.7.6 (Genome Research Ltd.). Se alcanzó un mínimo de 99.74 % de eficiencia de mapeo. Posteriormente, se generaron las listas de conteos utilizando *samtools* (Li et al., 2009). Para ensayar la expresión diferencial, las listas de conteos se sometieron a un análisis de expresión diferencial mediante el software EdgeR (Robinson and Smyth, 2008), utilizando una normalización de lecturas por millón (RPM) entre todas las bibliotecas a comparar.

Para evaluar los cambios en la acumulación de los transcritos reprimidos directamente por RdDM en las líneas mutantes durante la germinación en presencia de sal, se utilizó una calificación ('*score*') denominada des-regulación ('*de-regulation*'), de acuerdo a la siguiente lógica: genes normalmente reprimidos por RdDM en condiciones de salinidad en plantas tipo silvestre tendrán un resultado negativo en la siguiente ecuación:

$$\log_2(\text{"FC Col-0 NaCl vs Col-0 MS"})$$

donde "**FC**" se refiere a el valor de la expresión diferencial. Si dichos genes se des-reprimen dada la ausencia de un componente de la vía RdDM, deben tener un valor positivo en la siguiente ecuación:

$$\log_2(\text{"FC } ago4 \text{ NaCl vs Col-0 NaCl"})$$

El valor de la des-regulación captura el efecto de ambas condiciones dividiendo la represión de la des-represión como sigue:

$$\log_2(\text{"FC } ago4 \text{ NaCl vs Col-0 NaCl"}) / \log_2(\text{"FC Col-0 NaCl vs Col-0 MS"})$$

El valor de la des-regulación se aplica solamente a aquellos genes que se reprimen por sal en la línea tipo silvestre (Col-0).

Para el resto de los análisis de RNA-seq, después de evaluar la expresión diferencial mediante EdgeR, se seleccionaron los genes de acuerdo con su valor absoluto en la expresión diferencial expresado en escala logarítmica ( $\log_2FC$ ); el corte se estableció en 1.5 veces de diferencia entre las condiciones comparadas, así como con un corte estadístico en la tasa de descubrimiento de falsos (FDR) menor a  $1e^{-4}$ .

Con estos datos se construyeron mapas de calor ('Heatmaps') utilizando la rutina 'heatmap.2' en el lenguaje R; el valor logarítmico de las lecturas por millón en las listas de conteo se estandarizó a través de todos los genes, y después de probar que su distribución se ajusta a una distribución normal, su valor ( $\log_2$ ) se convirtió a número de desviaciones estándar de la media (S.D.) también denominado valor Z (z-score). Los valores estandarizados también se utilizaron para agrupar a los genes de acuerdo a la similitud de sus perfiles en todas las muestras comparadas.

Para encontrar aquellos genes cuya expresión influenciada por la sal es mayor en las líneas mutantes comparada con la tipo silvestre se utilizó el valor de "respuesta diferencial a NaCl" o valor "diff", el cual extrae el efecto de la salinidad en la mutante, del efecto que tiene sobre la línea tipo silvestre de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\log_2(\text{"FC } ago4 \text{ NaCl vs } ago4 \text{ MS"}) - \log_2(\text{"FC Col-0 NaCl vs Col-0 MS"})$$



Para seleccionar los genes más afectados en las mutantes *ago4-2* y *ago4-3*, el valor “diff” se estandarizó entre todos los genes para cada mutante, y se tomaron aquellos que tuvieran un valor z-score mayor o menor a 3.0 considerados hiper-inducidos (sobre-regulados) o hiper-reprimidos (des-regulados), respectivamente.

### **Extracción de DNA y secuenciación genómica por bisulfito de sodio (WGBS)**

Para analizar los cambios en la metilación de DNA en los diferentes genotipos utilizados, se extrajo el DNA total de semillas durante el proceso de germinación en las mismas condiciones que las muestras de RNA-seq descritas anteriormente. La muestra se purificó utilizando el kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor, pero añadiendo ligeras modificaciones al protocolo para el manejo de muestras pequeñas, sobre todo en el paso de la homogenización del tejido. La calidad del DNA extraído se verificó mediante electroforesis en geles no-desnaturalizantes de agarosa a 0.8% observando una sola banda de una longitud mayor a 20 kpb.

Para generar bibliotecas de secuenciación por bisulfito de sodio se utilizaron 100 µg de DNA total proveniente de germinados tipo silvestre, o de las mutantes *ago4-2*, *ago4-3* y *nrpe1-11*, usando el kit Methyl-seq Pico Library Prep (Zymo) de acuerdo con las instrucciones del proveedor para bibliotecas no-direccionales. A todas las muestras se les asignó un código de barras, y las correspondientes a Col-0, *ago4-2* y *ago4-3* se secuenciaron con su duplicado biológico en dos carriles de un secuenciador tipo HiSeq X-Ten (Illumina) por la compañía HudsonAlpha Institute for Biotechnology (Huntsville, AL). Las muestras provenientes de la mutante *nrpe1-11* se secuenciaron junto con su duplicado utilizando la plataforma NovaSeq S4 en el Advanced Genomics Core de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, MI). Todas las muestras se secuenciaron con una configuración de extremos pareados (‘Paired-End’) con 150 ciclos (2x150).

## Análisis bioinformáticos tipo WGBS

Posterior a la secuenciación, todas las bibliotecas contenían entre 37 y 82 millones de lecturas de alta calidad (Phred-33 Quality > 36) y carecían de secuencias únicas sobre-representadas. Las lecturas se limpiaron para eliminar los adaptadores utilizando el programa Trim-Galore (Chen et al., 2014). Una vez verificada la ausencia de adaptadores mediante ‘fastqc’, las lecturas se mapearon al genoma de referencia de *A. thaliana* (TAIR10) utilizando el software Bismark (Krueger and Andrews, 2011), con la opción de mapeo de extremos pareados (-PE) de bowtie2. Se alcanzó una cobertura del genoma mayor a 20 X en todas las muestras, con una eficiencia de mapeo mayor al 28 %, suficiente para los análisis posteriores. De la misma manera, se determinó una conversión por bisulfito de sodio mayor al 99 %; misma que se obtuvo contando la abundancia de citosinas convertidas en el genoma del cloroplasto. La evaluación del mapeo de las bibliotecas se muestra en la Tabla 2:

Muestra	Lecturas Totales	% de Mapeo único	Cobertura genómica	% de Conversión
Col_MS_r1	77,034,584	34.39	58.87	99.00
Col_MS_r2	40,709,111	34.74	29.75	99.39
ago4-2_MS_r1	72,783,693	31.34	50.69	99.08
ago4-2_MS_r2	87,403,807	34.81	67.61	99.10
ago4-3_MS_r1	69,044,391	29.71	45.59	99.11
ago4-3_MS_r2	71,221,525	33.33	52.76	99.12
Col_NaCl_r1	57,620,638	32.65	41.81	99.12
Col_NaCl_r2	72,039,351	34.64	55.46	99.15
ago4-2_NaCl_r1	76,271,495	34.80	59.00	99.08
ago4-2_NaCl_r2	82,909,336	38.14	70.28	99.13
ago4-3_NaCl_r1	76,317,126	34.01	57.68	99.05
ago4-3_NaCl_r2	73,445,912	32.96	53.79	99.05
nrpe1_MS_r1	39,749,839	28.86	25.49	99.95
nrpe1_MS_r2	38,622,680	28.49	24.45	99.93
nrpe1_NaCl_r1	37,548,375	28.21	23.54	99.94
nrpe1_NaCl_r2	48,830,311	28.19	30.59	99.95

Tabla 2. Resultados del mapeo de las muestras tipo WGBS.

Para los análisis comparativos de cambios en la metilación del DNA se identificaron regiones diferencialmente metiladas (DMRs) utilizando el software methyl-Kit dentro del lenguaje R (Akalín et al., 2012). Las DMRs se definieron dividiendo el genoma en ventanas de 100 pb de longitud con una distancia de deslizamiento de 50 pb. La diferencia de metilación entre DMRs se definió como sigue:

$$\% \text{ de metilación} = \% \text{ metilación condición A} - \% \text{ metilación condición B}$$

Aquellas DMRs con cambios de metilación mayores al 10 % y un FDR menor a 0.01 entre las condiciones comparadas fueron tomados en consideración para los demás análisis.

Los análisis de superposición entre DMRs y modelos genómicos, así como los análisis cruzados entre el RNA-seq y el WGBS se realizaron mediante el software *bedtools*. Los modelos genómicos se tomaron de la base de datos TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) y se refieren a tipo de genes, incluyendo genes codificantes de proteína, pseudogenes, elementos transponibles, fragmentos de transposones, y diferentes loci productores de RNAs no codificantes (ncRNAs, snoRNAs, miRNAs, RNAs ribosomales, etc).

En el caso de los análisis de proximidad a un transcrito producto de Pol V, la lista de los transcritos candidatos se descargó del proyecto GSE70290 de la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus, [ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) con el nombre "GSE70290\_PV\_transcripts.txt.gz" (Bohmdorfer et al., 2016), y se realizó una intersección de estos transcritos con los DMRs identificados utilizando la herramienta *bedtools*.

Todos los diagramas de calor, o de cajas y bigotes se generaron utilizando el lenguaje de programación R.

## **Acceso a los repositorios de secuencias**

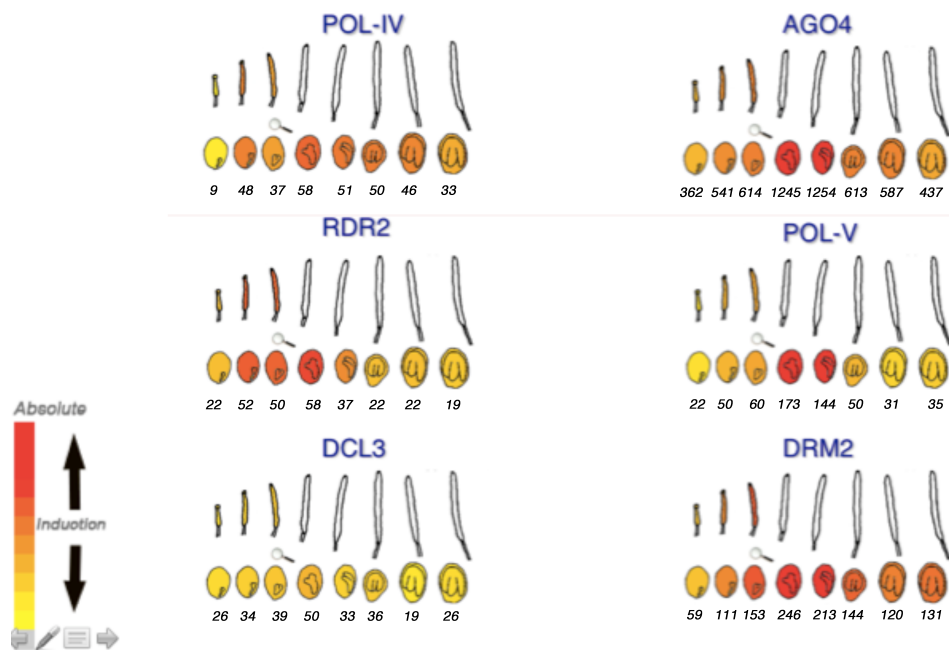
Los datos de RNA-seq generados en este trabajo se pueden descargar libremente a través de la base de datos GEO, buscando el proyecto GSE112051. Por otro lado, los datos del experimento WGBS se pueden encontrar dentro del proyecto GSE156093 del mismo sitio. Adicionalmente, los datos de RIP-seq utilizados para medir la proximidad a una región transcrita por Pol V se encuentran en el proyecto GEO GSE70290.

## RESULTADOS

### Los elementos de RdDM se acumulan durante la desecación de la semilla

La regulación de la activación de los ET orquestada por RdDM ha confluído, a lo largo de la evolución, en el control de diferentes regiones cromosómicas y de la expresión de genes implicados en diferentes procesos, tanto de desarrollo como de respuesta a estrés. La germinación y la etapa de establecimiento de la plántula son procesos críticos durante el desarrollo en plantas. En el primero, el embrión maduro se enfrenta a cambios ambientales dramáticos intrínsecos a este proceso; en tanto que, en el segundo, la planta al emerger de la semilla se puede enfrentar a cambios ambientales que pueden poner en riesgo su supervivencia. De ello se desprende la idea de que algunas de las respuestas de defensa al estrés en estas etapas podrían estar asociadas a la vía RdDM.

Para abordar esta idea, se inició buscando información sobre la abundancia de algunos de los elementos centrales de la vía RdDM canónica previo al desecado de la semilla. Utilizando la plataforma eFP Browser ([bar.utoronto.edu](http://bar.utoronto.edu)) se encontró que los transcritos que codifican los genes *RDR2*, *POL IV*, *POL V*, *DCL3*, *AGO4*, *DRM2* (elementos centrales de la vía RdDM) se acumulan diferencialmente durante el proceso de desecación de la semilla (Figura 4), proceso en el cual el embrión está expuesto natural y controladamente a condiciones extremas de falta de agua y, en algunos casos, como en *AGO4*, es la acumulación máxima comparada con otros órganos (no mostrado). Es importante resaltar que algunos de estos genes tienen una acumulación coincidente en estas condiciones (Figura 4), lo que podría sugerir que la vía RdDM participa en el proceso de desecación de la semilla. Esta evidencia, aunado a que los niveles de metilación de DNA tipo CHH aumentan gradualmente desde el desarrollo embrionario hasta la germinación, donde se observa su máximo nivel (Figura 3, (Kawakatsu et al., 2017)), sugiere que las proteínas de la vía RdDM podrían acumularse desde etapas tempranas, previas a la germinación, y que una vez que la planta emerge, su acumulación disminuiría, apoyando la idea de un papel activo de RdDM en la germinación y post-germinación.



**Figura 4. Interpretación gráfica de la acumulación de RNA mensajero de los elementos núcleo de RdDM durante el desarrollo y maduración de la semilla.** Cada panel representa un gen; los diagramas representan los estadios analizados y la escala representa un valor absoluto de acumulación del transcrito: rojo es una acumulación mayor, mientras que amarillo una menor acumulación. Las imágenes individuales fueron tomadas de la base de datos eFP Browser (bar.utoronto.ca). Los estadios del desarrollo del embrión corresponden a (de izquierda a derecha): globular temprano, globular tardío, corazón, torpedo, bastón, curvo, cotiledones formados y cotiledones verdes, respectivamente, y representan la progresión del desarrollo. Debajo de cada estadio se muestra el valor absoluto de acumulación de transcrito para cada gen.

### **La vía RdDM canónica se requiere para una germinación óptima en condiciones de salinidad**

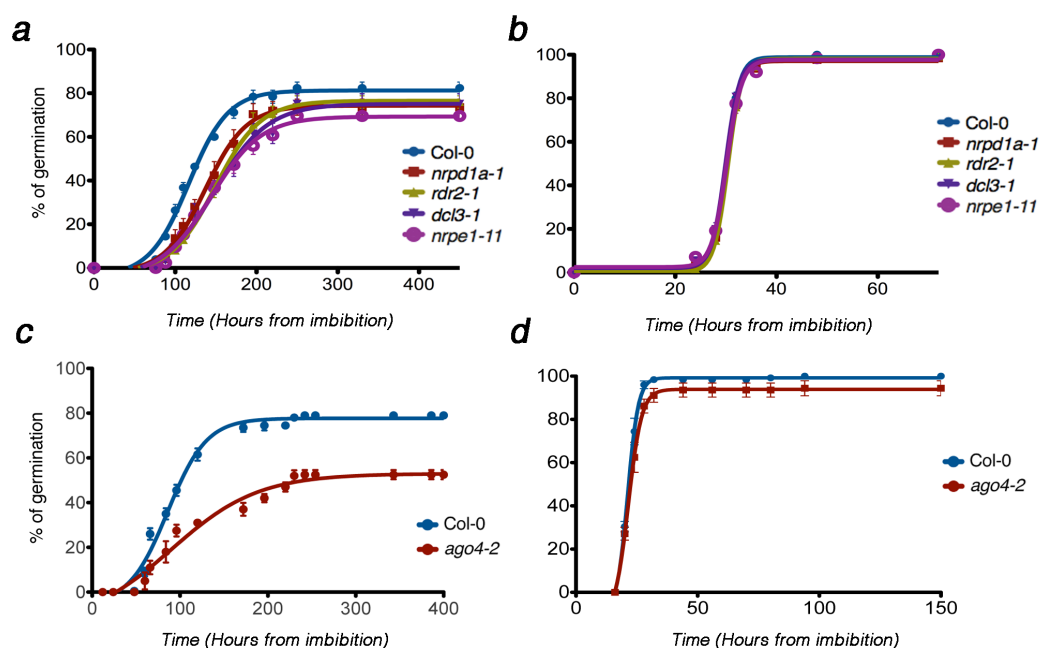
Una de las condiciones ambientales adversas más habituales con las que las plantas se enfrentan durante la germinación es la salinidad. Las altas concentraciones de cloruro de sodio en el suelo provocan déficit hídrico por la alta concentración de solutos, y toxicidad por los efectos desfavorables del sodio. Cuando la concentración de sales es excesiva puede llegar a detener el programa de germinación y provocar la muerte de la planta. Por lo tanto, es posible que la vía RdDM tenga un rol activo en esta respuesta.

Se estudió el fenotipo de plantas carentes de una vía RdDM funcional ante la presencia de altos niveles de sal en el medio. Se seleccionaron mutantes que carecen de las proteínas núcleo de RdDM (Pol IV, Pol V, DCL3 y RDR2, Tabla 1), y se sembraron en medio de germinación suplementado con cloruro de sodio a una concentración de 250 mM, condición en la cual las semillas son capaces de germinar pero no proceden a la fase de crecimiento temprano de la plántula. Se midió el tiempo que les tomaba completar el programa de germinación comparando sus patrones con el de la línea tipo silvestre (Col-0), así como con semillas de las mismas líneas germinadas en un medio sin estrés. Se encontró que la germinación de todas las líneas se retrasa cuando germinaban en el medio con estrés (Figura 5a), contrario a lo que ocurre con las semillas que germinaron en medio sin altos niveles de sal, las cuales alcanzan a germinar a un 100 % con una tasa similar de germinación (Figura 5b). Interesantemente, la germinación de las líneas carentes de las proteínas núcleo de la vía RdDM tiene un mayor retraso que la que se observa en la línea tipo silvestre (Col-0) en condiciones de salinidad (Figura 5a).

Para confirmar si este fenotipo era debido a la ausencia de una vía RdDM funcional, se estudió el efecto de una mutante alterada en la actividad de la proteína AGO4 (*ago4-2*). La proteína codificada por *AGO4-2* es una mutante puntual en la que se modificó el ácido glutámico en la posición 641 (E641K), aminoácido localizado dentro del dominio PIWI (P-element Induced Wimpy testis). Debido a que este cambio se encuentra cerca de uno de los residuos necesarios para la actividad de corte de AGO4 (*'slicer'*), se propuso que la proteína codificada por *AGO4-2* es una mutante con actividad catalítica alterada, y que el alelo *AGO4-2* se comporta como dominante negativo (Agorio and Vera, 2007). La mutación no afecta los niveles de la proteína (Figura 8), pero tiene un claro efecto negativo sobre la metilación de DNA en el transposón *AtSN1*, efecto similar al causado por una mutante carente de AGO4 (Agorio and Vera, 2007).

La mutante *ago4-2* también presenta una germinación retardada en condiciones de salinidad cuando se compara con la línea tipo silvestre, similar a lo que ocurre con las demás mutantes analizadas (Figura 5c y 5a); a pesar de que en

condiciones óptimas de crecimiento no existe una diferencia sobre su tasa o eficiencia de germinación con respecto a Col-0 (Figura 5d). Estos resultados indicaron que la vía RdDM se requiere para una germinación óptima en condiciones de alta salinidad.



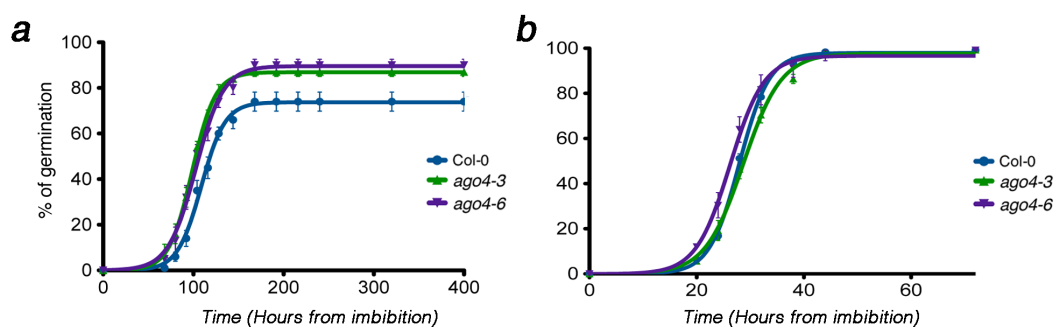
**Figura 5. Perfil de germinación de las mutantes deficientes en la actividad de RdDM.** a. Comparación del perfil de germinación de las mutantes en *Pol IV* y *Pol V* (*nrpd1a-1* y *nrpe1-11*, respectivamente), *DCL3* y *RDR2* contra la línea tipo silvestre (Col-0) germinadas en 250 mM de NaCl. b. Mismas líneas que en a. pero germinadas en medio sin NaCl. c. Comparación entre la mutante puntual de *AGO4* (*ago4-2*) y Col-0 germinadas en 250 mM de NaCl. d. Igual que en c. pero germinadas en medio sin sal. El eje de las abscisas muestra el tiempo a partir de la imbibición y el eje de las ordenadas el porcentaje total de semillas germinadas. Se muestra un experimento representativo de 5 réplicas biológicas, las barras de error corresponden al error estándar determinado en 5 réplicas técnicas. Todas las curvas de germinación en esta y las figuras subsecuentes fueron ajustadas a una sigmoide y sometidas a una prueba de significancia con la ecuación logística de cuatro parámetros.

### La ausencia de la proteína AGO4 desencadena una germinación acelerada

Dado que la pérdida de actividad 'slicer' de AGO4 muestra un fenotipo de retardo en la germinación ante condiciones de de salinidad, al causar la pérdida de funcionalidad de la vía RdDM, se predijo que la ausencia de AGO4 presentaría el mismo efecto. Para esto, se analizó el fenotipo de una línea cuya mutación



elimina completamente la presencia de AGO4 (*ago4-3*, Figura 6) durante la germinación en presencia de altos niveles de sal. Se observó que, a pesar de que esta mutante también germina a la misma velocidad y con la misma eficiencia que la línea tipo silvestre (Col-0) en medio sin alta salinidad (Figura 6b), muestra una germinación acelerada en el medio adicionado con 250 mM de NaCl (Figura 6a), contrario a lo que ocurre con la mutante puntual *ago4-2* (Figura 5c) y con las mutantes de otros componentes de RdDM (Figura 5a). Para validar esta observación, se comprobó la tasa de germinación de otro alelo nulo de AGO4 bajo el mismo fondo genético (*ago4-6*) (Figura 6), encontrándose que presenta el mismo efecto en condiciones de salinidad que *ago4-3* (Figura 6a), y ningún efecto cuando germina en condiciones control (Figura 6b).

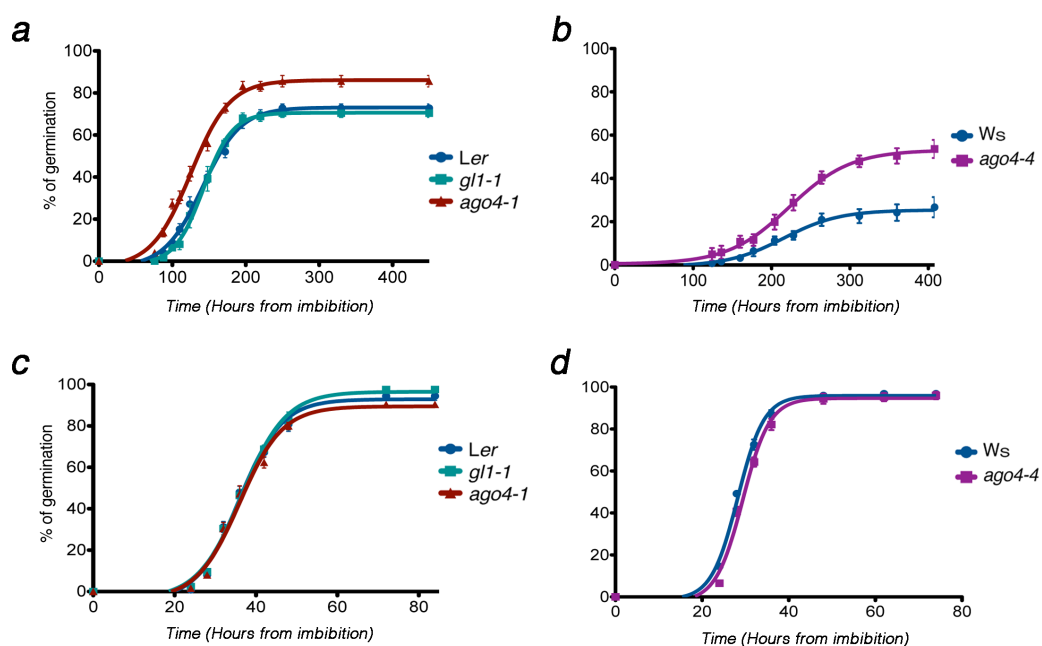


**Figura 6. Germinación de las mutantes nulas en AGO4 (*ago4-3* y *ago4-6*) bajo fondo Col-0.**

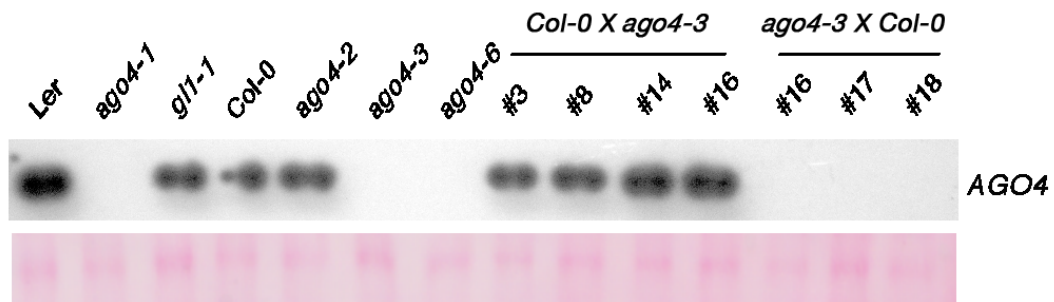
a. Germinación en medio con salinidad (250 mM NaCl). b. Germinación en medio control. El eje de las abscisas muestra el tiempo a partir de la imbibición y el eje de las ordenadas el porcentaje total de semillas germinadas. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas, las barras de error corresponden al error estándar determinado en 5 réplicas técnicas.

Para descartar que el fenotipo observado en las mutantes nulas de AGO4 se debiera a un efecto particular del ecotipo utilizado (Col-0), se ensayó la germinación de otros dos mutantes alélicas carentes de AGO4 en los ecotipos *Ler* y *Ws* (*ago4-1* y *ago4-4*, respectivamente). Los resultados obtenidos mostraron que en condiciones de alta salinidad estas mutantes también presentan una germinación acelerada en comparación con sus respectivas líneas tipo silvestre (Figura 7a y 7b), y que además este efecto es específico para la condición de salinidad, ya que en condiciones óptimas de germinación no se observó esta diferencia (Figura 7c y 7d). Estos resultados comprobaron que el fenotipo asociado a la ausencia de AGO4 es independiente del fondo tipo silvestre, y que

realmente es producto de la falta de esta proteína. Cabe señalar que el alelo *ago4-1* bajo fondo *Ler*, contiene adicionalmente la mutación *glabra* (*gl1-1*), misma que co-segrega con la mutación en *AGO4* y se usa con fines de selección porque presenta un evidente fenotipo de ausencia de tricomas. Fue por ello que se analizó la germinación de la mutante sencilla *gl1-1*, sin encontrar diferencias con respecto a la línea tipo silvestre (Figura 7a y 7c). También se comprobó que la mutante sencilla *gl1-1* no afecta la acumulación de la proteína AGO4 (Figura 8).



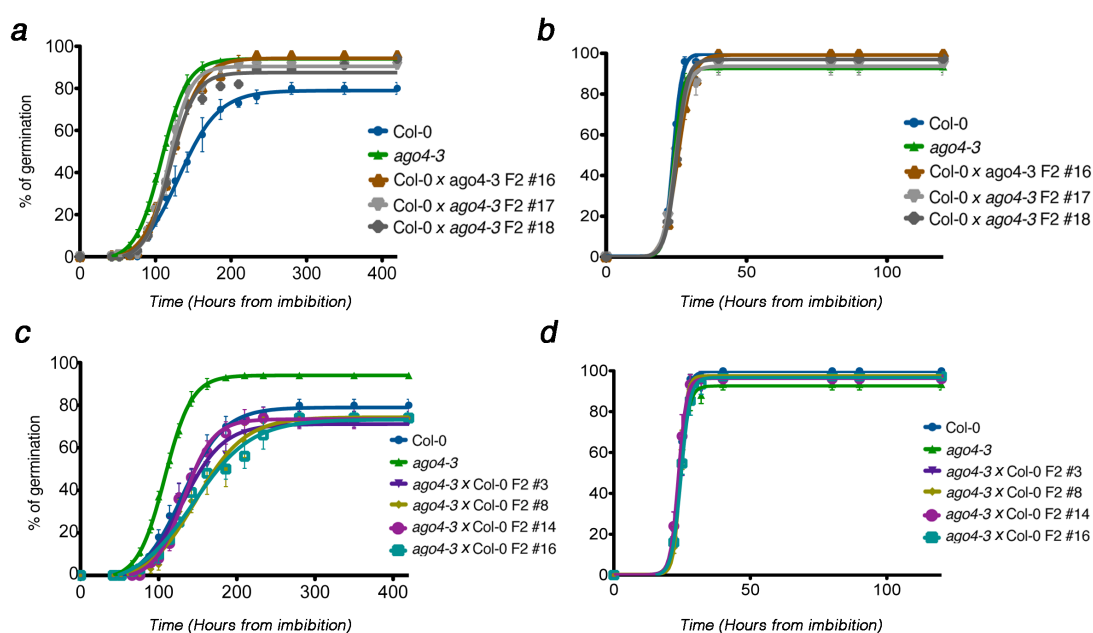
**Figura 7. Germinación de las mutantes nulas de AGO4 bajo distintos fondos genéticos. a.** Comparación entre *ago4-1*, *gl1-1* y la línea tipo silvestre *Ler*, en presencia de salinidad (250 mM NaCl). Nótese que la germinación de la línea *gl1-1* se ensayó debido a que es un marcador molecular de la línea *ago4-1*. **b.** Comparación de la mutante *ago4-4* con la línea tipo silvestre *Ws* germinadas en presencia de sal. **c y d.** Como en a y b, respectivamente, pero las semillas germinaron en medio óptimo. El eje de las abscisas muestra el tiempo a partir de la imbibición y el eje de las ordenadas el porcentaje total de semillas germinadas. Se muestra un experimento representativo de 5 réplicas biológicas para las mutantes en fondo *Ler*, y 3 para aquellas en fondo *Ws*, las barras de error corresponden al error estándar determinado en 5 réplicas técnicas para todos los genotipos.



**Figura 8. Inmunodetección mediante Western Blot de la proteína AGO4 en las líneas usadas para los experimentos fenotípicos.** Se muestran los ecotipos tipo silvestre (Col-0 y *Ler*), sus respectivos alelos mutantes y las líneas cruzadas. Col-0 X *ago4-3* corresponde a las líneas cruzadas (generación F2) provenientes de la retro-cruza del alelo tipo silvestre AGO4 sobre las mutantes *ago4-3*. *ago4-3* X Col-0 corresponde a las líneas cruzadas (generación F2 en estado homocigoto para *ago4-3*) provenientes de la introgresión del alelo mutante *ago4-3* sobre el fondo Col-0. El panel inferior muestra la carga total de proteínas. Se muestra un experimento representativo de dos reproducciones biológicas.

Una vía RdDM no funcional desencadena la activación de los ET, que al des-reprimirse se pueden insertar en regiones aleatorias del genoma, lo que provocaría que estas inserciones se acumularan en la progenie en mutantes de RdDM al propagarse por varias generaciones. Para descartar que el fenotipo observado en las mutantes nulas de AGO4 se debiera a un efecto de transposición, se decidió introducir la mutación *ago4-3* en plantas tipo silvestre mediante cruza genéticas (retro-cruzas). Tres líneas independientes retro-cruzadas (#16, #17 y #18) se seleccionaron para la mutación en AGO4, y se comprobó mediante experimentos de inmunodetección que la segunda generación filial (F2, proveniente de un experimento de retro-cruza) no presentara acumulación de la proteína AGO4, similar a lo que ocurre con la mutante nula *ago4-3* (Figura 8). Al ensayar la germinación de estas semillas bajo estrés salino, se encontró que su germinación fue similar a la mutante nula *ago4-3*, y que, si se germinaban en medio sin estrés, su germinación era igual que la línea tipo silvestre, indicando que los fenotipos se mantienen de una generación a otra (Figura 9a y 9b).

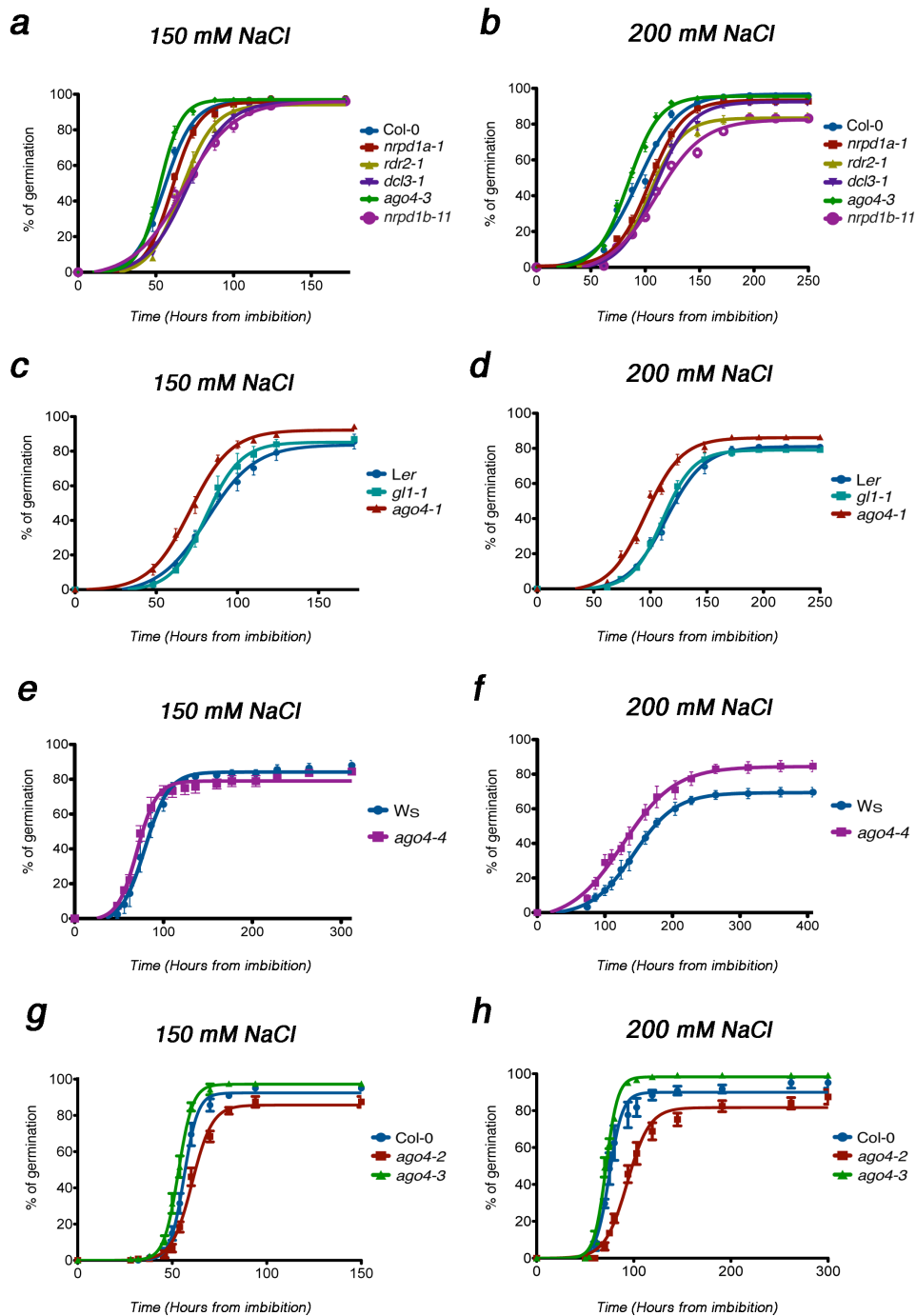
Para complementar la observación anterior, se realizó la cruce opuesta, introduciendo el alelo tipo silvestre a una mutante nula de AGO4 (*ago4-3*) y se seleccionaron cuatro líneas de introgresión que mostraran acumulación de AGO4 en la segunda generación filial (F2, #3, #8, #14 y #16. Figura 9). Se encontró que estas líneas presentan una germinación similar a la de la línea silvestre, tanto en condiciones de alta salinidad como en condiciones óptimas de germinación (Figura 9c y 9d). Lo que demostró que el fenotipo es resultado de la falta de AGO4, ya que al complementarse con el gen tipo silvestre se recuperó el fenotipo tipo silvestre.



**Figura 9. Perfil de germinación de las retro-cruzas y líneas de introgresión de *ago4-3*.** **a.** Comparación de la generación F2 de tres retro-cruzas (*Col-0* x *ago4-3*) con la mutante nula *ago4-3* y la línea tipo silvestre, germinadas en presencia de 250 mM NaCl. **b.** Como en a. pero germinadas en medio sin NaCl. **c.** Comparación de la generación F2 de líneas de introgresión (*ago4-3* x *Col-0*) con la mutante nula *ago4-3* y la línea tipo silvestre, germinadas en presencia de 250 mM NaCl. **d.** Como en c. pero germinadas en medio sin NaCl. El eje de las abscisas muestra el tiempo a partir de la imbibición y el eje de las ordenadas el porcentaje total de semillas germinadas. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas, las barras de error corresponden al error estándar determinado en 5 réplicas técnicas.

**El fenotipo asociado a la pérdida de AGO4 es dosis-dependiente a las condiciones de salinidad.**

Una vez comprobado que la ausencia de AGO4 era la causa directa de los fenotipos encontrados, se evaluó el efecto de la concentración de sal sobre el fenotipo. Para este fin, las semillas de las mutantes analizadas anteriormente se sometieron a ensayos de germinación en dos concentraciones distintas de NaCl (150 y 200 mM). Se encontró que los fenotipos son reproducibles en ambas condiciones, con una clara diferencia en la penetrancia, misma que dependía de la concentración de sal; es decir, los efectos son más ligeros en la menor concentración de NaCl (150 mM), y más pronunciados con una concentración mayor de sal (200 mM, Figura 10a - 10h). Así mismo, la penetrancia en el fenotipo es aún mayor a una concentración más alta de sal (250 mM) (Figura 5a).



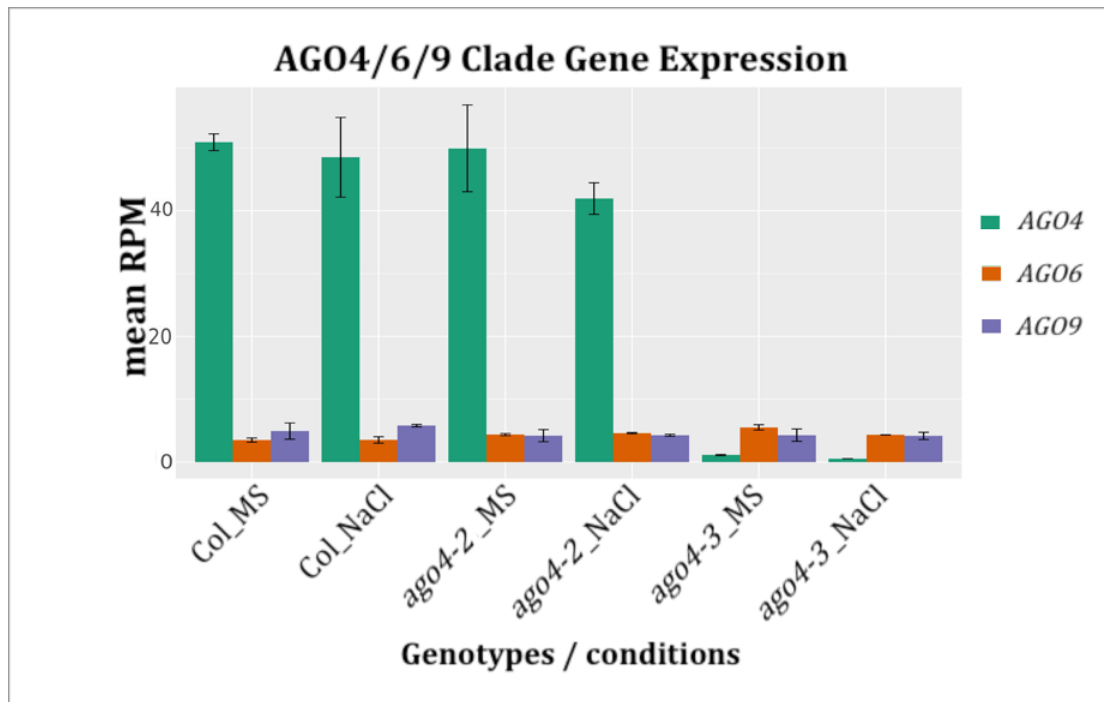
**Figura 10. Efecto dosis-dependiente de la sal sobre los fenotipos de las mutantes de RdDM.**

**a.** Comparación de las mutantes en las proteínas núcleo de RdDM contra la línea tipo silvestre, germinadas en 150 mM de NaCl. **c.** Comparación de *ago4-1*, *gl1-1* y *Ler* germinadas en 150 mM de NaCl. **e.** Comparación entre *ago4-4* y *Ws* en 150 mM de NaCl. **g.** Comparación entre *ago4-2*, *ago4-3* y *Col-0* en 150 mM de NaCl. **b, d, f y h,** como en a, c, e y g, respectivamente, germinando en medio con 200 mM de NaCl. Para cada gráfica, el eje de las abscisas muestra el tiempo a partir de la imbibición y el eje de las ordenadas el porcentaje total de semillas germinadas. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas, las barras de error corresponden al error estándar determinado en 5 réplicas técnicas.

En síntesis, estos resultados confirman que la ausencia de AGO4 es la causa directa de un fenotipo de germinación acelerada dosis-dependiente, y también sugieren que AGO4 podría tener una función adicional independiente de RdDM en esta respuesta o, alternativamente, que existe un mecanismo independiente de AGO4 que se encuentra alterado en su ausencia.

### **La proteína AGO6 tiene un efecto sobre la germinación en ausencia de AGO4**

Existen diez proteínas tipo Argonauta en *Arabidopsis*, las cuales se clasifican en tres clados de acuerdo a su similitud en secuencia. El primer clado contiene a AGO1, la proteína encargada de la inhibición post-transcripcional mediante miRNAs. AGO1 comparte homología con las proteínas AGO5 y AGO10. Las proteínas AGO2, AGO3 y AGO7 se agrupan en el segundo clado. Finalmente, las proteínas restantes, AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9 se encuentran en el tercer clado (Hutvagner and Simard, 2008, Peters and Meister, 2007). Las proteínas Argonauta del tercer clado poseen características similares en cuanto a su actividad, ya que son capaces de cargar RNAs pequeños de 24 nucleótidos; sin embargo, sus patrones de acumulación en los distintos tejidos de la planta son muy diferentes. AGO8 y AGO9 se expresan específicamente en flores, mientras que la acumulación de AGO6 se restringe a las zonas meristemáticas del embrión maduro; AGO4, a su vez, tiene una acumulación más pronunciada en el embrión, además de otros tejidos vegetativos (Havecker et al., 2010). A pesar de que no se encontraron diferencias en la acumulación de transcritos que codifican para las proteínas AGO6 y AGO9 en las condiciones experimentales utilizadas (Figura 11), es razonable pensar que, en ausencia de AGO4, AGO6 – que también se acumula en semillas – podría jugar un rol inusual aún no descrito independiente a su actividad común en RdDM no canónica en estas condiciones, desencadenando un fenotipo sintético.

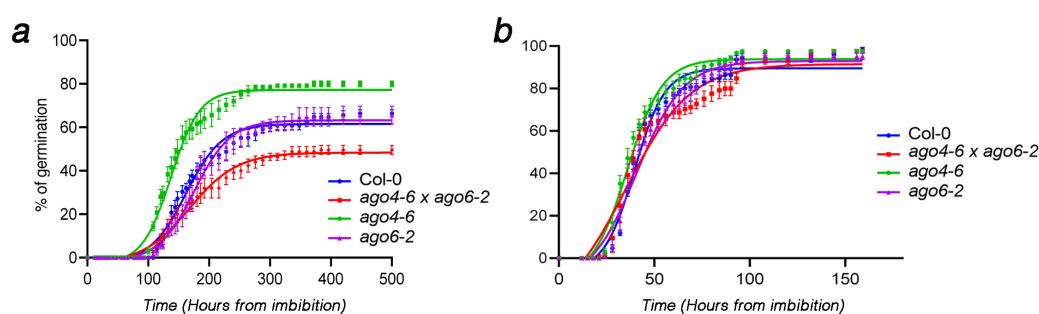


**Figura 11. Niveles de acumulación del RNA-mensajero de los genes *AGO4*, *AGO6* y *AGO9* durante el proceso de germinación.** Los valores graficados en el eje Y corresponden al promedio de lecturas por millón, y provienen de un experimento tipo RNA-seq con dos réplicas biológicas, todas están normalizadas como número de lecturas por millón. En el eje X se muestran los genotipos analizados en las condiciones experimentales señaladas. Las barras de error representan la desviación estándar. Las semillas fueron germinadas en condiciones control o en presencia de 100 mM de NaCl y fueron colectadas cuando el 50% de las semillas sembradas completaron el programa de germinación.

Para distinguir entre un efecto inusual debido a la contribución de *AGO6* en el fenotipo observado, y una actividad adicional de *AGO4*, se decidió analizar la germinación de una línea doble mutante *ago4 x ago6*. El Dr. Jian-Kang Zhu, de la Universidad de Riverside en California, amablemente donó la línea doble mutante *ago4-6 x ago6-2* (Duan et al., 2015); y después de propagarla en el laboratorio se analizó su germinación comparándola con la línea tipo silvestre (Col-0) y las mutantes sencillas de *AGO4* (*ago4-6*) y *AGO6* (*ago6-2*). Se observó que la doble mutante *ago4 x ago6*, presenta un fenotipo de germinación retrasada en condiciones de alta salinidad, similar a lo que ocurre con las demás mutantes sencillas de la vía RdDM (Figura 12a, 5a y 5c), y en contraste a las mutantes nulas de *AGO4* (Figura 6a), mientras que en condiciones óptimas no



presenta algún fenotipo (Figura 12b); interesantemente la mutante sencilla en AGO6 no presenta ningún fenotipo asociado (Figura 12a y 12b). Estos datos señalan que el fenotipo de germinación acelerada observado en mutantes nulas de AGO4 es debido a una alteración en la actividad de AGO6, provocando una cascada de cambios río debajo de estos elementos que convergen en un fenotipo inusual, y no a una actividad adicional de AGO4. En ausencia de ambas proteínas la respuesta a la salinidad se ve comprometida, causando un fenotipo de germinación retrasada. Esta conclusión está soportada por la ausencia de fenotipo en la mutante nula de AGO6, lo que indica que esta proteína por si misma no participa en el control de la respuesta a salinidad durante la germinación.



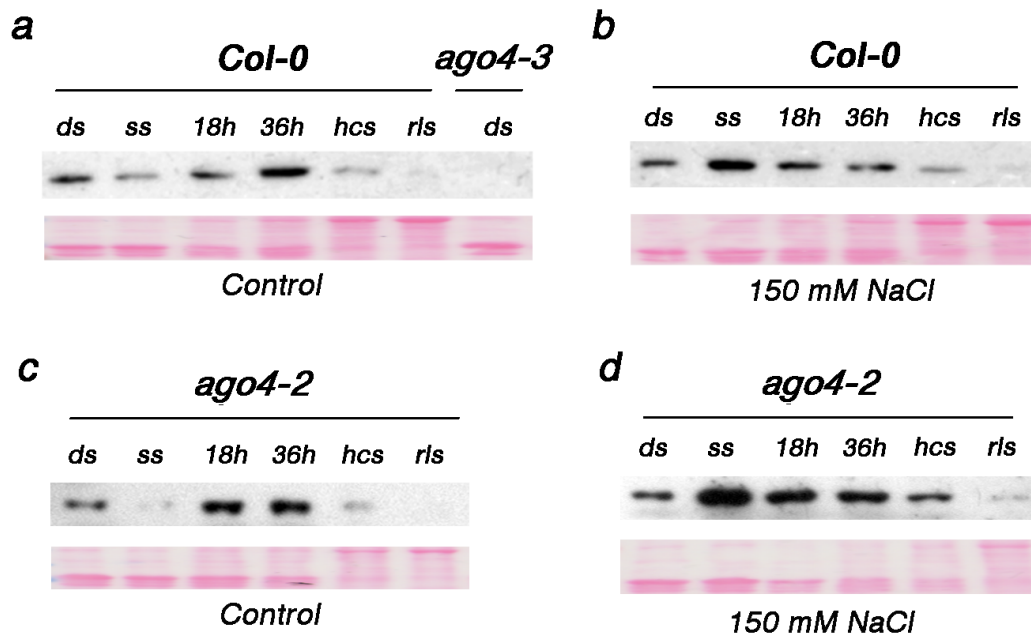
**Figura 12. Germinación de la doble mutante *ago4 x ago6*.** **a.** Comparación entre la doble mutante, las mutantes sencillas *ago4-6* y *ago6-2*, y la línea tipo silvestre (Col-0) germinadas en 250 mM de NaCl. **b.** Como en a. pero germinadas en medio sin salinidad. En el eje de las abscisas muestra el tiempo a partir de la imbibición y el eje de las ordenadas el porcentaje total de semillas germinadas. Se muestra un experimento representativo de 6 réplicas biológicas, las barras de error corresponden al error estándar determinado en 5 réplicas técnicas.

### La abundancia de AGO4 cambia durante la germinación y crecimiento temprano

Puesto que los datos obtenidos indican que los elementos de la vía RdDM canónica se requieren para una germinación óptima en condiciones de alta salinidad, y debido al rol crítico asignado a AGO4 en esta respuesta, se decidió conocer los patrones de acumulación de dicha proteína durante este proceso. Para este fin, se siguió la acumulación de AGO4 durante distintas etapas del proceso de germinación y crecimiento temprano de la plántula en condiciones

óptimas y de estrés salino (150 mM NaCl) – condición que permite la progresión del desarrollo temprano de la plántula – mediante experimentos de inmunodetección. Se utilizó un anticuerpo que específicamente reconoce a la proteína AGO4 y se determinó su acumulación en extractos de proteína totales de seis periodos distintos del proceso de germinación y crecimiento temprano: semillas secas, semillas estratificadas por dos días, 18 y 36 horas después del inicio de la imbibición (tiempos promedios en los cuales una población de semillas Col-0 alcanza el 50 y 100 % de germinación en condiciones control, respectivamente), plántulas con hipocotilos y radículas emergidas, y plántulas con dos hojas de la roseta desarrolladas.

Bajo condiciones óptimas de germinación, AGO4 se detectó desde el primer estadio (semillas secas), posteriormente, su abundancia se reduce cuando las semillas se estratifican. Interesantemente, durante los primeros momentos de la emergencia de la radícula (18 y 36 horas) se incrementa su acumulación, llegando a su máximo nivel después de que la radícula ha emergido en todas las semillas muestreadas (36 horas). Finalmente, sus niveles descienden progresivamente durante el desarrollo temprano de la plántula hasta ser indetectables en nuestras condiciones experimentales (Figura 13a). Estos resultados sugieren que AGO4 y RdDM tienen un pico de actividad durante el proceso de germinación, lo cual está de acuerdo con el incremento similar de la metilación CHH durante este estadio, evidencia reportada por otro grupo de investigación [Figura 3, (Kawakatsu et al., 2017)].



**Figura 13. Acumulación de la proteína AGO4 durante la germinación.** **a.** Inmunodetección de la proteína nativa AGO4 durante la germinación, los estadios se señalan como sigue: ds, semilla seca; ss, semilla estratificada; 18h, una población de 50 % de semillas germinadas; 36h, una población del 100 % de semillas germinadas; hcs, plántulas con la radícula e hipocotilo fuera de la testa; rls, plántulas con las primeras hojas verdaderas desarrolladas. Semillas secas de la mutante *ago4-3* se muestran como control negativo de la detección. El panel inferior indica la carga de proteína por medio de la tinción rojo Ponceau. **b.** Como en a. pero con semillas germinando en 150 mM de NaCl. **c y d.** Como en a. y b., respectivamente, pero utilizando semillas de la mutante *ago4-2*. Las imágenes provienen de un experimento representativo con un resultado reproducido en 3 ocasiones.

Cuando se exploraron los niveles de AGO4 en presencia de sal durante los mismos estadios, se observó una marcada diferencia en sus patrones con respecto a lo que ocurre en condiciones control. Su acumulación máxima se da después de la imbibición en el medio con alta salinidad, justo antes de que la radícula comience su emergencia. Dicha acumulación se reduce ligeramente durante la emergencia de la radícula y comienza a descender más pronunciadamente en plántulas con hipocotilo desarrollado, hasta ser casi indetectable en plántulas con hojas verdaderas (Figura 13b). Este resultado indica que la abundancia de AGO4 se modifica cuando las plantas perciben y responden a la presencia de altos niveles de sal, y sugiere fuertemente que AGO4 se comporta como una proteína de respuesta a salinidad durante la germinación.

Para profundizar en esta observación, se analizó la abundancia del transcrito de AGO4 en plantas germinadas en condiciones óptimas o en presencia de alta sal (100 mM) condición que permite el muestreo en tiempos cercanos y sin defectos evidentes en el desarrollo provocados por el estrés, después de 18 horas de germinación (60 horas en condiciones de alta salinidad), momento en que se alcanza un 50 % de emergencia de la radícula. Se observó que los niveles del transcrito de AGO4 no cambian entre ambas condiciones (Figura 11), lo que sugiere que la acumulación de la proteína AGO4 en presencia de altos niveles de salinidad en AGO4 no se debe a un efecto en la transcripción de su gen codificante.

Puesto que el alelo mutante *ago4-2* es el producto de una mutación puntual, se determinó si esta mutación causaba o no un efecto en la abundancia de la proteína. Para ello se realizaron experimentos de inmunodetección en las mismas condiciones ensayadas anteriormente. Los resultados mostraron que la abundancia de la proteína, en distintos estadios de germinación, no cambia significativamente con respecto a la proteína de la línea tipo silvestre; además, los cambios en su acumulación en respuesta a estrés ocurren en tiempos similares a los observados para la proteína de la línea tipo silvestre (Figura 13c y 13d). Esto demostró que la mutación puntual en *ago4-2* no afecta la acumulación de la proteína mutante ni su capacidad de acumularse en condiciones de alta salinidad.

En conjunto, estos datos demuestran, no solo que AGO4 se encuentra presente durante la germinación y el crecimiento temprano, sino que sus niveles se modulan en respuesta al estrés en concordancia con el rol funcional de la vía RdDM durante estos estadios del desarrollo y la respuesta a ambientes adversos.

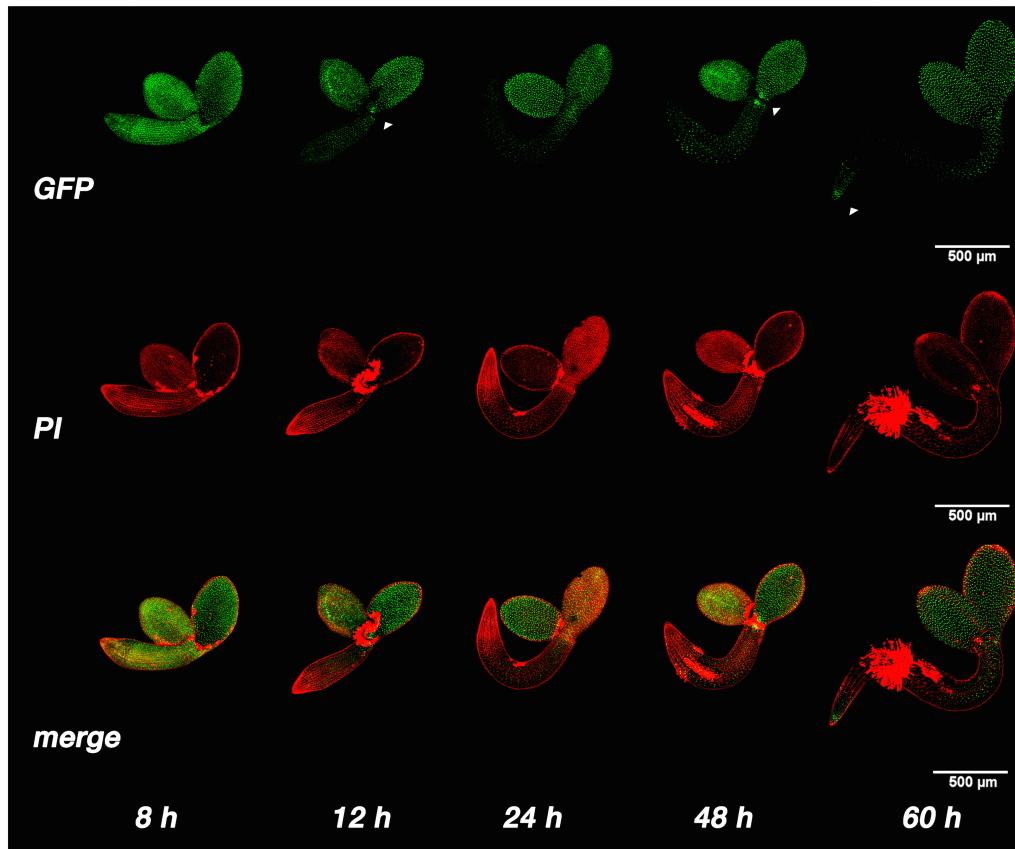
### **AGO4 se localiza diferencialmente en respuesta a salinidad**

Para explorar los tejidos de la plántula en las cuales RdDM podría ejercer su función durante la germinación de la semilla, se determinó la distribución tisular de AGO4 durante la germinación y el crecimiento temprano de la plántula, en

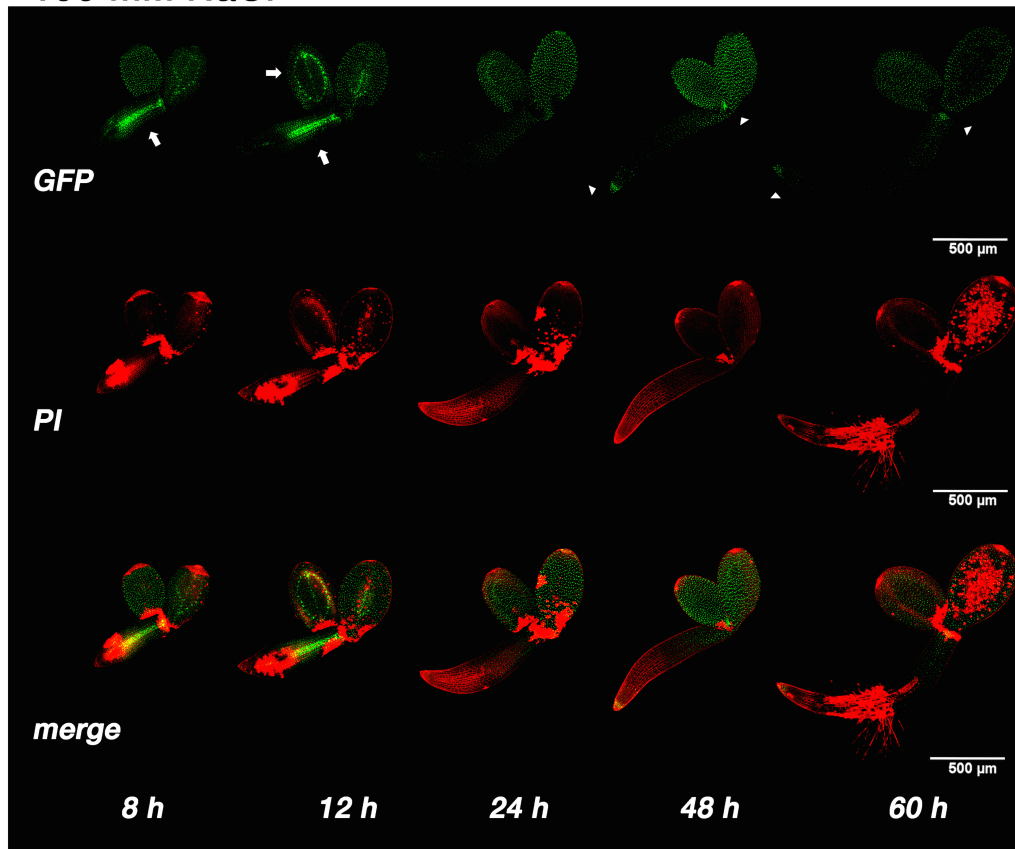
condiciones óptimas de germinación y durante salinidad. Para este fin se utilizó una línea transgénica que expresa una proteína de fusión que contiene a ARGONAUTA4 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en su extremo amino-terminal, y cuya expresión está dirigida por el promotor nativo del gen *AGO4* (*pAGO4::GFP-AGO4*) en un fondo tipo silvestre (Col-0). Dichas semillas fueron amablemente donadas por el Dr. Yijun Qi de la Universidad Tsinghua en China (Ye et al., 2012). La localización de esta proteína se determinó mediante la fluorescencia de GFP en embriones y plántulas aisladas a distintos tiempos durante la germinación y el crecimiento temprano, utilizando un microscopio confocal.

Los resultados mostraron que *AGO4* se presenta en alta abundancia y con amplia distribución en embriones muestreados 8 horas post-imbibición, dicha distribución no muestra un patrón preferencial en los distintos tejidos del embrión. Cabe remarcar que, justo después del rompimiento de la testa, la distribución de *AGO4* adquiere una compartimentación preferencial, manteniendo su abundancia en los cotiledones pero reduciéndola en la radícula, órgano en el que además se observó una distribución más dispersa. Dicha tendencia de compartimentación se mantiene hasta los últimos estadios del experimento (60 horas después de la estratificación), momentos en que la abundancia de la proteína es menor en comparación a los estadios tempranos (Figura 14a).

**a** Control



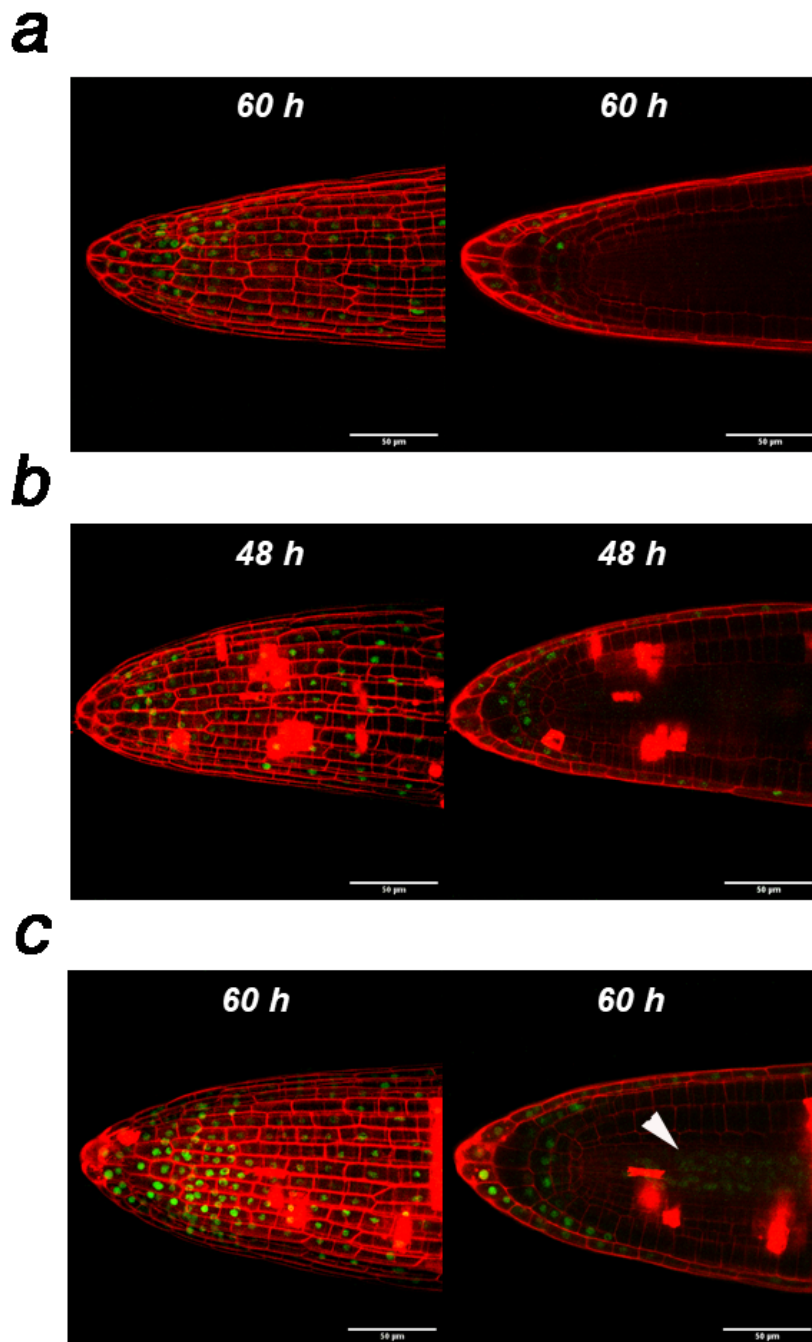
**b** 100 mM NaCl



**Figura 14. Distribución tejido-específica de la proteína de fusión GFP-AGO4 durante la germinación.** **a.** Detección de la fluorescencia de GFP en embriones aislados a 8, 12, 24, 48 y 60 horas después de la imbibición (GFP, arriba). Fluorescencia de yoduro de propidio sobre las mismas muestras (PI, medio). Ambas señales superpuestas (*'merge'*, abajo). **b.** Como en a. excepto que las semillas se germinaron en presencia de 100 mM de NaCl. Las imágenes obtenidas para cada estadio del desarrollo y cada condición experimental, son representativas de 8 individuos analizados, con 4 reproducciones biológicas. Las flechas blancas señalan acumulación en tejido vascular, y los triángulos blancos regiones meristemáticas.

Cuando el mismo experimento se realizó en plantas germinadas en condiciones de alta salinidad (100 mM NaCl) se observó un marcado cambio en la distribución de AGO4 desde los primeros estadios. En concreto, la fluorescencia de GFP se encuentra tanto en cotiledones como en radícula; sin embargo, se detectó una alta señal fluorescente, muy evidente, en tejido vascular de ambos órganos. Este patrón se mantiene después de la ruptura de la testa; en tanto que, en los estadios subsecuentes ocurre una reducción de los niveles de fluorescencia, hasta que difícilmente se detectó en las muestras correspondientes a las etapas más tardías (Figura 14b). Este cambio en la distribución de AGO4 sugiere que RdDM tiene una participación activa en la metilación de DNA en tejido vascular, posiblemente como un mecanismo de protección al daño de DNA causado por el transporte de la sal.

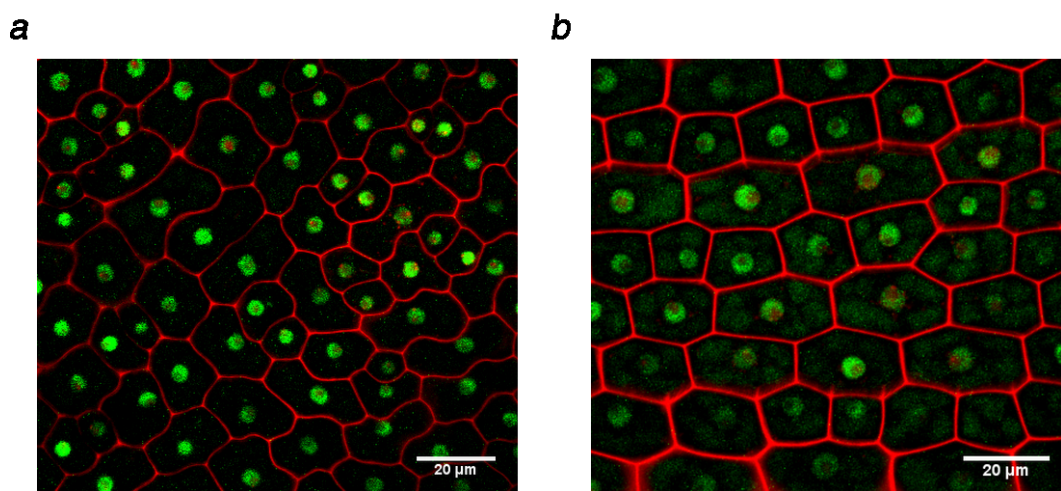
Notablemente, posterior a la ruptura de la testa, en ambas condiciones experimentales AGO4 se observó en foci distintivos de los cotiledones y la radícula, estos foci están localizados muy cerca de las zonas del meristemo apical del brote y de la punta de la raíz (Figura 14a, 14b y 15a - c). La localización en estos sitios es consistente con análisis previos de otros grupos de investigación que, mediante transcriptómica, encontraron una mayor abundancia de los transcritos para los elementos centrales de RdDM en la punta de la raíz de plántulas crecidas en condiciones óptimas (Kawakatsu et al., 2016); evidencia que apoya que la vía RdDM canónica juega un papel particular durante la germinación y en respuesta a salinidad.



**Figura 15. Localización de AGO4 en la región apical de la raíz. a.** Fluorescencia de GFP en raíces de embriones aislados después de 60 horas de imbibición en medio MS en tejido epidérmico (izquierda) y tejido central (derecha), **b.** Después de 48 horas en presencia de 100 mM de NaCl. **c.** Igual que en a. pero en presencia de 100 mM de NaCl. La punta de flecha indica señal aparente en tejido provascular. Las imágenes son representativas de 5 plantas analizadas, el experimento fue reproducido en 3 ocasiones con resultados similares.



Los experimentos de microscopía de fluorescencia también fueron útiles para explorar la localización intracelular de AGO4, confirmando que esta proteína se localiza preferencialmente en el núcleo de las células de los cotiledones y de las radículas (Figura 16a y 16b, respectivamente), consistente con su papel de metilación del DNA en el genoma nuclear y con los resultados de otros grupos (Pontes et al., 2009). Cabe hacer notar que AGO4 muestra una localización nuclear claramente punteada o como si se organizara en pequeños cuerpos esféricos, sugiriendo que forma 'agregados' o 'condensados' ribonucleoproteicos. Interesantemente se observó una acumulación de GFP-AGO4 fuera del núcleo en células de raíz tanto en condiciones control como de alta salinidad (Figura 16 y no mostrado), lo que sugiere que en este órgano, AGO4 tiene una regulación adicional a lo que ocurre en cotiledones.



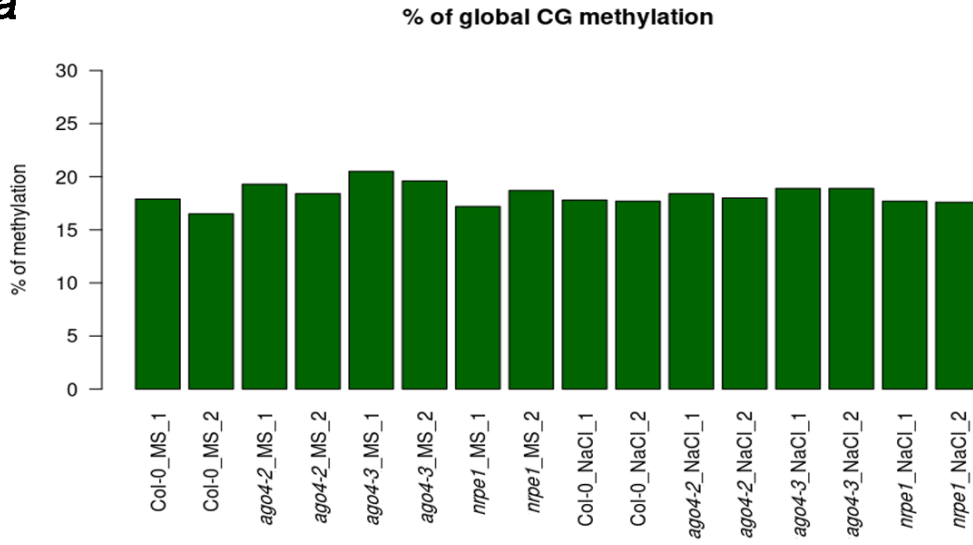
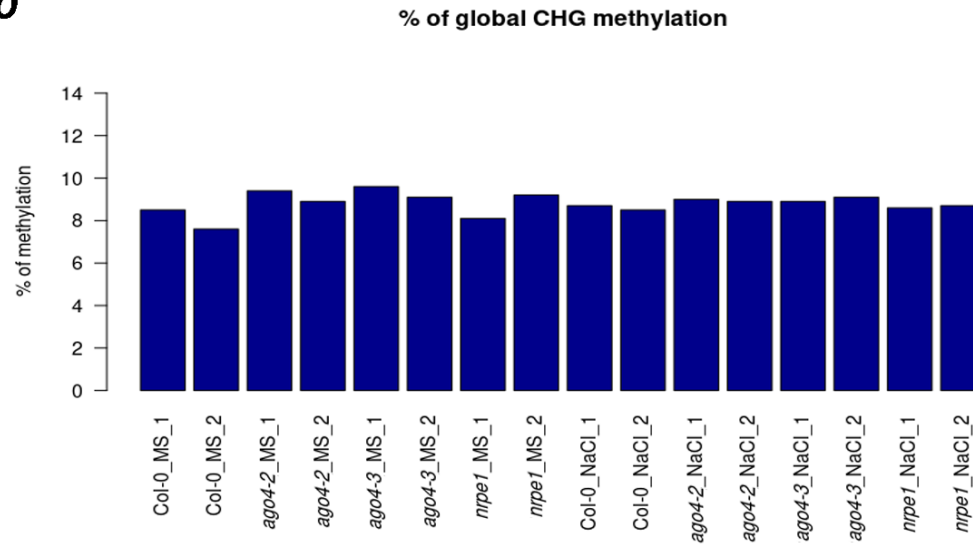
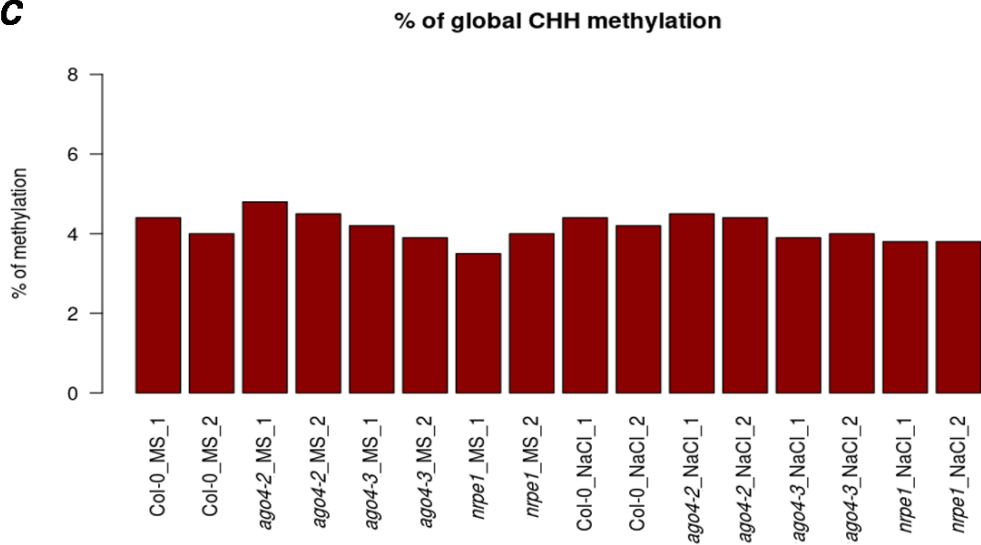
**Figura 16. Localización intracelular de AGO4 durante germinación.** **a.** Fluorescencia de GFP-AGO en tejido epidérmico de cotiledones obtenidos de plántulas después de 8 horas de germinación. **b.** Como en a. pero la imagen corresponde a células de una radícula de plántulas de las mismas condiciones. Es notable la señal observada fuera del núcleo celular. Las imágenes son representativas de 3 individuos analizados en tres experimentos independientes.

### **La pérdida de RdDM no repercute en la abundancia global de la metilación de DNA**

Para conocer el mecanismo mediante el cual AGO4 y RdDM ejercen su función durante la germinación, se exploraron los niveles de metilación de DNA en diferentes mutantes de la vía (*ago4-3*, *ago4-2* y *nrpe1-11*, un alelo nulo de Pol V)

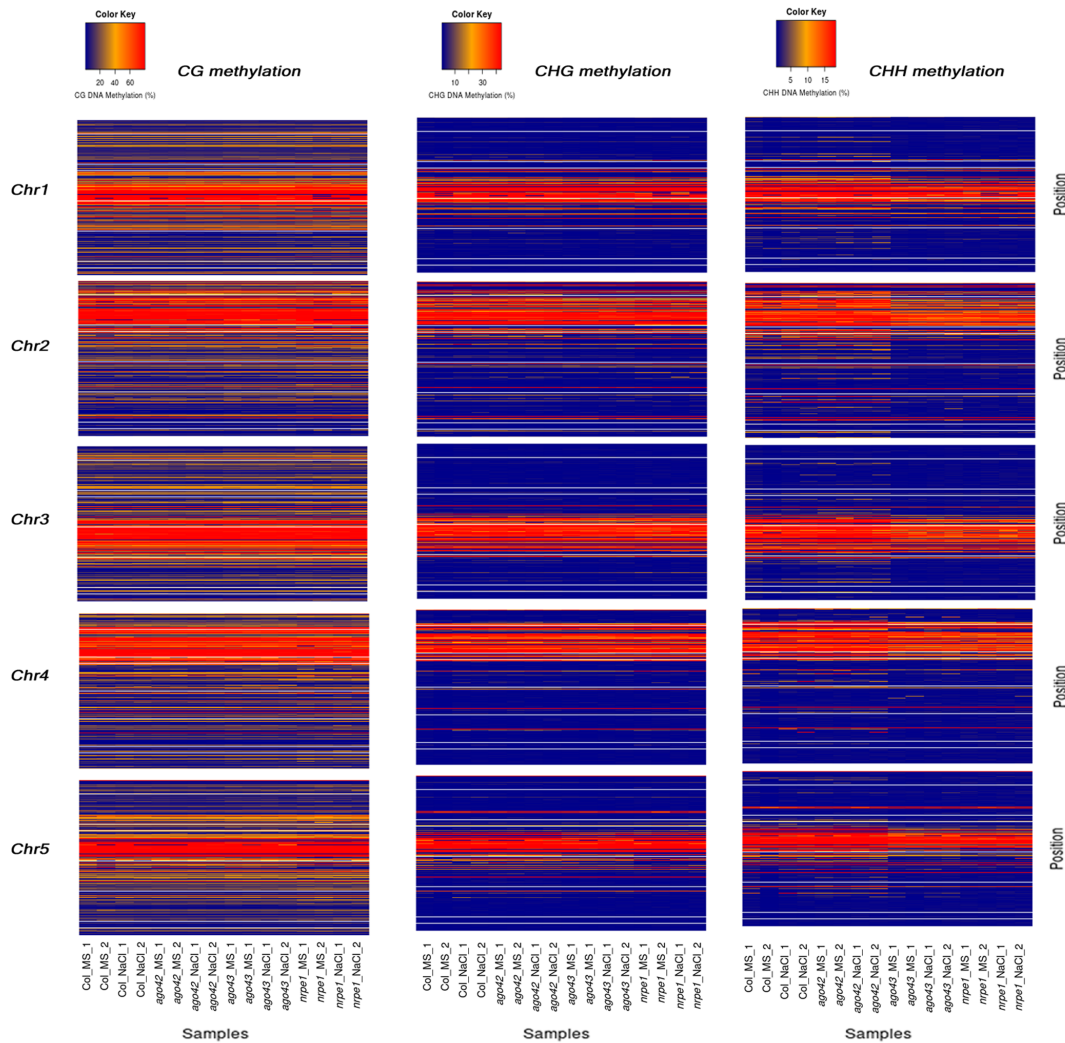
y en plantas tipo silvestre germinadas en condiciones óptimas de crecimiento y en medio salino (100 mM NaCl), mediante experimentos de secuenciación genómica por bisulfito de sodio (WGBS: Whole Genome Bisulfite Sequencing). Se eligió esta concentración de sales debido a que todas las líneas son muestreadas al mismo tiempo cuando alcanzan el 50 % de germinación; un tiempo mayor en presencia del estrés podría presentar efectos moleculares en las líneas con fenotipos más penetrantes.

Como se anticipó, dado el rol de RdDM en el control de la metilación de DNA, no se hallaron diferencias significativas en la proporción total de esta marca en ninguno de los contextos metilables encontrados en plantas (CG, CHG o CHH), tanto en las mutantes de RdDM como en la línea tipo silvestre (Figura 17a, 17b y 17c). Consistente con este hallazgo, también se encontró que la distribución de la metilación de DNA en los cromosomas de *Arabidopsis* tampoco se altera significativamente (Figura 18). Sin embargo, se observó un ligero cambio en la distribución de la metilación tipo CHH en las mutantes *ago4-3* y *nrpe1-11* (Figura 18), lo que sugirió que la ausencia de actividad de esta vía repercute en la metilación CHH de manera locus-específica. Estos resultados son consistentes con la actividad y distribución previamente reportada para RdDM en términos de metilación global y locus-específica (Schoft et al., 2009, Wierzbicki et al., 2012, Zhang and Zhu, 2012, Yaari et al., 2019, Gallego-Bartolome et al., 2019).

**a****b****c**

**Figura 17. Niveles globales de metilación de DNA en las diferentes mutantes de RdDM. a.** Porcentaje de metilación total en el contexto CG. **b.** Como en a. pero se representa la metilación CHG. **c.** Como en a. y b. pero se muestra la metilación CHH. El eje Y muestra el porcentaje de metilación global para cada contexto, mientras que el eje X representa los genotipos y condiciones analizadas (control "MS" y 100 mM de cloruro de sodio "NaCl"). La proporción de metilación se calculó con base en las citosinas metiladas vs. el total de citosinas en el genoma. Se muestran ambas réplicas biológicas.

Tampoco se halló una diferencia significativa en la abundancia o distribución de la metilación en respuesta a la salinidad en ninguno de los genotipos analizados (Figura 17 y 18), indicando que la salinidad tampoco altera significativamente la colocación de esta marca durante la germinación.

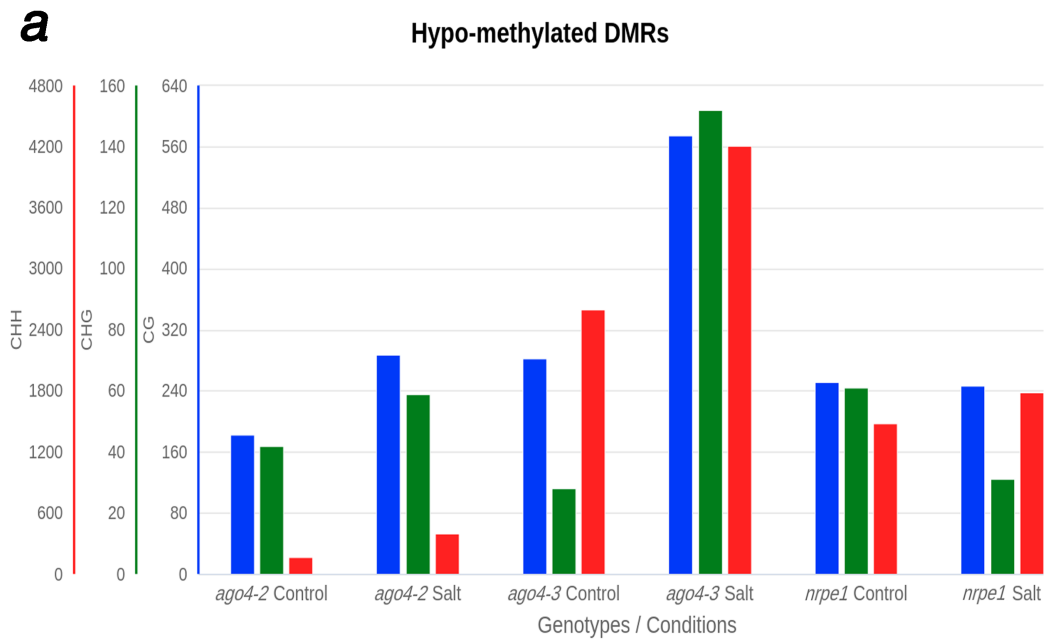


**Figura 18. Distribución de la metilación en los cinco cromosomas de *Arabidopsis*.** El código de color se indica arriba de cada columna para cada contexto: CG (izquierda), CHG (centro), y CHH (derecha). Las zonas con un rojo intenso marcan regiones centroméricas que usualmente tienen una mayor metilación. Se muestran ambas réplicas biológicas. El eje Y para cada gráfica representa la posición cromosómica, mientras que el eje X contiene los genotipos y condiciones analizadas

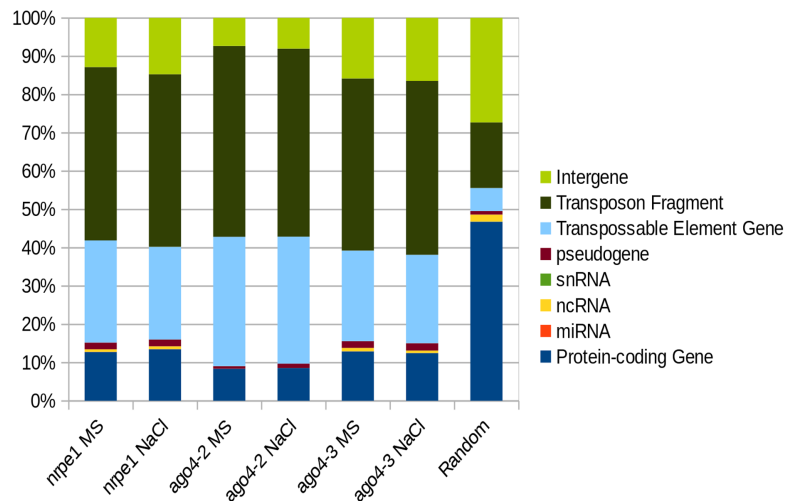
Para validar la participación de RdDM en la metilación CHH locus-específica, se realizó un análisis comparativo de regiones diferencialmente metiladas (DMR: Differentially Methylated Regions). Para este análisis, el genoma nuclear se dividió en ventanas de 100 nucleótidos de longitud y se determinaron los niveles de la metilación CHH dentro de cada ventana, para posteriormente compararlos con aquellos encontrados en los diferentes genotipos y condiciones de crecimiento (ver Materiales y Métodos para más detalles). Este análisis mostró una abundancia distinta de DMRs que pierden metilación (DMRs hipo-metiladas)

entre los diferentes genotipos analizados: 191, 2597 y 1481 (*ago4-2*, *ago4-3* y *nrpe1-11*, respectivamente) con respecto a la línea tipo silvestre (Col-0). El número de DMRs hipo-metiladas se incrementa a casi el doble en las mutantes en AGO4 (400 y 4206 en *ago4-2* y *ago4-3*, respectivamente), y un 20 % más en la mutante nula de Pol V (1787, Figura 19a) en respuesta a salinidad. En concordancia con el rol de RdDM en el mantenimiento de otros contextos de metilación [CG y CHG, (Law and Jacobsen, 2010b)], también se observó un incremento en las DMRs hipo-metiladas CG y CHG en respuesta a la salinidad (Figura 19a). Estas evidencias apoyan la conclusión de que RdDM tiene un papel en la metilación locus-específica en respuesta a esta condición adversa.

Análisis de superposición entre las DMRs hipo-metiladas en el contexto CHH y diferentes regiones genómicas mostraron que la mayoría de las DMRs se localizan en transposones o en sus fragmentos, y menos del 20 % se localizan en genes codificantes de proteínas o en sus promotores (2 kpb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, Figura 19b), confirmando que RdDM mantiene el control de la metilación sobre transposones, pero con la posibilidad de modular la expresión de otros genes durante la germinación en las condiciones ensayadas.



**b**



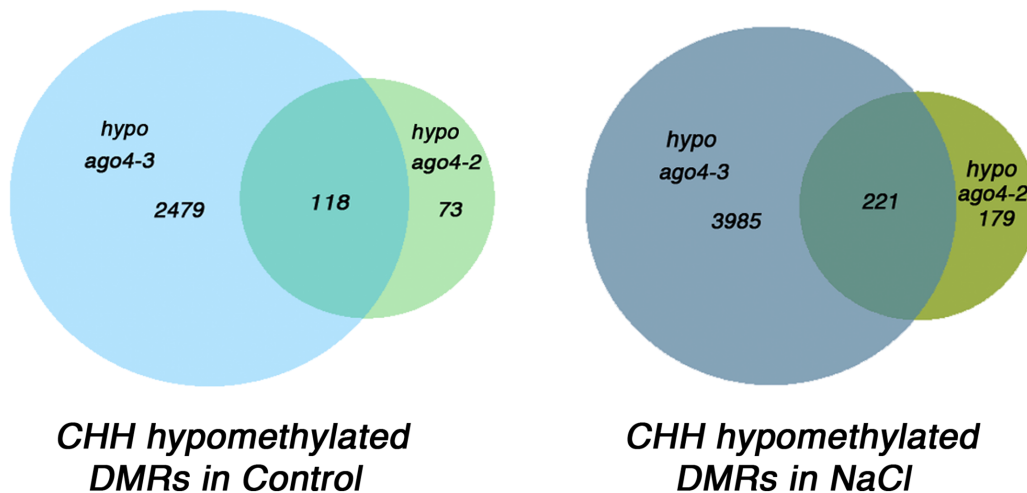
**Figura 19. Regiones diferencialmente hipo-metiladas identificadas en las mutantes de RdDM. a.** Número de DMRs hipo-metiladas en los contextos CG (rojo), CHG (verde) y CHH (azul). En el eje X se muestran los genotipos y condiciones analizadas, mientras que en los ejes Y el número total de DMRs encontrados **b.** Porcentaje de DMRs hipo-metiladas en el contexto CHH superpuestas con regiones genómicas. El eje de las ordenadas corresponde al porcentaje total de DMRs encontrados y el eje de las abscisas a los genotipos analizados. El código de colores corresponde a los modelos genómicos descritos en *Arabidopsis*. Se utilizó un subconjunto de regiones aleatorias como control experimental del enriquecimiento (Random).

## El alelo *ago4-2* genera una proteína AGO4 con baja actividad

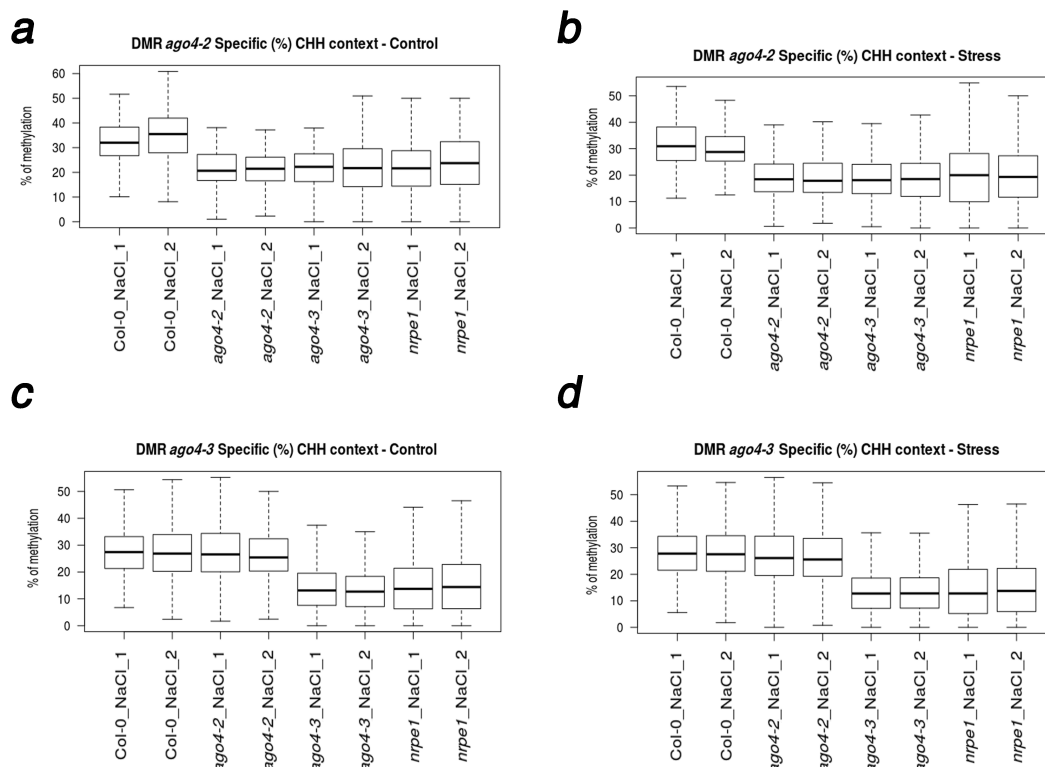
Debido a que *ago4-2* se describió como un alelo dominante negativo que codifica para una proteína con actividad deficiente (Agorio and Vera, 2007), se esperaba un efecto similar sobre la metilación como el que ocurre con la mutante nula (*ago4-3*). Sin embargo, la mutante nula tiene diez veces más DMRs hipometiladas en el contexto CHH comparado con *ago4-2*, tanto en condiciones control como en condiciones de alta salinidad (Figura 19a); adicionalmente, se demostró que la proteína producida por *ago4-2* se encuentra presente durante la germinación y es capaz de acumularse en condiciones de alta salinidad (Figura 13c y 13d). Estos datos sugieren que *ago4-2* es un alelo débil de AGO4 en términos de metilación de DNA.

Para explorar esta posibilidad se realizaron análisis de superposición entre las DMRs hipometiladas identificadas en ambas mutantes de AGO4, bajo condiciones óptimas y de altos niveles de sal y se clasificaron en tres grupos: DMRs específicas de *ago4-2*, DMRs específicas de *ago4-3*, y DMRs comunes en ambas. En condiciones control se pudieron encontrar 73, 2479 y 118 DMRs de cada categoría, mientras que en tratamiento de alto nivel de salinidad se encontraron 179, 3985 y 221 DMRs específicas de *ago4-2*, *ago4-3* y comunes, respectivamente. Esto indica que el 60 % de las DMRs encontradas en *ago4-2* también fueron identificadas como DMRs en *ago4-3* (Figura 20). Posteriormente, se analizó el nivel de metilación en el genoma de la mutante nula *ago4-3* (y de *nrpe1*, como referencia de RdDM), de las mismas DMRs que se identificaron como específicas para *ago4-2*. Se encontró que también existe una disminución de la metilación en estas regiones, la cual es menor a la requerida de acuerdo a los parámetros usados para la identificación de una DMR (10 % de disminución con respecto a la metilación de la misma región en plantas tipo silvestre, Figura 21a y 21b). Cuando se realizó el experimento inverso, es decir, se analizó la metilación de las regiones *ago4-3* específicas en el genoma de *ago4-2*, se encontró que no existe cambio alguno en la metilación de estas regiones, con respecto a las plantas tipo silvestre; sin embargo, se mantuvo una metilación disminuida en la mutante *nrpe1* (Figura 21c y 21d).





**Figura 20. Superposición de las DMRs hipometiladas en CHH entre las mutantes de AGO4.** En los diagramas de Venn se representan las DMRs identificadas en condiciones control (izquierda) y alto nivel de salinidad (derecha). Los números corresponden a los DMRs totales identificados para cada mutante en ambas condiciones.



**Figura 21. Perfil de metilación de las DMRs específicas de ago4-2 y ago4-3 sobre otros fondos mutantes. a y b.** Metilación de las regiones específicas de ago4-2, en los genomas de Col-0, ago4-2, ago4-3 y nrpe1, en condiciones control (MS) y de altos niveles de sal (NaCl). **c y d.** Análisis de la metilación de las DMRs específicas de ago4-3, como en a. y b., respectivamente. Se

muestran ambas replicas biológicas. El eje Y representa el porcentaje de metilación de las DMRs mientras que el eje X representa los genotipos y condiciones analizadas. Se muestran ambas réplicas analizadas independientemente. Las cajas representan la mediana y los cuartiles inferior y superior, mientras que las barras de error representan los datos extremos superior e inferior, se omiten puntos atípicos.

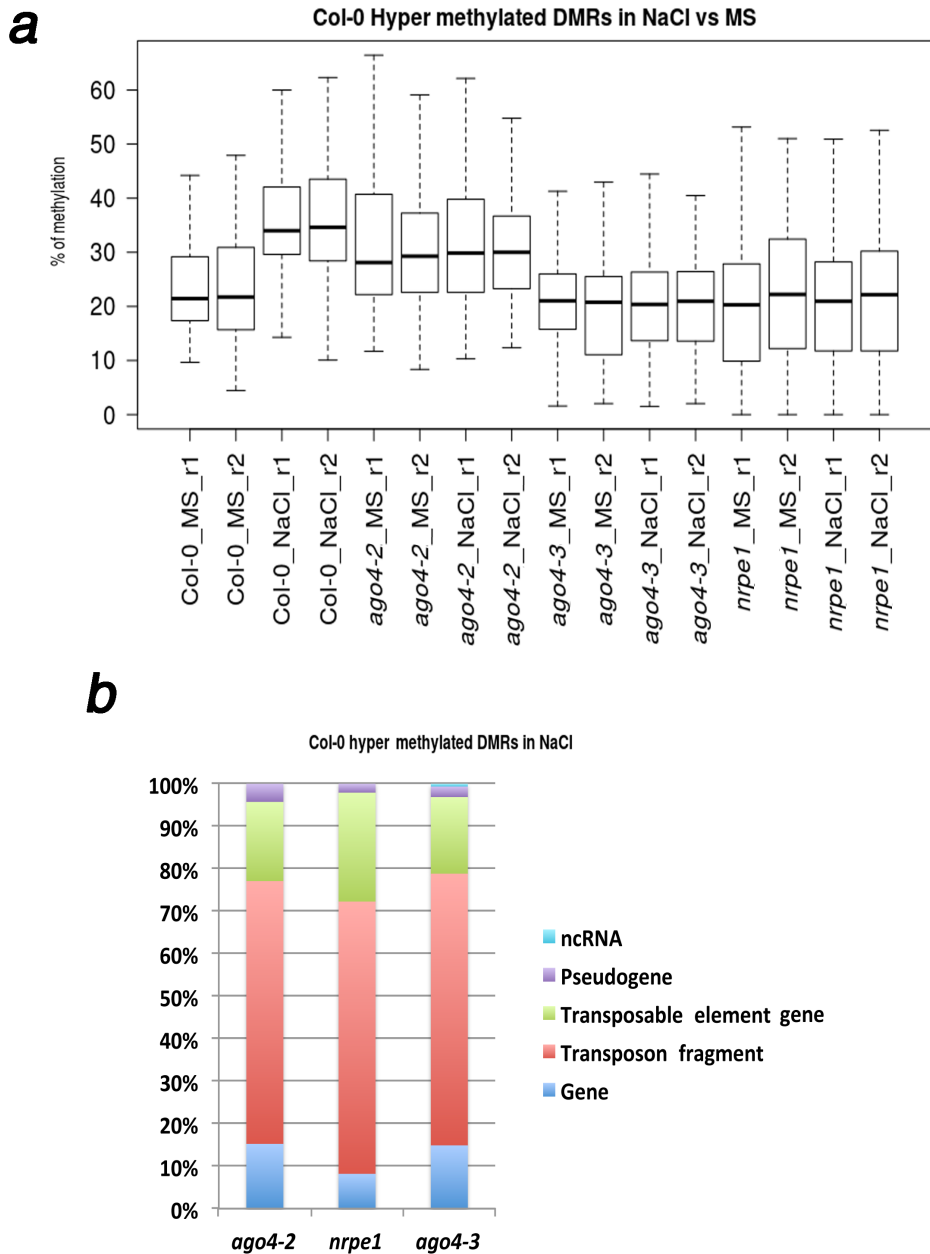
En conjunto, estos datos indican el alelo *ago4-2* codifica para una proteína AGO4 cuya actividad de metilación de DNA es menor que una proteína AGO4 de plantas tipo silvestre, pero no se reduce en los niveles observados en ausencia de AGO4 o una RdDM no funcional. A pesar de la actividad residual de *ago4-2* en términos de metilación de DNA, su fenotipo es claramente similar al observado en *nrpe1* y otras mutantes en las proteínas núcleo de RdDM (Figura 5), lo que indica que, a pesar de que el efecto en la metilación por *ago4-2* no es tan penetrante como lo que se observa en *nrpe1*, es suficiente para alterar el impacto de RdDM sobre la germinación en condiciones de alta salinidad.

### **La vía RdDM controla la metilación CHH locus-específica en respuesta a salinidad**

Para identificar aquellas regiones en el genoma que son reguladas específicamente por RdDM en respuesta a salinidad durante la germinación, y considerando que la actividad principal de RdDM es la de metilar sitios CHH (Matzke and Moshier, 2014), se decidió analizar aquellas DMRs en la línea tipo silvestre que ganaran metilación en respuesta a la sal, comparando contra condiciones control, en el contexto CHH (DMRs hiper-metiladas). Este análisis arrojó 170 DMRs con una mayor metilación en condiciones de sal contra lo que ocurre en medio óptimo de germinación en Col-0. Posteriormente, para determinar si AGO4 y RdDM participan en esta metilación, se compararon los perfiles de metilación de *ago4-2*, *ago4-3* y *nrpe1-11* con aquellos de la línea tipo silvestre sobre estas regiones en las condiciones mencionadas.

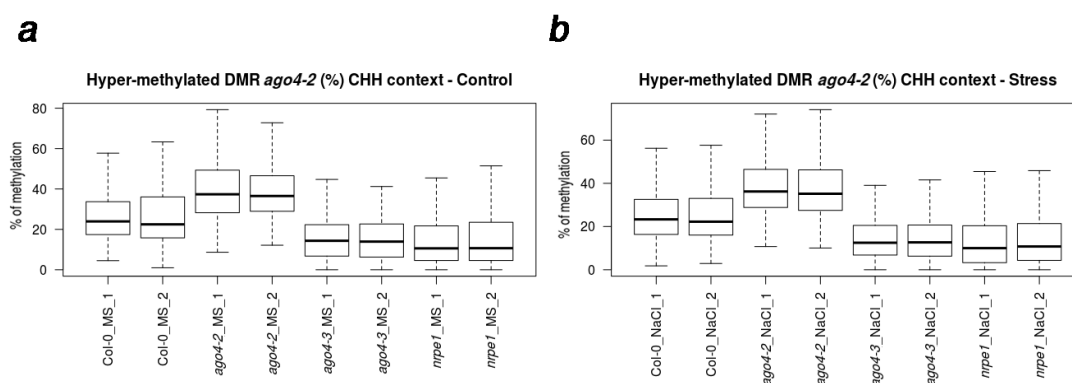
Los resultados mostraron que, mientras existe una ganancia de metilación en la línea tipo silvestre en condiciones de alta salinidad comparada con condiciones control, las diferentes mutantes no muestran tal diferencia; en cambio, la

metilación en condiciones de alta salinidad es similar a la encontrada en condiciones control, incluso los niveles de metilación son comparables a lo observado en la línea tipo silvestre en condiciones óptimas de germinación. Adicionalmente, como se anticipa de un alelo débil de AGO4, la mutante *ago4-2* muestra niveles de metilación intermedios entre la línea tipo silvestre y la mutante nula *ago4-3* en condiciones de alta salinidad (Figura 22a). Análisis de superposición entre los DMRs hiper-metilados en Col-0 y regiones genómicas mostraron que la mayoría de las regiones corresponden a aquellas relacionadas con ET (transposones y sus fragmentos), que son blancos típicos de RdDM (Figura 22b). Estos resultados indican que los cambios en la metilación tipo CHH en respuesta a salinidad dependen de AGO4 y de la actividad de RdDM.



**Figura 22. Metilación CHH de las DMRs hiper-metiladas por salinidad en Col-0. a.** Comparación de los niveles de metilación entre las líneas Col-0, *ago4-2*, *ago4-3* y *nrpe1* en condiciones control (MS) y salinidad (NaCl) de los DMRs hiper-metilados identificados en Col-0 en salinidad contra condiciones control. Se muestran independientemente ambas réplicas biológicas. Las cajas representan la mediana y los cuartiles inferior y superior, mientras que las barras de error representan los datos extremos superior e inferior, se omiten puntos atípicos. **b.** Proporción de los DMRs hiper-metilados sobre los modelos genómicos. Se muestran datos de las mutantes *ago4-2*, *ago4-3* y *nrpe1* para las dos replicas en conjunto. El valor máximo en el eje Y corresponde al número total de DMRs hiper-metilados identificados en cada en cada mutante (eje X), los colores corresponden a cada uno de los modelos genómicos representados

Resultó interesante que parece existir una ligera hiper-metilación en el genoma de *ago4-2* en comparación a Col-0 en condiciones de crecimiento en MS (Figura 22a), sugiriendo que la proteína producida por *AGO4-2* conserva algunos blancos con respecto a la proteína de plantas tipo silvestre y dirige su actividad residual sobre estos, resultando en una hiper-metilación. Para explorar esta posibilidad se identificaron regiones diferencialmente hiper-metiladas en *ago4-2* con respecto a Col-0, tanto en control como en condiciones de salinidad, y se exploraron los niveles de metilación de las mismas regiones en los genomas de la mutante nula *ago4-3* y de *nrpe1*. Se encontraron 446 y 833 DMRs hiper-metiladas en *ago4-2* en control y sal, respectivamente, mismas que muestran una reducción sustancial de la metilación en los genomas de las mutantes *ago4-3* y *nrpe1*, así como en la línea tipo silvestre Col-0, tanto en condiciones de germinación óptima como en estrés salino (Figura 23a y 23b). Estos resultados sugieren que la actividad residual de *ago4-2* tiene la capacidad de exacerbar la metilación en aquellos blancos que aún mantiene respecto a *ago4*.



**Figura 23. Metilación de las DMRs hiper-metiladas específicas de *ago4-2* en los genomas las diferentes líneas. a.** Patrón de metilación en las mutantes *ago4-2*, *ago4-3* y *nrpe1*, comparados con Col-0 de las DMRs hiper-metiladas específicas de *ago4-2* identificadas en condiciones control. **b.** Similar a a. con las DMRs identificadas en condiciones salinidad. El eje Y corresponde al porcentaje de metilación de cada DMR mientras que el eje X las condiciones ensayadas. Las cajas representan la mediana y los cuartiles inferior y superior, mientras que las barras de error representan los datos extremos superior e inferior, se omiten puntos atípicos. Dos replicas biológicas son independientemente mostradas.

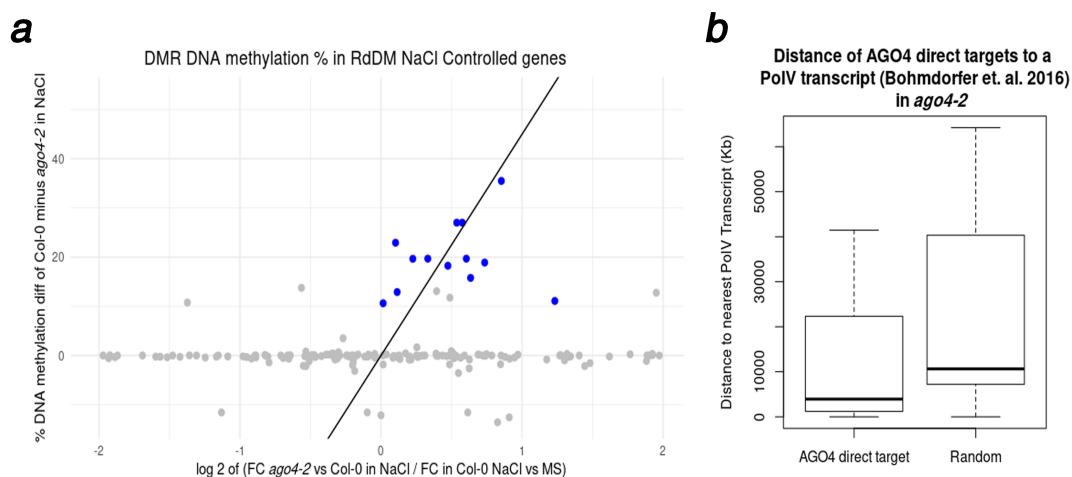
## **RdDM participa en el control del tiempo de germinación**

Para obtener información sobre el impacto de AGO4 y RdDM sobre la expresión genética durante la germinación en condiciones de alta salinidad, se realizó un experimento de secuenciación masiva de RNAs mensajeros (RNA-seq) utilizando semillas durante germinación de la línea tipo silvestre Col-0 y de las mutantes en AGO4 (*ago4-2* y *ago4-3*).

El enfoque inicial fue conocer si existía una relación entre el aumento en la metilación en Col-0 en condiciones de salinidad, dependiente de RdDM, y la expresión genética. Por ello se buscaron genes que se localizaran en superposición con alguna de las 170 DMRs hipermetiladas de Col-0 identificadas en la sección anterior (Figura 22a), o que se encontraran en la vecindad de transposones que presentaran esta superposición (5 kpb río arriba y río abajo del ET o el fragmento de transposon. Figura 22b). Posteriormente se analizó si la expresión de estos genes se des-regulaba en las mutantes de AGO4; es decir, si dichos genes se reprimían en la línea tipo silvestre en presencia de alta salinidad, en concordancia con el incremento en la metilación de DNA y, posteriormente, si esta represión se perdía en las mutantes (ver Materiales y Métodos para más detalles).

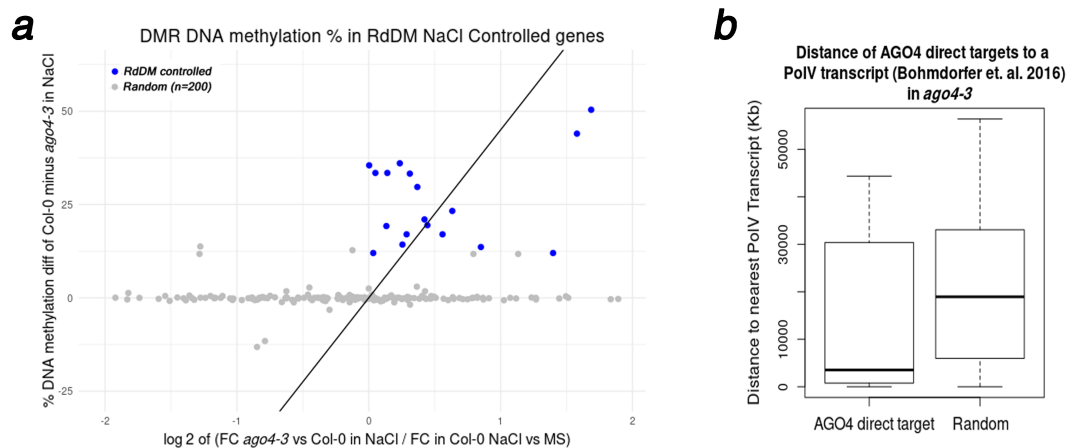
De 78 genes potenciales que mostraron un cambio significativo en la metilación al comparar Col-0 y *ago4-2* en condiciones de salinidad, se encontró un subconjunto de 13 genes cuyos transcritos se acumulan en menor nivel en Col-0 en respuesta a un alto nivel de sal, y en mayor nivel en *ago4-2*, consistente con una mayor metilación CHH en regiones aledañas a estos genes en el genotipo silvestre en esta condición (Figura 24a y Tabla 3). Este resultado indica que la metilación tipo CHH RdDM-dependiente es responsable de que estos genes se expresen en menor grado durante la germinación en condiciones de salinidad y que, además, esta represión se libera en ausencia de una vía RdDM funcional. Para profundizar en esta observación, se decidió investigar si estos genes se encontraban cercanos a una zona regulada por RdDM, utilizando una validación experimental independiente. Para este fin, se analizó la distancia de estos genes

hacia una zona transcrita por Pol V, identificada mediante experimentos de inmunoprecipitación de RNA (RIP-seq) en líneas tipo silvestre y mutantes carentes de Pol V (Bohmdorfer et al., 2016). Se observó que el sub-conjunto de 13 genes blanco identificados en *ago4-2* tiene una proximidad mayor hacia un transcrito de Pol V comparado con la distancia que existe entre un número similar de regiones en el genoma seleccionadas al azar, con el transcrito de Pol V más cercano (Figura 24b).



**Figura 24. Control de RdDM sobre la expresión de genes blanco directos identificados en *ago4-2*.** **a.** Correlación entre la des-represión transcripcional en la mutante *ago4-2* (eje x) y la metilación de DNA en la DMR cercana en Col-0 (eje y) para los blancos directos de *ago4-2* (puntos azules) y un set de 200 genes aleatorios (puntos grises). **b.** Distancia entre los genes blanco de RdDM y la región transcrita por PolV más cercana identificada por RIP-seq, comparada con la distancia del mismo número de regiones aleatorias. Las cajas representan la mediana y los cuartiles inferior y superior, mientras que las barras de error representan los datos extremos superior e inferior, se omiten puntos atípicos. Los datos para ambas gráficas provienen del conjunto de ambas réplicas analizadas por cada experimento.

Cuando este mismo análisis se aplicó a la mutante nula *ago4-3*, se encontraron 18 genes (de 83 candidatos originales) con represión des-regulada en la mutante en condiciones de salinidad, efecto que correlaciona con una mayor metilación en DMR cercana al blanco de RdDM (Figura 25a, Tabla 4). De manera similar, estos genes se encuentran más cercanos a un transcrito blanco de Pol V, identificado por RIP-seq, comparado contra un sub-conjunto de regiones aleatorias (Figura 25b).



**Figura 25. Control de RdDM sobre la expresión de genes blanco directos identificados en *ago4-3*.** **a.** Correlación entre la des-represión transcripcional en la mutante *ago4-3* (eje x) y la metilación de DNA en la DMR cercana en Col-0 (eje y) para los blancos directos de *ago4-3* (puntos azules) y un set de 200 genes aleatorios (puntos grises). **b.** Distancia entre los genes blanco de RdDM y la región transcrita por PoIV más cercana identificada por RIP-seq, comparada con la distancia del mismo número de regiones aleatorias. Las cajas representan la mediana y los cuartiles inferior y superior, mientras que las barras de error representan los datos extremos superior e inferior, se omiten puntos atípicos. Los datos para ambas gráficas provienen del conjunto de ambas réplicas analizadas por cada experimento.

Doce de los genes identificados de esta manera son comunes en ambas mutantes (Tablas 3 y 4), lo que indica que son blancos *bona-fide* de AGO4/RdDM. La existencia de blancos adicionales específicos de *ago4-3* (6 genes) podría ser consecuencia de la pérdida total de la actividad de AGO4 o, alternativamente, de la interferencia de AGO6, como se demostró en secciones anteriores.

La mayoría de los genes blanco (8 candidatos) están relacionados con transducción de señales u otras funciones regulatorias, algunas de ellas involucradas en el control de la dormancia o la germinación, o en funciones relacionadas a estos procesos (Tabla 5). Entre ellos destaca el gen *EBF1* (EIN3 Binding F-Box 1), que codifica para una proteína E3-ubiquitina ligasa, la cual en conjunto con *EBF2* es esencial para una óptima señalización mediada por etileno (Binder et al., 2007), resaltando así el control de la dormancia de la semilla a través de la vía etileno – *DOG1* (Delay of Germination 1), en respuesta a estrés (Nishimura et al., 2007, Li et al., 2019). De la misma manera es importante resaltar al gen *NAC4*, que codifica para un factor de transcripción cuya expresión

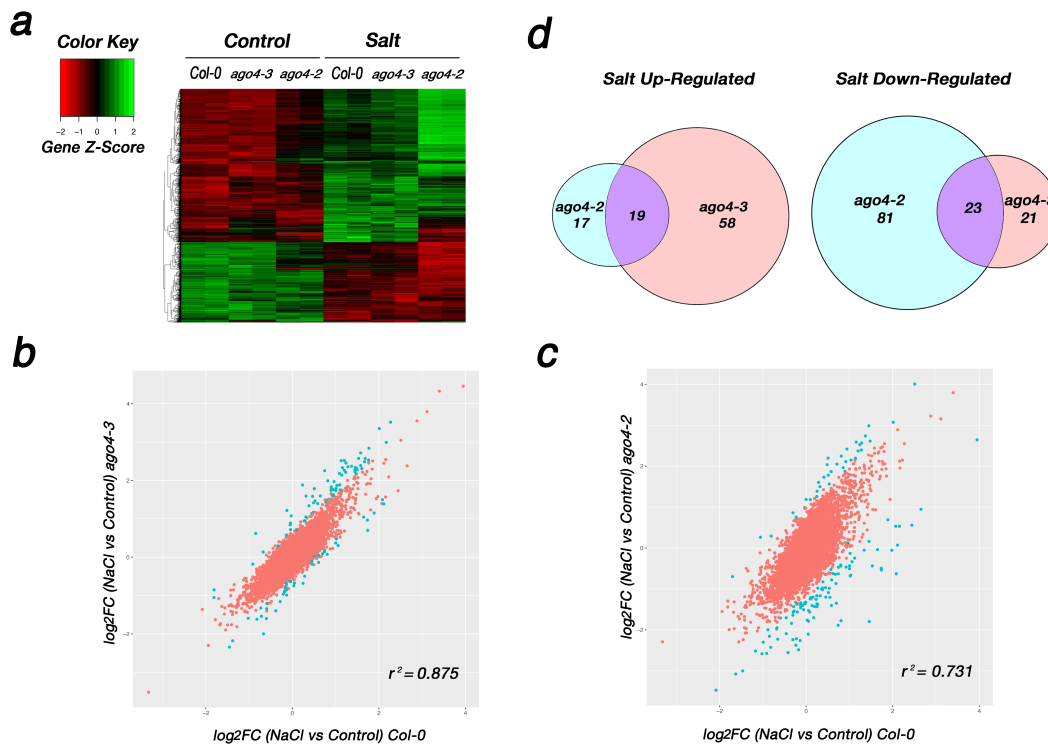


está regulada por AFB3, un receptor de auxinas involucrado en varios aspectos del desarrollo vegetal, incluyendo el control de la dormancia de la semilla mediada por auxinas (Vidal et al., 2014, Lee et al., 2017, Liu et al., 2013).

Es importante destacar que en estos análisis se encontró como blanco directo al gen At5g52070, que codifica para una proteína con dominios tipo Agenet, que previamente fue propuesto como un blanco directo de RdDM (Kurihara et al., 2008). Esto indica que la regulación por la vía RdDM está conservada entre distintas etapas del desarrollo.

### **El control de RdDM sobre la germinación involucra la regulación de blancos secundarios**

Más allá de los blancos directos, el fenotipo observado en las mutantes de RdDM puede implicar la regulación de varios blancos indirectos o secundarios. Para caracterizar el impacto a gran escala de AGO4 y RdDM sobre la germinación en respuesta a salinidad, se analizó la acumulación diferencial de transcritos entre las mutantes *ago4-2* y *ago4-3* con la línea tipo silvestre. Se encontró que los perfiles transcripcionales son similares entre la mutante nula *ago4-3* y la línea tipo silvestre, y ligeramente diferentes con *ago4-2* (Figura 26a, 26b y 26c). Interesantemente, también se encontraron diferencias entre la línea tipo silvestre y las mutantes en condiciones óptimas de crecimiento (Figura 26a), lo que indica que, a pesar de que las mutantes de RdDM no muestran un fenotipo obvio en condiciones óptimas (Figura 5b y 6b), tienen efectos sobre la regulación genética.

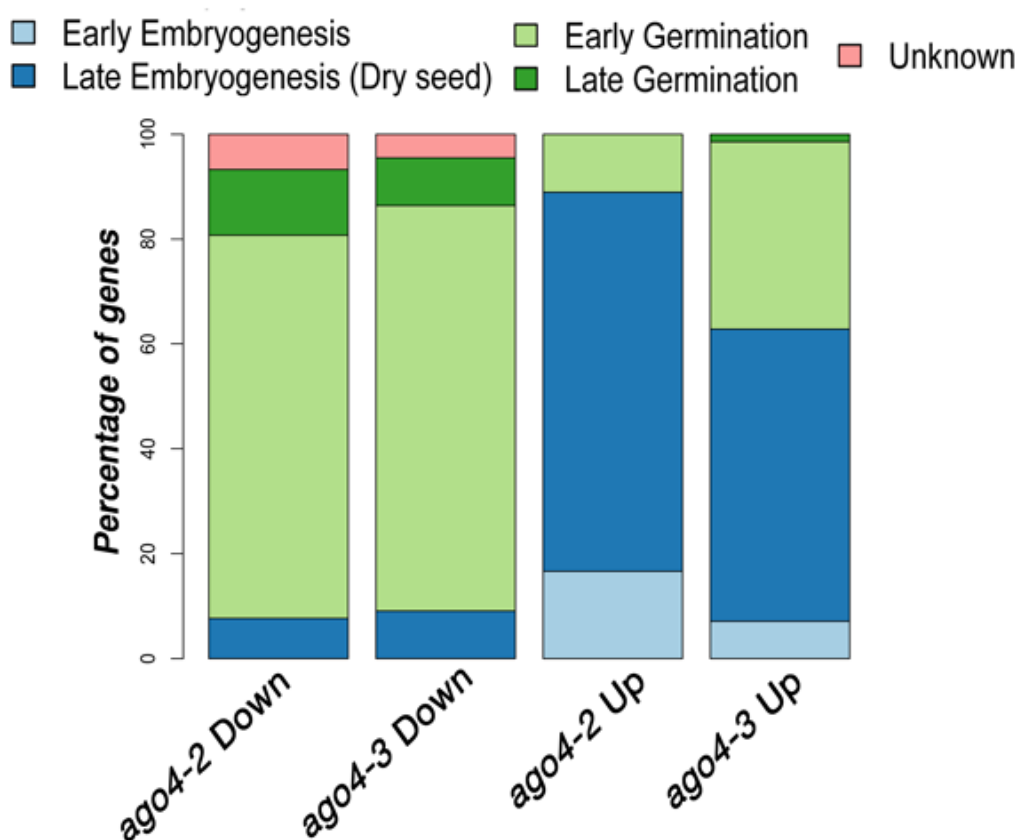


**Figura 26. Cambios transcripcionales en las mutantes de AGO4 durante la germinación. a.** Perfil transcripcional de las mutantes *ago4-2* y *ago4-3* comparadas con Col-0 en condiciones óptimas y de salinidad. El código de color está expresado en número de desviaciones estándar de la media en escala logarítmica (z-score) y se pueden interpretar como represión (rojo) y activación transcripcional (verde) cada línea en el eje Y corresponde a un gen analizado. Se muestran resultados del conjunto de las dos réplicas biológicas **b.** Comparación del perfil transcripcional entre *ago4-2* y Col-0 con respecto a la respuesta a la salinidad. Los puntos rojos siguen una correlación entre ambas líneas mientras que los azules son identificados como específicos. Se muestra la  $r^2$  como medida de correlación. **c.** como en b. pero comparando *ago4-3* con Col-0. **d.** Superposición de los genes específicos de *ago4-2* y *ago4-3* producto de los análisis mostrados en b. y c. (puntos azules).

Para identificar aquellos transcritos que se acumulan diferencialmente entre la línea tipo silvestre y ambas mutantes de AGO4, se realizaron análisis de correlación en respuesta al estrés, mismos que mostraron un perfil transcripcional de respuesta a sal similar con algunas diferencias particulares (Figura 26b y 26c, puntos azules). Posteriormente, se seleccionaron aquellos transcritos que no siguieron dicha correlación. Como se esperaba, muchos de estos transcritos se comparten entre *ago4-2* y *ago4-3* (Figura 26d), las mayores diferencias en abundancia se encontraron entre transcritos cuya función está

asociada con la maduración de la semilla, dormancia y germinación (Figura 27), muchos de ellos relacionados con funciones metabólicas.

Consistente con una germinación acelerada en *ago4-3*, esta mutante muestra una sobre-regulación de transcritos involucrados en la germinación y el crecimiento temprano (Figura 27). En este caso destacan aquellos que codifican para proteínas fosfatasa tipo 2C [AHG1 (ABA-hypersensitive germination) y AHG3], proteínas que son conocidas por interactuar con DOG1, un regulador clave de la germinación independiente de ácido abscísico (Nishimura et al., 2007, Nee et al., 2017, Li et al., 2019). En este sentido también destaca la proteína ILITHYA (ILA), la cual media la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  por medio de la activación de GCN2, involucrándose así en la modulación de la traducción durante la recuperación del estrés (Faus et al., 2018). Adicional a esto, también se identificaron transcritos involucrados en el crecimiento y metabolismo, como proteínas ribosomales, enzimas como sacarosa sintetasa, fosfofructocinasas, la proteína 'stay-green', y una proteína SnRK1 que está involucrada en la modulación del metabolismo de carbono, entre otras.

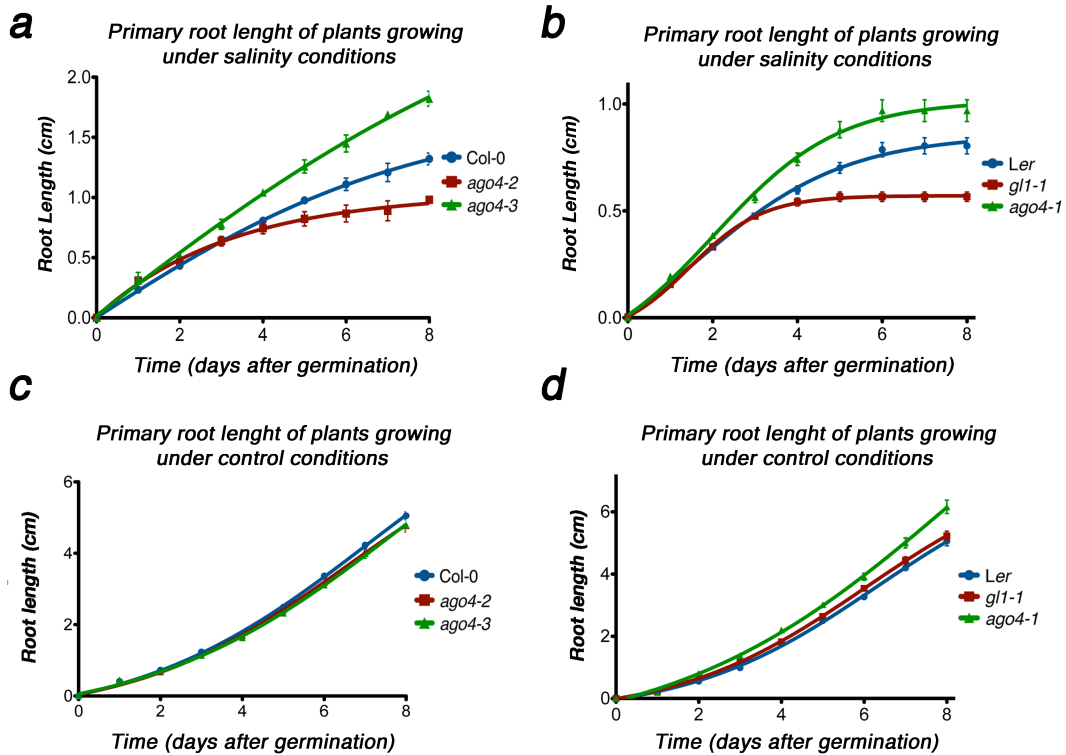


**Figura 27. Proporción de los transcritos de respuesta a sal en las mutantes *ago4-2* y *ago4-3*.** La clasificación se realizó sobre embriogénesis temprana y tardía (desarrollo y maduración de la semilla, respectivamente), y germinación temprana y tardía (germinación *sensu stricto* y crecimiento temprano, respectivamente). La clasificación de un transcrito se realizó considerando el pico de acumulación para cada gen dentro de los estadios analizados. Se muestra el porcentaje de genes por cada categoría en el eje Y, y la regulación transcripcional en cada mutante en el eje X. Los colores corresponden a cada categoría analizada.

Entre los genes afectados en *ago4-2* se encontró que el gen *AHG1* también está sobre-expresado, indicando que la vía AGO4/RdDM modula indirectamente su transcripción. Adicionalmente otros transcritos se acumulan en esta mutante, como lo son aquellos que codifican para varias proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA); así como, para ANAC032, un factor de transcripción involucrado en la inhibición de la fotosíntesis y la reprogramación de los metabolismos de carbono y nitrógeno (Sun et al., 2019), procesos que pudiesen estar relacionados con una germinación retrasada.

### **La participación de RdDM en la respuesta a estrés durante la germinación de las semillas se extiende a otras etapas del desarrollo**

Para comprender la importancia de la vía RdDM en la respuesta a salinidad, se analizó si existía un fenotipo asociado a su pérdida en otros estadios del desarrollo vegetal. Para este fin, se analizó la longitud de la raíz primaria en las mutantes de AGO4 (*ago4-2* y *ago4-3*) bajo fondo Col-0 y la mutante *ago4-1* bajo fondo *Ler*, germinadas y crecidas en condiciones óptimas y de altos niveles de sal (100 mM NaCl). Los resultados mostraron una longitud de la raíz primaria más larga en las mutantes nulas, comparada contra las líneas tipo silvestre, cuando crecen en condiciones de salinidad (Figura 28a y 28b); mientras que, la mutante débil de AGO4 (*ago4-2*) mostró una raíz más corta (Figura 28a). Cuando las plántulas crecen en condiciones óptimas, la longitud de sus raíces primarias es muy similar (Figura 28c y 28d). Esto sugiere que AGO4 y RdDM juegan un papel importante en la respuesta a salinidad más allá del momento de la germinación.



**Figura 28. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de la raíz en las mutantes de AGO4.** **a.** Longitud de la raíz primaria en plántulas de *Arabidopsis* de las líneas Col-0, *ago4-2* y *ago4-3* germinadas en presencia de 100 mM de NaCl. **b.** Longitud de la raíz primaria en plántulas de *Arabidopsis* de las líneas *Ler*, *ago4-1* y *gl1-1* germinadas en presencia de 100 mM de NaCl. **c y d.** Como en a. y b., respectivamente, en plántulas crecidas en condiciones control. Se muestran resultados de al menos 15 plantas por cada genotipo en cada réplica biológica. En el eje Y se muestra la longitud de la raíz, expresada en centímetros y en el eje X los días después de la germinación. Las barras de error corresponden al error estándar de los datos en tres replicas biológicas.

## Discusión

A pesar de que la mayoría de la información acerca de los roles regulatorios de la vía RdDM ha sido analizada en procesos reproductivos (Matzke and Moshier, 2014, Matzke et al., 2015), existen algunos ejemplos donde la contribución de esta vía a la respuesta a estrés abiótico ha sido investigada (Ito et al., 2011, Matsunaga et al., 2012, Tricker et al., 2012, Popova et al., 2013, Chan et al., 2016). En estos casos, el control de la expresión de los elementos transponibles ha sido descrito como uno de los mecanismos capaces de modular indirectamente la transcripción de una amplia gama de genes (Secco et al., 2015, Au et al., 2017). Sin embargo, solo un puñado de genes ha sido identificado como blancos directos de la actividad de RdDM (Kurihara et al., 2008, Au et al., 2017, Iwasaki et al., 2019b). Recientemente se reportó también que una vía RdDM no canónica participa en el control materno de la dormancia de la semilla en *Arabidopsis*, así como la dormancia producida por frío durante el desarrollo de la semilla (Iwasaki et al., 2019a).

El trabajo realizado como parte de esta tesis se enfocó en establecer la participación de la vía RdDM en estadios posteriores al desarrollo y dormancia de la semilla, es decir, durante la germinación, que es el proceso más crítico del desarrollo en el cual la planta incipiente está expuesta a las inclemencias del ambiente y, por medio de mecanismos muy finos de control, la planta toma la decisión de germinar cuando las condiciones son favorables. Es por esto que el estudio de la participación de RdDM y otras vías de regulación en la respuesta al estrés en esta etapa de la vida vegetal cobra una gran relevancia.

Una vía RdDM funcional se requiere para la modulación del proceso de germinación en altos niveles de sal, esto se demostró dado los fenotipos que mostraron las mutantes que carecen de las proteínas o de la actividad de los elementos centrales de esta vía. Ello también implica que RdDM es esencial en el momento que la semilla toma la decisión de germinar. Inesperadamente, la pérdida total de AGO4, una proteína clave para la fase de establecimiento de la metilación dirigida por RdDM, da lugar a un fenotipo contrario al mostrado por

las demás mutantes de RdDM. Los datos obtenidos demostraron que este efecto es el resultado de la intervención de AGO6, posiblemente provocando efectos inesperados y variados río-abajo de la regulación de RdDM, generando así un fenotipo sintético, y no por una actividad adicional de AGO4 independiente de RdDM. AGO4 y AGO6 tienen preferencia por siRNAs con características similares (24 nt. de longitud), y además se ha demostrado que tienen redundancia funcional en ciertos procesos del desarrollo (Mi et al., 2008, Havecker et al., 2010, McCue et al., 2015, Duan et al., 2015). Sin embargo, sus patrones de acumulación en semillas están lejos de ser iguales (Havecker et al., 2010, Eun et al., 2011), por lo que es posible pensar que AGO6 solamente está supliendo la pérdida de AGO4 en los tejidos en los que se llega a expresar [meristemas (Eun et al., 2011)], posiblemente, cargando siRNAs huérfanos dada la ausencia de AGO4. Los niveles bajos y estables de acumulación del transcrito de AGO6 soportan esta hipótesis, sugiriendo fuertemente que AGO6 es incapaz de complementar eficientemente todas las funciones perdidas en la mutante nula de AGO4.

Por otro lado, la mutante *ago4-2*, cuya actividad de metilación de DNA está reducida, muestra un fenotipo similar a las demás mutantes en elementos de RdDM, sugiriendo que aún así es capaz de unir siRNAs endógenos; y que los efectos hallados en esta mutante son suficientes para desencadenar un fenotipo similar a la ausencia completa de RdDM. Esta hipótesis está soportada dada la evidencia que mutantes en los residuos necesarios para la actividad de corte 'slicer' de AGO4 son capaces de seguir uniendo siRNAs (Ye et al., 2012, Qi et al., 2006).

En concordancia con el involucramiento de RdDM en los procesos de germinación en condiciones óptimas [este trabajo, (Kawakatsu et al., 2017)], AGO4 se acumula en altos niveles en semillas secas, sus niveles aumentan durante la germinación y, posteriormente, son muy bajos y, por tanto, difícilmente detectables en plántulas. La distribución de AGO4 cambia de igual manera en condiciones óptimas de germinación, en algunos momentos concentrándose en zonas meristemáticas del brote y la raíz. Como se mencionó

en párrafos anteriores, AGO6 tiene una función esencial en el mantenimiento de meristemas, principalmente el meristemo apical del brote (Eun et al., 2011), por lo que es posible que sea en estos tejidos en los cuales se da la complementación parcial por AGO6 en ausencia de AGO4. De la misma manera, la distribución de AGO4 en estadios post-germinación en condiciones óptimas de crecimiento muestra una restricción hacia los cotiledones y se reduce drásticamente en la radícula, lo cual es consistente con la participación de RdDM en la confrontación de las plántulas a nuevos ambientes.

La germinación en presencia de altos niveles de salinidad en el medio genera un cambio drástico en la acumulación y distribución de AGO4; en particular, la proteína responde positivamente a la presencia de sal durante la estratificación, y posteriormente se relocaliza en la vasculatura del embrión. A pesar de que por ahora no se cuenta con una evidencia sólida para explicar este cambio en la distribución, la relocalización puede ser consecuencia de un estrés severo alrededor de los haces vasculares, donde la sal es transportada desde el medio hacia los diferentes tejidos de la planta. Consistente con esta hipótesis, se ha descrito que una vía no canónica de RdDM está involucrada en la protección a daño en el DNA (Wei et al., 2012), por lo que es posible que RdDM tenga una función de protección al daño al DNA provocado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno en tejidos expuestos a altos niveles de sal (Dutta et al., 2018, Roy et al., 2015, Roy et al., 2013), en este caso el tejido vascular. Además, la localización en la vasculatura es consistente con trabajos previos en los que se ha descrito un aumento en los transcritos de los elementos de RdDM en el estele de raíces de plantas crecidas bajo condiciones óptimas (Kawakatsu et al., 2016). En conjunto, estos resultados apuntan a un posible rol regulatorio por RdDM en el tejido vascular, en respuesta a estrés, ya sea como protección a daño en el DNA o, alternativamente, como un mecanismo de comunicación a larga distancia resultado del transporte de siRNAs a otras células vecinas o una potencial traslocación a través de floema (Melnik et al., 2011, Sarkies and Miska, 2014).

Existe una íntima relación entre la actividad de RdDM y la respuesta a salinidad, misma que se demuestra en este trabajo dado el incremento en el número de



regiones diferencialmente hipo-metiladas (DMRs), en respuesta al estrés salino en las mutantes analizadas con respecto a la línea tipo silvestre. Esto también sugiere que RdDM tiene un rol esencial en el mantenimiento de la represión de sus blancos canónicos en respuesta a esta condición. Adicionalmente, esta vía exagera su actividad sobre algunos de sus blancos en respuesta a la sal, misma que es identificada como un aumento en las DMRs hiper-metiladas cuando se comparan ambas condiciones experimentales en la línea tipo silvestre, estrategia cuya finalidad es evitar la activación ectópica de elementos deletéreos en el genoma, así como la represión transcripcional de genes aledaños a esos blancos.

Interesantemente, la mutante débil de AGO4 (*ago4-2*) muestra una metilación ligeramente reducida sobre algunos blancos de RdDM, pero también una hiper-metilación sobre otros. Esto sugiere que la proteína mutante producida en este alelo ha perdido la capacidad de reconocer algunos de sus blancos naturales, pero se concentra sobre otros, siendo capaz de reconocerlos y ejercer una hiper-metilación sobre los mismos. Esta hipótesis se soporta por el hecho de que los niveles de acumulación de la proteína codificada por *AGO4-2* no se afectan por el cambio puntual que posee, y que, además, una mutante de AGO4 con pérdida de actividad de corte aún es capaz de cargar siRNAs endógenos (Ye et al., 2012, Qi et al., 2006).

Como se esperaba, la germinación en altos niveles de salinidad muestra diferentes patrones transcripcionales entre las líneas analizadas, comparado con lo que ocurre en condiciones óptimas de germinación. Sin embargo, no todos los genes afectados en estas condiciones están relacionados con la protección a estrés salino, indicando que la diferencia observada en las tasas de germinación no es necesariamente solo consecuencia de un mecanismo de defensa a altos niveles de salinidad, sino un efecto de ajuste a diferentes niveles. Notablemente, algunos de estos patrones de acumulación de transcritos coinciden con diferencias en la metilación de DNA en el contexto CHH entre las líneas mutantes y plantas tipo silvestre. De especial interés son aquellos genes en los cuales existe una correlación entre una alta metilación en la línea tipo silvestre en respuesta a salinidad, misma que se pierde en las mutantes de RdDM, y una alta

acumulación de otros transcritos en las mutantes en las mismas condiciones. Debido a que los blancos canónicos de RdDM son secuencias genómicas relacionadas con transposones, la cercanía de estos elementos con los genes cuya expresión cambia en las mutantes es consistente con una regulación tipo RdDM en su vecindad, o incluso a larga distancia, en este caso mediada por estructuración de cromatina (Bohmdorfer et al., 2016, Rowley et al., 2017).

Varios de los genes hallados en este trabajo como blancos directos de RdDM se comparten entre las dos mutantes de AGO4 analizadas, corroborando su dependencia de la metilación de DNA, misma que previene su activación transcripcional en condiciones de salinidad. A pesar de que la lista de blancos directos solo incluye un puñado de genes, es consistente con reportes previos que señalan una contribución pequeña de las marcas represivas establecidas por RdDM regulando la expresión genética (Schoft et al., 2009, Wierzbicki et al., 2012, Zhang and Zhu, 2012, Yaari et al., 2019, Gallego-Bartolome et al., 2019).

La mayoría de los genes blanco identificados posee características con una clara asociación a procesos activos en la germinación. *EBF1* (At2g25490) tiene particular interés ya que codifica para una proteína nuclear tipo F-Box, componente de una proteína Ub-ligasa tipo E3, la cual dirige la degradación de la proteína EIN3, un factor de transcripción clave que juega un rol positivo en la percepción de etileno. La deficiencia de *EBF1* resulta en un incremento en los niveles de EIN3, induciendo una hipersensibilidad al etileno (Binder et al., 2007, Merchante et al., 2013), una hormona que tiene un rol esencial en el control de la dormancia y la germinación (Corbineau et al., 2014). En *Arabidopsis* y otras especies, el etileno promueve la germinación de semillas no dormantes bajo condiciones ambientales adversas, incluyendo la salinidad (Wang et al., 2007, Lin et al., 2013) y, además, la interrupción de la vía de señalización del etileno resulta en fenotipos de sensibilidad a la salinidad y el estrés osmótico durante la germinación (Leubner-Metzger et al., 1998, Pirrello et al., 2006). Estas observaciones concuerdan con los resultados de este trabajo, en los cuales una metilación deficiente en la mutante *ago4-2* resulta en la sobre-expresión del gen *EBF1*, lo que en consecuencia impacta negativamente la tasa de germinación. A

pesar de que existe un efecto similar de la regulación de *EBF1* en la mutante *ago4-3*, el efecto en la germinación es contrastante comparado con *ago4-2*, sugiriendo que la actividad de AGO6 en la mutante nula de AGO4 contrarresta los efectos río abajo de la proteína EBF1. Más evidencias experimentales son necesarias para establecer la participación de otros genes cuya metilación también se ve alterada en *ago4-2*, en la transducción de señales relacionada con la función del etileno, así como en otros procesos hormonales con roles descritos en la dormancia y la germinación, como al ácido abscísico o giberelinas, cuyas vías de señalización tienen una estrecha comunicación con la del etileno (Corbineau et al., 2014).

Por otra parte, como se mencionó con anterioridad, la abundancia de AGO4 es mayor en tejido vascular de cotiledones y de radícula en respuesta a salinidad, lo que sugiere una distribución sistémica de moléculas con capacidad regulatoria. En este sentido es de gran relevancia el blanco directo de la vía RdDM *PDLP7* (Plasmodesmata-located protein 7, At5g37660), que codifica a una proteína localizada en plasmodesmos y está involucrado en la comunicación célula-célula (Thomas et al., 2008); así como *SKS6* (*Sku5* Similar 6, At1g41830), un gen sobre-regulado por ABA que codifica para una proteína tipo 'multi-copper' oxidasa, misma que participa en el establecimiento del patrón vascular en *Arabidopsis* (Jacobs and Roe, 2005).

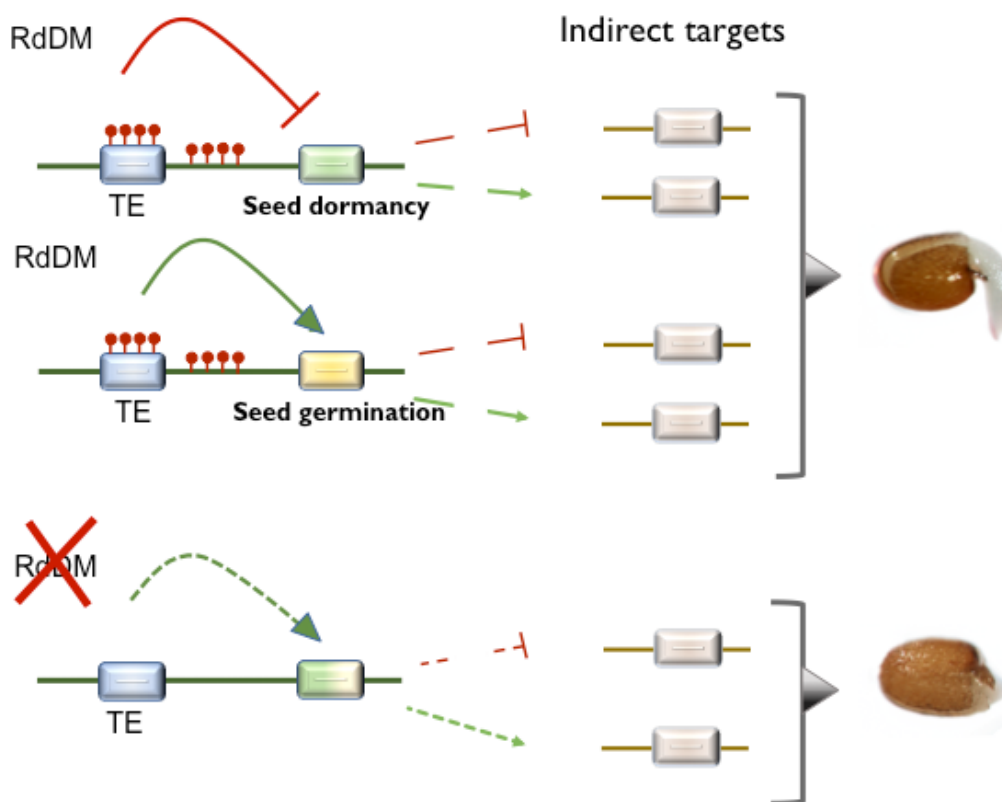
La diferencia entre los perfiles transcripcionales de las mutantes analizadas en este estudio indica que el efecto de RdDM sobre la germinación en respuesta a salinidad es multi-génico, por lo que no solo es consecuencia de la regulación de RdDM sobre los blancos directos, sino también sobre los blancos secundarios que participan en este proceso. En este sentido, entre los blancos secundarios en las mutantes de AGO4 se encontraron genes implicados en dormancia y procesos de germinación y post-germinación. Para *ago4-2*, que muestra una germinación retrasada como el resto de las mutantes de RdDM, algunos mRNAs que se acumulan en embriones maduros (proteínas LEA y proteínas de reserva), se encuentran entre los genes sobre-expresados, así como el RNA mensajero que codifica para el represor transcripcional ANAC032, un factor transcripcional

de respuesta a estrés inducido por la deficiencia de carbono e involucrado en la inhibición de la fotosíntesis y la regulación del metabolismo de carbono, asimilación de nitrógeno y catabolismo de aminoácidos (Sun et al., 2019). Aunado a esto, y consistente con el fenotipo observado en *ago4-2*, el gen *AHG1* muestra una alta acumulación de su transcrito, el cual codifica para una proteína fosfatasa tipo 2C, abundante en la maduración de la semilla y que, en conjunto con *DOG1* (Delay of Germination 1), controla la germinación por mecanismos ABA-independientes (Nee et al., 2017, Nishimura et al., 2018). Recientemente se demostró que el etileno controla parcialmente la dormancia a través de la vía *DOG1* (Li et al., 2019), lo cual coincide con una metilación RdDM-dependiente y el control de la expresión de *EBF1*, hallada en este trabajo.

Entre los blancos secundarios encontrados en *ago4-3*, están dos proteínas que codifican fosfatasas tipo PP2C, involucradas en la regulación de la dormancia de la semilla y la germinación, *AHG1* y *AHG3*. Estas fosfatasas PP2C parecen tener funciones superpuestas pero distinguibles; así como, actividades similares pero patrones de expresión espacio-temporales distintos (Nishimura et al., 2007, Nishimura et al., 2018). Sin embargo, entre los transcritos que cambian su acumulación en las mutantes no se encontraron aquellos que codifican a receptores de ABA, lo que sugiere que el grupo de fosfatasas tipo AHG podría encontrarse en su forma activa, lo cual se esperaría en semillas durante germinación (Cutler et al., 2010). Además, en concordancia con la germinación acelerada de esta mutante en altos niveles de sal, se encontró una alta abundancia de transcritos involucrados en metabolismo y crecimiento activo.

En síntesis, los datos de metiloma y transcriptoma en este trabajo exhiben el rol de la vía *AGO4/RdDM* en germinación y procesos relacionados con la dormancia de las semillas, este último involucrado en la modulación del tiempo de la germinación, una función que es más evidente bajo condiciones estresantes (Figura 29). De la misma manera, estos resultados exponen la complejidad de los cambios en la expresión genética, mismos que afectan numerosas redes genéticas resultando en fenotipos complejos. Es notable que, a pesar de que en este trabajo no se encontraron defectos en la tasa y capacidad de germinación

cuando las mutantes crecen en condiciones óptimas, se han descrito previamente efectos de esta vía sobre el desarrollo de las semillas (Wang and Köhler, 2017, Kirkbride et al., 2019, Chow et al., 2020), mismos que parecen no impactar significativamente el proceso de germinación.



**Figura 29. Modelo propuesto acerca de la participación de RdDM en el control de la germinación en respuesta a estrés salino.** En semillas tipo silvestre germinando bajo condiciones de estrés, la vía RdDM canónica controla el proceso de germinación favoreciendo o reprimiendo la expresión de genes necesarios para su iniciación y/o progresión. Dicho control se ejerce a través de la metilación de DNA (puntos rojos) sobre sus blancos canónicos (ET, cajas azules), que están en la vecindad de los genes blanco. Estos genes pueden ser moduladores positivos (flechas verdes) o negativos (líneas rojas) de los procesos de germinación a través de una red transcripcional amplia (genes indirectos). Cuando RdDM se pierde, esta regulación es eliminada, afectando la óptima respuesta al estrés durante la germinación.

A pesar de que son necesarias aún más evidencias para comprender el rol preciso de RdDM sobre la germinación y la latencia de las semillas de *Arabidopsis* ante condiciones adversas, estos hallazgos revelan blancos nuevos para RdDM, varios de ellos caracterizados por su papel en vías de señalización, controlando

el tiempo de germinación; pero otros que abren nuevas preguntas en relación a los mecanismos de control involucrados en las respuestas de la planta a la salinidad, abriendo nuevos horizontes para la búsqueda de blancos que puedan ser utilizados para mejorar la agricultura sobre suelos afectados por salinidad.

## Conclusiones

- La ausencia de una vía RdDM funcional impacta negativamente sobre la germinación de semillas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino.
- La ausencia de AGO4, una proteína esencial para la fase de silenciamiento por RdDM, presenta un fenotipo contrastante comparado con las demás mutantes de RdDM. Este efecto es consecuencia de la interferencia de AGO6.
- AGO4 es una proteína de respuesta a salinidad que se induce durante la germinación en condiciones óptimas y rápidamente en respuesta a la exposición a salinidad. Además, en estas condiciones, se distribuye diferencialmente en embriones y plántulas en desarrollo.
- El estrés salino durante la germinación provoca un aumento en la metilación CHH en algunas regiones del genoma, dicho aumento es consecuencia directa de la actividad de RdDM.
- La pérdida de RdDM tiene efectos locus-específicos sobre la metilación tipo CHH durante la germinación en condiciones de estrés salino a pesar de que no modifica la acumulación global de la marca. Además, su ausencia impacta en menor medida la acumulación de la metilación en contextos CG y CHG.
- El aumento en la metilación CHH RdDM-dependiente, es consistente con la represión de genes moduladores del proceso de la germinación en respuesta a salinidad, sugiriendo que previene su activación ectópica en respuesta a este estrés
- La regulación dirigida por RdDM impacta la expresión genética tanto de sus blancos directos como de los indirectos, y afecta procesos multi-génicos relacionados la germinación y el crecimiento temprano.

## **Perspectivas**

- Estudiar el mecanismo mediante el cual cada uno de los genes blanco de RdDM identificados en este estudio participan en la respuesta al estrés salino durante la germinación.
- Analizar la contribución de la vía RdDM en la respuesta a salinidad en raíces y otros órganos durante el desarrollo de la planta, así como en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico durante la germinación y crecimiento temprano.
- Conocer la participación de otras marcas epigenéticas que, en concordancia con la metilación CHH dependiente de RdDM, previenen la activación ectópica de los genes en respuesta a estrés salino durante la germinación.
- Averiguar el impacto de la represión transcripcional por RdDM sobre la estructuración de la cromatina en las regiones blanco identificadas en este estudio, así como sus consecuencias en la expresión genética.



## Referencias

- ABOGADALLAH, G. M. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal Behav*, 5, 369-74.
- ADDICOTT, F. T., LYON, J. L., OHKUMA, K., THIESSEN, W. E., CARNS, H. R., SMITH, O. E., CORNFORTH, J. W., MILBORROW, B. V., RYBACK, G. & WAREING, P. F. 1968. Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science*, 159, 1493.
- AGIUS, C., EAMENS, A. L., MILLAR, A. A., WATSON, J. M. & WANG, M. B. 2012. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Methods Mol Biol*, 894, 17-38.
- AGORIO, A. & VERA, P. 2007. ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 3778-90.
- AHMAD, A., ZHANG, Y. & CAO, X. F. 2010. Decoding the epigenetic language of plant development. *Mol Plant*, 3, 719-28.
- AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F. E., FIGUEROA, M. E., MELNICK, A. & MASON, C. E. 2012. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol*, 13, R87.
- ALLEN, E., XIE, Z., GUSTAFSON, A. M. & CARRINGTON, J. C. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121, 207-21.
- ALLEN, L. H., VALLE, R. R., JONES, J. W. & JONES, P. H. 1998. Soybean leaf water potential responses to carbon dioxide and drought. *Agronomy Journal*, 90, 375-383.
- ANJUM, N. A., SHARMA, P., GILL, S. S., HASANUZZAMAN, M., KHAN, E. A., KACHHAP, K., MOHAMED, A. A., THANGAVEL, P., DEVI, G. D., VASUDHEVAN, P., SOFO, A., KHAN, N. A., MISRA, A. N., LUKATKIN, A. S., SINGH, H. P., PEREIRA, E. & TUTEJA, N. 2016. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 19002-29.
- AU, P. C. K., DENNIS, E. S. & WANG, M. B. 2017. Analysis of Argonaute 4-Associated Long Non-Coding RNA in Arabidopsis thaliana Sheds Novel Insights into Gene Regulation through RNA-Directed DNA Methylation. *Genes (Basel)*, 8.
- AXTELL, M. J. 2010. A method to discover phased siRNA loci. *Methods Mol Biol*, 592, 59-70.
- AXTELL, M. J., JAN, C., RAJAGOPALAN, R. & BARTEL, D. P. 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 127, 565-77.
- AXTELL, M. J., SNYDER, J. A. & BARTEL, D. P. 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell*, 19, 1750-69.
- AXTELL, M. J., WESTHOLM, J. O. & LAI, E. C. 2011. Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*, 12, 221.
- BALL, M. C. & MUNNS, R. 1992. Plant-Responses to Salinity under Elevated Atmospheric Concentrations of Co<sub>2</sub>. *Australian Journal of Botany*, 40, 515-525.
- BANERES, J. L., MARTIN, A. & PARELLO, J. 1997. The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J Mol Biol*, 273, 503-8.

- BARKLA, B. J., VERA-ESTRELLA, R., CAMACHO-EMITERIO, J. & PANTOJA, O. 2002. Na(+)/H(+) exchange in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na(+) storage. *Functional Plant Biology*, 29, 1017-1024.
- BASKIN, J. M. & BASKIN, C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1-16.
- BATTAGLIA, M., OLVERA-CARRILLO, Y., GARCIARRUBIO, A., CAMPOS, F. & COVARRUBIAS, A. A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 148, 6-24.
- BAUER, H., ACHE, P., LAUTNER, S., FROMM, J., HARTUNG, W., AL-RASHEID, K. A., SONNEWALD, S., SONNEWALD, U., KNEITZ, S., LACHMANN, N., MENDEL, R. R., BITTNER, F., HETHERINGTON, A. M. & HEDRICH, R. 2013. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol*, 23, 53-7.
- BELCH, Y., YANG, J., LIU, Y., MALKARAM, S. A., LIU, R., RIETHOVEN, J. J. & LADUNGA, I. 2010. Weakly positioned nucleosomes enhance the transcriptional competency of chromatin. *PLoS ONE*, 5, e12984.
- BENDER, J. 2004. DNA METHYLATION AND EPIGENETICS. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 41-68.
- BEWLEY, J. D., BRADFORD, K. J., HILHORST, H. W. M., NONOGAKI, H. & SPRINGERLINK (ONLINE SERVICE). 2013. *Seeds physiology of development, germination and dormancy*. 3rd ed. New York, NY: Springer.
- BINDER, B. M., WALKER, J. M., GAGNE, J. M., EMBORG, T. J., HEMMANN, G., BLEECKER, A. B. & VIERSTRA, R. D. 2007. The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*, 19, 509-23.
- BLATT, M. R., SUTTER, J. U., SIEBEN, C., HARTEL, A., EISENACH, C. & THIEL, G. 2007. Abscisic acid triggers the endocytosis of the Arabidopsis KAT1 K<sup>+</sup> channel and its recycling to the plasma membrane. *Current Biology*, 17, 1396-1402.
- BLUM, A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 1159-1168.
- BOHMDORFER, G., SETHURAMAN, S., ROWLEY, M. J., KRZYSZTON, M., ROTH, M. H., BOUZIT, L. & WIERZBICKI, A. T. 2016. Long non-coding RNA produced by RNA polymerase V determines boundaries of heterochromatin. *Elife*, 5.
- BOND, D. M. & BAULCOMBE, D. C. 2015. Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 917-22.
- BONNET, E., VAN DE PEER, Y. & ROUZE, P. 2006. The small RNA world of plants. *New Phytol*, 171, 451-68.
- BORGES, F., CALARCO, J. P. & MARTIENSSSEN, R. A. 2012. Reprogramming the epigenome in *Arabidopsis* pollen. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 77, 1-5.
- BORGES, F. & MARTIENSSSEN, R. A. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 727-41.
- BORGES, F., PARENT, J. S., VAN EX, F., WOLFF, P., MARTINEZ, G., KOHLER, C. & MARTIENSSSEN, R. A. 2018. Transposon-derived small RNAs triggered by

- miR845 mediate genome dosage response in Arabidopsis. *Nat Genet*, 50, 186-192.
- BOSTON, R. S., VIITANEN, P. V. & VIERLING, E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol*, 32, 191-222.
- BOYER, J. S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443-8.
- BOYKO, A. & KOVALCHUK, I. 2008. Epigenetic control of plant stress response. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49, 61-72.
- BRAY, E. A. 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol*, 103, 1035-1040.
- BRAY, E. A. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Environ*, 25, 153-161.
- BROSSEAU, C., EL OIRDI, M., ADUROGBANGBA, A., MA, X. & MOFFETT, P. 2016. Antiviral Defense Involves AGO4 in an Arabidopsis-Potexvirus Interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 29, 878-888.
- BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W. & JONES, R. L. 2015. Biochemistry & molecular biology of plants. Second edition. ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, American Society of Plant Biologists.
- BUCKLEY, T. N. 2019. How do stomata respond to water status? *New Phytol*, 224, 21-36.
- BUDHAVARAPU, V. N., CHAVEZ, M. & TYLER, J. K. 2013. How is epigenetic information maintained through DNA replication? *Epigenetics Chromatin*, 6, 32.
- CACHORRO, P., MARTINEZ, R., ORTIZ, A. & CERDA, A. 1995. Abscisic-Acid and Osmotic Relations in Phaseolus-Vulgaris L Shoots under Salt Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14, 99-104.
- CAI, S., CHEN, G., WANG, Y., HUANG, Y., MARCHANT, D. B., WANG, Y., YANG, Q., DAI, F., HILLS, A., FRANKS, P. J., NEVO, E., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., SESSA, E., WOLF, P. G., XUE, D., ZHANG, G., POGSON, B. J., BLATT, M. R. & CHEN, Z. H. 2017. Evolutionary Conservation of ABA Signaling for Stomatal Closure. *Plant Physiol*, 174, 732-747.
- CAMBIAGNO, D. A., GIUDICATTI, A. J., ARCE, A. L., GAGLIARDI, D., LI, L., YUAN, W., LUNDBERG, D. S., WEIGEL, D. & MANAVELLA, P. A. 2021. HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Mol Plant*, 14, 426-439.
- CANTO, T., UHRIG, J. F., SWANSON, M., WRIGHT, K. M. & MACFARLANE, S. A. 2006. Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *J Virol*, 80, 9064-72.
- CAVERZAN, A., PASSAIA, G., ROSA, S. B., RIBEIRO, C. W., LAZZAROTTO, F. & MARGIS-PINHEIRO, M. 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol*, 35, 1011-9.
- CHAN, Z., WANG, Y., CAO, M., GONG, Y., MU, Z., WANG, H., HU, Y., DENG, X., HE, X. J. & ZHU, J. K. 2016. RDM4 modulates cold stress resistance in Arabidopsis partially through the CBF-mediated pathway. *New Phytol*, 209, 1527-39.
- CHEN, C., KHALEEL, S. S., HUANG, H. & WU, C. H. 2014. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol Med*, 9, 8.

- CHEN, M., LV, S. L. & MENG, Y. J. 2010. Epigenetic performers in plants. *Development Growth & Differentiation*, 52, 555-566.
- CHINNUSAMY, V. & ZHU, J. K. 2009. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Sci China C Life Sci*, 52, 331-43.
- CHINNUSAMY, V. & ZHU, J. K. 2010. Epigenetic Regulation: Chromatin Modeling and Small RNAs. *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, 217-241.
- CHIU, M. H., CHEN, I. H., BAULCOMBE, D. C. & TSAI, C. H. 2010. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol*, 11, 641-9.
- CHOI, K., ZHAO, X., TOCK, A. J., LAMBING, C., UNDERWOOD, C. J., HARDCASTLE, T. J., SERRA, H., KIM, J., CHO, H. S., KIM, J., ZIOLKOWSKI, P. A., YELINA, N. E., HWANG, I., MARTIENSSEN, R. A. & HENDERSON, I. R. 2018. Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in Arabidopsis thaliana transposons and gene regulatory regions. *Genome Res*, 28, 532-546.
- CHOW, H. T., CHAKRABORTY, T. & MOSHER, R. A. 2020. RNA-directed DNA Methylation and sexual reproduction: expanding beyond the seed. *Curr Opin Plant Biol*, 54, 11-17.
- CONTRERAS-CUBAS, C., PALOMAR, M., ARTEAGA-VAZQUEZ, M., REYES, J. L. & COVARRUBIAS, A. A. 2012. Non-coding RNAs in the plant response to abiotic stress. *Planta*, 236, 943-58.
- CORBINEAU, F., XIA, Q., BAILLY, C. & EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. 2014. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front Plant Sci*, 5, 539.
- CREASEY, K. M. & MARTIENSSEN, R. A. 2010. Germline reprogramming of heterochromatin in plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 75, 269-74.
- CRESS, W. A., HARE, P. D. & VAN STADEN, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment*, 21, 535-553.
- CUERDA-GIL, D. & SLOTKIN, R. K. 2016. Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nat Plants*, 2, 16163.
- CUTLER, S. R., RODRIGUEZ, P. L., FINKELSTEIN, R. R. & ABRAMS, S. R. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 651-79.
- CUZIN, F. & RASSOULZADEGAN, M. 2010. Non-Mendelian epigenetic heredity: gametic RNAs as epigenetic regulators and transgenerational signals. *Essays in Biochemistry: Epigenetics, Disease and Behaviour*, 48, 101-106.
- CZARNOCKA, W. & KARPINSKI, S. 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic Biol Med*, 122, 4-20.
- DE PATER, S., PHAM, K., MEMELINK, J. & KIJNE, J. 1997. RAP-1 is an Arabidopsis MYC-like R protein homologue, that binds to G-box sequence motifs. *Plant Mol Biol*, 34, 169-74.
- DEMETRIOU, K., KAPAZOGLU, A., TONDELLI, A., FRANCA, E., STANCA, M. A., BLADENOPOULOS, K. & TSAFTARIS, A. S. 2009. Epigenetic chromatin modifiers in barley: I. Cloning, mapping and expression analysis of the plant specific HD2 family of histone deacetylases from barley, during seed

- development and after hormonal treatment. *Physiologia Plantarum*, 136, 358-368.
- DING, J., ZHOU, S. & GUAN, J. 2012. Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 10, 264-75.
- DOROODIAN, P. & HUA, Z. 2021. The Ubiquitin Switch in Plant Stress Response. *Plants (Basel)*, 10.
- DOWEN, R. H., PELIZZOLA, M., SCHMITZ, R. J., LISTER, R., DOWEN, J. M., NERY, J. R., DIXON, J. E. & ECKER, J. R. 2012. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2183-91.
- DU, J., JOHNSON, L. M., GROTH, M., FENG, S., HALE, C. J., LI, S., VASHISHT, A. A., WOHLSCHLEGEL, J. A., PATEL, D. J. & JACOBSEN, S. E. 2014. Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Mol Cell*, 55, 495-504.
- DUAN, C. G., ZHANG, H., TANG, K., ZHU, X., QIAN, W., HOU, Y. J., WANG, B., LANG, Z., ZHAO, Y., WANG, X., WANG, P., ZHOU, J., LIANG, G., LIU, N., WANG, C. & ZHU, J. K. 2015. Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J*, 34, 581-92.
- DUNN, K. & GRIFFITH, J. D. 1980. The presence of RNA in a double helix inhibits its interaction with histone protein. *Nucleic Acids Res*, 8, 555-66.
- DUNOYER, P., BROSANAN, C. A., SCHOTT, G., WANG, Y., JAY, F., ALIOUA, A., HIMBER, C. & VOINNET, O. 2010. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J*, 29, 1699-712.
- DUTTA, S., MITRA, M., AGARWAL, P., MAHAPATRA, K., DE, S., SETT, U. & ROY, S. 2018. Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant Signal Behav*, 13, e1460048.
- EAMENS, A., VAISTIJ, F. E. & JONES, L. 2008. NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Plant J*, 55, 596-606.
- EISENACH, C., CHEN, Z. H., GREFFEN, C. & BLATT, M. R. 2012. The trafficking protein SYP121 of Arabidopsis connects programmed stomatal closure and K(+) channel activity with vegetative growth. *Plant J*, 69, 241-51.
- EUN, C., LORKOVIC, Z. J., NAUMANN, U., LONG, Q., HAVECKER, E. R., SIMON, S. A., MEYERS, B. C., MATZKE, A. J. & MATZKE, M. 2011. AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, 6, e25730.
- FAHLGREN, N., MONTGOMERY, T. A., HOWELL, M. D., ALLEN, E., DVORAK, S. K., ALEXANDER, A. L. & CARRINGTON, J. C. 2006. Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr Biol*, 16, 939-44.
- FANG, X. & QI, Y. 2016. RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *Plant Cell*, 28, 272-85.
- FANG, Y. Y., ZHAO, J. H., LIU, S. W., WANG, S., DUAN, C. G. & GUO, H. S. 2016. CMV2b-AGO Interaction Is Required for the Suppression of RDR-Dependent Antiviral Silencing in Arabidopsis. *Front Microbiol*, 7, 1329.
- FAROOQ, M., WAHID, A., KOBAYASHI, N., FUJITA, D. & BASRA, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212.



- FAROOQ, M. A., NIAZI, A. K., AKHTAR, J., SAIFULLAH, FAROOQ, M., SOURI, Z., KARIMI, N. & RENGEL, Z. 2019. Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiol Biochem*, 141, 353-369.
- FAUS, I., NINOLES, R., KESARI, V., LLABATA, P., TAM, E., NEBAUER, S. G., SANTIAGO, J., HAUSER, M. T. & GADEA, J. 2018. Arabidopsis ILITHYIA protein is necessary for proper chloroplast biogenesis and root development independent of eIF2alpha phosphorylation. *J Plant Physiol*, 224-225, 173-182.
- FINKELSTEIN, R., REEVES, W., ARIIZUMI, T. & STEBER, C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 387-415.
- FINKELSTEIN, R. R., GAMPALA, S. S. & ROCK, C. D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14 Suppl, S15-45.
- FINOGENOVA, K., BONNET, J., POEPEL, S., SCHAFFER, I. B., FINKL, K., SCHMID, K., LITZ, C., STRAUSS, M., BENDA, C. & MULLER, J. 2020. Structural basis for PRC2 decoding of active histone methylation marks H3K36me2/3. *Elife*, 9.
- FISCHLE, W., WANG, Y. & ALLIS, C. D. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 172-83.
- FUJITA, Y., YOSHIDA, T. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2013. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant*, 147, 15-27.
- FUSARO, A. F., CORREA, R. L., NAKASUGI, K., JACKSON, C., KAWCHUK, L., VASLIN, M. F. & WATERHOUSE, P. M. 2012. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology*, 426, 178-87.
- GALLAGHER, S., WINSTON, S. E., FULLER, S. A. & HURRELL, J. G. 2001. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 8, Unit 8 10.
- GALLEGO-BARTOLOME, J., LIU, W., KUO, P. H., FENG, S., GHOSHAL, B., GARDINER, J., ZHAO, J. M., PARK, S. Y., CHORY, J. & JACOBSEN, S. E. 2019. Co-targeting RNA Polymerases IV and V Promotes Efficient De Novo DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell*, 176, 1068-1082 e19.
- GARCIA, D., COLLIER, S. A., BYRNE, M. E. & MARTIENSSEN, R. A. 2006. Specification of leaf polarity in Arabidopsis via the trans-acting siRNA pathway. *Curr Biol*, 16, 933-8.
- GARCIA-RUIZ, H., TAKEDA, A., CHAPMAN, E. J., SULLIVAN, C. M., FAHLGREN, N., BREMPERIS, K. J. & CARRINGTON, J. C. 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell*, 22, 481-96.
- GOHLKE, J., SCHOLZ, C. J., KNEITZ, S., WEBER, D., FUCHS, J., HEDRICH, R. & DEEKEN, R. 2013. DNA methylation mediated control of gene expression is critical for development of crown gall tumors. *PLoS Genet*, 9, e1003267.
- GOLLDACK, D., YANG, O., POPOVA, O. V., SUTHOFF, U., LUKING, I. & DIETZ, K. J. 2009. The Arabidopsis basic leucine zipper transcription factor AtbZIP24 regulates complex transcriptional networks involved in abiotic stress resistance. *Gene*, 436, 45-55.
- GOUIL, Q. & BAULCOMBE, D. C. 2016. DNA Methylation Signatures of the Plant Chromomethyltransferases. *PLoS Genet*, 12, e1006526.

- GRAESSLE, S., LOIDL, P. & BROSCHE, G. 2001. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell Mol Life Sci*, 58, 704-20.
- GROVER, J. W., BURGESS, D., KENDALL, T., BATEN, A., POKHREL, S., KING, G. J., MEYERS, B. C., FREELING, M. & MOSHER, R. A. 2020. Abundant expression of maternal siRNAs is a conserved feature of seed development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 15305-15315.
- GROVER, J. W., KENDALL, T., BATEN, A., BURGESS, D., FREELING, M., KING, G. J. & MOSHER, R. A. 2018. Maternal components of RNA-directed DNA methylation are required for seed development in *Brassica rapa*. *Plant J*, 94, 575-582.
- GU, S., JIN, L., HUANG, Y., ZHANG, F. & KAY, M. A. 2012. Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Curr Biol*, 22, 1536-42.
- GUO, H., SONG, X., XIE, C., HUO, Y., ZHANG, F., CHEN, X., GENG, Y. & FANG, R. 2013. Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 26, 927-36.
- HALE, C. J., ERHARD, K. F., JR., LISCH, D. & HOLLICK, J. B. 2009. Production and processing of siRNA precursor transcripts from the highly repetitive maize genome. *PLoS Genet*, 5, e1000598.
- HAMERA, S., SONG, X., SU, L., CHEN, X. & FANG, R. 2012. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J*, 69, 104-15.
- HANDA, S., BRESSAN, R. A., HANDA, A. K., CARPITA, N. C. & HASEGAWA, P. M. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiol*, 73, 834-43.
- HAO, Q., YIN, P., YAN, C., YUAN, X., LI, W., ZHANG, Z., LIU, L., WANG, J. & YAN, N. 2010. Functional mechanism of the abscisic acid agonist pyrabactin. *J Biol Chem*, 285, 28946-52.
- HAUSER, M. T., AUFSATZ, W., JONAK, C. & LUSCHNIG, C. 2011. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809, 459-468.
- HAVECKER, E. R., WALLBRIDGE, L. M., HARDCASTLE, T. J., BUSH, M. S., KELLY, K. A., DUNN, R. M., SCHWACH, F., DOONAN, J. H. & BAULCOMBE, D. C. 2010. The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, 22, 321-34.
- HERNÁNDEZ CERDA, M. E., CARRASCO ANAYA, G. & ÁLFARO SÁNCHEZ, G. 2007. *Mitos y realidades de la sequía en México : María Engracia Hernández Cerda, Germán Carrasco Anaya, Gloria Alfaro Sánchez*, México, D.F., UNAM, Instituto de Geografía.
- HERNANDEZ-LAGANA, E., RODRIGUEZ-LEAL, D., LUA, J. & VIELLE-CALZADA, J. P. 2016. A Multigenic Network of ARGONAUTE4 Clade Members Controls Early Megaspore Formation in Arabidopsis. *Genetics*, 204, 1045-1056.
- HINCHA, D. K. & THALHAMMER, A. 2012. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochem Soc Trans*, 40, 1000-3.
- HO, D. H. & BURGGREN, W. W. 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *J Exp Biol*, 213, 3-16.

- HOLDSWORTH, M. J., BENTSINK, L. & SOPPE, W. J. J. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol*, 179, 33-54.
- HONG, S. W. & VIÉRLING, E. 2000. Mutants of Arabidopsis thaliana defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4392-7.
- HONG, Y., ZHAO, J., GUO, L., KIM, S. C., DENG, X., WANG, G., ZHANG, G., LI, M. & WANG, X. 2016. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Prog Lipid Res*, 62, 55-74.
- HOU, H., WANG, Y., KALLGREN, S. P., THOMPSON, J., YATES, J. R., 3RD & JIA, S. 2010. Histone variant H2A.Z regulates centromere silencing and chromosome segregation in fission yeast. *J Biol Chem*, 285, 1909-18.
- HUBE, F., ULVELING, D., SUREAU, A., FORVEILLE, S. & FRANCASTEL, C. 2017. Short intron-derived ncRNAs. *Nucleic Acids Res*, 45, 4768-4781.
- HURKMAN, W. J. & TANAKA, C. K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 81, 802-6.
- HUTVAGNER, G. & SIMARD, M. J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 22-32.
- INGRAM, J. & BARTELS, D. 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 377-403.
- ITO, H. 2011. Small RNAs and transposon silencing in plants. *Development Growth & Differentiation*.
- ITO, H., GAUBERT, H., BUCHER, E., MIROUZE, M., VAILLANT, I. & PASZKOWSKI, J. 2011. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 472, 115-9.
- IWASAKI, M., HYVARINEN, L., PISKUREWICZ, U. & LOPEZ-MOLINA, L. 2019a. Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *Elife*, 8.
- IWASAKI, M., HYVÄRINEN, L., PISKUREWICZ, U. & LOPEZ-MOLINA, L. 2019b. Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *Elife*, 8.
- JACKSON, J. P., LINDROTH, A. M., CAO, X. & JACOBSEN, S. E. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416, 556-60.
- JACOB, P., HIRT, H. & BENDAHMANE, A. 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnol J*, 15, 405-414.
- JACOB, Y., BERGAMIN, E., DONOGHUE, M. T., MONGEON, V., LEBLANC, C., VOIGT, P., UNDERWOOD, C. J., BRUNZELLE, J. S., MICHAELS, S. D., REINBERG, D., COUTURE, J. F. & MARTIENSSSEN, R. A. 2014. Selective methylation of histone H3 variant H3.1 regulates heterochromatin replication. *Science*, 343, 1249-53.
- JACOBS, J. & ROE, J. L. 2005. SKS6, a multicopper oxidase-like gene, participates in cotyledon vascular patterning during Arabidopsis thaliana development. *Planta*, 222, 652-66.
- JANGAM, D., FESCHOTTE, C. & BETRAN, E. 2017. Transposable Element Domestication As an Adaptation to Evolutionary Conflicts. *Trends Genet*, 33, 817-831.



- JAUBERT, M., BHATTACHARJEE, S., MELLO, A. F., PERRY, K. L. & MOFFETT, P. 2011. ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 156, 1556-64.
- JEN, C. H., MICHALOPOULOS, I., WESTHEAD, D. R. & MEYER, P. 2005. Natural antisense transcripts with coding capacity in Arabidopsis may have a regulatory role that is not linked to double-stranded RNA degradation. *Genome Biol*, 6, R51.
- JEONG, D. H., GERMAN, M. A., RYMARQUIS, L. A., THATCHER, S. R. & GREEN, P. J. 2010. Abiotic stress-associated miRNAs: detection and functional analysis. *Methods Mol Biol*, 592, 203-30.
- JIA, Y., LISCH, D. R., OHTSU, K., SCANLON, M. J., NETTLETON, D. & SCHNABLE, P. S. 2009. Loss of RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) function causes widespread and unexpected changes in the expression of transposons, genes, and 24-nt small RNAs. *PLoS Genet*, 5, e1000737.
- JIN, C., ZANG, C., WEI, G., CUI, K., PENG, W., ZHAO, K. & FELSENFELD, G. 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nature Publishing Group*, 41, 941-945.
- JIN, H., VACIC, V., GIRKE, T., LONARDI, S. & ZHU, J. K. 2008. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis. *BMC Mol Biol*, 9, 6.
- JIN, X. F., XIONG, A. S., PENG, R. H., LIU, J. G., GAO, F., CHEN, J. M. & YAO, Q. H. 2010. OsAREB1, an ABRE-binding protein responding to ABA and glucose, has multiple functions in Arabidopsis. *BMB Rep*, 43, 34-9.
- JOLY-LOPEZ, Z. & BUREAU, T. E. 2014. Diversity and evolution of transposable elements in Arabidopsis. *Chromosome Research*, 22, 203-216.
- JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P. & BARTEL, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 19-53.
- KANNAN, P. R., DEEPA, S., KANTH, S. V. & RENGASAMY, R. 2013. Growth, osmolyte concentration and antioxidant enzymes in the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. under salinity stress. *Appl Biochem Biotechnol*, 171, 1925-32.
- KAWAKATSU, T., NERY, J. R., CASTANON, R. & ECKER, J. R. 2017. Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination. *Genome Biol*, 18, 171.
- KAWAKATSU, T., STUART, T., VALDES, M., BREAKFIELD, N., SCHMITZ, R. J., NERY, J. R., URICH, M. A., HAN, X., LISTER, R., BENFEY, P. N. & ECKER, J. R. 2016. Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem. *Nat Plants*, 2, 16058.
- KIDNER, C. A. & MARTIENSSEN, R. A. 2005. The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Dev Biol*, 280, 504-17.
- KINOSHITA, T. & SEKI, M. 2014. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant Cell Physiol*, 55, 1859-63.
- KIRKBRIDE, R. C., LU, J., ZHANG, C., MOSHER, R. A., BAULCOMBE, D. C. & CHEN, Z. J. 2019. Maternal small RNAs mediate spatial-temporal regulation of gene expression, imprinting, and seed development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 2761-2766.

- KOFFLER, B. E., LUSCHIN-EBENGREUTH, N., STABENTHEINER, E., MULLER, M. & ZECHMANN, B. 2014. Compartment specific response of antioxidants to drought stress in Arabidopsis. *Plant Sci*, 227, 133-44.
- KORBER, P. & BECKER, P. B. 2010. Nucleosome dynamics and epigenetic stability. *Essays Biochem*, 48, 63-74.
- KRADOLFER, D., HENNIG, L. & KOHLER, C. 2013. Increased maternal genome dosage bypasses the requirement of the FIS polycomb repressive complex 2 in Arabidopsis seed development. *PLoS Genet*, 9, e1003163.
- KRISHNASWAMY, S., VERMA, S., RAHMAN, M. H. & KAV, N. N. 2011. Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 75, 107-27.
- KRUEGER, F. & ANDREWS, S. R. 2011. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27, 1571-2.
- KURIHARA, Y., MATSUI, A., KAWASHIMA, M., KAMINUMA, E., ISHIDA, J., MOROSAWA, T., MOCHIZUKI, Y., KOBAYASHI, N., TOYODA, T., SHINOZAKI, K. & SEKI, M. 2008. Identification of the candidate genes regulated by RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 553-7.
- KUZNIAK, E. & KOPCZEWSKI, T. 2020. The Chloroplast Reactive Oxygen Species-Redox System in Plant Immunity and Disease. *Front Plant Sci*, 11, 572686.
- LAURESSERGUES, D., COUZIGOU, J. M., CLEMENTE, H. S., MARTINEZ, Y., DUNAND, C., BECARD, G. & COMBIER, J. P. 2015. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520, 90-3.
- LAVROV, S. A. & KIBANOV, M. V. 2007. Noncoding RNAs and chromatin structure. *Biochemistry (Mosc)*, 72, 1422-38.
- LAW, J. A. & JACOBSEN, S. E. 2010a. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 1-18.
- LAW, J. A. & JACOBSEN, S. E. 2010b. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 11, 204-20.
- LE, Q. H., WRIGHT, S., YU, Z. & BUREAU, T. 2000a. Transposon diversity in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7376-81.
- LE, Q. H., WRIGHT, S., YU, Z. H. & BUREAU, T. 2000b. Transposon diversity in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 7376-7381.
- LE, T. N., SCHUMANN, U., SMITH, N. A., TIWARI, S., AU, P. C., ZHU, Q. H., TAYLOR, J. M., KAZAN, K., LLEWELLYN, D. J., ZHANG, R., DENNIS, E. S. & WANG, M. B. 2014. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in Arabidopsis. *Genome Biol*, 15, 458.
- LEE, H. N., LEE, K. H. & KIM, C. S. 2015. Abscisic acid receptor PYRABACTIN RESISTANCE-LIKE 8, PYL8, is involved in glucose response and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 463, 24-8.
- LEE, M. H., JEON, H. S., KIM, H. G. & PARK, O. K. 2017. An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. *New Phytol*, 214, 343-360.
- LEI, B. & BERGER, F. 2020. H2A Variants in Arabidopsis: Versatile Regulators of Genome Activity. *Plant Commun*, 1, 100015.

- LEUBNER-METZGER, G., PETRUZZELLI, L., WALDVOGEL, R., VOGELI-LANGE, R. & MEINS, F., JR. 1998. Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant Mol Biol*, 38, 785-95.
- LEUNG, J. & GIRAUDAT, J. 1998. Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 199-222.
- LEVITT, J. 1986. Recovery of turgor by wilted, excised cabbage leaves in the absence of water uptake : a new factor in drought acclimation. *Plant Physiol*, 82, 147-53.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNELL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G., DURBIN, R. & GENOME PROJECT DATA PROCESSING, S. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-9.
- LI, X., CHEN, T., LI, Y., WANG, Z., CAO, H., CHEN, F., LI, Y., SOPPE, W. J. J., LI, W. & LIU, Y. 2019. ETR1/RDO3 Regulates Seed Dormancy by Relieving the Inhibitory Effect of the ERF12-TPL Complex on DELAY OF GERMINATION1 Expression. *Plant Cell*, 31, 832-847.
- LI, Y., LI, C., XIA, J. & JIN, Y. 2011. Domestication of transposable elements into MicroRNA genes in plants. *PLoS One*, 6, e19212.
- LIN, Y., YANG, L., PAUL, M., ZU, Y. & TANG, Z. 2013. Ethylene promotes germination of Arabidopsis seed under salinity by decreasing reactive oxygen species: evidence for the involvement of nitric oxide simulated by sodium nitroprusside. *Plant Physiol Biochem*, 73, 211-8.
- LINDROTH, A. M., SHULTIS, D., JASENCAKOVA, Z., FUCHS, J., JOHNSON, L., SCHUBERT, D., PATNAIK, D., PRADHAN, S., GOODRICH, J., SCHUBERT, I., JENUWEIN, T., KHORASANIZADEH, S. & JACOBSEN, S. E. 2004. Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J*, 23, 4286-96.
- LIRA-MEDEIROS, C. F., PARISOD, C., FERNANDES, R. A., MATA, C. S., CARDOSO, M. A. & FERREIRA, P. C. G. 2010. Epigenetic Variation in Mangrove Plants Occurring in Contrasting Natural Environment. *PLoS ONE*, 5, -.
- LISCH, D. 2009. Epigenetic Regulation of Transposable Elements in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 43-66.
- LIU, L., ZHU, K., YANG, Y., WU, J., CHEN, F. & YU, D. 2008. Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). *J Plant Res*, 121, 215-26.
- LIU, X., ZHANG, H., ZHAO, Y., FENG, Z., LI, Q., YANG, H. Q., LUAN, S., LI, J. & HE, Z. H. 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 15485-90.
- LOPEZ, A., RAMIREZ, V., GARCIA-ANDRADE, J., FLORS, V. & VERA, P. 2011. The RNA silencing enzyme RNA polymerase v is required for plant immunity. *PLoS Genet*, 7, e1002434.
- LORETI, E., BETTI, F., LADERA-CARMONA, M. J., FONTANA, F., NOVI, G., VALERI, M. C. & PERATA, P. 2020. ARGONAUTE1 and ARGONAUTE4 Regulate Gene Expression and Hypoxia Tolerance. *Plant Physiol*, 182, 287-300.

- LOVE, A. J., LAIRD, J., HOLT, J., HAMILTON, A. J., SADANANDOM, A. & MILNER, J. J. 2007. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J Gen Virol*, 88, 3439-3444.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- LU, J., ZHANG, C., BAULCOMBE, D. C. & CHEN, Z. J. 2012. Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of Arabidopsis seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5529-34.
- MAHFOUZ, M. M. 2010. RNA-directed DNA methylation: mechanisms and functions. *Plant Signal Behav*, 5, 806-16.
- MALLORY, A. C. & BOUCHE, N. 2008. MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave. *Trends Plant Sci*, 13, 359-67.
- MAO, H., WANG, H., LIU, S., LI, Z., YANG, X., YAN, J., LI, J., TRAN, L. S. & QIN, F. 2015. A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. *Nat Commun*, 6, 8326.
- MARGUERON, R. & REINBERG, D. 2010. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Publishing Group*, 11, 285-296.
- MARI-ORDONEZ, A., MARCHAIS, A., ETCHEVERRY, M., MARTIN, A., COLOT, V. & VOINNET, O. 2013. Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon. *Nat Genet*, 45, 1029-39.
- MARTIENSSEN, R. A. & RICHARDS, E. J. 1995. DNA methylation in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, 5, 234-42.
- MARTINEZ, G., WOLFF, P., WANG, Z., MORENO-ROMERO, J., SANTOS-GONZALEZ, J., CONZE, L. L., DEFRAIA, C., SLOTKIN, R. K. & KOHLER, C. 2018. Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in Arabidopsis. *Nat Genet*, 50, 193-198.
- MATSUNAGA, W., KOBAYASHI, A., KATO, A. & ITO, H. 2011. The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a copia-like retrotransposon in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*.
- MATSUNAGA, W., KOBAYASHI, A., KATO, A. & ITO, H. 2012. The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a copia-like retrotransposon in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 53, 824-33.
- MATZKE, M., KANNO, T., CLAXINGER, L., HUETTEL, B. & MATZKE, A. J. M. 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 367-376.
- MATZKE, M., KANNO, T., HUETTEL, B., DAXINGER, L. & MATZKE, A. J. 2006. RNA-directed DNA methylation and Pol IVb in Arabidopsis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71, 449-59.
- MATZKE, M., KANNO, T., HUETTEL, B., DAXINGER, L. & MATZKE, A. J. M. 2007. Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 512-519.
- MATZKE, M. A., KANNO, T. & MATZKE, A. J. 2015. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu Rev Plant Biol*, 66, 243-67.
- MATZKE, M. A. & MOSHER, R. A. 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 15, 394-408.

- MCCUE, A. D., PANDA, K., NUTHIKATTU, S., CHOUDURY, S. G., THOMAS, E. N. & SLOTKIN, R. K. 2015. ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J*, 34, 20-35.
- MELNYK, C. W., MOLNAR, A. & BAULCOMBE, D. C. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J*, 30, 3553-63.
- MERCHANTE, C., ALONSO, J. M. & STEPANOVA, A. N. 2013. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 16, 554-60.
- MEYERS, B. C., AXTELL, M. J., BARTEL, B., BARTEL, D. P., BAULCOMBE, D., BOWMAN, J. L., CAO, X., CARRINGTON, J. C., CHEN, X., GREEN, P. J., GRIFFITHS-JONES, S., JACOBSEN, S. E., MALLORY, A. C., MARTIENSSSEN, R. A., POETHIG, R. S., QI, Y., VAUCHERET, H., VOINNET, O., WATANABE, Y., WEIGEL, D. & ZHU, J. K. 2008. Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20, 3186-90.
- MI, S., CAI, T., HU, Y., CHEN, Y., HODGES, E., NI, F., WU, L., LI, S., ZHOU, H., LONG, C., CHEN, S., HANNON, G. J. & QI, Y. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133, 116-27.
- MIGNOLET-SPRUYT, L., XU, E., IDANHEIMO, N., HOEBERICHTS, F. A., MUHLENBOCK, P., BROSCHE, M., VAN BREUSEGEM, F. & KANGASJARVI, J. 2016. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J Exp Bot*, 67, 3831-44.
- MOLINIER, J., RIES, G., ZIPFEL, C. & HOHN, B. 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, 442, 1046-9.
- MORGAN, D. K. & WHITELAW, E. 2008. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome*, 19, 394-7.
- MOUILLON, J. M., ERIKSSON, S. K. & HARRYSON, P. 2008. Mimicking the plant cell interior under water stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiol*, 148, 1925-37.
- MULLET, J. E. & WHITSITT, M. S. 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation*, 20, 119-124.
- MURATA, Y., BUNDO, M., UEDA, J., KUBOTA-SAKASHITA, M., KASAI, K., KATO, T. & IWAMOTO, K. 2017. DNA methylation and hydroxymethylation analyses of the active LINE-1 subfamilies in mice. *Sci Rep*, 7, 13624.
- MYLNE, J. S., WANG, C. K., VAN DER WEERDEN, N. L. & CRAIK, D. J. 2010. Cyclotides are a component of the innate defense of *Oldenlandia affinis*. *Biopolymers*, 94, 635-46.
- NAKASHIMA, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep*, 32, 959-70.
- NEE, G., KRAMER, K., NAKABAYASHI, K., YUAN, B., XIANG, Y., MIATTON, E., FINKEMEIER, I. & SOPPE, W. J. 2017. DELAY OF GERMINATION1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nat Commun*, 8, 72.
- NIGHTINGALE, K. P., O'NEILL, L. P. & TURNER, B. M. 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 125-36.
- NISHIMURA, N., TSUCHIYA, W., MORESCO, J. J., HAYASHI, Y., SATOH, K., KAIWA, N., IRISA, T., KINOSHITA, T., SCHROEDER, J. I., YATES, J. R., 3RD,



- HIRAYAMA, T. & YAMAZAKI, T. 2018. Control of seed dormancy and germination by DOG1-AHG1 PP2C phosphatase complex via binding to heme. *Nat Commun*, 9, 2132.
- NISHIMURA, N., YOSHIDA, T., KITAHATA, N., ASAMI, T., SHINOZAKI, K. & HIRAYAMA, T. 2007. ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J*, 50, 935-49.
- NUTHIKATTU, S., MCCUE, A. D., PANDA, K., FULTZ, D., DEFRAIA, C., THOMAS, E. N. & SLOTKIN, R. K. 2013. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol*, 162, 116-31.
- OHTA, M., SATO, A., RENHU, N., YAMAMOTO, T., OKA, N., ZHU, J. K., TADA, Y., SUZAKI, T. & MIURA, K. 2018. MYC-type transcription factors, MYC67 and MYC70, interact with ICE1 and negatively regulate cold tolerance in Arabidopsis. *Sci Rep*, 8, 11622.
- OLIVER, K. R., MCCOMB, J. A. & GREENE, W. K. 2013. Transposable Elements: Powerful Contributors to Angiosperm Evolution and Diversity. *Genome Biology and Evolution*, 5, 1886-1901.
- OLMEDO-MONFIL, V., DURAN-FIGUEROA, N., ARTEAGA-VAZQUEZ, M., DEMESA-AREVALO, E., AUTRAN, D., GRIMANELLI, D., SLOTKIN, R. K., MARTIENSSEN, R. A. & VIELLE-CALZADA, J. P. 2010. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature*, 464, 628-32.
- OLVERA-CARRILLO, Y., CAMPOS, F., REYES, J. L., GARCIARRUBIO, A. & COVARRUBIAS, A. A. 2010. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 154, 373-90.
- ONOZAWA, M., GOLDBERG, L. & APLAN, P. D. 2015. Landscape of insertion polymorphisms in the human genome. *Genome Biol Evol*, 7, 960-8.
- PARK, S. Y. & KIM, J. S. 2020. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med*, 52, 204-212.
- PARKER, J. S., ROE, S. M. & BARFORD, D. 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J*, 23, 4727-4737.
- PERRY, M. & CHALKLEY, R. 1982. Histone acetylation increases the solubility of chromatin and occurs sequentially over most of the chromatin. A novel model for the biological role of histone acetylation. *J Biol Chem*, 257, 7336-47.
- PETERS, L. & MEISTER, G. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 26, 611-23.
- PIRRELLO, J., JAIMES-MIRANDA, F., SANCHEZ-BALLESTA, M. T., TOURNIER, B., KHALIL-AHMAD, Q., REGAD, F., LATCHE, A., PECH, J. C. & BOUZAYEN, M. 2006. Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiol*, 47, 1195-205.
- PITZSCHKE, A., FORZANI, C. & HIRT, H. 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1757-64.
- PLANCHET, E., RANNOU, O., RICOULT, C., BOUTET-MERCEY, S., MAIA-GRONDARD, A. & LIMAMI, A. M. 2011. Nitrogen metabolism responses to water deficit act through both abscisic acid (ABA)-dependent and

- independent pathways in *Medicago truncatula* during post-germination. *J Exp Bot*, 62, 605-15.
- PONTES, O., COSTA-NUNES, P., VITHAYATHIL, P. & PIKAARD, C. S. 2009. RNA Polymerase V Functions in Arabidopsis Interphase Heterochromatin Organization Independently of the 24-nt siRNA-Directed DNA Methylation Pathway. *Molecular Plant*, 2, 700-710.
- PONTIER, D., PICART, C., ROUDIER, F., GARCIA, D., LAHMY, S., AZEVEDO, J., ALART, E., LAUDIE, M., KARLOWSKI, W. M., COOKE, R., COLOT, V., VOINNET, O. & LAGRANGE, T. 2012. NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Mol Cell*, 48, 121-32.
- POPOVA, O. V., DINH, H. Q., AUFSATZ, W. & JONAK, C. 2013. The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in Arabidopsis. *Mol Plant*, 6, 396-410.
- PULI, M. R. & RAGHAVENDRA, A. S. 2012. Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *J Exp Bot*, 63, 1349-56.
- QI, Y., HE, X., WANG, X.-J., KOHANY, O., JURKA, J. & HANNON, G. J. 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443, 1008-1012.
- QU, F., YE, X. & MORRIS, T. J. 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14732-7.
- RABINOWICZ, P. D., CITEK, R., BUDIMAN, M. A., NUNBERG, A., BEDELL, J. A., LAKEY, N., O'SHAUGHNESSY, A. L., NASCIMENTO, L. U., MCCOMBIE, W. R. & MARTIENSSEN, R. A. 2005. Differential methylation of genes and repeats in land plants. *Genome Res*, 15, 1431-40.
- RAE, L., LAO, N. T. & KAVANAGH, T. A. 2011. Regulation of multiple aquaporin genes in Arabidopsis by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta*.
- RAZIN, S. V., IAROVAIA, O. V., SJAKSTE, N., SJAKSTE, T., BAGDONIENE, L., RYNDITCH, A. V., EIVAZOVA, E. R., LIPINSKI, M. & VASSETZKY, Y. S. 2007. Chromatin domains and regulation of transcription. *J Mol Biol*, 369, 597-607.
- REA, M., CHEN, M., LUAN, S., BHANGU, D., BRAUD, M. & XIAO, W. 2011. Determination of DNA methylation of imprinted genes in Arabidopsis endosperm. *J Vis Exp*.
- RICHARDS, E. J., KANKEL, M. W., RAMSEY, D. E., STOKES, T. L., FLOWERS, S. K., HAAG, J. R., JEDDELOH, J. A., RIDDLE, N. C. & VERBSKY, M. L. 2003. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 163, 1109-1122.
- ROBINSON, M. D. & SMYTH, G. K. 2008. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics*, 9, 321-32.
- RODRIGUEZ-GACIO MDEL, C., MATILLA-VAZQUEZ, M. A. & MATILLA, A. J. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal Behav*, 4, 1035 - 49.
- RON, M., ALANDETE SAEZ, M., ESHED WILLIAMS, L., FLETCHER, J. C. & MCCORMICK, S. 2010. Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in Arabidopsis. *Genes Dev*, 24, 1010-21.

- RONEMUS, M., VAUGHN, M. W. & MARTIENSSEN, R. A. 2006. MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18, 1559-74.
- ROSENWASSER, S., ROT, I., SOLLNER, E., MEYER, A. J., SMITH, Y., LEVIATAN, N., FLUHR, R. & FRIEDMAN, H. 2011. Organelles contribute differentially to reactive oxygen species-related events during extended darkness. *Plant Physiol*, 156, 185-201.
- ROWLEY, M. J., ROTH, M. H., BOHMDORFER, G., KUCINSKI, J. & WIERZBICKI, A. T. 2017. Long-range control of gene expression via RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genet*, 13, e1006749.
- ROY, S., BANERJEE, V. & DAS, K. P. 2015. Understanding the Physical and Molecular Basis of Stability of Arabidopsis DNA Pol lambda under UV-B and High NaCl Stress. *PLoS One*, 10, e0133843.
- ROY, S., CHOUDHURY, S. R., SENGUPTA, D. N. & DAS, K. P. 2013. Involvement of AtPollambda in the repair of high salt- and DNA cross-linking agent-induced double strand breaks in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 162, 1195-210.
- RUIZ-FERRER, V. & VOINNET, O. 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol*, 60, 485-510.
- RUSK, N. 2012. Writing the histone code. *Nat Methods*, 9, 777.
- SADDHE, A. A., MANUKA, R. & PENNA, S. 2021. Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. *Physiol Plant*, 171, 739-755.
- SAITO, S. & UOZUMI, N. 2019. Guard Cell Membrane Anion Transport Systems and Their Regulatory Components: An Elaborate Mechanism Controlling Stress-Induced Stomatal Closure. *Plants (Basel)*, 8.
- SAKUMA, Y., MARUYAMA, K., QIN, F., OSAKABE, Y., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2006. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18822-7.
- SARKIES, P. & MISKA, E. A. 2014. Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 525-35.
- SCHAGGER, H., AQUILA, H. & VON JAGOW, G. 1988. Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem*, 173, 201-5.
- SCHATLOWSKI, N. & KOHLER, C. 2012. Tearing down barriers: understanding the molecular mechanisms of interploidy hybridizations. *J Exp Bot*, 63, 6059-67.
- SCHOFT, V. K., CHUMAK, N., MOSIOLEK, M., SLUSARZ, L., KOMNENOVIC, V., BROWNFIELD, L., TWELL, D., KAKUTANI, T. & TAMARU, H. 2009. Induction of RNA-directed DNA methylation upon decondensation of constitutive heterochromatin. *EMBO Rep*, 10, 1015-21.
- SCHRADER, L. & SCHMITZ, J. 2019. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol Ecol*, 28, 1537-1549.
- SCHRAMM, F., LARKINDALE, J., KIEHLMANN, E., GANGULI, A., ENGLICH, G., VIERLING, E. & VON KOSKULL-DORING, P. 2008. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant Journal*, 53, 264-74.



- SCHWAB, R., MAIZEL, A., RUIZ-FERRER, V., GARCIA, D., BAYER, M., CRESPI, M., VOINNET, O. & MARTIENSSEN, R. A. 2009. Endogenous TasiRNAs mediate non-cell autonomous effects on gene regulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 4, e5980.
- SECCO, D., WANG, C., SHOU, H., SCHULTZ, M. D., CHIARENZA, S., NUSSAUME, L., ECKER, J. R., WHELAN, J. & LISTER, R. 2015. Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements. *Elife*, 4.
- SHABALA, S. & MACKAY, A. 2011. Ion Transport in Halophytes. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era*, 57, 151-199.
- SHAH, S., VERMA, T., RASHID, M., GADEWAL, N. & GUPTA, S. 2020. Histone H2A isoforms: Potential implications in epigenome plasticity and diseases in eukaryotes. *J Biosci*, 45.
- SHAHID, Z., SIMPSON, B., MIAO, K. H. & SINGH, G. 2020. Genetics, Histone Code. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- SHAPULATOV, U., VAN HOOGDALM, M., SCHREUDER, M., BOUWMEESTER, H., ABDURAKHMONOV, I. Y. & VAN DER KROL, A. R. 2018. Functional intron-derived miRNAs and host-gene expression in plants. *Plant Methods*, 14, 83.
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2006. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 221-227.
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*, 58, 221-7.
- SHUAI, H. W., MENG, Y. J., LUO, X. F., CHEN, F., QI, Y., YANG, W. Y. & SHU, K. 2016. The roles of auxin in seed dormancy and germination. *Yi Chuan*, 38, 314-22.
- SHUKLA, A., CHAURASIA, P. & BHAUMIK, S. R. 2009. Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1419-33.
- SHVACHKO NCAPITAL A, C. & KHLESTKINA, E. K. 2020. Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*, 24, 451-458.
- SIBLEY, C. R., SEOW, Y., SAAYMAN, S., DIJKSTRA, K. K., EL ANDALOUSSI, S., WEINBERG, M. S. & WOOD, M. J. 2012. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res*, 40, 438-48.
- SINCLAIR, T. R. & SERRAJ, R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell and Environment*, 25, 333-341.
- SINGH, A. K. & MUELLER-PLANITZ, F. 2021. Nucleosome Positioning and Spacing: From Mechanism to Function. *J Mol Biol*, 433, 166847.
- SKINNER, M. K. & GUERRERO-BOSAGNA, C. 2009. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics*, 1, 111-117.
- SKIRYCZ, A. & INZE, D. 2010. More from less: plant growth under limited water. *Curr Opin Biotechnol*, 21, 197-203.

- SLOTKIN, R. K., VAUGHN, M., BORGES, F., TANURDZIC, M., BECKER, J. D., FEIJO, J. A. & MARTIENSSEN, R. A. 2009. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 136, 461-72.
- SMART, R. E. 1974. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiol*, 53, 258-60.
- STANGE, A., HEDRICH, R. & ROELFSEMA, M. R. 2010. Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization. *Plant J*, 62, 265-76.
- STOUTE, A. I., VARENKO, V., KING, G. J., SCOTT, R. J. & KURUP, S. 2012. Parental genome imbalance in Brassica oleracea causes asymmetric triploid block. *Plant J*, 71, 503-16.
- SUN, L., ZHANG, P., WANG, R., WAN, J., JU, Q., ROTHSTEIN, S. J. & XU, J. 2019. The SNAC-A Transcription Factor ANAC032 Reprograms Metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 60, 999-1010.
- SUTTLE, J. C. & HULTSTRAND, J. F. 1993. Involvement of Abscisic Acid in Ethylene-Induced Cotyledon Abscission in Cotton Seedlings. *Plant Physiol*, 101, 641-646.
- SZEGLETES, Z., ERDEI, L., TARI, I. & CSEUZ, L. 2000. Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, 28, 403-410.
- TARIQ, M. & PASZKOWSKI, J. 2004. DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet*, 20, 244-51.
- THOMAS, C. L., BAYER, E. M., RITZENTHALER, C., FERNANDEZ-CALVINO, L. & MAULE, A. J. 2008. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol*, 6, e7.
- TREJO-ARELLANO, M. S., MAHREZ, W., NAKAMURA, M., MORENO-ROMERO, J., NANNI, P., KOHLER, C. & HENNIG, L. 2017. H3K23me1 is an evolutionarily conserved histone modification associated with CG DNA methylation in Arabidopsis. *Plant J*, 90, 293-303.
- TRICKER, P. J., GIBBINGS, J. G., RODRIGUEZ LOPEZ, C. M., HADLEY, P. & WILKINSON, M. J. 2012. Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J Exp Bot*, 63, 3799-813.
- TSUZUKI, M., SETHURAMAN, S., COKE, A. N., ROTH, M. H., BOYLE, A. P. & WIERZBICKI, A. T. 2020. Broad noncoding transcription suggests genome surveillance by RNA polymerase V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 30799-30804.
- TUCKER, M. R., OKADA, T., HU, Y., SCHOLEFIELD, A., TAYLOR, J. M. & KOLTUNOW, A. M. 2012. Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in Arabidopsis. *Development*, 139, 1399-404.
- TURCK, F., ROUDIER, F., FARRONA, S., MARTIN-MAGNIETTE, M. L., GUILLAUME, E., BUISINE, N., GAGNOT, S., MARTIENSSEN, R. A., COUPLAND, G. & COLOT, V. 2007. Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet*, 3, e86.
- URAO, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., MITSUKAWA, N., SHIBATA, D. & SHINOZAKI, K. 1996. Molecular cloning and characterization of a gene

- that encodes a MYC-related protein in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 32, 571-6.
- VAISTIJ, F. E. & JONES, L. 2009. Compromised virus-induced gene silencing in RDR6-deficient plants. *Plant Physiol*, 149, 1399-407.
- VAUCHERET, H. 2005. MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production. *Sci STKE*, 2005, pe43.
- VAUCHERET, H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci*, 13, 350-8.
- VAZQUEZ, F., VAUCHERET, H., RAJAGOPALAN, R., LEPERS, C., GASCIOLLI, V., MALLORY, A. C., HILBERT, J. L., BARTEL, D. P. & CRETE, P. 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell*, 16, 69-79.
- VERMA, V., RAVINDRAN, P. & KUMAR, P. P. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol*, 16, 86.
- VIDAL, E. A., ALVAREZ, J. M. & GUTIERREZ, R. A. 2014. Nitrate regulation of AFB3 and NAC4 gene expression in Arabidopsis roots depends on NRT1.1 nitrate transport function. *Plant Signal Behav*, 9, e28501.
- WALIA, H., JOSEFSSON, C., DILKES, B., KIRKBRIDE, R., HARADA, J. & COMAI, L. 2009. Dosage-dependent deregulation of an AGAMOUS-LIKE gene cluster contributes to interspecific incompatibility. *Curr Biol*, 19, 1128-32.
- WANG, G. & KÖHLER, C. 2017. Epigenetic processes in flowering plant reproduction. *J Exp Bot*, 68, 797-807.
- WANG, Y., LIU, C., LI, K., SUN, F., HU, H., LI, X., ZHAO, Y., HAN, C., ZHANG, W., DUAN, Y., LIU, M. & LI, X. 2007. Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Mol Biol*, 64, 633-44.
- WARING, M. J. 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*, 13, 269-82.
- WEI, W., BA, Z., GAO, M., WU, Y., MA, Y., AMIARD, S., WHITE, C. I., RENDTLEW DANIELSEN, J. M., YANG, Y. G. & QI, Y. 2012. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*, 149, 101-12.
- WEINHEIMER, I., HAIKONEN, T., ALA-POIKELA, M., MOSER, M., STRENG, J., RAJAMAKI, M. L. & VALKONEN, J. P. 2016. Viral RNase3 Co-Localizes and Interacts with the Antiviral Defense Protein SGS3 in Plant Cells. *PLoS One*, 11, e0159080.
- WENDTE, J. M. & SCHMITZ, R. J. 2018. Specifications of Targeting Heterochromatin Modifications in Plants. *Mol Plant*, 11, 381-387.
- WIERZBICKI, A. T. 2002. [The mystery of histone H1]. *Postepy Biochem*, 48, 167-74.
- WIERZBICKI, A. T., COCKLIN, R., MAYAMPURATH, A., LISTER, R., ROWLEY, M. J., GREGORY, B. D., ECKER, J. R., TANG, H. & PIKAARD, C. S. 2012. Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes Dev*, 26, 1825-36.
- WU, L., MAO, L. & QI, Y. 2012. Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiol*, 160, 990-9.
- WU, L., ZHOU, H., ZHANG, Q., ZHANG, J., NI, F., LIU, C. & QI, Y. 2010. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell*, 38, 465-75.

- XIE, M. & YU, B. 2015. siRNA-directed DNA Methylation in Plants. *Curr Genomics*, 16, 23-31.
- XIE, Q. & GUO, H. S. 2006. Systemic antiviral silencing in plants. *Virus Res*, 118, 1-6.
- XIE, Z. H. 2009. [The role of endogenous small RNAs in plant stress responses]. *Yi Chuan*, 31, 809-17.
- YAARI, R., KATZ, A., DOMB, K., HARRIS, K. D., ZEMACH, A. & OHAD, N. 2019. RdDM-independent de novo and heterochromatin DNA methylation by plant CMT and DNMT3 orthologs. *Nat Commun*, 10, 1613.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2007. [Molecular mechanisms of abiotic stress responses: water and temperature stress conditions--overview]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 52, 515-6.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 1993a. Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. *Plant Physiol*, 101, 1119-20.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 1993b. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 236, 331-40.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 781-803.
- YAMAMOTO, Y. Y., ICHIDA, H., MATSUI, M., OBOKATA, J., SAKURAI, T., SATOU, M., SEKI, M., SHINOZAKI, K. & ABE, T. 2007. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics*, 8, 67.
- YANG, L. P., FANG, Y. Y., AN, C. P., DONG, L., ZHANG, Z. H., CHEN, H., XIE, Q. & GUO, H. S. 2013. C2-mediated decrease in DNA methylation, accumulation of siRNAs, and increase in expression for genes involved in defense pathways in plants infected with beet severe curly top virus. *Plant J*, 73, 910-7.
- YE, R., CHEN, Z., LIAN, B., ROWLEY, M. J., XIA, N., CHAI, J., LI, Y., HE, X. J., WIERZBICKI, A. T. & QI, Y. 2015. A Dicer-Independent Route for Biogenesis of siRNAs that Direct DNA Methylation in Arabidopsis. *Mol Cell*.
- YE, R., CHEN, Z., LIAN, B., ROWLEY, M. J., XIA, N., CHAI, J., LI, Y., HE, X. J., WIERZBICKI, A. T. & QI, Y. 2016. A Dicer-Independent Route for Biogenesis of siRNAs that Direct DNA Methylation in Arabidopsis. *Mol Cell*, 61, 222-35.
- YE, R., WANG, W., IKI, T., LIU, C., WU, Y., ISHIKAWA, M., ZHOU, X. & QI, Y. 2012. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Arabidopsis Argonaute4/siRNA complexes. *Mol Cell*, 46, 859-70.
- YOSHIKAWA, M., PERAGINE, A., PARK, M. Y. & POETHIG, R. S. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev*, 19, 2164-75.
- YOU, W., LORKOVIC, Z. J., MATZKE, A. J. & MATZKE, M. 2013. Interplay among RNA polymerases II, IV and V in RNA-directed DNA methylation at a low copy transgene locus in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, 82, 85-96.

- YU, D., FAN, B., MACFARLANE, S. A. & CHEN, Z. 2003. Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact*, 16, 206-16.
- ZEMACH, A., KIM, M. Y., HSIEH, P. H., COLEMAN-DERR, D., ESHED-WILLIAMS, L., THAO, K., HARMER, S. L. & ZILBERMAN, D. 2013. The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell*, 153, 193-205.
- ZHANG, B., PAN, X., COBB, G. P. & ANDERSON, T. A. 2006a. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol*, 289, 3-16.
- ZHANG, H. & ZHU, J. K. 2011. RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 142-7.
- ZHANG, H. & ZHU, J. K. 2012. Seeing the forest for the trees: a wide perspective on RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev*, 26, 1769-73.
- ZHANG, X., DU, P., LU, L., XIAO, Q., WANG, W., CAO, X., REN, B., WEI, C. & LI, Y. 2008. Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology*, 374, 351-60.
- ZHANG, X., YUAN, Y. R., PEI, Y., LIN, S. S., TUSCHL, T., PATEL, D. J. & CHUA, N. H. 2006b. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, 20, 3255-68.
- ZHANG, Y., RAMMING, A., HEINKE, L., ALTSCHMIED, L., SLOTKIN, R. K., BECKER, J. D., KAPPEL, C. & LENHARD, M. 2019. The poly(A) polymerase PAPS1 interacts with the RNA-directed DNA-methylation pathway in sporophyte and pollen development. *Plant J*, 99, 655-672.
- ZHENG, Z., XING, Y., HE, X. J., LI, W., HU, Y., YADAV, S. K., OH, J. & ZHU, J. K. 2010. An SGS3-like protein functions in RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant J*, 62, 92-9.
- ZHOU, S., LIU, X., ZHOU, C., ZHOU, Q., ZHAO, Y., LI, G. & ZHOU, D. X. 2016. Cooperation between the H3K27me3 Chromatin Mark and Non-CG Methylation in Epigenetic Regulation. *Plant Physiol*, 172, 1131-1141.
- ZHU, B. & REINBERG, D. 2011. Epigenetic inheritance: Uncontested? *Cell Res*.
- ZHU, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 247-73.
- ZHU, Y., ROWLEY, M. J., BOHMDORFER, G. & WIERZBICKI, A. T. 2013. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol Cell*, 49, 298-309.

**Tabla 3. Genes blanco encontrados en *ago4-2*.**

AGI	Deregulation in <i>ago4-2</i> †	DNA methylation difference ‡	Name
AT2G05786 §	3.23818	12.4681	hypothetical protein
AT5G35830 §	2.28452	11.8333	Ankyrin repeat family protein
AT3G25490 §	1.23218	11.0896	Protein kinase family protein
AT3G15300 §	0.734898	18.8961	VQ motif-containing protein
AT3G28940 §	0.635058	15.7812	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein
AT5G37670 §	0.604745	19.6897	HSP20-like chaperones superfamily protein
AT3G26470 §	0.576367	27.0098	Powdery mildew resistance protein, RPW8 domain
AT3G26480 §	0.536978	27.0098	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
AT5G52070 §	0.474015	18.2488	Agenet domain-containing protein
AT5G37660 §	0.331682	19.6897	plasmodesmata-located protein
AT1G41830 §	0.225374	19.6587	SKU5-similar 6
AT5G07680	0.114474	12.8979	NAC domain containing protein
AT2G19830 §	0.0149694	10.619	SNF7 family protein

† Deregulation is represented as follows:  $\log_2((FC\ ago4-2\ NaCl\ vs\ Col-0\ NaCl) / (FC\ Col-0\ NaCl\ vs\ Col-0\ MS))$ .

Only targets with repression in Col-0 NaCl vs Col-0 MS were selected

‡ DNA methylation difference is the percentage result from:  $(ago4-2\ NaCl - (Col-0\ NaCl - Col-0\ MS))\ CHH\ DNA\ methylation$

§ Target is also found in *ago4-3*



**Tabla 4. Genes blanco encontrados en *ago4-3*.**

AGI	Deregulation in <i>ago4-3</i> †	DNA methylation difference ‡	Name
AT2G05786 §	3.22245	16.4079	hypothetical protein
AT5G35830 §	2.27079	13.3234	Ankyrin repeat family protein
AT5G52070 §	1.6868	50.3815	Agenet domain-containing protein
AT4G11320	1.57879	43.9872	Papain family cysteine protease
AT3G25490 §	1.39769	12.0031	Protein kinase family protein
AT3G15300 §	0.633385	23.2755	VQ motif-containing protein
AT5G37660 §	0.559208	17.0167	plasmodesmata-located protein 7
AT3G28940 §	0.444741	19.4587	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein
AT1G41830 §	0.422577	21.0014	SKU5-similar 6
AT5G08040	0.368176	29.6957	mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog
AT2G28740	0.311433	33.271	histone H4
AT5G37670 §	0.286775	17.0167	HSP20-like chaperones superfamily protein
AT2G19830 §	0.255223	14.2717	SNF7 family protein
AT1G35580	0.235531	36.0381	cytosolic invertase 1
AT3G26470 §	0.140622	33.4573	Powdery mildew resistance protein, RPW8 domain
AT4G08180	0.133327	19.2304	OSBP(oxysterol binding protein)-related protein 1C
AT3G25470	0.0501604	33.4573	bacterial hemolysin-related
AT3G26480 §	0.00304088	35.4997	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein

† Deregulation is represented as follows:  $\log_2((FC\ ago4-3\ NaCl\ vs\ Col-0\ NaCl) / (FC\ Col-0\ NaCl\ vs\ Col-0\ MS))$ . were selected

Only targets with repression in Col-0 NaCl vs Col-0 MS

‡ DNA methylation difference is the percentage result from:  $(ago4-3\ NaCl - (Col-0\ NaCl - Col-0\ MS)) / CHH\ DNA\ methylation$




§ Targets also found in *ago4-2*

**Tabla 5. Función de los genes blanco de RdDM.**

AGI	Name	Description	Function	References
At2g25490	EBF1	Ub-protein ligase E3	Essential for proper ethylene perception together with EBF2	Binder et al., 2007
At2g19830	VPS32 or SNF7.2	SFN7-domain protein	Involved in vacuolar protein sorting, and component of the ESCORT complex	Winter and Houser, 2006; Gao et al., 2017
At5g35830	At5g35830	Ankirin-repeat family protein	Implicated in targeting cytosol proteins to organellar outer membranes	Becerra et al., 2004; Gissot et al., 2006
At5g37660	PDLP7	Plasmodesmata-located protein 7	Protein containing two DUF26 motifs and implicated in bacterial immunity	Thomas et al., 2008; Aung et al., 2019
At5g52070	At5g52070	Agenet domain-containing protein	Associated to chromatin remodeling with significant impact on gene expression. It has been proposed as an RdDM target	Maurer-Stroh et al., 2003; Kurihara et al., 2008
At3g15300	MVQP	VQ motif-containing protein	This protein is phosphorylated by MAPKs and interacts with WRKY transcription factors	Cheng et al., 2012; Jing and Lin, 2015
At5g07680	NAC4	NAC domain-containing protein	Its transcript is targeted by miR164 and its expression is regulated by AFB3, an auxin receptor	Vidal et al., 2013; Lee et al., 2017
At1g41830	SKS6	SKU-similar 6	A multicopper oxidase-like protein involved in cotyledon vascular patterning	Jacobs and Roe, 2005



# The canonical RdDM pathway mediates the control of seed germination timing under salinity

Víctor Miguel Palomar<sup>1,†</sup> , Alejandro Garcíarrubio<sup>2</sup>, Adriana Garay-Arroyo<sup>3</sup>, Coral Martínez-Martínez<sup>1</sup>, Omar Rosas-Bringas<sup>1</sup>, José L. Reyes<sup>1</sup>  and Alejandra A. Covarrubias<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. C.P 62250, Mexico,

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. C.P 62250, Mexico, and

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N anexo Jardín Botánico Exterior, Ciudad Universitaria, Ciudad de México C.P. 04500, México

Received 8 February 2018; revised 11 September 2020; accepted 26 October 2020.

\*For correspondence (e-mail crobles@ibt.unam.mx).

†Present address: Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA

## SUMMARY

Plants respond to adverse environmental cues by adjusting a wide variety of processes through highly regulated mechanisms to maintain plant homeostasis for survival. As a result of the sessile nature of plants, their response, adjustment and adaptation to the changing environment is intimately coordinated with their developmental programs through the crosstalk of regulatory networks. Germination is a critical process in the plant life cycle, and thus plants have evolved various strategies to control the timing of germination according to their local environment. The mechanisms involved in these adjustment responses are largely unknown, however. Here, we report that mutations in core elements of canonical RNA-directed DNA methylation (RdDM) affect the germination and post-germination growth of *Arabidopsis* seeds grown under salinity stress. Transcriptomic and whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) analyses support the involvement of this pathway in the control of germination timing and post-germination growth under salinity stress by preventing the transcriptional activation of genes implicated in these processes. Subsequent transcriptional effects on genes that function in relation to these developmental events support this conclusion.

**Keywords:** RdDM pathway, AGO4 protein, germination, *Arabidopsis*, RNA-directed DNA methylation, salinity.

## INTRODUCTION

Different mechanisms are involved in the tuning of an efficient and appropriate gene expression program under stressful conditions. Among the best-characterized control mechanisms are those modulating transcription patterns that involve pathways controlling the number and/or activity of different transcription factors (Zhu, 2002; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Nakashima *et al.*, 2009). More recently, additional mechanisms involving chromatin modifications, some of them persistent and/or heritable, have been implicated in the modulation of transcriptional activity denoting epigenetic regulation (Cubas *et al.*, 1999; Soppe *et al.*, 2000; Manning *et al.*, 2006; Pecinka and Mittelsten Scheid, 2012). Transcriptional control of gene

expression is also exerted through the recruitment of histone variants to different genome regions, histone post-translational modifications and DNA methylation, which leads to the conformation of a wide variety of 'epigenomes' depending on developmental or environmental signals, or those derived from their crosstalk.

Plants have evolved under frequent and/or sudden environmental changes; hence, the control of their developmental programs has co-evolved with their stress responses to be able to develop, grow and reproduce under adverse conditions (Skirycz and Inze, 2010). The ability to acclimate upon repeated exposure to a particular stress is frequently observed in plants, with such a response representing a form of short-term stress memory (Chinnusamy and Zhu, 2009; Secco *et al.*, 2015). This

capacity to retain a stress memory also occurs for longer periods (Molinier *et al.*, 2006; Chinnusamy and Zhu, 2009; Han and Wagner, 2014). Diverse processes that lead to stable DNA methylation and histone modifications have been identified in this behavior, allowing growth adjustment and reprogramming of developmental decisions (Chinnusamy and Zhu, 2009; Han and Wagner, 2014; Kinoshita and Seki, 2014).

DNA methylation is considered an essential plant contentment mechanism against transposable element activation, which may occur under hostile conditions such as high temperatures (Ito *et al.*, 2011; Matsunaga *et al.*, 2012). The extent of plant genome methylation is controlled by new/novel and maintenance DNA methylation, and by demethylation processes. DNA methylation may occur in symmetric (CG and CHG) and asymmetric (CHH) sequence contexts (H = C, A or T) (Law and Jacobsen, 2010). To date, four DNA methylation writers have been described in *Arabidopsis*: DNA METHYL TRANSFERASE 1 (MET1), responsible for maintaining CG methylation; CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3), which retains methylation in CHG contexts; CMT2, which retains methylation in CHG and CHH sequences; and RNA-directed DNA methylation (RdDM), which mediates the initiation and maintenance of DNA methylation, mostly at CHH sites and to a lesser extent at CG and CHG sequences, with the participation of DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2) and other context-specific methyltransferases (Law and Jacobsen, 2010).

RNA-directed DNA methylation (RdDM) consists of complex pathways occurring through the participation of small interfering RNAs (siRNAs) and requires a specific transcriptional assembly. The best-characterized RdDM pathway, known as canonical RdDM, depends on two plant-specific RNA polymerases, Pol IV and Pol V, which play key roles (Mahfouz, 2010; Matzke *et al.*, 2015; Wang and Axtell, 2017), together with RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2), type-III ribonuclease DICER-LIKE 3 (DCL3) (Henderson *et al.*, 2006; Blevins *et al.*, 2015; Zhai *et al.*, 2015) and ARGONAUTE 4 (AGO4) (Zilberman *et al.*, 2003), among other factors. RdDM is not exclusively a nuclear process, as siRNAs produced in the nucleus are exported to the cytoplasm (Ye *et al.*, 2012), where they are bound by AGO4 to then return to the nucleus to form a silencing complex by pairing with a scaffold long non-coding RNA produced by Pol V (Wierzbicki *et al.*, 2009; reviewed extensively by Matzke and Moshier, 2014; Matzke *et al.*, 2015). For the canonical RdDM pathway, there is evidence indicating that the formation of mature AGO4/siRNA complexes requires AGO4 endonucleolytic activity, which triggers the removal of the passenger strand, allowing entry of the mature AGO4/siRNA complex to the nucleus (Ye *et al.*, 2012). AGO4 is closely related to AGO6 and AGO9, proteins belonging to the same AGO family,

and has been shown to control DNA methylation through canonical and non-canonical RdDM pathways. AGO9 has a specific function by silencing transposable elements in the female gametophyte by a non-cell autonomous mechanism (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010). Although AGO6 also participates in controlling DNA methylation via AGO6/RdDM and non-canonical AGO6/RDR6 RdDM pathways, AGO4 and AGO6 have different preferences for siRNAs (Havecker *et al.*, 2010; McCue *et al.*, 2015). Genome-wide methylation analyses of *ago4*, *ago6* or *ago4 ago6* mutants showed that there is very low redundancy between these proteins, indicating that they do not have exactly the same function, although they show some common targets (Havecker *et al.*, 2010; Eun *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2015; McCue *et al.*, 2015).

The participation of the RdDM pathway in different plant processes is exposed by phenotypes found in various plant species, including *Zea mays* (maize; Hollick, 2010), *Oryza sativa* (rice; Wu *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014), *Solanum lycopersicum* (tomato; Gouil and Baulcombe, 2016; Corem *et al.*, 2018), and two Brassicaceae species, *Brassica rapa* (Grover *et al.*, 2018) and *Capsella rubella* (Wang *et al.*, 2020). However, although dynamic DNA methylation occurs during different developmental stages, in the absence of RdDM core proteins few phenotypes have been detected in *Arabidopsis thaliana* plants growing under optimal conditions (Matzke *et al.*, 2015). Among these are a delay in flowering time (Pontier *et al.*, 2005; Haag and Pikaard, 2011), the anomalous expression of imprinted genes leading to seed arrest (triploid block; Kradofer *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2018) and defects in endosperm development (Köhler and Lafon-Placette, 2015; Chow *et al.*, 2020). In addition, a role for RdDM during pathogen infection has been evidenced by the phenotypes of RdDM-associated protein mutants during infection by viruses (Hamera *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Brosseau *et al.*, 2016), bacteria (Agorio and Vera, 2007; Downen *et al.*, 2012; Gohlke *et al.*, 2013) or fungi (Lopez *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2014). The RdDM pathway is also involved in the plant response to abiotic stresses such as heat (Ito *et al.*, 2011; Popova *et al.*, 2013), low relative humidity (Tricker *et al.*, 2012) and low temperatures (Chan *et al.*, 2016).

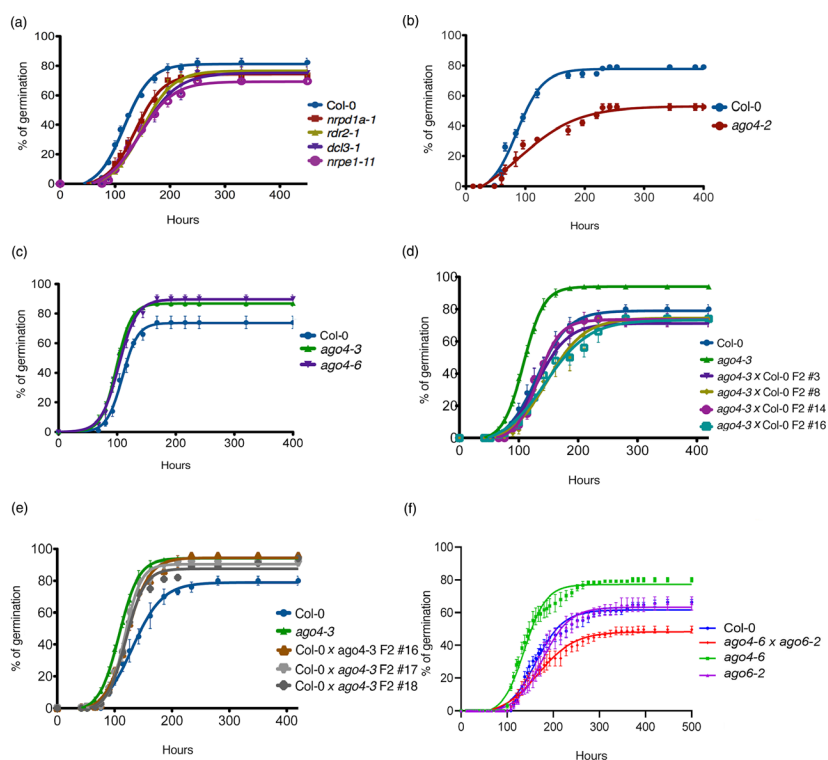
Germination is a crucial developmental stage in the plant life cycle, when plant embryos confront severe environmental changes: in orthodox seeds, when embryos switch from dry to humid conditions, or during embryo revival in unfavorable environments. Recently it was reported that DNA methylation is dynamically modulated during seed development and germination in *A. thaliana* under optimal conditions, where major changes occur in the methylation of the CHH sequence context (Kawakatsu *et al.*, 2017). In this work, we address the question of whether the canonical RdDM pathway is required for the proper germination of *A. thaliana* under conditions of high

salinity, a common condition present in arid and semi-arid regions, in degraded croplands and in contaminated soils. We demonstrate that the RdDM pathway plays a key role in the plant response to salinity during germination and early seedling growth. Accordingly, RNA-seq comparative analyses from wild-type plants and *AGO4* null and weak mutants, germinated in media with or without NaCl, show that in response to salinity RdDM is mostly involved in the control of embryo development and germination genes, and to a lesser degree in the regulation of genes implicated in stress tolerance. Whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) analyses support the conclusion that this response is a consequence of the RdDM pathway modulating gene expression, mainly by controlling DNA methylation on its usual targets and preventing the activation of genes in response to salinity. These results agree with changes in the protein levels and localization of RdDM components during *Arabidopsis* germination and early seedling growth under this environmental adversity.

## RESULTS

### The canonical RdDM pathway is required for optimal germination under salinity stress

As there is evidence of a dynamic reprogramming of DNA methylation during seed development and germination and considering that germination is a critical process that repeatedly exposes the embryonic plant to extremes, we asked whether the RdDM pathway is involved in the plant response to salinity. To address this, we evaluated the germination rate of different mutant lines lacking the core proteins of the canonical RdDM pathway: DCL3, RDR2, and the largest subunits of Pol IV (NRPD1) and Pol V (NRPE1) (Matzke and Moshier, 2014). Under optimal conditions, all wild-type *Arabidopsis* (Col-0) and mutant lines germinated at similar rates, reaching 100% germination (Figure S1a). In contrast, when the seeds of these mutants were germinated under high salt concentration (250 mM NaCl), their germination rate significantly decreased ( $P = 1e^{-4}$ )



**Figure 1.** RNA-directed DNA methylation (RdDM) and ARGONAUTE 4 (AGO4) are required for the germination process under salt stress. (a–f) *Arabidopsis* seed germination curves in media containing 250 mM NaCl. (a) Comparison between RdDM core component mutant (*nrpd1a-1*, *rdr2-1*, *dcl3-1* and *nrpe1-11*) and wild-type (Col-0) lines ( $P = 1e^{-4}$ ), under the Col-0 background. Differences between *nrpe1-11* and *nrpd1a-1*, and between *nrpe1-11* and *rdr2-1*, were also significant ( $P = 1e^{-4}$  and  $P = 3e^{-4}$ , respectively). (b) Germination of *ago4-2* (point mutant allele) compared with the wild type (Col-0;  $P = 1e^{-4}$ ). (c) Comparison between two *AGO4* null mutant alleles (*ago4-3* and *ago4-6*) and the wild type (Col-0;  $P = 1e^{-4}$ ), under the Col-0 background. (d) Germination rate and capacity of *ago4-3* complementation lines compared with mutant and wild-type (Col-0) lines ( $P = 1e^{-4}$ ). The wild-type allele was introduced by crossing into *ago4-3* homozygous plants and the resultant F<sub>2</sub> plants (homozygous for the wild-type allele) were used for the experiment. (e) Germination rate and capacity of *ago4-3* introgression lines compared with the *ago4-3* mutant and the wild type (Col-0;  $P = 1e^{-4}$ ). The *ago4-3* mutant allele was introduced into wild-type plants by genetic crosses and the resultant F<sub>2</sub> plants (homozygous for the mutant allele *ago4-3*) were used for the experiment. (f) Comparison between wild type (Col-0), *ago4-6* and *ago6-2* single mutants, and *ago4-6 ago6-2* double mutant (homozygous for both mutant alleles;  $P = 1e^{-4}$ ). The germination analyses under optimal conditions are shown in Figure S1.

compared with the wild type (Figure 1a), indicating that the canonical RdDM pathway is required for proper germination under conditions of high salinity.

Given this evidence, under the same conditions we analyzed seeds carrying an AGO4 point mutation allele (*ago4-2*; E641K within the PIWI domain, close to the residues required for AGO4 slicing activity), which behaves as a dominant-negative allele and causes defective DNA methylation by producing a less active protein, according to Agorio and Vera (2007). The results showed that *ago4-2* seeds present lower germination rates under salt stress, when compared with wild-type seeds (Figure 1b), consistent with the phenotype shown by the other RdDM-defective mutants (Figure 1a), although its germination profile under optimal conditions is only slightly changed (Figure S1b). This result confirms that the whole canonical RdDM is involved in germination under these environmental conditions.

As a phenotype similar to that of *ago4-2* would be expected for a mutant lacking AGO4 as part of the RdDM pathway, we analyzed the effect of the absence of AGO4 protein on germination efficiency under salt stress using a null AGO4 mutant (*ago4-3*). In sharp contrast to the negative effect on germination observed for the rest of the mutants (Figure 1a,b), under salt stress the lack of AGO4 protein led to a higher germination rate when compared with wild-type seeds (Col-0; Figure 1c). The same effect was detected for other AGO4 null mutant alleles (*ago4-6*; Figure 1c), some of them in different genetic backgrounds (*ago4-1*, *Ler* ecotype; *ago4-4*, *Ws* ecotype; Figure S2a,b, respectively). These AGO4 null alleles also reached similar germination efficiency compared with the wild type under optimal conditions (Figure S1c–e). The absence of the AGO4 protein in the different null mutants was confirmed by Western blot experiments (Figure S3). The salt concentration dependence of the germination phenotype in the absence of these RdDM components was also tested (germination under 150 and 200 mM NaCl), showing that the germination rate decreased in the null mutants of the RdDM pathway, as well as in the point mutant *ago4-2*; meanwhile, the germination of the three null *ago4* mutants increased compared with the wild type, as expected (Figure S4a–h), confirming that the observed phenotypes result from salt exposure.

To validate the contribution of AGO4 to the observed phenotypes, the wild-type gene was introduced into the *ago4-3* null mutant by genetic crosses (Col-0 × *ago4-3*). Analysis of the germination rate under optimal and stress conditions of the resultant F<sub>2</sub> lines showed a recovery of the wild-type phenotype in plants where wild-type AGO4 protein levels were detected (Figures 1d and S3). Additionally, the *ago4-3* null allele was introgressed into wild-type Col-0 plants (*ago4-3* × Col-0) and the resulting homozygous lines (F<sub>2</sub>), where AGO4 protein was not detected by Western blot (Figure S3), showed high germination rates

under salt stress, similar to those shown by the *ago4* null mutants (Figure 1e), confirming that this phenotype resulted from the absence of AGO4. The germination rate of the crossed lines under optimal conditions showed no differences (Figure S1f,g).

The phenotypes of *ago4* mutants extend into seedling stages, with no significant effect when seedlings were grown under optimal conditions (Figure S5c,d). Seedlings carrying AGO4 null alleles showed longer primary roots when exposed to salinity compared with wild-type plants (Figure S5a,b), whereas the *ago4-2* mutant showed a detrimental effect on primary root length (Figure S5a). The phenotypic effects of these mutants are analogous to those observed during germination (Figure 1b,c).

#### **AGO6 plays a role during germination under salinity when AGO4 is absent**

The contrasting difference between AGO4 null and *ago4-2* mutant phenotypes led us to hypothesize that either AGO4 was playing an additional role, independent of the RdDM pathway during this plant developmental stage in response to stress, or that in the absence of AGO4, AGO6, expressed in low levels in the seed embryo (Havecker *et al.*, 2010), could play an unusual role under these conditions. To distinguish between these two possibilities, the phenotype of the *ago4-6 ago6-2* double mutant was analyzed during germination under the same stress conditions. The results showed that the double mutant germinates with a lower rate than the wild-type genotype under salinity, similar to that shown by the mutants lacking other core RdDM elements, whereas it showed a wild-type phenotype under optimal conditions (Figures 1a,f and S1h), and in sharp contrast to the higher germination rate shown by the different *ago4* null mutants (Figures 1c,f and S2). These data indicate that the *ago4* phenotype did not result from an additional AGO4 function but rather from the contribution of AGO6 in this plant response, perhaps by binding siRNAs that in the absence of AGO4 are preferentially associated with AGO6, producing a synthetic phenotype. In the absence of both AGO proteins, the plant stress response is compromised as in the case of the rest of the RdDM mutants tested causing a deficient germination (Figure 1a, f). This interpretation is supported by the null *ago6* single-mutant phenotype, which showed wild-type behavior under the conditions tested (Figure 1f), indicating that AGO6 by itself does not play a role in this process.

#### **AGO4 protein abundance changes during germination and early seedling growth**

Given the above evidence indicating that RdDM is needed for optimal germination under salinity stress, and the critical role assigned to AGO4 in this pathway, we asked whether its abundance is modulated during this process. For this, we tracked AGO4 protein accumulation during



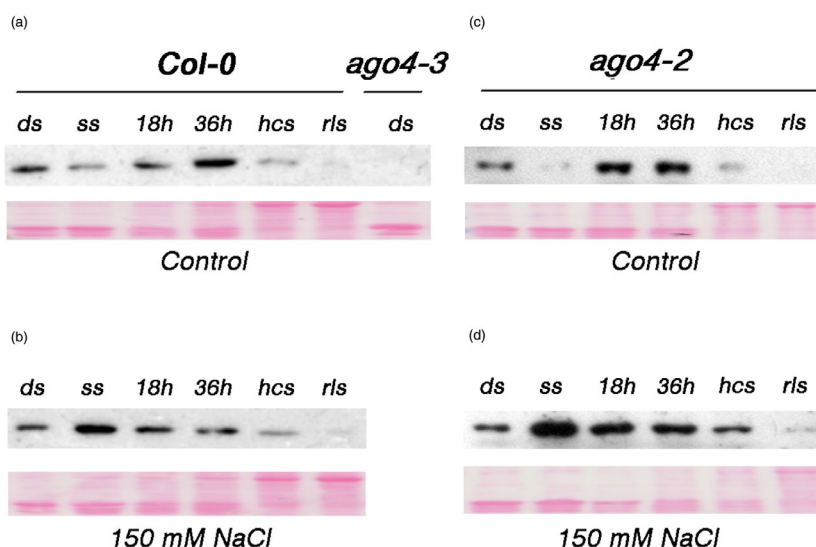
germination and throughout early seedling growth under optimal and salt-stress conditions. We performed Western blot assays using an AGO4-specific antibody against total protein extracts from six developmental stages: dry and stratified seeds, germinating seeds at 18 and 36 h, seedlings where hypocotyl and cotyledons have emerged from the seed coat, and seedlings with two rosette leaves, all germinated under optimal conditions. The results showed that the accumulated AGO4 protein present in dry seeds decreased after stratification, but then progressively increased until 36 h post-stratification, when its highest levels were achieved. After this time point, AGO4 protein levels gradually declined again until the last stage tested (Figure 2a). Under salinity conditions (150 mM NaCl), we found a markedly different AGO4 accumulation pattern, where the highest protein levels were detected in stratified seeds, with a subsequent gradual reduction, and with the lowest levels found in seedlings with two rosette leaves, as observed under non-stress conditions (Figure 2b). We did not detect changes in AGO4 transcript accumulation in response to salinity during germination (Figure S6), indicating that under these conditions AGO4 protein abundance is not controlled at the transcriptional level. It is worth mentioning that the accumulation patterns of the point mutant protein encoded by the *ago4-2* allele were similar to those found using wild-type seeds, indicating that AGO4-2 protein synthesis and stability are not drastically affected (Figure 2c,d). These data demonstrate not only that AGO4 is present during germination and early seedling growth, but also that its levels are modulated upon stress, in consonance with a functional role for the canonical RdDM pathway during these developmental stages and in response to adverse germination environments.

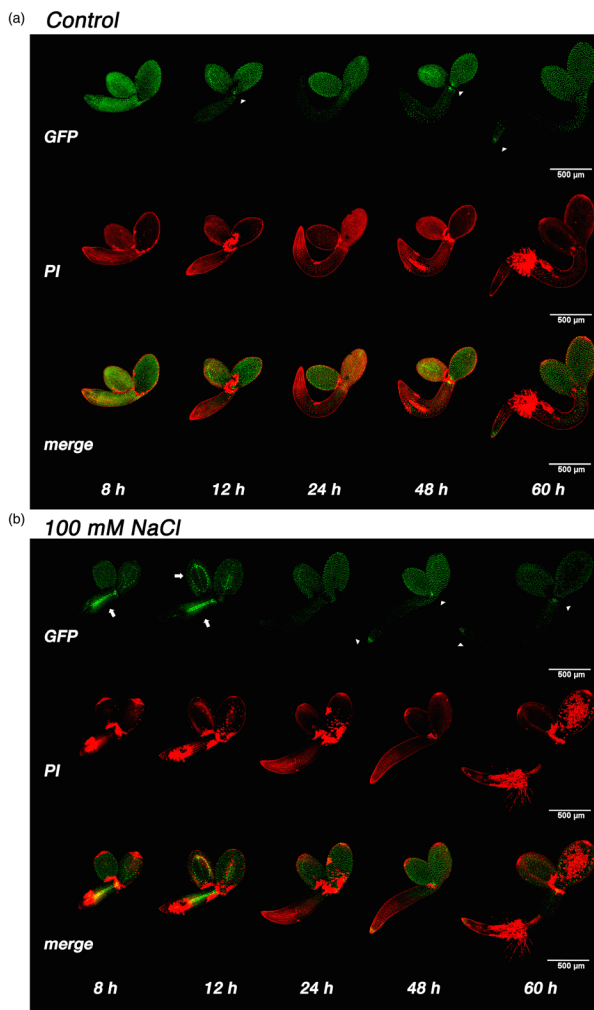
### AGO4 is differentially localized in response to salinity

To explore in which seedling regions RdDM exerts its function during seed germination, we determined the tissue distribution of AGO4 during germination and early seedling growth stages. For this end we used transgenic plants containing a *GFP-AGO4* translational fusion under the control of the *AGO4* endogenous promoter (*pAGO4::GFP-AGO4*) expressed in a wild type background (Ye *et al.*, 2012). Protein localization was determined by GFP fluorescence using confocal microscopy of isolated embryos and young seedlings at different times after imbibition. As expected for AGO4, most of the fluorescence signal was localized in cell nuclei across the different tissues (Figure S7). GFP fluorescence showed a high AGO4 abundance and broad distribution in embryos imbibed for 8 h (Figure 3a). Remarkably, just after testa rupture the AGO4 distribution changed, maintaining its abundance in cotyledons but with lower levels and more dispersed localization observed in radicles. This distribution pattern was then maintained throughout radicle protrusion, late germination phase and young seedling growth (60 h after imbibition). At the later stage AGO4 accumulation was even lower in cotyledons, whereas the signal was detected in hypocotyls and root tips (Figure 3a).

When this analysis was performed on embryos and seedlings exposed to salt stress (100 mM NaCl), GFP fluorescence was also found in cotyledons and radicles; however, a strong signal was clearly detected in vascular tissues in both embryo regions (Figure 3b). This pattern was also present after testa rupture and was followed by a significant reduction during subsequent stages, with the fluorescence signal being barely detected in the roots or cotyledons of young seedlings.

**Figure 2.** ARGONAUTE 4 (AGO4) protein levels are modulated during germination and in response to stress. (a, c) Western blot immunodetection of AGO4 protein during germination and early seedling development from wild-type (*Col-0*), *ago4-3* and *ago4-2* seeds, germinated under optimal conditions; ds, dry seeds; ss, stratified seeds; 18 and 36 h (after stratification); hcs, seedlings with emerged hypocotyls and cotyledons; rls, seedlings with two rosette leaves (upper row); Ponceau staining of the membranes used above, as loading reference (lower row). (b, d) As before, except that seeds were germinated in media containing 150 mM NaCl.





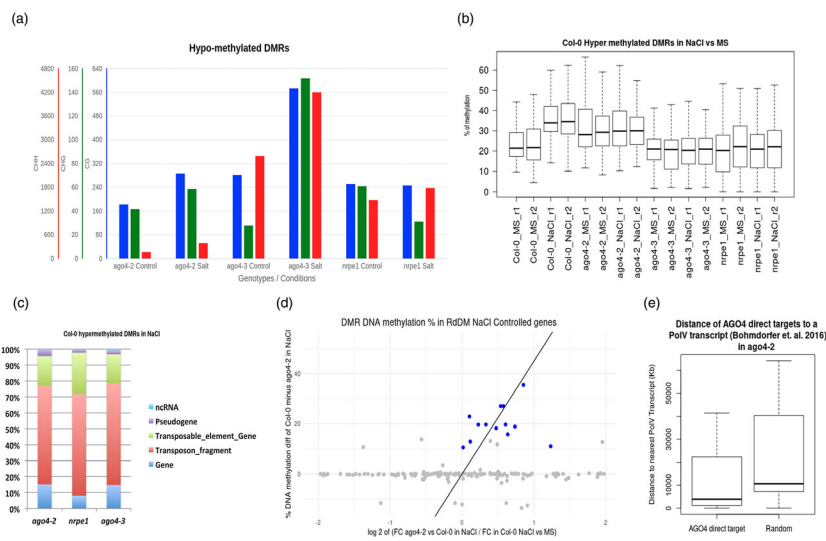
**Figure 3.** ARGONAUTE 4 (AGO4) shows differential tissue distribution during germination and early seedling development under optimal and high salt conditions. (a) GFP-AGO4 fluorescence detection in isolated embryos of 8, 12, 24, 48 and 60 h after imbibition (GFP, upper row); propidium iodide fluorescence of the same samples (PI, middle row); both signals merged (lower row). (b) Samples as described in (a), except that seeds were germinated in media supplemented with 100 mM NaCl. For detail, see Experimental procedures. These images are representative samples of at least eight individuals analyzed per experiment, and these observations were reproduced in four independent experiments. Arrowheads and arrows indicate apical and root meristematic regions, and vascular tissues showing high AGO4 abundance, respectively.

We noticed that during late germination stages and early seedling growth a sharp signal could be detected in shoot apical regions and in root tips (Figures 3a,b, and S8, arrowheads), consistent with previous findings by other groups using transcriptomic data obtained from roots of seedlings growing under optimal conditions (Kawakatsu *et al.*, 2016). This result strongly suggests that the canonical RdDM pathway plays a particular role in response to salinity during seed germination.

### RdDM controls CHH methylation during germination under salinity in a locus-specific manner

To obtain a mechanistic insight into the role of the canonical RdDM in the plant response to salinity, we explored the DNA methylation differences between RdDM-defective (*ago4-3*, *ago4-2* and *nrpe1-11*, a Pol V null mutant) and wild-type lines germinated under optimal or high-salinity conditions by performing WGBS. As we anticipated, according to the proposed RdDM mechanism, no strong differences were found in terms of the global proportion of methylated cytosines on any of the three different methylation contexts found in plants (CG, CHG and CHH) in the mutant alleles, when compared with the wild type (Figure S9a). The distribution of CHH methylation was slightly decreased in the chromosome arms without noticeable changes in the centromeric regions, whereas the other methylation contexts (CG and CHG) remained unaffected (Figure S9b). These results are consistent with the activity and distribution previously reported for RdDM in terms of global DNA methylation (Schoft *et al.*, 2009; Wierzbicki *et al.*, 2012; Zhang and Zhu, 2012; Yaari *et al.*, 2019). Moreover, we did not notice any prominent effect as result of the salinity treatment over the global DNA methylation or its distribution along chromosomes in the wild type or in RdDM mutants (Figure S9a,b). Overall, these results suggest that RdDM does not produce a widespread effect at the genome level, but rather that it acts in a locus-specific manner in response to salinity during germination, similar to its activity in other developmental stages.

To validate the latter hypothesis, we identified differentially methylated regions (DMRs, defined as >10% methylation change in each mutant, compared with Col-0, with  $P < 0.01$ , adjusted for false discovery rate, in 100-bp sliding windows from the two biological replicates; see Experimental procedures) for each set of growth conditions. This analysis showed 191, 2597 and 1481 CHH hypomethylated DMRs in *ago4-2*, *ago4-3* and *nrpe1*, respectively. This number was nearly doubled in the AGO4 mutants and was increased by 20% in *nrpe1* when seeds were exposed to salinity (Figure 4a; Table S1), strongly supporting an active locus-specific role of the RdDM pathway during germination in response to salt stress. Interestingly, we also observed changes in the number of CG and CHG DMRs, in agreement with the participation of RdDM in the maintenance of DNA methylation (Law and Jacobsen, 2010). An overlapping analysis between the DMRs identified and the genomic features (see Experimental procedures) showed, as expected, that most of the DMRs are located within transposable elements (TE genes and fragments; Figure S10a), and that <20% were located in protein-coding genes (including up to 2 Kb of their regulatory regions), non-coding genes or pseudogenes, confirming that the main role of RdDM is to control the methylation of TEs.



**Figure 4.** RNA-directed DNA methylation (RdDM) is required for the repression of a small subset of genes in response to salinity (a) Comparison between the numbers of hypomethylated differentially methylated regions (DMRs) identified in all of the genotypes and conditions tested in the Col-0 background. The y-axes show the number of hypo-DMRs in each methylation context. The precise values for each case are shown in Table S1. (b) RdDM dependence on the number of hypermethylated DMRs in wild-type seeds subjected to salinity treatments. Methylation is represented as a percentage for each genotype/treatment ( $n = 170$ ). (c) Genomic features of the RdDM-dependent Col-0 DMRs in NaCl affected in each of the RdDM mutants (<10% of CHH methylation compared with Col-0 NaCl). Bars represent percentages of the total number of features mentioned in the text. (d) Correlation analysis of the salinity-dependent hypermethylated genes found in *ago4-2* and its transcriptional release from the repressive status imposed by NaCl in RdDM-deficient plants (blue dots). Gray dots represent a random subset ( $n = 200$ ) of genes, with methylation status on its promoter region and transcriptional status shown as a control. (e) Distance to the nearest Pol V transcript with the selected subset of genes in (d) compared with the same number of random regions with the same length ( $n = 13$ ).

RdDM can also affect protein-coding genes during germination under the conditions tested, however.

### The *ago4-2* allele produces a low-activity AGO4 protein

As *ago4-2* was considered to be a dominant-negative AGO4 allele encoding a defective protein (Agorio and Vera, 2007), we expected a similar effect on methylation in *ago4-2* as in the null mutant (*ago4-3*). DMRs in *ago4-3* showed 10 times more hypomethylated CHH regions compared with *ago4-2* (Figure 4a; Table S1), however, suggesting that *ago4-2* produces an AGO4 weak allele. To investigate this possibility further, we performed an overlapping analysis of the DMRs identified in both mutants, under optimal and salinity conditions, and classified them into three sets: specific to *ago4-2*, specific to *ago4-3* or common to both. Under control conditions, we found 73, 2479 and 118 DMRs in these three sets, respectively. With NaCl treatment we found 179, 3985 and 221 DMRs in the three respective sets. Thus, in both conditions, about 60% of *ago4-2* DMRs are common with *ago4-3* (Figure S10b). We then looked at the methylation effects in DMR sets specific to *ago4-2* (Figure S10c,d) and to *ago4-3* (Figure S10e,f) in the different genetic backgrounds. The results showed that specific *ago4-2* DMRs present lower methylation than wild-type DMRs in *ago4-3* and *nrpe1* genotypes under both

conditions (Figure S10c,d), a reduction that was not detected before because it was lower than the cut-off value considered to define a DMR (10%, see Experimental procedures). When we looked at the methylation level of the specific *ago4-3* DMRs in *ago4-2*, we found that it was similar to that in the wild type, whereas in *nrpe1* it was low, as in *ago4-3* (Figure S10e,f). Therefore, these data indicate that the *ago4-2* allele encodes an AGO4 protein with lower influence on methylation levels than observed in the wild type, but not as reduced as in AGO4 or Pol V null mutants, consistent with an AGO4 weak allele. Despite the residual activity of the *ago4-2* allele in terms of DNA methylation, its phenotype is clearly similar to *nrpe1* and to other RdDM core element null mutants (Figure 1a,b), indicating that, even though the DNA methylation effect in *ago4-2* is not as penetrant as in *nrpe1*, it is sufficient to alter the RdDM impact on germination under salinity.

### The RdDM pathway controls locus-specific methylation in response to salinity during germination

To identify AGO4-dependent methylated regions, we looked for wild-type (Col-0) DMRs that gain CHH methylation under salinity stress. This analysis identified 170 DMRs with higher methylation by comparing stress vs non-stress in wild type seeds. To determine whether AGO4

was participating in the methylation of such regions in response to salinity, we compared their methylation profiles in *ago4-2* and *ago4-3* mutants grown in optimal and salinity conditions using the *nrpe1* methylation profile as the RdDM reference. The comparison of the methylation gain between non-stress and stress conditions showed differences for the wild-type line, as expected, but not for *nrpe1*, *ago4-2* and *ago4-3*. As anticipated for an AGO4 weak allele, *ago4-2* showed a small methylation decrease compared with *ago4-3* (Figure 4b). These results indicate that most of the locus-specific changes in CHH methylation in response to this stress depend on AGO4 and the RdDM activity.

Analysis of the genomic features of the DMRs exhibiting the strongest reduction in DNA methylation (>10%), when Col-0 was compared with *ago4-2* (20 regions), *nrpe1* (64 regions) or *ago4-3* (127 regions), showed that most of them correspond to TE genes and TE fragments, typical targets of the canonical RdDM (Figure 4c).

#### RdDM participates in the control of germination timing

To obtain information on the impact of AGO4 on gene expression during germination under salinity conditions, we performed RNA-seq experiments using Col-0, *ago4-3* and *ago4-2* seedlings germinated under optimal and salinity conditions. We first focused on the hypermethylated regions previously identified in Col-0 from salinity conditions that also showed lower DNA methylation levels in *ago4-2* (170 DMRs, see Figure 4b). We searched for protein-coding genes containing these regions, as well as for those falling within 5 kb on each side of the recognized TEs (Figure 4c). Out of 78 potential target genes, we identified a subset of 13 genes for which expression is lower in Col-0 in response to salt but is higher in *ago4-2*, consistent with the higher CHH methylation occurring nearby in wild-type genotypes (Figure 4d; Table 1). Hence, this result suggests that the RdDM-dependent CHH methylation deposition is responsible for the lower expression of these genes during germination under salinity, and that this repression is released in the absence of a functional AGO4/RdDM. In accordance with this outcome, these genes are located significantly closer to previously identified Pol V target sites, when compared with a set of randomly selected regions (Bohmdorfer *et al.*, 2016) (Figure 4e). Consequently, this set of RdDM-regulated genes might be at least partially responsible for the *ago4-2* germination phenotype observed under salt stress (Figure 1b).

Most of the genes identified (8/13) from this analysis are related to signal transduction or other regulatory functions, some of which have been involved in the control of dormancy and/or germination or in functions related to these processes (Table 2). Among them, EIN3 BINDING F-BOX1 (*EBF1*), encoding a component of the Ub-protein ligase (E3) that, together with *EBF2*, is essential for proper

**Table 1** RdDM target candidate list with a corresponding change in DNA methylation found in *ago4-2*

Targets found in <i>ago4-2</i>			
AGI <sup>b</sup>	Deregulation in <i>ago4-2</i> <sup>a</sup>	DNA methylation difference <sup>c</sup>	Name
AT2G05786 <sup>d</sup>	3.23818	12.4681	hypothetical protein
AT5G35830 <sup>d</sup>	2.28452	11.8333	Ankyrin repeat family protein
AT3G25490 <sup>d</sup>	1.23218	11.0896	Protein kinase family protein
AT3G15300 <sup>d</sup>	0.734898	18.8961	VQ motif-containing protein
AT3G28940 <sup>d</sup>	0.635058	15.7812	AlG2-like (avirulence induced gene) family protein
AT5G37670 <sup>d</sup>	0.604745	19.6897	HSP20-like chaperones superfamily protein
AT3G26470 <sup>d</sup>	0.576367	27.0098	Powdery mildew resistance protein, RPW8 domain
AT3G26480 <sup>d</sup>	0.536978	27.0098	Transducin family protein/ WD-40 repeat family protein
AT5G52070 <sup>d</sup>	0.474015	18.2488	Agenet domain-containing protein
AT5G37660 <sup>d</sup>	0.331682	19.6897	plasmodesmata-located protein
AT1G41830 <sup>d</sup>	0.225374	19.6587	SKU5-similar 6
AT5G07680	0.114474	12.8979	NAC domain containing protein
AT2G19830 <sup>d</sup>	0.0149694	10.619	SNF7 family protein

<sup>a</sup>Deregulation is represented as follows:  $\log_2((FC\ ago4-2\ NaCl)/(FC\ Col-0\ NaCl\ versus\ Col-0\ MS))$ .

<sup>b</sup>Only targets with repression in Col-0 NaCl versus Col-0 MS were selected.

<sup>c</sup>DNA methylation difference is the percentage result from:  $(ago4-2\ NaCl - (Col-0\ NaCl - Col-0\ MS))\ CHH\ DNA\ methylation$ .

<sup>d</sup>Target is also found in *ago4-3*.

ethylene signaling (Binder *et al.*, 2007), underscores the control of seed dormancy through the ethylene–DOG1 pathway under stress conditions (Nishimura *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). It is also worth noting the *NAC4* gene transcription factor, the expression of which is regulated by AFB3 (Vidal *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017), an auxin receptor involved in various aspects of plant development, including the auxin-mediated control of seed dormancy (Liu *et al.*, 2013).

When we performed the same analysis with the *ago4-3* null mutant we found a subset of 18 out of 83 candidate genes, the expression of which under salt treatment in Col-0 is derepressed in this mutant, consistent with the loss of CHH methylation on the nearby DMRs (Figure S11a) and their relative proximity to a Pol V transcribed region



(Bohmdorfer *et al.*, 2016) (Figure S11b). Twelve of these targets are shared with *ago4-2* (Table S2), indicating that they are *bona fide* AGO4/RdDM direct gene targets. Additional targets in this mutant could be a consequence of the complete loss of AGO4 activity and/or AGO6 interference, as demonstrated in the previous sections.

Beyond the direct targets, the phenotype of RdDM mutants should involve the deregulation of many downstream genes. To characterize these broader effects of AGO4/RdDM during germination, and in response to salinity, we analyzed the differential accumulation of transcripts in *ago4-2*, *ago4-3* and wild-type lines. We found that transcript accumulation profiles overall are similar between wild type and *ago4-3* lines, and slightly different to *ago4-2* (Figure S12a–c). Interestingly, differences were also found between wild type and the mutants even under optimal growth conditions (Figure S12a). This shows that although RdDM mutants have no detectable phenotype during germination in the absence of salt stress, they still have some transcriptional effects (Figure S1).

To identify the differentially accumulated transcripts under stress conditions between wild-type, *ago4-2* and *ago4-3* lines, we performed a correlation analysis (Figure S12b,c) and selected outliers as genes strongly upregulated or downregulated by salt in the mutants. As we anticipated, many genes are shared by the *ago4-2* and the *ago4-3* subsets (Figure S12d,e). The greater differences in abundance were found among transcripts associated with seed maturation, dormancy and germination (Figure 5a; Tables S3–S6), with most of them related to metabolic functions. Comparison analysis between *ago4-3* and wild-type expression patterns during germination under salt stress highlights the upregulation of transcripts involved in dormancy, germination and growth in *ago4-3* (Figure 5a),

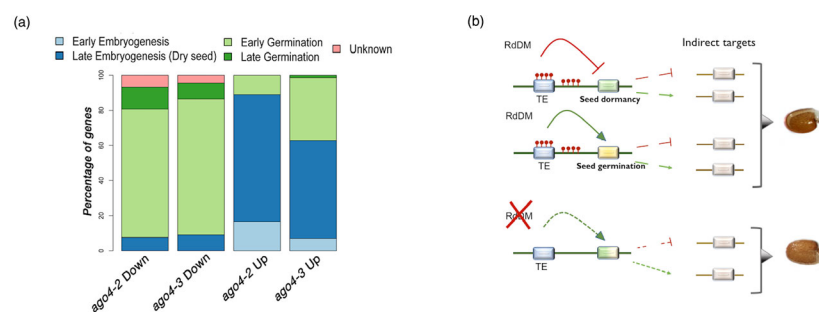
consistent with the higher germination rate of this line. This is also the case for transcripts encoding two 2C-type protein phosphatases (AHG1 and AHG3), proteins that are known to interact with DOG1, an ABA-independent key regulator of seed germination (Nishimura *et al.*, 2007; Nee *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019), as well as the transcript encoding ILITHYA (ILA), a protein that mediates the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by the activation of GCN2, and hence is involved in the modulation of translation under stress recovery (Faus *et al.*, 2018). Also, transcripts involved in growth and metabolism, such as ribosomal proteins, sucrose synthase, phosphofructokinase and stay-green protein, an SnRK1 subunit implicated in the regulation of carbon metabolism, among others, are upregulated (Table S3). The same analysis using *ago4-2* showed that the transcript encoding AHG1 was among the upregulated transcripts, indicating that the AGO4/RdDM pathway indirectly modulates its transcription. In addition, other notable upregulated transcripts encode for various late embryogenesis abundant proteins and for the ANAC032 transcription factor, involved in photosynthesis inhibition and the reprogramming of carbon and nitrogen metabolism (Sun *et al.*, 2019), processes that might be related to delayed germination (Table S5).

## DISCUSSION

Although most of the information on the regulatory roles of the RdDM pathway has been analyzed during reproductive processes (Matzke and Moshier, 2014; Matzke *et al.*, 2015), there are a few examples where the contribution of this pathway in the plant response to abiotic stress has been investigated (Ito *et al.*, 2011; Matsunaga *et al.*, 2012; Tricker *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2016). In this last case, the control of transposable elements has

**Table 2** Proposed ARGONAUTE 4 (AGO4)/RNA-directed DNA methylation (RdDM) targets and their functions

AGI	Name	Description	Function	References
At2g25490	EBF1	Ub-protein ligase E3	Essential for proper ethylene perception together with EBF2	Binder <i>et al.</i> , 2007
At2g19830	VPS32 or SNF7.2	SFN7-domain protein	Involved in vacuolar protein sorting, and component of the ESCORT complex	Winter and Hauser, 2006; Gao <i>et al.</i> , 2017
At5g35830	At5g35830	Ankirin-repeat family protein	Implicated in targeting cytosol proteins to organellar outer membranes	Becerra <i>et al.</i> , 2004; Gissot <i>et al.</i> , 2006
At5g37660	PDLP7	Plasmodesmata-located protein 7	Protein containing two DUF26 motifs and implicated in bacterial immunity	Thomas <i>et al.</i> , 2008; Aung <i>et al.</i> , 2019
At5g52070	At5g52070	Agenet domain-containing protein	Associated with chromatin remodeling with significant impact on gene expression. It has been proposed as an RdDM target	Maurer-Stroh <i>et al.</i> , 2003; Kurihara <i>et al.</i> , 2008
At3g15300	MVQP	VQ motif-containing protein	This protein is phosphorylated by MAPKs and interacts with WRKY transcription factors	Cheng <i>et al.</i> , 2012; Jing and Lin, 2015
At5g07680	NAC4	NAC domain-containing protein	Its transcript is targeted by miR164 and its expression is regulated by AFB3, an auxin receptor	Vidal <i>et al.</i> , 2013; Lee <i>et al.</i> , 2017
At1g41830	SKS6	SKU-similar 6	A multi-copper oxidase-like protein involved in cotyledon vascular patterning	Jacobs and Roe, 2005



**Figure 5.** RNA-directed DNA methylation (RdDM)-dependent ARGONAUTE 4 (AGO4) activity participates in the control of the germination process.

(a) Proportion of salt-responsive transcripts in *ago4-2* and *ago4-3* lines (Tables S3–S6). The classification into early and late embryogenesis (seed maturation) and early and late germination (initial growth processes and post-germination growth, respectively) categories was made considering the highest expression peak for every gene in the analysis.

(b) Proposed model for RdDM participation in the control of the germination process in response to adverse environments: in wild-type seeds, under stress conditions, the canonical RdDM pathway controls the germination process by favoring or repressing the expression of genes needed for its initiation and/or progression. This control is exerted through DNA methylation (red dots) of its canonical target regions (transposable elements, blue boxes) that neighbor the controlled genes; those genes may be key modulators of the germination process through the control of a broad transcriptional network (indirect targets). When the RdDM is lost this regulation is eliminated, affecting the appropriate response to stress during germination.

been described as one of the mechanisms regulating the transcription of a diversity of genes (Secco *et al.*, 2015; Au *et al.*, 2017), but only a small number of target genes have been identified (Kurihara *et al.*, 2008; Au *et al.*, 2017; Iwasaki *et al.*, 2019). Recently, it has been reported that non-canonical RdDM participates in the maternal control of *Arabidopsis* seed dormancy, as well as in the enhanced dormancy produced by cold during seed development (Iwasaki *et al.*, 2019). In this work, we addressed the involvement of the canonical RdDM pathway in the regulation of the plant response to abiotic stress imposed by salinity during germination, a critical developmental stage during the plant life cycle.

Our results showed that mutants affected in different canonical RdDM core elements exhibit delayed germination under salinity, demonstrating that this pathway participates in the modulation of the germination process in high-salt environments. Although RdDM has been implicated in the plant response to environmental stresses under other circumstances, our results show that it also plays an important role in the decision to germinate, a requirement for optimal adjustment in plants grown under stress.

Unexpectedly, the analysis of seeds lacking AGO4 (*ago4-3*) showed contrasting behavior, displaying a higher germination rate than wild-type seeds under stress conditions. This observation was further investigated showing that this phenotype is not the result of an additional RdDM-independent AGO4 function but instead is linked to the action of the AGO6 protein. These data lead us to propose that, under these conditions, when AGO4 is not available AGO6 is able to bind otherwise AGO4-specific siRNAs. As the AGO6 or AGO9 transcript levels do not change in the AGO4 mutants used (Figure S6), and given the AGO6 distribution reported in *Arabidopsis* seeds (Havecker *et al.*,

2010; Eun *et al.*, 2011), it is possible to predict that AGO6 would not be able to fully compensate for the absence of AGO4, therefore leading to a synthetic phenotype. The action of AGO6 was not detected in the *ago4-2* mutant, however. A plausible explanation for this outcome is that the defective AGO4 protein produced by this weak allele still efficiently binds siRNAs, and thus such siRNAs are not available for apocryphal AGO6 binding.

Consonant with the involvement of RdDM in the germination process in a non-stress environment (this work; Kawakatsu *et al.*, 2017), high AGO4 protein levels were detected in dry seeds, which change throughout germination and post-germination. The AGO4 tissue localization also changes throughout these periods, and in some stages the protein is also localized in root meristematic regions. The AGO4 post-germination distribution, where AGO4 levels decrease in radicles and do not change in cotyledons, are consistent with its participation during those stages, when seedlings have to confront their transition to a different environment.

Germination in the presence of high salt concentrations leads to a drastic change in AGO4 distribution; in particular, AGO4 becomes highly abundant in the radicle vascular cylinder, and with less intensity but clearly patent in cotyledon vasculature. Under both germination conditions it is observed that AGO4 protein levels decrease in the roots, whereas they do not change much in cotyledons through the post-germination stages and continue to be present in the meristematic regions up to the latest periods tested. Although at this point we do not have enough data to explain this remarkable shift in AGO4 allocation towards vascular tissues, it is likely that this is a response to the severe stress conditions occurring around vascular cells, where salt is transported once it is taken up from the

growth medium. The finding of AGO4 and other RdDM component transcripts in the root stele supports the distribution observed (Kawakatsu *et al.*, 2016). These results point to a possible RdDM regulatory role in the vascular system in response to stress, and/or in a long-distance communication strategy for alarm, as suggested by siRNA transport to neighboring cells, or to a potential translocation through the phloem (Melnyk *et al.*, 2011; Sarkies and Miska, 2014).

As expected, seed germination under high salt concentrations produced different changes in transcript abundance profiles between all lines, when they are compared with those obtained from non-stress conditions. Not all of them share transcripts involved in protection against salt stress, however, indicating that the difference in germination rates is not necessarily linked only with salt defense responses. It is noteworthy that differences were found when CHH DNA methylation patterns arising from salinity were compared between the wild type and the *ago4-2* and *ago4-3* lines. Of special interest are genes showing lower methylation levels in *ago4-2* and *ago4-3* than in wild type, presenting genomic features characteristic of RdDM targets (neighboring to a TE) and their closeness to Pol V transcripts (Bohmdorfer *et al.*, 2016). Most of these genes are shared between the two AGO4 mutants; hence, corroborating their methylation dependence on the RdDM pathway, which prevents their transcriptional activation under salinity conditions. Although not many protein-coding gene targets were found in this analysis, this outcome is consistent with previous reports showing a small contribution of RdDM-dependent repressive marks on gene expression (Zheng *et al.*, 2013; Gallego-Bartolome *et al.*, 2019).

The majority of the identified genes with these characteristics encode proteins that have been associated with different regulatory roles during germination. *EBF1* (At2g25490) is of particular interest because it encodes a nuclear F-Box protein component of a Ub-protein ligase (E3) that targets EIN3 for degradation, a key transcription factor playing a positive role in ethylene perception. Deficiency of *EBF1* leads to an increase in EIN3 levels inducing hypersensitivity to ethylene (Binder *et al.*, 2007; Merchante *et al.*, 2013), a plant hormone that plays a pivotal role in the control of dormancy and germination (Corbineau *et al.*, 2014). In *Arabidopsis* and in numerous other species, ethylene promotes the germination of non-dormant seeds under diverse adverse environments, including conditions of high salinity (Wang *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2013), and interestingly enough the disruption of the ethylene signaling pathway leads to salinity and osmotic stress sensitivity during germination (Leubner-Metzger *et al.*, 1998; Pirrello *et al.*, 2006). These observations are in consonance with our findings showing that defective CHH DNA methylation in the *ago4-2* mutant during germination under conditions of salinity results in the upregulation of *EBF1* (compared

with the wild type), which would have a negative effect on ethylene perception, and as a consequence would lead to a lower rate and/or capacity of germination. Despite a similar effect on *EBF1* expression and methylation for *ago4-3*, the effect on germination was contrasting, suggesting that the activity of AGO6 in the AGO4 null mutant counteracts *EBF1* downstream effects. Further experimentation is needed to establish whether some of the genes in which DNA methylation is affected in *ago4-2* also participate in the signal transduction pathways related to ethylene function, and/or in pathways involved with other hormones with recognized roles in dormancy and germination, such as abscisic acid (ABA) and gibberellic acid, the signaling pathways of which have close communication with the signaling pathway for ethylene (Corbineau *et al.*, 2014).

As the high abundance of AGO4 in root and cotyledon vascular tissues in response to salinity suggests systemic translocation, it is worth highlighting the *PDL7* gene (At5g37660), the product of which is a plasmodesmata-located protein (PDL) involved in cell-to-cell communication (Thomas *et al.*, 2008), and *SKS6* (At1g41830), upregulated by ABA and encoding a multi-copper oxidase-like protein that participates in cotyledon vascular patterning in *Arabidopsis* (Jacobs and Roe, 2005).

The participation of the AGO4/RdDM pathway in germination under salinity demonstrated by the RdDM mutant phenotypes is strengthened by the transcriptomic profiles obtained from the RNA-seq analysis, as the comparison with wild-type expression patterns exhibited differential accumulation levels for transcripts mostly implicated in dormancy, germination and post-germination processes. For *ago4-2*, showing low germination rate and capacity, like the rest of the RdDM mutants, some mRNAs that typically accumulated in mature embryos (LEA and storage proteins) stand out among the upregulated transcripts, as well as an mRNA encoding a stress-responsive transcription factor (ANAC032) induced by carbon starvation and involved in the inhibition of photosynthesis, and in the regulation of carbon metabolism, nitrogen assimilation and amino acid catabolism (Sun *et al.*, 2019). Also, consistent with the *ago4-2* phenotype, the *AHG1* transcript showed higher levels than the wild type upon salinity treatment. *AHG1* is a type-2C protein phosphatase (PP2C), usually highly abundant during seed maturation, that together with *DELAY OF GERMINATION 1* (*DOG1*) control seed dormancy and germination, independently of ABA (Nee *et al.*, 2017; Nishimura *et al.*, 2018). Recently, it has been shown that ethylene partially controls seed dormancy/germination through the *DOG1* pathway (Li *et al.*, 2019), in agreement with our finding that RdDM-dependent methylation might control *EBF1* expression, a participant of ethylene signal transduction.

Among the upregulated transcripts in *ago4-3*, we found two encoding PP2C proteins involved in the regulation of

seed dormancy and germination, AHG1 and AHG3. These PP2C phosphatases seem to have overlapping and distinctive functions, showing similar activities but different spatial and temporal expression patterns (Nishimura *et al.*, 2007, 2018); however, ABA receptor transcripts were not detected among the differentially expressed mRNAs, suggesting that at least a pool of AHG1 and AHG3 phosphatases could be in their active forms, as expected for germinating seeds (Cutler *et al.*, 2010). Furthermore, in agreement with its higher germination rate under salinity conditions, we identified a higher abundance of transcripts involved in active growth and metabolism than in wild-type seeds.

As a whole, the methylome and transcriptome data in this work exhibit the role of the AGO4/RdDM pathway in germination and dormancy processes; particularly, by modulating the germination timing, a function that is more evident under stressful environments (Figure 5b). Also, the resultant information exposes the complexity of the gene expression changes affecting numerous gene networks, leading to the characterized phenotypes. It should be noted that we did not detect any effect on germination rate and capacity when the mutant seeds affected in different core RdDM elements were exposed to optimal growth conditions, showing that any effect of RdDM on *A. thaliana* seed development (Wang and Köhler, 2017; Kirkbride *et al.*, 2019; Chow *et al.*, 2020) does not impact the germination process.

Even though further experimentation is needed to understand the precise role of the RdDM pathway activity in Arabidopsis seed germination and dormancy in response to salt stress, the findings in this work unveil RdDM gene targets, some of which have been previously involved in signaling pathways controlling germination timing, and others that prompt new questions regarding the control mechanisms involved in the plant responses to salinity, providing a state-of-the-art potential source for the search of targets for improving future farming on salt-affected soils.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Plant material and growth conditions

In this work we used seeds of *A. thaliana* (L.). For propagation or germination experiments, seeds were surface sterilized with absolute ethanol for 2 min, washed with 40% commercial bleach containing 0.02% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com>) for 8 min, and were rinsed five times with sterile milliQ<sup>®</sup> water. After sowing, seeds were stratified on MS plates for 2 days (for Columbia) or 4 days (for Ler and Ws) in the dark at 4°C and then transferred to optimal growth conditions in a growth chamber held at 21°C and 40–60% relative humidity, with a 16-h light/8-h dark photoperiod under white light (80–100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ). Seeds were germinated in round dishes containing full-strength MS salts (4.3 g L<sup>-1</sup>, with macro- and micronutrients, without vitamins; Caisson Labs, <https://caissonlabs.com>), 1% sucrose

(Research Organics, <https://resorg.lookchem.com>), 0.5 g L<sup>-1</sup> 2-(*N*-morpholine)-ethanesulphonic acid (MES; Calbiochem, now Merck, <https://www.merckmillipore.com>) and 0.65% agar (Sigma-Aldrich). For propagation, 2-week-old seedlings were transferred (or directly sown) into soil (Metromix 200; Hummert International, <https://www.hummert.com>) and kept under the described growth conditions with optimal watering until the siliques were dry.

Mutant lines *nrrpd1-1*, *nrrpe1-11*, *rdr2-1*, *dcl3-1* and *ago4-6* in the Col-0 background, and *ago4-1* in the Ler background (Zilberman *et al.*, 2003), were obtained from ABRC (<https://abrc.osu.edu>) or NASC (<http://arabidopsis.info>), whereas *ago4-2*, *ago4-4* and *ago4-3*, in the Col-0 background, were kindly donated by Pablo Vera (Agorio and Vera, 2007), Michael Axtell (Wang and Axtell, 2017) and Blake Meyers, respectively. The seeds of the double mutant *ago4 ago6* were kindly donated by J-K Zhu (Duan *et al.*, 2015). For genetic crosses, plants were grown in the conditions described above until the first floral buds were visible. Crossed flowers were marked and plants were grown under optimal conditions as described until seeds were dry. Offspring from introgressed lines and crosses were identified by marker selection and by PCR.

### Germination under optimal and stress conditions

Seeds used for germination experiments were collected from plants growing under optimal conditions until senescence. Harvested seeds were stored under low humidity at 4°C for at least 2 weeks before use. Germination under salt conditions was achieved in MS media supplemented with 100–250 mM NaCl (JT Baker, now Fisher Science, <https://www.fishersci.com>), as indicated. Germination was quantified by radicle emergence from five technical replicates of 50 seeds each. All germination experiments were performed with seeds of the same age and were replicated at least five times.

### Root length determination

For root length experiments, stratified seeds were sown in square 10 × 10 cm vertical dishes containing 0.2 × MS salts, 1% sucrose and 1% agar or in medium containing 100 mM NaCl. After sowing, plants were grown under the conditions described above. After radicle protrusion, root length was measured by marking the root tip position of every plant every day at the same hour until day 8. The measurements were made using IMAGEJ<sup>®</sup> (<https://imagej.nih.gov/ij>).

### Statistics applied to phenotypic analyses

The germination experiments included in this work were replicated five times using 50 seeds per replicate and five biological replicates. Data were accumulated over time and fitted to sigmoidal dose–response curves with variable slope:  $y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - x) \times \text{hillslope})})$ , also called the four-parameter logistic equation. ‘Bottom’ is the  $y$  value at the lower plateau (constrained to zero), ‘top’ is the  $y$  value at the upper plateau, ‘LogEC50’ is the  $x$  value when the response is half-way between the bottom and the top and ‘hillslope’ describes the steepness of the curve. The null hypothesis was that two curve-fitting parameters (hillslope and LogEC50) from each data set were the same (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010).

For root-length experiments, length was measured every day ( $n = 15$  for optimal conditions and  $n = 60$  for salinity conditions) with three biological replicates; data were accumulated over time and fitted to sigmoidal dose–response curves with variable slope, as described above.



### Protein extraction and Western blot assays

Total protein extracts from seedlings, dry seeds or germinating seeds were obtained according to the method described by Olvera-Carrillo *et al.* (2010). Protein contents were quantified by the Lowry protocol (Lowry *et al.*, 1951) and separated in 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Western blots were performed following standard protocols using 30–40 µg of protein extracts. Anti-AGO4 antibody (Agrisera, <https://www.agrisera.com>) was used in 1:2000 to 1:4000 dilutions, whereas secondary antibody (anti-rabbit horseradish peroxidase; Zymed, now ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com>) was used in 1:20000 or 1:30000 dilutions. Signals were developed with peroxidase substrate from Supersignal West Pico (ThermoFisher Scientific) and exposed to blue X-ray films (Kodak, <https://www.kodak.com>). Films were photographed using IMAGEQUANT 300 (GE Healthcare, <https://www.gehealthcare.com>).

### Fluorescence microscopy

For these experiments, we used seeds from *pAGO4::GFP-AGO4* transgenic Arabidopsis that were kindly donated by Dr Qi (Ye *et al.*, 2012). This construction allows the production of a chimeric AGO4 wild-type protein fused at its N terminal with GFP under the control of the native *AGO4* promoter. Seeds were germinated in plates containing full-strength MS medium or full-strength MS medium supplemented with 100 mM NaCl. Whole embryos were isolated under the microscope and immediately stained with 20 µg µl<sup>-1</sup> propidium iodide (Sigma-Aldrich) for 20 min and observed using an Olympus FV1000 upright confocal microscope (Olympus, <https://www.olympus-global.com>) with a 10× objective. Embryo images were obtained from stacks of individual digital slices with a thickness of 6.23 µm. In the case of the intracellular analysis, a 60× objective was used, and images were obtained from stacks of individual digital slices (500 pixel × 456 pixel), with a thickness of 0.8 µm. GFP and propidium iodide were excited at 488 and 568 nm, respectively. Fluorescence brightness in the GFP channel was increased with IMAGEJ without affecting signal distribution.

### RNA isolation and high-throughput sequencing

Total RNA from germinated seeds was extracted using the hot phenol method (Mylne *et al.*, 2010). For high-throughput sequencing analysis, RNA was obtained from the wild type and from *ago4-3* and *ago4-2* lines germinated in full-strength MS or full-strength MS supplemented with 100 mM NaCl. To achieve the most homogeneous representation of the different developmental stages for each line, samples were harvested when each seed population reached 50% germination in every condition examined. RNA-seq libraries were prepared from high-quality RNA, verified using a Bioanalyzer 2100 (Agilent, <https://www.agilent.com>). Construction of polyA RNA libraries was carried out using the TrueSeq stranded mRNA Library Prep kit (Illumina, <https://www.illumina.com>). High-throughput sequencing was performed on duplicate biological samples using the multiplex paired-end 2 × 75 configuration. Libraries and sequencing were performed by the Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (IBT-UNAM) with a HiSeq 2500 platform (Illumina).

### RNA-seq analysis

For RNA-seq analysis, all libraries contained between 20.5 and 49.2 million high-quality reads per library with non-over-represented sequences. The obtained reads were aligned to the TAIR10

reference genome (<https://www.arabidopsis.org>) using SMALT 0.7.6 (Genome Research Ltd., <https://www.sanger.ac.uk>), and at least 99.74% of reads mapped to the genome. Hit counting was performed using SAMTOOLS (Li *et al.*, 2009). Differential expression analysis of RdDM direct targets were performed using EDGER (Robinson and Smyth, 2008).

To select and sort the genes in which repression in salt could depend on RdDM methylation (RdDM direct targets), we used a 'deregulation' score, with the following logic. Genes normally 'repressed' by RdDM in salt conditions should have a negative log<sub>2</sub>('FC Col-0 NaCl versus Col-0 MS'). If they become 'de-repressed' by the lack of RdDM, they should have a positive log<sub>2</sub>('FC *ago4* NaCl versus Col-0 NaCl'). The 'deregulation' value captures the effect of both conditions by subtracting the 'repression' term from the 'de-repression' term as follows: log<sub>2</sub>('FC *ago4* NaCl versus Col-0 NaCl')/log<sub>2</sub>('FC Col-0 NaCl versus Col-0 MS'). This applies only to genes that meet the 'repression' condition; genes with the highest 'deregulation' score are reported on Table 1 (*ago4-2*) and Table S2 (*ago4-3*). For the rest of RNA-seq analyses, after evaluating differential expression using EDGER, genes were selected with an absolute log<sub>2</sub>FC greater than 1.5 and a false discovery rate (FDR) smaller than 1e<sup>-4</sup>. Heat maps were generated using the HEAT-MAP.2 package in R; logarithms of counts per million (CPM) were standardized across genes (rows), and thus converted to standard deviations (SDs) from the mean (z-score). The standardized values were also used to cluster genes by the similarity of their profiles over samples. To find genes for which induction or repression by salt is stronger in a mutant than in the wild type, we used a 'the differential response to NaCl' score ('diff'), which subtracts the effect of salt in the wild type from the effect of salt in the mutant, as follows: diff = log<sub>2</sub>('FC *ago4* NaCl versus *ago4* MS') – log<sub>2</sub>('FC Col-0 NaCl versus Col-0 MS').

To select the most affected genes in the *ago4-2* and *ago4-3* mutants, diff was standardized across all genes for each mutant, and genes for which diff is 3.0 or more SD above the mean were considered hyperinduced (upregulated), and those for which diff is 3.0 or more SD below the mean were considered hyperrepressed (downregulated). Diff values for the selected genes are reported in Tables S3–S6. The selected genes are also shown in Figure S12(b–e).

### Whole-genome bisulfite sequencing (WGBS)

DNA from the lines and conditions described for the RNA-seq, plus *nrpe1*, was isolated using the DNeasy Plant mini kit (Qiagen, <https://www.qiagen.com>) following the manufacturer's protocol, with minor changes to handle low-input samples. DNA quality was assessed by 0.8% agarose gel electrophoresis as a single band above 20 Kb. Portions of DNA (100 ng) were used to generate sequencing libraries using the Methyl-seq Pico Library Prep kit (Zymo, <https://www.zymoresearch.com>) following the manufacturer's instructions. Non-directional DNA libraries were single barcoded and sequenced with its biological duplicate in two lanes of the HiSeq X-Ten platform (Illumina) with a 2 × 150 paired-end (PE) configuration. Sequencing was performed by the HudsonAlpha Institute for Biotechnology (<https://hudsonalpha.org>). The WGBS libraries for the *nrpe1* mutant were sequenced in a NovaSeq S4 flow-cell at the Advanced Genomics Core of the University of Michigan with a 2 × 150 PE configuration.

### WGBS analysis

Following sequencing, all libraries contained between 40 and 82 million high-quality reads. Reads were adapter-trimmed using

TRIM GALORE (Chen *et al.*, 2014), and subsequently mapped using BISMAR (Krueger and Andrews, 2011) with the BOWTIE2 PE alignment option. Genome coverage higher than 20× was obtained with a bisulfite conversion higher than 99.1%, assessed by analyzing cytosine methylation in the plastid genome. Analysis of DNA methylation and differentially methylated regions (DMRs) calling were done using the methyl-Kit R package (Akalin *et al.*, 2012). DMRs were defined as a 10% statistically significant (FDR = 0.01) methylation difference between samples using 100-bp sliding windows (50 bp step size). Regions with at least 10 reads were considered for the downstream analysis. Overlapping and cross-analysis of DMRs and genomic features, and the RNA-seq and WGBS, respectively, were performed using BEDTOOLS. Genomic features for overlapping analyses were taken from the TAIR database (<https://www.arabidopsis.org>) and are based on gene type, including protein-coding genes, pseudogenes, transposable element genes, transposon fragments, non-coding RNAs, small nucleolar RNAs, microRNA, ribosomal RNAs, etc.

All box plots and heat maps were generated using R. The TAIR 10 version of the genome was used as a reference for mapping and as a reference for the genomic models used in the comparisons performed in this work.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by a grant from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) (IN211816). We are grateful to Andrzej Wierzbicki for his support during the development of this work and for his critical reading of the manuscript and comments. We also thank Caspar Chater, Tzvetanka D. Dinkova and M. Hafiz Rothi for their critical reading of the manuscript and for valuable comments, and P. Vera, Y. Qi, M.J. Axtel, J.K. Zhu and B. Meyers for the generous gift of some of the seeds used in this work, as indicated in the text. We also thank the Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, to the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, R. Grande, V. Jiménez-Jacinto, K. Estrada-Guerra, C.L. Ibarra-Sánchez, C.A. González-Chávez, R.M. Solórzano and M.B. Pérez-Morales for their technical support. We are also thankful to A. Cruz for the preliminary phenotypical analysis in Arabidopsis roots. VMP and CM-M received PhD and MSc fellowships, respectively, from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-México, and ORB was the recipient of a predoctoral fellowship from Instituto de Biotecnología. VMP is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and has received a CONACyT fellowship (239759).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VMP and AAC conceived the idea and designed the research. VMP, AAC and JLR interpreted the data and wrote the article. VMP performed germination and immunodetection experiments with the help of ORB. AGA performed the root-length experiments. VMP, AG and AAC analyzed the RNA-seq data. CM-M performed the fluorescence imaging, with the assistance of VMP. VMP performed, analyzed and interpreted the WGBS data with the assistance of AAC. All authors reviewed the article and approved the final version for publication.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing financial interests.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The RNA-seq data generated in this work can be freely accessed through the Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) project GSE112051. The WGBS data can be found in project GSE156093. The RIP-seq data set (Bohmdorfer *et al.*, 2016) used in this work to analyze the Pol V transcribed region proximity can be accessed in GEO project GSE70290.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Figure S1.** Germination of the Arabidopsis lines displayed in Figure 1, under optimal conditions.

**Figure S2.** Germination of additional AGO4 null mutant lines on different genetic backgrounds.

**Figure S3.** Western blot immunodetection of AGO4 protein in the different Arabidopsis lines used in this study.

**Figure S4.** Dose-dependency effect of salt treatments on the RdDM core protein mutants during germination.

**Figure S5.** Effect of AGO4 mutants on root growth.

**Figure S6.** Comparison of transcript accumulation among the AGO4/6/9 clade.

**Figure S7.** AGO4 intracellular localization in germinating seeds.

**Figure S8.** AGO4 localization in the root apical region.

**Figure S9.** Genome-wide DNA methylation analyses comparing RdDM mutants with the wild type (Col-0).

**Figure S10.** Locus-specific DNA methylation differences in RdDM mutants.

**Figure S11.** Identification of RdDM direct targets in *ago4-3*.

**Figure S12.** RNA-seq transcriptome analysis of *ago4-2* and *ago4-3* mutants in response to salinity.

**Table S1.** List of DMR numbers identified for AGO4 and NRPE1 mutants.

**Table S2.** List of candidate genes directly modulated by RdDM in *ago4-3*.

**Table S3.** List of specific *ago4-3* salt upregulated genes.

**Table S4.** List of specific *ago4-3* salt downregulated genes.

**Table S5.** List of specific *ago4-2* salt upregulated genes.

**Table S6.** List of specific *ago4-2* salt downregulated genes.

## REFERENCES

- Agorio, A. and Vera, P. (2007) ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 3778–3790.
- Akalin, A., Kormaksson, M., Li, S., Garrett-Bakelman, F.E., Figueroa, M.E., Melnick, A. and Mason, C.E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* **13**, R87.
- Au, P.C.K., Dennis, E.S. and Wang, M.B. (2017) Analysis of Argonaute 4-associated long non-coding RNA in Arabidopsis thaliana sheds novel insights into gene regulation through RNA-directed DNA methylation. *Genes*, **8**, 198.

- Becerra, C., Jahrmann, T., Puigdomènech, P. and Vicient, C.M. (2004) Ankyrin repeat-containing proteins in Arabidopsis: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene*, **340**(1), 111–121.
- Binder, B.M., Walker, J.M., Gagne, J.M., Emborg, T.J., Hemmann, G., Bleecker, A.B. and Vierstra, R.D. (2007) The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*, **19**, 509–523.
- Blevins, T., Podicheti, R., Mishra, V., Marasco, M., Wang, J., Rusch, D., Tang, H. and Pikaard, C.S. (2015) Identification of Pol IV and RDR2-dependent precursors of 24 nt siRNAs guiding de novo DNA methylation in Arabidopsis. *eLife*, **4**, e09591.
- Bohmdorfer, G., Sethuraman, S., Rowley, M.J., Krzyszton, M., Rothi, M.H., Bouzit, L. and Wierzbicki, A.T. (2016) Long non-coding RNA produced by RNA polymerase V determines boundaries of heterochromatin. *eLife*, **5**, e19092.
- Borges, F., Parent, J.-S., van Ex, F., Wolff, P., Martinez, G., Köhler, C. and Martienssen, R.A. (2018) Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in Arabidopsis. *Nat. Genet.* **50**, 186–192.
- Brousseau, C., El Oirdi, M., Adurogbangba, A., Ma, X. and Moffett, P. (2016) Antiviral defense involves AGO4 in an arabidopsis-potyvirus interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **29**, 878–888.
- Chan, Z., Wang, Y., Cao, M., Gong, Y., Mu, Z., Wang, H., Hu, Y., Deng, X., He, X.J. and Zhu, J.K. (2016) RdDM4 modulates cold stress resistance in Arabidopsis partially through the CBF-mediated pathway. *New Phytol.* **209**, 1527–1539.
- Chen, C., Khaleel, S.S., Huang, H. and Wu, C.H. (2014) Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol. Med.* **9**, 8.
- Cheng, Y., Zhou, Y., Yang, Y. *et al.* (2012) Structural and functional analysis of VQ motif-containing proteins in Arabidopsis as interacting proteins of WRKY transcription factors. *Plant Physiol.* **159**(2), 810–825.
- Chinnusamy, V. and Zhu, J.K. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 133–139.
- Chow, H.T., Chakraborty, T. and Mosher, R.A. (2020) RNA-directed DNA Methylation and sexual reproduction: expanding beyond the seed. *Curr. Opin. Plant Biol.* **54**, 11–17.
- Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C. and El-Maarouf-Bouteau, H. (2014) Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front. Plant Sci.* **5**, 539.
- Corem, S., Doron-Faigenboim, A., Jouffroy, O., Maumus, F., Arazi, T. and Bouche, N. (2018) Redistribution of CHH methylation and small interfering RNAs across the genome of tomato ddm1 mutants. *Plant Cell*, **30**, 1628–1644.
- Cubas, P., Vincent, C. and Coen, E. (1999) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, **401**, 157–161.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. and Abrams, S.R. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 651–679.
- Down, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Down, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E. and Ecker, J.R. (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, E2183–2191.
- Duan, C.G., Zhang, H., Tang, K. *et al.* (2015) Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J.* **34**, 581–592.
- Eun, C., Lorkovic, Z.J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E.R., Simon, S.A., Meyers, B.C., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2011) AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, **6**, e25730.
- Faus, I., Ninoles, R., Kesari, V., Llabata, P., Tam, E., Nebauer, S.G., Santiago, J., Hauser, M.T. and Gadea, J. (2018) Arabidopsis ILITHYIA protein is necessary for proper chloroplast biogenesis and root development independent of eIF2alpha phosphorylation. *J. Plant Physiol.* **224–225**, 173–182.
- Gallego-Bartolome, J., Liu, W., Kuo, P.H., Feng, S., Ghoshal, B., Gardiner, J., Zhao, J.M., Park, S.Y., Chory, J. and Jacobsen, S.E. (2019) Co-targeting RNA polymerases IV and V promotes efficient de novo DNA methylation in Arabidopsis. *Cell*, **176**(5), 1068–1082.e19.
- Gao, Y.Q., Chen, J.G., Chen, Z.R., An, D., Lv, Q.Y., Han, M.L., Wang, Y.L., Salt, D.E. and Chao, D.Y. (2017) A new vesicle trafficking regulator CTL1 plays a crucial role in ion homeostasis. *PLoS Biol.* **15**(12), e2002978.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M. and Thomas, M. (2006) AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol.* **142**(3), 931–944.
- Gohlke, J., Scholz, C.J., Kneitz, S., Weber, D., Fuchs, J., Hedrich, R. and Deeken, R. (2013) DNA methylation mediated control of gene expression is critical for development of crown gall tumors. *PLoS Genet.* **9**, e1003267.
- Gouil, Q. and Baulcombe, D.C. (2016) DNA methylation signatures of the plant chromomethyltransferases. *PLoS Genet.* **12**, e1006526.
- Grover, J.W., Kendall, T., Baten, A., Burgess, D., Freeling, M., King, G.J. and Mosher, R.A. (2018) Maternal components of RNA-directed DNA methylation are required for seed development in Brassica rapa. *Plant J.* **94**, 575–582.
- Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2011) Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 483–492.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X. and Fang, R. (2012) Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.* **69**, 104–115.
- Han, S.K. and Wagner, D. (2014) Role of chromatin in water stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* **65**, 2785–2799.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. and Baulcombe, D.C. (2010) The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, **22**, 321–334.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J. and Jacobsen, S.E. (2006) Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* **38**, 721–725.
- Hollick, J.B. (2010) Paramutation and development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 557–579.
- Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I. and Paszkowski, J. (2011) An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, **472**, 115–119.
- Iwasaki, M., Hyvärinen, L., Piskurewicz, U. and Lopez-Molina, L. (2019) Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *eLife*, **8**, e37434.
- Jacobs, J. and Roe, J.L. (2005) SKS6, a multicopper oxidase-like gene, participates in cotyledon vascular patterning during Arabidopsis thaliana development. *Planta*, **222**, 652–666.
- Jing, Y. and Lin, R. (2015) The VQ motif-containing protein family of plant-specific transcriptional regulators. *Plant Physiol.* **169**(1), 371–378.
- Kawakatsu, T., Nery, J.R., Castanon, R. and Ecker, J.R. (2017) Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination. *Genome Biol.* **18**, 171.
- Kawakatsu, T., Stuart, T., Valdes, M. *et al.* (2016) Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem. *Nat. Plants*, **2**, 16058.
- Kinoshita, T. and Seki, M. (2014) Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1859–1863.
- Kirkbride, R.C., Lu, J., Zhang, C., Mosher, R.A., Baulcombe, D.C. and Chen, Z.J. (2019) Maternal small RNAs mediate spatial-temporal regulation of gene expression, imprinting, and seed development in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **116**, 2761–2766.
- Köhler, C. and Lafon-Placette, C. (2015) Evolution and function of epigenetic processes in the endosperm. *Front. Plant Sci.* **6**, 130.
- Kradolfer, D., Wolff, P., Jiang, H., Siretskiy, A. and Kohler, C. (2013) An imprinted gene underlies postzygotic reproductive isolation in Arabidopsis thaliana. *Dev. Cell*, **26**, 525–535.
- Krueger, F. and Andrews, S.R. (2011) Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, **27**, 1571–1572.
- Kurihara, Y., Matsui, A., Kawashima, M. *et al.* (2008) Identification of the candidate genes regulated by RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 553–557.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204–220.
- Le, T.N., Schumann, U., Smith, N.A. *et al.* (2014) DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in Arabidopsis. *Genome Biol.* **15**, 458.
- Lee, M.H., Jeon, H.S., Kim, H.G. and Park, O.K. (2017) An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. *New Phytol.* **214**, 343–360.



- Leubner-Metzger, G., Petruzzelli, L., Waldvogel, R., Vogeli-Lange, R. and Meins, F. Jr (1998) Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant Mol. Biol.* **38**, 785–795.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078–2079.
- Li, X., Chen, T., Li, Y., Wang, Z., Cao, H., Chen, F., Li, Y., Soppe, W.J.J., Li, W. and Liu, Y. (2019) ETR1/RD03 regulates seed dormancy by relieving the inhibitory effect of the ERF12-TPL complex on DELAY OF GERMINATION1 expression. *Plant Cell*, **31**, 832–847.
- Lin, Y., Yang, L., Paul, M., Zu, Y. and Tang, Z. (2013) Ethylene promotes germination of Arabidopsis seed under salinity by decreasing reactive oxygen species: evidence for the involvement of nitric oxide simulated by sodium nitroprusside. *Plant Physiol. Biochem.* **73**, 211–218.
- Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H.Q., Luan, S., Li, J. and He, Z.H. (2013) Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABL3 activation in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **110**, 15485–15490.
- Lopez, A., Ramirez, V., Garcia-Andrade, J., Flors, V. and Vera, P. (2011) The RNA silencing enzyme RNA polymerase v is required for plant immunity. *PLoS Genet.* **7**, e1002434.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Mahfouz, M.M. (2010) RNA-directed DNA methylation: mechanisms and functions. *Plant Signal. Behav.* **5**, 806–816.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J. and Seymour, G.B. (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat. Genet.* **38**, 948–952.
- Martinez, G., Wolff, P., Wang, Z., Moreno-Romero, J., Santos-Gonzalez, J., Conze, L.L., DeFraia, C., Slotkin, R.K. and Kohler, C. (2018) Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in Arabidopsis. *Nat. Genet.* **50**, 193–198.
- Matsunaga, W., Kobayashi, A., Kato, A. and Ito, H. (2012) The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a copia-like retrotransposon in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **53**, 824–833.
- Matzke, M.A., Kanno, T. and Matzke, A.J. (2015) RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 243–267.
- Matzke, M.A. and Mosher, R.A. (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 394–408.
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F. and Ponting, C.P. (2003) The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem. Sci.* **28**(2), 69–74.
- McCue, A.D., Panda, K., Nuthikattu, S., Choudury, S.G., Thomas, E.N. and Slotkin, R.K. (2015) ARGONAUT6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J.* **34**, 20–35.
- Melnyk, C.W., Molnar, A. and Baulcombe, D.C. (2011) Inter-cellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* **30**, 3553–3563.
- Merchante, C., Alonso, J.M. and Stepanova, A.N. (2013) Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 554–560.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C. and Hohn, B. (2006) Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, **442**, 1046–1049.
- Mylne, J.S., Wang, C.K., van der Weerden, N.L. and Craik, D.J. (2010) Cyclotides are a component of the innate defense of Oldenlandia affinis. *Biopolymers*, **94**, 635–646.
- Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol.* **149**, 88–95.
- Nee, G., Kramer, K., Nakabayashi, K., Yuan, B., Xiang, Y., Miatton, E., Finke-meier, I. and Soppe, W.J.J. (2017) DELAY OF GERMINATION1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nat. Commun.* **8**, 72.
- Nishimura, N., Tsuchiya, W., Moresco, J.J. et al. (2018) Control of seed dormancy and germination by DOG1-AHG1 PP2C phosphatase complex via binding to heme. *Nat. Commun.* **9**, 2132.
- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K. and Hirayama, T. (2007) ABA-hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J.* **50**, 935–949.
- Olmedo-Monfil, V., Duran-Figueroa, N., Arteaga-Vazquez, M., Demesa-Arevalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A. and Vielle-Calzada, J.P. (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature*, **464**, 628–632.
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J.L., Garciarubio, A. and Covarrubias, A.A. (2010) Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **154**, 373–390.
- Pecinka, A. and Mittelsten Scheid, O. (2012) Stress-induced chromatin changes: a critical view on their heritability. *Plant Cell Physiol.* **53**, 801–808.
- Pirrello, J., Jaimes-Miranda, F., Sanchez-Ballesta, M.T., Tournier, B., Khalil-Ahmad, O., Regad, F., Latche, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M. (2006) SLERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1195–1205.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. and Lagrange, T. (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**, 2030–2040.
- Popova, O.V., Dinh, H.Q., Aufsatz, W. and Jonak, C. (2013) The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in Arabidopsis. *Mol. Plant*, **6**, 396–410.
- Robinson, M.D. and Smyth, G.K. (2008) Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics*, **9**, 321–332.
- Sarkies, P. and Miska, E.A. (2014) Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 525–535.
- Schoft, V.K., Chumak, N., Mosiolek, M., Slusarz, L., Komnenovic, V., Brownfield, L., Twell, D., Kakutani, T. and Tamaru, H. (2009) Induction of RNA-directed DNA methylation upon decondensation of constitutive heterochromatin. *EMBO Rep.* **10**, 1015–1021.
- Secco, D., Wang, C., Shou, H., Schultz, M.D., Chiarenza, S., Nussaume, L., Ecker, J.R., Whelan, J. and Lister, R. (2015) Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements. *eLife*, **4**, e09343.
- Skirycz, A. and Inze, D. (2010) More from less: plant growth under limited water. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 197–203.
- Soppe, W.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M. and Peeters, A.J. (2000) The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol. Cell*, **6**, 791–802.
- Sun, L., Zhang, P., Wang, R., Wan, J., Ju, Q., Rothstein, S.J. and Xu, J. (2019) The SNAC-A transcription factor ANAC032 reprograms metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **60**, 999–1010.
- Thomas, C.L., Bayer, E.M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L. and Maule, A.J. (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol.* **6**, e7.
- Tricker, P.J., Gibbings, J.G., Rodriguez Lopez, C.M., Hadley, P. and Wilkinson, M.J. (2012) Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J. Exp. Bot.* **63**, 3799–3813.
- Vidal, E.A., Alvarez, J.M. and Gutierrez, R.A. (2014) Nitrate regulation of AFB3 and NAC4 gene expression in Arabidopsis roots depends on NRT1.1 nitrate transport function. *Plant Signal. Behav.* **9**, e28501.
- Vidal, E.A., Moyano, T.C., Riveras, E., Contreras-López, O. and Gutiérrez, R.A. (2013) Systems approaches map regulatory networks downstream of the auxin receptor AFB3 in the nitrate response of Arabidopsis thaliana roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**(31), 12840–12845.
- Wang, F. and Antxell, M.J. (2017) AGO4 is specifically required for heterochromatic siRNA accumulation at Pol V-dependent loci in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **90**, 37–47.
- Wang, G. and Köhler, C. (2017) Epigenetic processes in flowering plant reproduction. *J. Exp. Bot.* **68**, 797–807.
- Wang, Y., Liu, C., Li, K. et al. (2007) Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Mol. Biol.* **64**, 633–644.



- Wang, Z., Butel, N., Santos-Gonzalez, J., Borges, F., Yi, J., Martienssen, R.A., Martinez, G. and Kohler, C. (2020) Polymerase IV plays a crucial role in pollen development in *capsella*. *Plant Cell*, **32**, 950–966.
- Wei, L., Gu, L., Song, X. *et al.* (2014) Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **111**, 3877–3882.
- Wierzbicki, A.T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M.J., Gregory, B.D., Ecker, J.R., Tang, H. and Pikaard, C.S. (2012) Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev.* **26**, 1825–1836.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* **41**, 630–634.
- Winter, V. and Hauser, M.T. (2006) Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci.* **11**(3), 115–123.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. and Qi, Y. (2010) DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol. Cell*, **38**, 465–475.
- Yaari, R., Katz, A., Domb, K., Harris, K.D., Zemach, A. and Ohad, N. (2019) RdDM-independent de novo and heterochromatin DNA methylation by plant CMT and DNMT3 orthologs. *Nat. Commun.* **10**, 1613.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 781–803.
- Yang, L.P., Fang, Y.Y., An, C.P., Dong, L., Zhang, Z.H., Chen, H., Xie, Q. and Guo, H.S. (2013) C2-mediated decrease in DNA methylation, accumulation of siRNAs, and increase in expression for genes involved in defense pathways in plants infected with beet severe curly top virus. *Plant J.* **73**, 910–917.
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X. and Qi, Y. (2012) Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* Argonaute4/siRNA complexes. *Mol. Cell*, **46**, 859–870.
- Zhai, J., Bischof, S., Wang, H. *et al.* (2015) A one precursor one siRNA model for Pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell*, **163**, 445–455.
- Zhang, H. and Zhu, J.K. (2012) Seeing the forest for the trees: a wide perspective on RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev.* **26**, 1769–1773.
- Zheng, Q., Rowley, M.J., Bohmdorfer, G., Sandhu, D., Gregory, B.D. and Wierzbicki, A.T. (2013) RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J.* **73**, 179–189.
- Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 247–273.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716–719.



### RESEARCH PAPER

# The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phased siRNA formation in response to drought

Guadalupe Sosa-Valencia, Miguel Palomar, Alejandra A. Covarrubias and José L. Reyes\*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca Mor., Mexico

\* Correspondence: [jlreyes@ibt.unam.mx](mailto:jlreyes@ibt.unam.mx)

Received 29 June 2016; Accepted 28 September 2016

Editor: Christine Foyer, Leeds University

## Abstract

Recent studies have identified microRNAs as post-transcriptional regulators involved in stress responses. miR1514a is a legume microRNA that is induced in response to drought stress in *Phaseolus vulgaris* (common bean) and shows differential accumulation levels in roots during water deficit in two cultivars with different drought tolerance phenotypes. A recent degradome analysis revealed that miR1514a targets the transcripts of two NAC transcription factors (TFs), Phvul.010g121000 and Phvul.010g120700. Furthermore, expression studies and small RNA-seq data indicate that only Phvul.010g120700 generates phased siRNAs, which also accumulate under water deficit conditions. To confirm these results, we over-expressed miR1514a in transgenic *hairy roots*, and observed a reduced accumulation of Phvul.010g120700 and an increase in NAC-derived phased siRNAs; inhibition of miR1514a activity resulted in the opposite effect. Moreover, we determined that a NAC-derived phased siRNA associates with ARGONAUTE 1 (AGO1), suggesting that it is functional. In addition, a transcriptome analysis of transgenic *hairy roots* with reduced miR1514a levels revealed several differentially expressed transcripts, mainly involved in metabolism and stress responses, suggesting they are regulated by the NAC TF and/or by phased siRNAs. This work therefore demonstrates the participation of miR1514a in the regulation of a NAC transcription factor transcript through phased siRNA production during the plant response to water deficit.

**Key words:** ARGONAUTE 1, drought, microRNAs, phased siRNAs, *Phaseolus vulgaris*, PTGS, transcriptome.

## Introduction

Plants are constantly exposed to adverse conditions, such as limited water availability, that affect their growth, productivity, and development (Buchanan *et al.*, 2015). To contend with water deficit, plants have developed diverse strategies at the molecular, cellular, and physiological levels, thus increasing their plasticity and consequently their probability of survival (Bray, 1997; Oliver *et al.*, 2010). The Fabaceae family (Legumes) includes 18 000 described species within

approximately 700 genera, and they represent one-third of the primary crop production in the world; however, legume production necessary for feed and food relies on only a few cultivated species (Doyle and Luckow, 2003). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for human consumption and serves as a primary source of protein in the human diet in Central and South America (Broughton *et al.*, 2003; Graham and Vance, 2003; Miklas

*et al.*, 2006; Castro-Guerrero *et al.*, 2016). However, the lack of proper irrigation systems and the ensuing exposure to significant drought periods impact directly on the yields of common bean in most areas where it is produced, affecting around 60% of its production. For these reasons, many breeding programs have focused on obtaining drought-resistant cultivars (Gallegos and Shibata, 1989; Broughton *et al.*, 2003). The characterization of stress responses at the molecular level among existing germplasm might reveal mechanisms underlying resistance and tolerance to drought stress.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding small RNAs of 21–24 nucleotides (nt) in length with regulatory roles in gene expression at the post-transcriptional level through mRNA cleavage or translation repression. In plants, miRNAs are involved in the control of diverse processes such as phytohormone regulation, morphogenesis, development, and stress responses. Most knowledge of post-transcriptional gene silencing (PTGS) mediated by miRNAs in response to stress has been gained in *Arabidopsis thaliana* and a few other model species (Mallory and Vaucheret, 2006; Voinnet, 2009; Covarrubias and Reyes, 2010; Sunkar, 2010; Sosa-Valencia *et al.*, 2013), despite an apparent close co-evolution between environment adaptation and gene-silencing mechanisms mediated by miRNAs being widespread in plants (Borges and Martienssen, 2015).

In the particular case of common bean, genome-wide studies have reported more than a hundred miRNAs encoded in its genome (Pelaez *et al.*, 2012; Formey *et al.*, 2015). A few studies have described common bean miRNAs responding to different stress factors such as nutrient deficit, metal toxicity, salinity, phosphorous deficiency, and copper homeostasis (Valdes-Lopez *et al.*, 2008, 2010; Naya *et al.*, 2014; Nova-Franco *et al.*, 2015). However, miRNA involvement in drought responses of common bean remains largely unexplored (Arenas-Huertero *et al.*, 2009; Contreras-Cubas *et al.*, 2012).

miRNA activities in plants commonly result in cleavage of the target transcript followed by its degradation. One alternative pathway in miRNA function in plants results from the cleavage and the recruitment of the cleaved RNA fragment by SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) and RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) for double-strand RNA (dsRNA) formation and its subsequent cleavage by Dicer-like 4 (DCL4) at consecutive 21-nt intervals. This process results in the production of phased small RNAs, which were initially named *trans*-acting siRNAs (tasiRNAs) because they caused down-regulation of their own target mRNAs *in trans* (Vazquez *et al.*, 2004). Not all phased siRNAs are known to act *in trans* and therefore, more recently, they have been renamed as phased secondary siRNAs (phasiRNAs) (Jeong *et al.*, 2011; Fei *et al.*, 2013).

The phasiRNA mechanism is well described for model plants such as *Arabidopsis thaliana*, which contains a few well-characterized *PHAS* loci (Vazquez *et al.*, 2004; Fahlgren *et al.*, 2007). In contrast, little is known for other plant species commonly possessing a larger number of uncharacterized *PHAS* loci, such as *Vitis vinifera* (grape) or *Populus*

*trichocarpa* (poplar) (Zheng *et al.*, 2015). In particular, phasiRNAs can be produced by members of the *PPR*, *NB-LRR*, and *MYB* gene families in *Arabidopsis*, *Medicago truncatula*, *Malus domestica*, and *Prunus persica* (Fahlgren *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). More recently, a catalog of *PHAS* loci has been described for *P. vulgaris* (Formey *et al.*, 2015), but their involvement in water deficit responses remains unknown.

The aim of this work was to contribute to the knowledge of post-transcriptional regulation in common bean mediated by the legume-specific miR1514a induced during drought stress (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Our analyses demonstrated that miR1514a targets the transcript encoding Phvul.010g120700 (hereafter named NAC 700), a member of the family known as No Apical Meristem (NAM) or NAC family of transcription factors (Olsen *et al.*, 2005), through cleavage and subsequent generation of secondary phasiRNAs. Here, we show that this process occurs during the exposure of adult plants to drought. Notably, we found that one resulting phasiRNA is recruited to ARGONAUTE 1- (AGO1-) complexes, supporting its role in PTGS. Furthermore, based on an RNA-seq strategy we propose downstream regulatory targets of the transcription factor NAC 700.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

We used *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) adult and seedling roots of two Mesoamerican cultivars (kindly provided by Dr Jorge Acosta of INIFAP): ‘Bayo Madero’ (drought-susceptible) and ‘Pinto Saltillo’ (drought-resistant) as described previously (Acosta-Gallegos *et al.*, 1999; Terán and Singh, 2002). For experiments with adult plants we used the biological material reported in Rosales *et al.* (2012). Plants were grown under greenhouse conditions, at  $24 \pm 4$  °C with a relative humidity of  $70 \pm 20\%$ , and a natural light/dark cycle. At 29 d after germination (DAG), 252 plants were divided in three groups and subjected to three irrigation treatments: optimal irrigation, where pots were irrigated up to field capacity (fc, 2.5 ml g<sup>-1</sup> substrate); moderate drought (1.25 ml g<sup>-1</sup> substrate); and severe drought (0.625 ml g<sup>-1</sup> substrate) (Cuellar-Ortiz *et al.*, 2008). Leaves and roots were collected at 13 and 22 d of treatment and stored at -70 °C until further use.

To obtain seedlings, common bean seeds of the Pinto Saltillo and Bayo Madero cultivars were surface-sterilized using commercial alcohol and a bleach solution and germinated for 5 d at 26–28 °C and 60% relative humidity (RH) in darkness. They were then transplanted to vermiculite irrigated with a nutrient solution (CaCl<sub>2</sub> 0.78 M, MgSO<sub>4</sub> 0.486 M, ferric citrate 0.02 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.74 M pH 7.3, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.84 M pH 7.3, KCl 50 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 25 mM, MnSO<sub>4</sub> 5 mM, CuSO<sub>4</sub> 0.5 mM, ZnSO<sub>4</sub> 0.2 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mM). For control conditions, seedlings were sown in vermiculite containing nutrient solution to 1.7 ml g<sup>-1</sup> substrate. The water deficit treatment consisted of reducing the nutrient solution content to 0.425 ml g<sup>-1</sup> (1/4 or mild drought) or 0.212 ml g<sup>-1</sup> substrate (1/8 or severe drought), as described previously (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). We harvested seedling hypocotyls or roots at 6, 12, 24 or 48 h after applying the water deficit conditions and they were stored at -70 °C until further use. These treatments were performed in three independent experiments.

For other treatments, ABA (65 μM), NaCl (100 and 200 mM) or Paraquat (10 and 100 μM) were added into the nutrient solution used to irrigate the seedlings sown in vermiculite as described above,

and hypocotyls and seedling roots were harvested at 6, 12, 24 or 48 h after applying each treatment.

#### RNA isolation and northern blot analysis

Total RNA was isolated from 100–500 mg of frozen tissue using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Northern blot analyses were carried out as described previously (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Synthetic DNA oligonucleotides (Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, IBT-UNAM) with the antisense sequence corresponding to miR1514a and to U6 snRNA were used as probes (see Supplementary Table S5 at *JXB* online for oligonucleotide sequences; a full list of all primers used in this study is given in Table S5). Normalized miR1514a expression levels were calculated relative to U6 snRNA, as previously reported (Contreras-Cubas *et al.*, 2012; Naya *et al.*, 2014).

#### Real-time quantitative RT-PCR analysis

For the quantification of miR1514a and phasiRNAs accumulation levels by RT-qPCR, cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using the NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) or, alternatively, using the stem-loop protocol as previously reported (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) with minor adjustments as indicated by Contreras-Cubas *et al.* (2013). For qPCR we used a Step One real-time thermocycler (Applied Biosystems) and the SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). We performed an initial denaturing step at 95 °C for 5 min, followed by 95 °C for 10 s, 55 °C for 20 s for 40 cycles, and a final step of increasing temperature by 0.2 °C from 60 °C to 95 °C. Relative expression for each sample was calculated with the comparative  $C_t$  method. The  $C_t$  values obtained were normalized with the  $C_t$  value of U6 snRNA amplification.

To quantify mRNA levels of selected genes we generated cDNA using a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). cDNA synthesis and quality verification for RT-qPCR were performed as previously reported (Contreras-Cubas *et al.*, 2012). The resulting cDNA was then diluted and used to perform RT-qPCR assays using SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). Reactions were analyzed in a Step One real-time thermocycler (Applied Biosystems) using the following conditions: one cycle of 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s; 55 °C for 30 s, and extension steps were performed at specific temperatures for specific sequences. For each of three biological replicates, at least three RT-qPCR reactions were performed. Relative expression for each transcript was calculated with the comparative  $C_t$  method. The  $C_t$  values obtained were normalized with the  $C_t$  value of the reference gene *Skip16* (Borges *et al.*, 2012). The sequences of oligonucleotide primers used for RT-qPCR amplification of each RNA are provided in Supplementary Table S5.

Statistical analysis of gene expression (small RNAs and transcripts) was performed using one-way ANOVA and multiple paired Student's *t*-tests.

#### Immunoprecipitation of AGO1

For immunoprecipitation assays of AGO1, we used a custom-made rabbit polyclonal antibody (Genscript, Piscataway, NJ) raised against a synthetic peptide (CFYMEPETS DSGSMA) derived from AGO1 (Phvul.004G142900). The peptide sequence is located at the end of the PIWI domain at the C-terminus of the protein, and it is shared with *Arabidopsis thaliana* AGO1 and is not present in any other AGO protein encoded in the *P. vulgaris* or *A. thaliana* genomes. The antibody recognizes a single ~120 kDa protein in western blot assays. For each assay, we required 600 mg of root tissue from adult *P. vulgaris* plants ground in liquid nitrogen. A 1:50 antibody dilution was used and protein extracts were incubated in extraction buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1.5 mM NaCl; 0.1% Nonidet 40; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; Complete protease inhibitor

(Roche, Indianapolis, IN)] with the antibody and protein A-agarose beads (Roche) overnight at 4 °C. The co-immunoprecipitated RNA fraction was purified by phenol extraction. Alternatively, the protein fraction from immunoprecipitated material and total extract was obtained and analyzed by western blot, using the AGO1 antibody at a 1:1000 dilution.

#### Plasmid constructs and generation of composite transgenic hairy roots

The Pvu-miR1514a precursor (202 bp) was amplified from genomic DNA and cloned into the pENTR/SD/D-TOPO vector (Invitrogen). To obtain a miR1514a over-expression construct, we used the Gateway LR Clonase in a recombination reaction (Gateway system, Invitrogen) between pENTR-premiR1514a and pBA-DC-TdT. This expression plasmid contains the 35S CaMV promoter, and the tdTomato gene (red-fluorescent protein) as a visible reporter gene (Naya *et al.*, 2014). To obtain the miR1514a STTM construct we followed the Short Tandem Target Mimicry strategy (Yan *et al.*, 2012). The resulting DNA fragment (113 bp) was cloned into the pENTR-SD vector (Invitrogen). The insert in this plasmid (pENTR-STTM-1514a) was then recombined into pBA-DC-TdT to obtain pBA-STTM-miR1514a-TdT. All constructs were confirmed by DNA sequencing (Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, IBT-UNAM).

The empty pBA-DC-TdT vector and the resulting pBA-premiR1514a-TdT (OE-1514a) and pBA-STTM-miR1514a-TdT (STTM-1514a) plasmids were introduced into *Agrobacterium rhizogenes* K599 strain, and used for plant transformation as described previously (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007) with minor modifications, in three independent experiments with 15 plants each. Plants were maintained for hairy root formation for 2 weeks and we obtained 2–6 independent TdT fluorescence positive roots per plant, which were pooled in each independent experiment and kept at –70 °C until further use.

#### RNA-seq experiments and gene ontology analysis of common bean transgenic hairy roots

Common bean transgenic hairy roots carrying the appropriate constructs (EV, OE-1514a, or STTM-1514a) from two independent sets of samples were collected and processed to obtain total RNA as described above. Total RNA (1 µg) from each of the six samples was assessed for quality and integrity using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), processed to obtain cDNA libraries using the True-Seq stranded mRNA Library Prep kit (Illumina, San Diego, CA), and sequenced using a NextSeq 500 platform (Illumina) with a configuration of 150 cycles for 2 × 75 paired-end sequences (Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA, IBT-UNAM). After removing low-quality reads, all libraries contained between 32 and 47 million total reads of which 23 to 33 million reads per library mapped to the *P. vulgaris* ver. 1.0 genome available at Phytozome ([www.phytozome.net/commonbean.php](http://www.phytozome.net/commonbean.php)). Differential expression analysis was obtained using reads in the fastq format mapped to the *P. vulgaris* reference transcript compilation PhytozomeV10\_Pvulgaris\_218\_v1.0.transcript.fa using the Bowtie aligner (Langmead *et al.*, 2009), applying the parameters -aS -X 600 --offrate 1. The resulting alignment was normalized using the eXpress software (Roberts and Pachter, 2013) with the -rf-stranded parameter since the data were generated using a strand-specific dUTP method. The normalized counts were used as input for the differential expression analysis using the scripts included with the Trinity software selecting the EdgeR package (Haas *et al.*, 2013). RNA-seq data in the form of raw data for six samples (EV, OE-1514a, or STTM-1514a, with replicates) have been deposited in the NCBI database as a Bioproject (accession PRJNA342643).

To predict functional relationships among differentially expressed genes found in the RNA-seq experiments, the enriched gene ontology (GO) categories obtained by topGO (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>; *P*-value <0.05) were



classified based on their parental GO terms using the CateGORizer tool (<http://www.animalgenome.org/tools/catego/>) with the ‘consolidated single occurrences count’ option. The final count of secondary categories for the corresponding parental categories was represented in a graph using the ggplot2 package in R (<http://ggplot2.org/>).

#### *In silico DNA motif discovery analysis*

To identify DNA sequence motifs we used the MEME discovery tool with default parameters (Bailey *et al.*, 2009). We retrieved a region of 1000 nt upstream from selected genes using sequence data available for the *P. vulgaris* genome ([www.phytozome.net/commonbean.php](http://www.phytozome.net/commonbean.php); Goodstein *et al.*, 2012).

To discover sequence motifs present in NAC transcripts in *P. vulgaris* and other legume species using the MEME discovery tool, a sequence fragment starting from the miRNA recognition sequence and ending at the stop codon was retrieved from different NAC TF sequences from the common bean genome, and homologous genes from *Glycine max* and *Medicago truncatula* were also retrieved using sequence data available from annotated genomes ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net); Goodstein *et al.*, 2012).

#### *Target prediction for NAC-derived phasiRNAs*

To predict potential regulatory target mRNAs for the NAC-derived phasiRNAs, we used psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server, (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>; Dai and Zhao, 2011), using the default parameters. Manual addition of the phasiRNAs sequences was used to search targets using the transcriptome dataset for *P. vulgaris* ([www.phytozome.net/commonbean.php](http://www.phytozome.net/commonbean.php)).

## Results

### *miR1514a shows different accumulation levels in roots during drought in two cultivars with different drought tolerance*

We have previously reported that miR1514a levels in common bean (Pvu-miR1514a) increased in seedlings exposed to different abiotic stress conditions, as determined by northern blot assays (Arenas-Huertero *et al.*, 2009), and that its sequence is identical to that of *Glycine max* miR1514a (Subramanian *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011). The soybean genome encodes two *MIR1514* loci (*MIR1514a* and *MIR1514b*), which produce mature miRNAs that are identical in sequence except for a single nucleotide change towards the 3'-end (miRBase, version 21) (Subramanian *et al.*, 2008; Goettel *et al.*, 2014). We identified two loci encoding for *MIR1514a* (Chr. 3) and *MIR1514b* (Chr. 7) in the common bean genome, producing two mature 22-nt long miRNAs identical in sequence to Gma-miR1514a, and originating from asymmetrical precursors (see Supplementary Fig. S1A–C). We confirmed that both loci are expressed under the conditions tested in this study (Supplementary Fig. S1D, E). Because both common bean loci produce a miRNA identical in sequence to Gma-miR1514a, for the purposes of this study we will not distinguish between them and we will address both common bean miRNAs as miR1514a.

To continue characterizing the response to stress of miR1514a, we exposed 5-d-old seedlings to the addition of ABA or to different stress factors, including high NaCl or oxidative stress induced by the herbicide Paraquat, and

determined miR1514a levels by northern blot analysis (see Supplementary Fig. S2). In these initial experiments, we observed that the different treatments did not show changes in miR1514a accumulation. Thus, we focused on drought stress and we compared two common bean cultivars, Pinto Saltillo (PS, drought-tolerant) and Bayo Madero (BM, drought-sensitive), known to have contrasting drought tolerance phenotypes as defined by their grain yield under terminal drought conditions (Acosta-Gallegos *et al.*, 1999; Terán and Singh, 2002). We determined the accumulation levels of miR1514a by northern blot analysis in seedlings subjected to mild or severe drought regimes for 6, 12, 24, or 48 h and we analyzed roots and hypocotyls of each cultivar (Fig. 1 and Supplementary Fig. S3). The results showed that miR1514a levels increased in PS roots and hypocotyls upon 6 h of treatment (Fig. 1A and Supplementary Fig. S3A), whereas in BM roots no changes were detected (Fig. 1B and Supplementary Fig. S3B).

Furthermore, we analyzed leaves and roots of PS and BM adult plants subjected to drought stress, where we found similar accumulation profiles to those observed for seedlings: namely, that miR1514a showed a significant increase in accumulation under drought in PS roots (Fig. 1C) but not in leaves (Supplementary Fig. S4A) when compared to well-irrigated conditions, while BM plants showed no significant difference in roots (Fig. 1D) or leaves (Supplementary Fig. S4B).

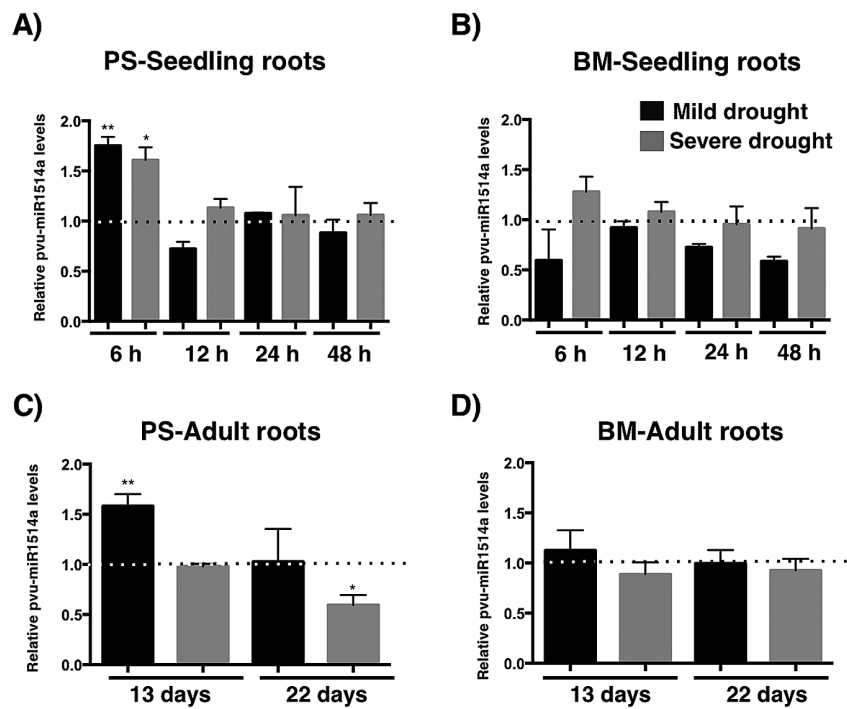
### *miR1514a targets the mRNA of a NAC transcription factor under drought*

Recently, we reported the genome-wide identification of miRNA targets in *P. vulgaris* by employing a Degradome or PARE analysis from seedling samples (Formey *et al.*, 2015), where miR1514a was found to target two transcripts encoding transcription factors of the NAC family, named Phvul.010G121000 (or NAC 000) and Phvul.010G120700 (or NAC 700) (Fig. 2A, B). This result was consistent with previous reports in *G. max* describing the mRNA targets of Gma-miR1514a as NAC TF-encoding transcripts (Arikrit *et al.*, 2014). In contrast to the degradome results obtained from seedlings, only NAC 700 transcript was detected in roots from adult plants (Fig. 2C; Formey *et al.*, 2015).

To confirm these data, a time-course experiment was performed in adult plants of PS and BM cultivars that were subjected to mild and severe drought treatments, and RT-qPCR analysis was carried out using RNA from roots to determine NAC 700 transcript accumulation levels. In agreement with the miR1514a accumulation pattern (see Fig. 1), the results showed that NAC 700 transcript abundance decreased in PS roots from stressed plants (Fig. 3A), whereas no significant change was detected for this transcript in BM roots from drought-treated plants, except at 22 d upon severe drought, which might represent an effect unrelated to miR1514a regulation (Fig. 3B).

### *NAC 700 mRNA is processed into phasiRNAs upon cleavage by miR1514a*

Because miR1514a is 22 nt in length, we hypothesized that cleavage of its target mRNA would trigger the formation



**Fig. 1.** miR1514a shows differential accumulation levels in roots of two common bean cultivars with different drought tolerance. Northern blot analysis of Pvu-miR1514a accumulation levels in (A) Pinto Saitillo (PS) seedling roots, (B) Bayo Madero (BM) seedling roots, (C) PS adult plant roots, and (D) BM adult plant roots. Seedlings were subjected to mild drought by irrigating with 1/4 of field capacity (fc), while adult plants were irrigated with 1/2 fc. Severe drought was imposed on seedlings by watering with 1/8 fc whereas adult plants were irrigated with 1/4 fc (See Methods for details). Dotted lines represent the Pvu-miR1514a levels for untreated samples at each time point. All Pvu-miR1514a values were normalized to the endogenous levels of U6 snRNA. Asterisks indicate a significant difference compared to the control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ),  $n = 3$ .

of phased small RNAs, or phasiRNAs (Chen *et al.*, 2007). Thus, considering the proposed miR1514a mRNA targets as candidates for phasiRNA formation, we applied a previously reported algorithm for phasiRNA loci identification (Chen *et al.*, 2007), which employed our previous sRNA-seq dataset (Pelaez *et al.*, 2012) to assign a  $P$ -value score. We found that NAC 700, but not NAC 000, showed a significant score ( $P = 5.9 \times 10^{-6}$  and 'Not Detected', respectively). As a control for this analysis we also recovered *TAS3* ( $P = 9.1 \times 10^{-5}$ ), a transcript that generates phasiRNAs upon miR390-mediated processing, known as tasiARFs (Axtell *et al.*, 2006) (see Supplementary Table S1). Moreover, we also found the NAC 700-derived phasiRNAs present in an independent sRNA-seq dataset of common bean (Nakano *et al.*, 2006; Pelaez *et al.*, 2012) (Supplementary Table S2). As part of our recent genome-wide analysis in common bean to uncover phasiRNAs-generating loci, we also identified the NAC 700 locus (Formey *et al.*, 2015) using an independent bioinformatical approach (Zhai *et al.*, 2011) (see Fig. 4A for a diagram).

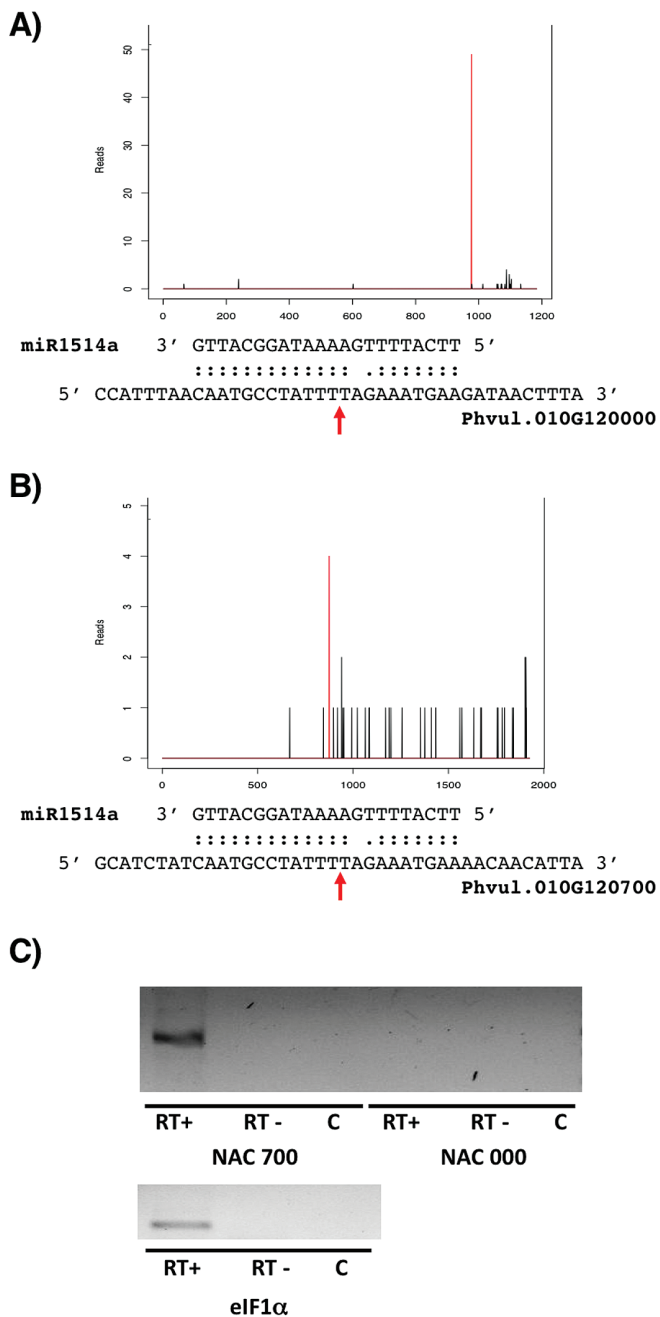
To evaluate the production of NAC 700-derived phasiRNAs in common bean roots under drought conditions, we performed RT-qPCR analysis to determine their accumulation levels during drought time-course experiments where we had previously detected increased miR1514a levels and reduced NAC 700 levels (see Figs 1 and 3). The results indicated the presence of a subset of the phasiRNAs, which showed strikingly distinct accumulation levels (see Supplementary Fig. S5). Only one phasiRNA reproducibly increased during drought in PS roots, corresponding to the 21-mer RNA

immediately following the first phasiRNA defined by miRNA cleavage, denoted hereafter as phasiRNA1 (Fig. 4A, B). In comparison, the accumulation levels of the unrelated tasiARFs derived from the *TAS3* transcript were unaffected under the same stress conditions (Fig. 4C).

#### Modulation of miR1514a levels affects NAC 700 mRNA abundance

To provide further evidence of the direct role of miR1514a in regulating NAC 700 mRNA, we generated common bean transgenic *hairy roots* over-expressing the miR1514a precursor (OE-1514a) or transgenic *hairy roots* with reduced levels of active miR1514a using a Short Tandem Target Mimicry construct (STTM-1514a) aimed at inhibiting miRNA activity, as previously reported (Yan *et al.*, 2012). As expected, transgenic OE-1514a *hairy roots* showed an increased level of mature miR1514a, while the accumulation of NAC 700 mRNA was decreased. By contrast, we observed an increase in NAC 700 transcript levels when miR1514a was inhibited (Fig. 5A, B). Therefore, these results are consistent with a direct regulation of the NAC 700 transcript by miR1514a.

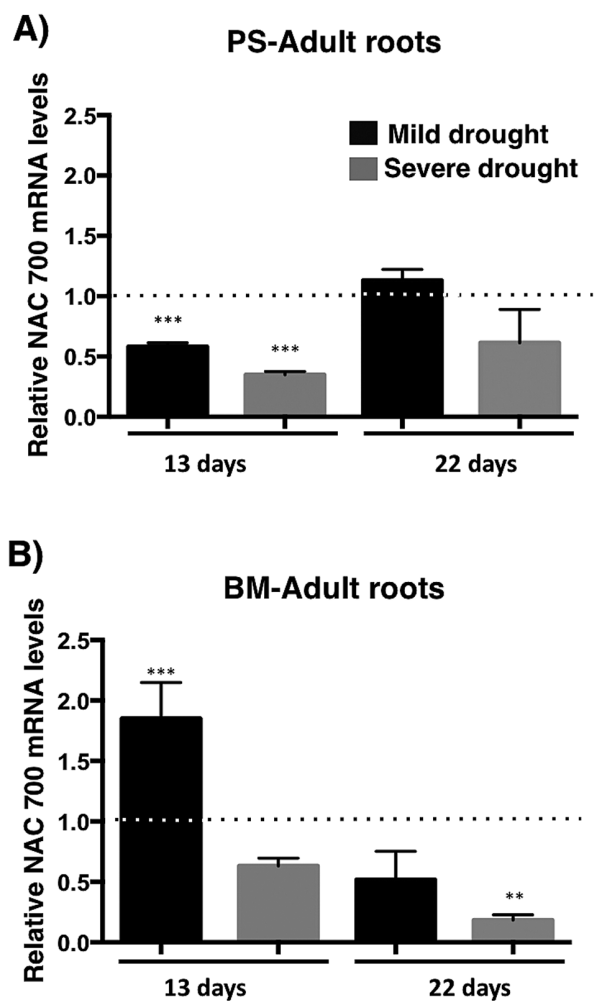
Next, we determined the accumulation of the NAC-derived phasiRNAs in these transgenic *hairy roots*. This analysis showed that even though not all individual phasiRNAs reached consistent accumulation profiles, both phasiRNA1 and phasiRNA6 showed reduced levels when miR1514a was inhibited, and increased levels when miR1514a was over-expressed (Fig. 5C, and see Fig. 4A for a diagram of phasiRNAs produced),



**Fig. 2.** miR1514a targets the transcripts of two different NAC-TFs. (A) Phvu1.010G121000 (NAC 000) and (B) Phvu1.010G120700 (NAC 700) are targeted by miR1514a. The peak values show the cleavage site defined by Degradome analysis (Formey *et al.*, 2015). (C) RT-PCR assays showing the presence of NAC 700 and NAC 000 transcripts in roots of adult plants. RT+ and RT- refer to the presence or absence of reverse transcriptase enzymes in the cDNA reaction; C is the PCR negative control. NAC 700 shows an amplicon of 360 bp, and the NAC 000 amplicon has a length of 248 bp. Amplification of the eIF4 transcript was used as positive control in cDNA reactions. (This figure is available in colour at JXB online.)

consistent with their formation upon NAC 700 mRNA processing. In contrast, the levels of the unrelated tasiARFs under these conditions were largely unaffected (Fig. 5C).

The transgenic hairy root system successfully revealed the relationship between miR1514a and phasiRNA production. However, there is an extremely low efficiency in obtaining



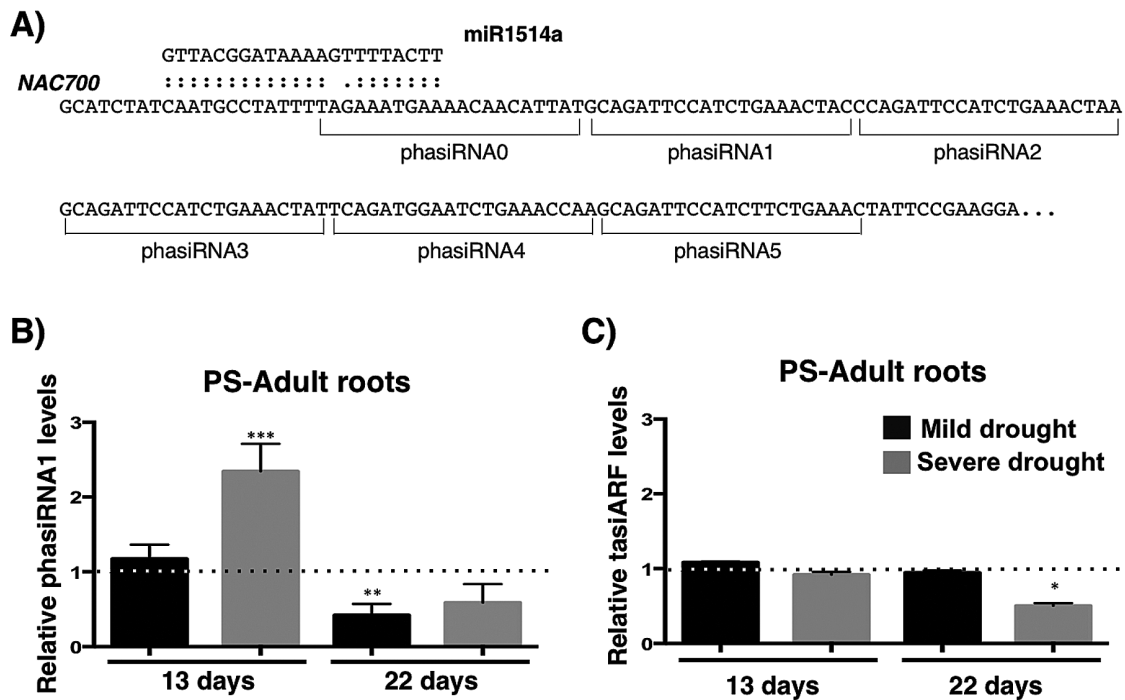
**Fig. 3.** The drought resistant Pinto Saltillo (PS) cultivar shows reduced NAC 700 levels under drought conditions. (A) Levels of NAC 700 mRNA in roots of PS adult plants determined by RT-qPCR. (B) Levels of NAC 700 mRNA in roots of Bayo Madero (BM) adult plants determined by RT-qPCR. Mild drought represents irrigation to 1/2 field capacity (fc). Severe drought is 1/4 fc. Samples were collected at 13 or 22 d after water deprivation. Expression of NAC 700 was normalized with Skp16 mRNA levels. Asterisks indicate a significant difference compared to control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ),  $n = 3$ .

stable transgenic plants in common bean and this precluded our analysis of phenotypic traits caused by altered levels of miR1514a and/or NAC 700.

#### NAC 700-derived phasiRNA1 associates with AGO1

To explore the potential functionality of the NAC-derived phasiRNAs we wanted to see whether they could be detected in association with AGO1-containing protein complexes. To that end, we performed immunoprecipitation (IP) experiments using an antibody raised against *P. vulgaris* AGO1 (see Methods). For this, total cell protein extracts were obtained from roots of PS adult plants subjected to drought. We successfully recovered Pv-AGO1 as determined by western blots of the IP fractions, which showed enrichment for miR1514a, while U6 snRNA, an unrelated RNA, was not recovered in





**Fig. 4.** phasiRNA1 levels are increased during a drought time-course in PS roots. (A) Scheme of miR1514a targeting of NAC 700 and phasiRNAs produced, including the numbering scheme used. Root samples of Pinto Saitillo (PS) adult plants were collected after 13 or 22 d after water deprivation and total RNA was used for RT-qPCR detection of small RNAs. (B) phasiRNA1 accumulation levels, (C) tasiARF accumulation levels. Dotted lines represent the small RNA levels for untreated samples at each time point normalized to 1. Mild drought represents irrigation to 1/2 field capacity (fc) and severe drought is 1/4 fc. Accumulation levels of small RNAs were normalized to those of U6 snRNA. Asterisks indicate a significant difference compared to control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ),  $n=3$ .

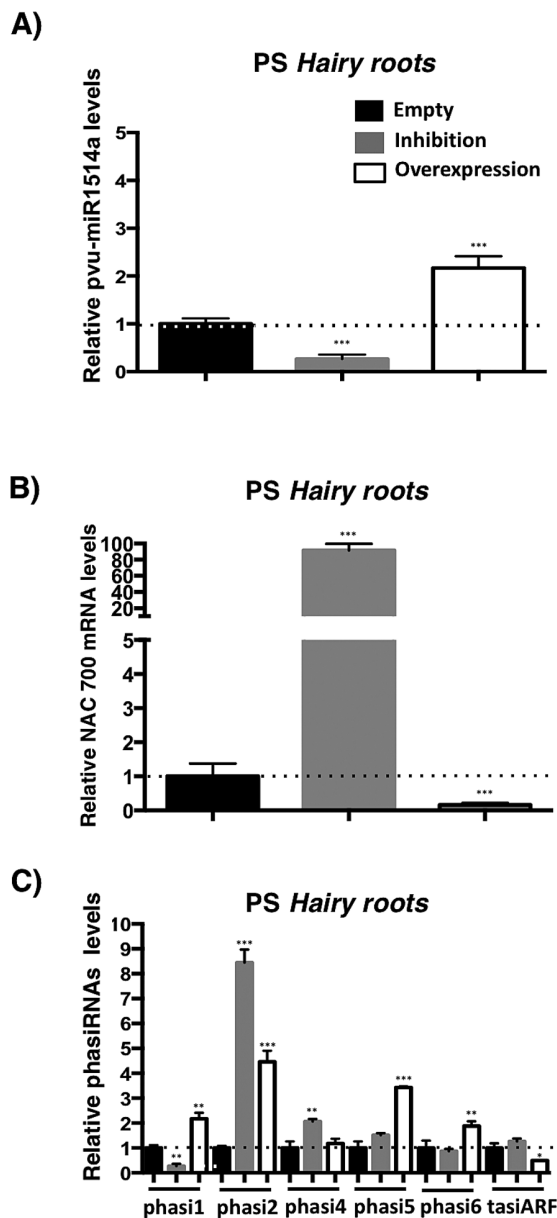
the IP fractions (Fig. 6A–C illustrates one of two independent experiments that showed similar patterns).

We then determined the presence of different NAC-derived phasiRNAs in AGO1 complexes. We observed that only phasiRNA1 was enriched in the IP fraction, while other NAC-derived phasiRNAs were not consistently recovered (Fig. 6C). These results indicate that phasiRNA1 is recruited into AGO1-containing protein complexes and suggest that it is functional in PTGS. However, other NAC-derived phasiRNAs that we did not recover could be associated to other AGO protein complexes, or their low abundance could limit our ability to detect them reliably.

#### Genome-wide effects of modulating miR1514a activity

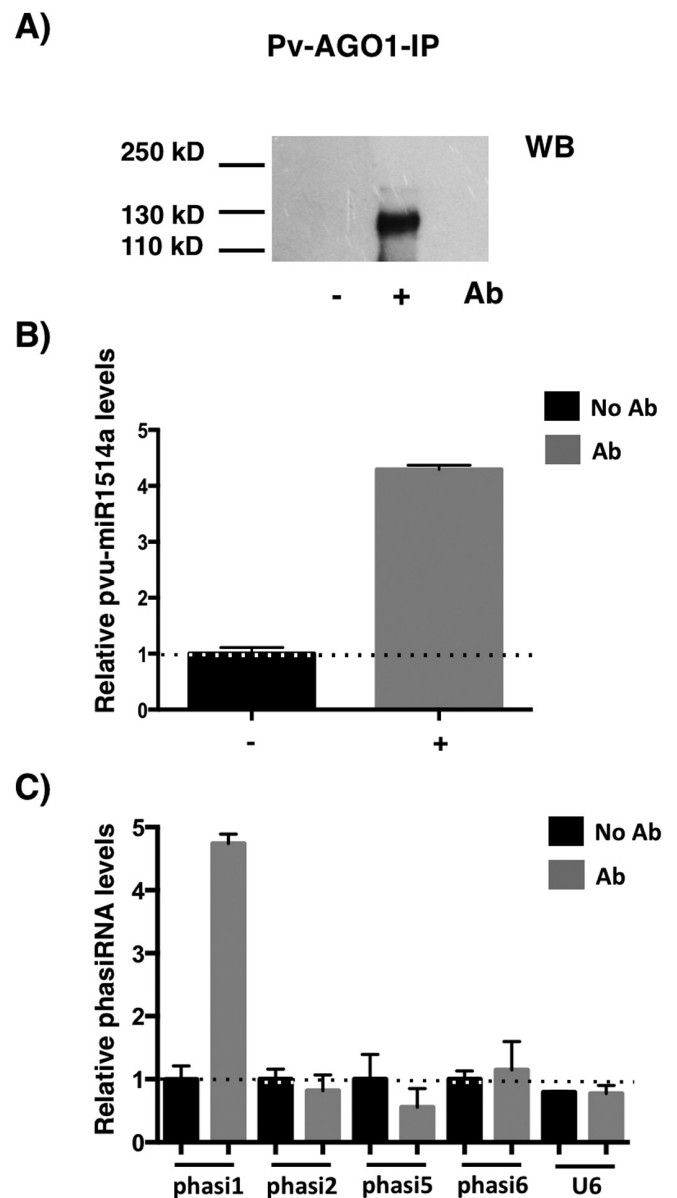
To explore the consequences of miR1514a activity in relation to gene expression, we generated composite plants for over-expression or inhibition of miR1514a (OE-1514a or STTM-1514a, respectively), or containing the empty vector (EV, used as a control). Total RNA samples from two independent sets of transgenic hairy roots were subjected to RNA-seq analysis. While we observed an increased accumulation of miR1514a in the OE-1514a roots (see Fig. 5A, and Supplementary Fig. S6), RNA-seq analysis of these samples revealed a very limited number of differentially expressed genes (five up-regulated and seven down-regulated genes,  $P$ -value = 0.01, FDR = 0.01, data not shown). Among these genes, we did not observe the expected reduced levels of NAC 700 mRNA; thus

the miR1514a overexpression levels attained in these samples were not sufficient to produce a significant change and therefore these results were not analyzed further. In sharp contrast, we observed a large number of up- and down-regulated genes in roots where the miR1514a activity was inhibited (61 and 129 genes, respectively,  $P$ -value = 0.01, FDR = 0.01, Supplementary Table S3). Within this dataset we detected the corresponding up-regulation of NAC 700 mRNA but not of other unrelated NAC TFs (Fig. 7A and 7B, respectively). Thus, we determined significantly enriched gene ontology (GO) categories for the up- and down-regulated genes (see Supplementary Table S3). Based on Biological Process, in the up-regulated genes these categories included four metabolism terms, biogenesis, and morphogenesis (Fig. 8A), and included two HSP70 homologs and one SHAVEN 3 (SHV3) homolog involved in glycerol metabolism and important for root hair elongation (Hayashi *et al.*, 2008). For down-regulated genes, we again detected metabolism-related terms and responses to stress, including four different peroxidases, and a homolog of the PYR1-like ABA receptors (Kline *et al.*, 2010). We then analyzed the enriched GO terms based on Molecular Function, where we observed an enrichment for nucleic acid binding activity in the up-regulated genes, which contained two DCL homologs, two RDR homologs, and a HEN1 homolog. In the case of down-regulated genes, terms such as protein binding and antioxidant activity were recovered. To evaluate the significance of the results obtained in the RNA-seq experiments using a different approach, we selected

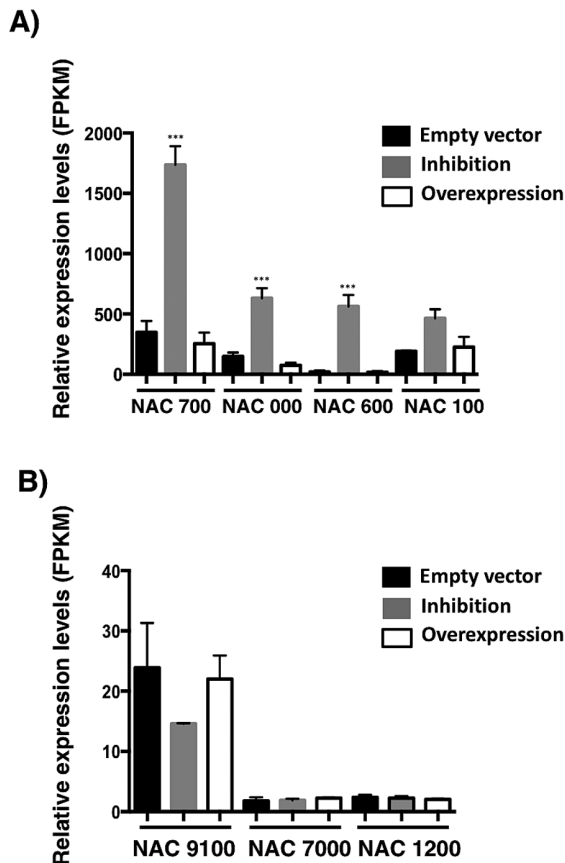


up- and down-regulated genes (based on their fold-change values) to detect them by RT-qPCR in the RNA samples employed for high-throughput sequencing. Consistently, four of the selected genes showed a similar trend of accumulation to that observed in the transcriptome analysis (Fig. 8B).

Finally, we reasoned that if phasiRNAs act in PTGS, inhibition of miR1514a in transgenic *hairy roots* should result in reduced phasiRNA activity. To explore this idea, we first



predicted regulatory targets of phasiRNAs using the psRNA-Target server (see Supplementary Table S4). However, based on the RNA-seq data we did not find changes in these transcripts upon miR1514a deregulation (Supplementary Fig. S7), suggesting that phasiRNAs do not act *in trans*. Interestingly, other NAC transcripts related to NAC 700 showed a significant increase in their accumulation when miR1514a was inhibited (see Fig. 7A), suggesting they are targeted by miR1514a and/or by NAC-derived phasiRNAs in transgenic *hairy roots*.



**Fig. 7.** Transgenic *hairy roots* with reduced miR1514a levels reveal effects on NAC TF transcripts. Total RNA from two sets of transgenic *hairy roots* carrying the STTM-1514a construct, OE-1514a, or the empty vector, was obtained and analyzed by RNA-seq. (A) NAC 700 and other related NAC transcripts are modulated in roots carrying the miR1514a inhibition construct. (B) miR1514a has no effect on other unrelated NAC TFs lacking the miRNA recognition site. FPKM = fragments per kilobase of exon per million reads mapped. Asterisks indicate a significant difference compared to the empty vector samples, as determined by Tukey's multiple comparisons test (\*\*\*) $P < 0.001$ .

## Discussion

In contrast to *Arabidopsis* and other model legume species, little is known about the post-transcriptional regulation in common bean during drought and even less is known about the contribution of miRNAs and other small RNAs, despite the great importance of gaining knowledge about this crop for improvement for food production to face population and climate changes. Therefore, in this study we aimed to characterize the activity of the common bean miR1514a during water deficit conditions.

### *miR1514a* shows differential expression levels in response to drought in common bean

In an attempt to contribute to our knowledge of miRNAs in common bean, in 2009 Arenas-Huertero and co-workers reported cloning of 16 conserved and six non-conserved miRNAs, including miR1514a which showed expression levels modulated by low water availability

conditions (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Here, we analyzed the miR1514a expression levels using two common bean cultivars with contrasting drought tolerance (Terán and Singh, 2002; Rosales-Serna *et al.*, 2004; Sanchez-Valdez *et al.*, 2004; Padilla-Ramirez *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). Our results indicate that the terminal drought-resistant cultivar PS has a specific pattern of miR1514a modulation at two different developmental stages that was not detected in the susceptible BM cultivar, suggesting that it may mediate downstream events leading to stress responses.

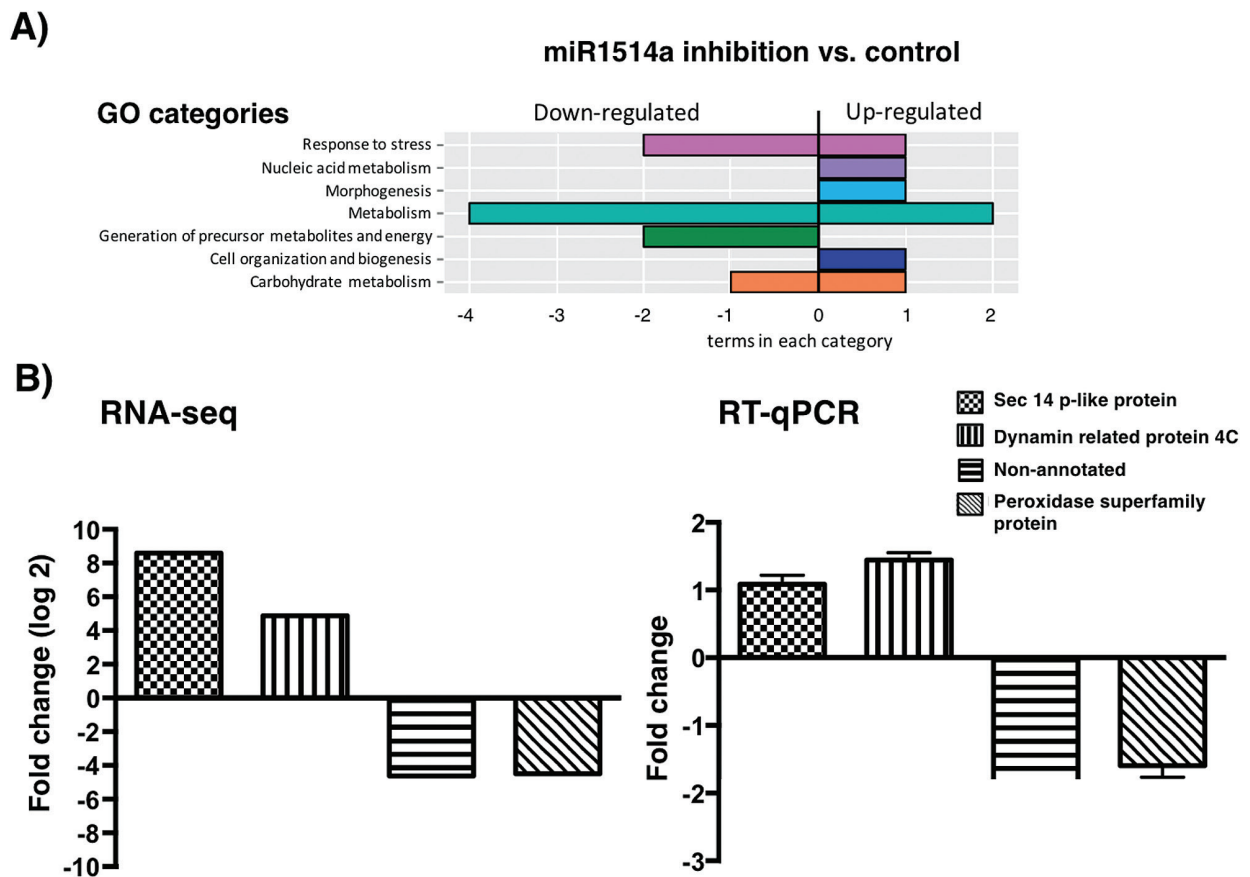
### *miR1514a* targets a NAC TF mRNA for degradation in roots

A recent genome-wide analysis to identify miRNA targets showed two NAC transcription factor transcripts for miR1514a, Phvul.010G120700 (NAC 700) and Phvul.010G121000 (NAC 000) (Formey *et al.*, 2015). Similarly, a homologous NAC TF mRNA is targeted by miR1514a in soybean, supporting these findings (Arikiti *et al.*, 2014). Here, we focused our attention on NAC 700 because its mRNA accumulation was decreased when miR1514a was up-regulated in roots of adult plants subjected to water deficit, while NAC 000 was not detected. These observations were consistent with the results obtained from transgenic *hairy roots*, where miR1514a accumulation levels were modulated, and showed an inverse effect on NAC 700 mRNA abundance, hence indicating that miR1514a directly targets NAC 700 mRNA. Nevertheless, we do not discard the possibility that with different growth conditions, different cultivars, and/or at other developmental stages, NAC 000 – or other related NAC TF mRNAs – might be expressed and subjected to miRNA regulation.

In plants, several miRNAs regulate mRNAs encoding transcription factors (Jones-Rhoades *et al.*, 2006), indicating that miRNAs can have an impact in miRNA-TF gene expression regulatory networks (Osella *et al.*, 2011; Megraw *et al.*, 2016). In addition, miRNAs can act in cell-cell or organ-organ communication (Megraw *et al.*, 2016), and they can even work at long distances from where they are produced, being transported through phloem (Buhtz *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2008), thus effectively amplifying their regulatory effects. Upon cleavage of an initial transcript, production of secondary small RNAs may represent another way of signal amplification, as could be the case for phasiRNAs.

### *miR1514a*-directed cleavage of NAC 700 mRNA triggers phasiRNA formation

In *A. thaliana*, tasiRNAs have been widely studied, being produced mainly from four *TAS* genes; miR173 regulates *TAS1alb/c* and *TAS2* transcripts, while miR390 and miR828 target *TAS3* and *TAS4*, respectively (Axtell *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013). With the advent of high-throughput sequencing of small RNAs, phasiRNA identification has been developed and more *PHAS* loci have been annotated, as is the case for *TAS5*, *TAS6* (Arif *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012), and many *TAS*-like (*TASL*) loci (Zhai *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013).



**Fig. 8.** Genome-wide analysis of genes affected by inhibition of miR1514a. RNA-seq data was obtained from transgenic *hairy roots* carrying the STTM-1514a construct, OE-1514a, or the empty vector. (A) Gene ontology (GO) categories of mRNAs showing differential expression in roots carrying the miR1514a inhibition construct. (B) Comparison between RNA-seq data and RT-qPCR of selected genes with significant changes in miR1514a inhibition in *hairy roots*. (This figure is available in colour at JXB online.)

In comparison, phasiRNAs have not been widely studied with the exception of a few crop plants, such as rice, maize, and soybean (Johnson *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2012; Arikiti *et al.*, 2014). In general, identification of phasiRNA loci has employed algorithms in genome-wide analyses (Chen *et al.*, 2007; Howell *et al.*, 2007), including *Phaseolus* (Formey *et al.*, 2015). In *G. max* miR1514a targets a NAC TF mRNA, subsequently triggering production of phasiRNAs (Arikiti *et al.*, 2014). Likewise, in common bean we observed in sRNA-seq datasets that the NAC 700 locus is a source of phasiRNAs, consistent with its processing by miR1514a. Moreover, when the activity of miR1514a was modulated in transgenic *hairy roots* or during water deficit conditions, the accumulation of NAC 700-derived phasiRNAs was also affected, indicating that production of phasiRNAs triggered by the action of the 22-nt-long miR1514a on a NAC TF transcript is conserved in *P. vulgaris*, and possibly other legumes as well.

#### The role of miR1514a during water deficit responses

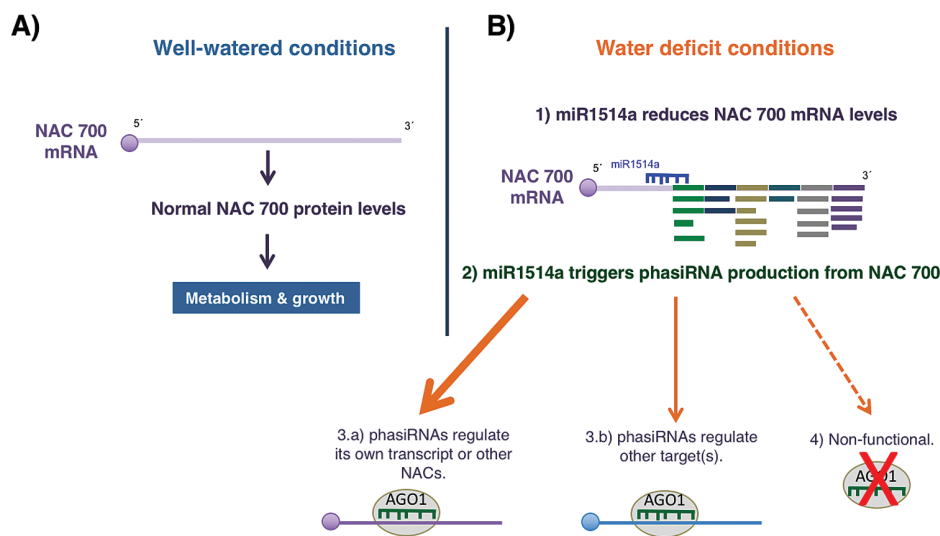
The activity of miR1514a on the transcript of NAC 700 has two outcomes. Firstly, it reduces the levels of the NAC 700 transcription factor, thus affecting downstream gene expression; secondly, miR1514a action results in phasiRNA production, in particular phasiRNA1, which could have its own

regulatory roles, including amplification of the response initiated by miR1514a. Either one or both outcomes could be directly involved in stress responses and we will discuss them next (Fig. 9).

#### NAC-derived phasiRNAs could target other transcripts for cleavage in trans

NAC-derived phasiRNAs may have two alternative outcomes: (1) phasiRNAs may target other transcripts *in trans*, or (2) phasiRNAs may not be functional (shown as 3.a and 3.b, or 4, in Fig. 9). Remarkably, the sequence of NAC 700-derived phasiRNA1 is conserved in different common bean NAC TF transcripts and is present in related NAC TF genes from other legume species (see Supplementary Fig. S8), suggesting that it is functional, although conservation due to other factors, including NAC 700 mRNA amino acid coding capacity, can not be ruled out. Our results can be compared to miR390, which directs the processing of *TAS3* in different plant species to generate phasiRNAs where only a subset of these, known as tasiARFs, are conserved and regulate the transcripts of ARF2, ARF3/ETT, and ARF4 *in trans* (Axtell *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013), suggesting that phasiRNA1 acts as a tasiRNA. Accordingly, we found that phasiRNA1 is recruited into AGO1 complexes under water deficit conditions in adult plant roots; hence, together with





**Fig. 9.** miR1514a amplifies RNA silencing by phasiRNA production through the cleavage of NAC 700 transcript during drought stress. This model summarizes our results. Under non-stress conditions, NAC 700 TF regulates downstream gene expression to contribute to normal metabolism and growth (A). Upon water limitation (B), miR1514a is induced and targets NAC 700 transcript for cleavage (1) and phasiRNA production (2). Some phasiRNAs may have their own regulatory targets such as NAC 700 and/or other NAC homologous transcripts, as discussed in the text (3.a) or other unrelated mRNAs (3.b). Alternatively, they may be non-functional (4).

its conservation, this result suggests that phasiRNA1 acts *in trans* and might target a mRNA to perform a particular function in the Fabaceae family. The phasiRNA1 contains a G at the 5'-end, which differs from the U preference known for AGO1 (Mi *et al.*, 2008), although other conserved miRNAs such as miR172 also contain a G at the 5'-end, indicating that this is not an absolute prerequisite for association with AGO1. However, in the transcriptome analysis of transgenic *hairy roots* with reduced miR1514a activity we found no changes in potential transcripts regulated by phasiRNAs. In contrast, the levels of other related NAC TF mRNAs were altered, suggesting that phasiRNAs and/or miR1514a are directly involved in their modulation *in trans* (shown as a thick arrow in 3.a in Fig. 9). The potential activity of NAC-derived phasiRNAs on NAC transcripts could be indicating a new tasiRNA activity on their own transcripts, a hypothesis that remains to be tested.

#### Potential regulatory targets of the NAC 700 transcription factor

To evaluate the molecular consequences of miR1514a activity, we performed a transcriptome analysis of transgenic *hairy roots* focusing on the transcription factor NAC 700. From the differentially expressed genes we determined enriched GO terms indicating that genes related to metabolism, biogenesis, morphogenesis, and responses to stress were affected when we modulated miR1514a abundance. In *A. thaliana* several NAC TFs have been associated with drought-stress, including NAC016, NAC019, NAP, NAC053/NTL4, NAC055, NAC072, and NAC096 (Tran *et al.*, 2004; Lee and Park, 2012; Zhang and Gan, 2012; Xu *et al.*, 2013), indicating the relevance of this TF family in stress responses. The differentially expressed genes obtained by RNA-seq analyses could be a direct consequence of NAC 700 TF activity. If so, the regulatory regions of these genes might contain common

sequence motifs, potentially representing a NAC 700 binding site. However, we failed to uncover any significant sequence motifs, probably due to the presence of direct and indirect gene expression changes occurring in the transgenic *hairy roots*.

Finally, among the differentially expressed genes defined by the RNA-seq of transgenic *hairy roots* we identified a homolog of Sec14p (Phvul.006G137200, Fig. 8B), a protein initially defined as involved in vesicle trafficking in yeast (Bankaitis *et al.*, 1989). This mRNA was also differentially accumulated in response to water deficit in the roots of drought-resistant PS plants but not in the drought-sensitive BM plant roots (data not shown). This finding suggests that it is possible to identify gene expression changes related to miR1514a regulation that are reflected in gene expression changes caused by water deficit in PS and BM cultivars. It remains to be determined if other genes that were not considered in this analysis could also be affected by NAC 700 accumulation levels and water deficit conditions.

#### Conclusions

Taken together, the results presented here illustrate the participation of the miR1514a regulatory module during water deficit conditions in *P. vulgaris*. It is possible that common bean and other legumes may have particular strategies for gene regulation based on other miRNAs and phasiRNA products to regulate stress responses. The recent description of the common bean genome (Schmutz *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2016) will provide invaluable knowledge for future PTGS studies. In addition, the different molecular participants in the miR1514a pathway could be used to guide crop improvement programs directed at the generation of new and more resistant cultivars of common bean and other legumes.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online

Figure S1. Pre-miR1514a is present in the common bean variety Pinto Saltillo.

Figure S2. Accumulation levels of miR1514a in hypocotyls and roots of common bean under different abiotic stresses.

Figure S3. miR1514a levels in hypocotyls of the Pinto Saltillo and Bayo Madero cultivars during water deficit.

Figure S4. miR1514a levels in leaves of adult plants of Pinto Saltillo and Bayo Madero cultivars during water deficit.

Figure S5. Some NAC-derived phasiRNAs in roots from adult plants have different levels during a drought time-course experiment.

Figure S6. Expression levels of RNA-seq control genes.

Figure S7. NAC-derived phasiRNA predicted targets are not affected in RNA-seq data.

Figure S8. PhasiRNA1 is conserved in common bean and other legumes.

Table S1. Probability of generating phasiRNAs for NAC genes.

Table S2. phasiRNAs reads derived from NAC 700 in two independent sRNA-seq experiments.

Table S3. Differential gene expression in STTM-1514a transgenic hairy roots.

Table S4. NAC-derived phasiRNA targets predicted by psRNATarget.

Table S5. Primers used in this study.

## Acknowledgements

Guadalupe Sosa-Valencia is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received a fellowship (239786) from CONACYT. We are grateful to MS David Rendón for his assistance in data analysis, to Biol. David Garcías for help with RT-qPCR; Dr Cecilia Contreras-Cubas for her contribution to the characterization of the AGO1 antibody and to Lic Rosa María Solórzano for technical support received during this project. We are grateful to MS Luis Delgadillo, Dr Catalina Arenas-Huertero, Dr Oswaldo Valdés-López, and members of our research group for valuable comments and discussions related to this work. Our research was partially supported by grants from DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN-205115, IN-205015) and CONACYT (151571) to JLR.

## References

- Acosta-Gallegos J, Acosta E, Padilla S, Goytia MA, Rosales R, López E.** 1999. Mejoramiento de la resistencia a la sequía en frijol común en México. *Agronomía Mesoamericana* **10**, 83–90.
- Arenas-Huertero C, Perez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2009. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology* **70**, 385–401.
- Arif MA, Fattash I, Ma Z, Cho SH, Beike AK, Reski R, Axtell MJ, Frank W.** 2012. DICER-LIKE3 activity in *Physcomitrella patens* DICER-LIKE4 mutants causes severe developmental dysfunction and sterility. *Molecular Plant* **5**, 1281–1294.
- Arikrit S, Xia R, Kakrana A, et al.** 2014. An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. *Plant Cell* **26**, 4584–4601.
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP.** 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* **127**, 565–577.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS.** 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* **37**, W202–W208.
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD, Greene R.** 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *Journal of Cell Biology*, **108**, 1271–1281.
- Borges A, Tsai SM, Caldas DG.** 2012. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **31**, 827–838.
- Borges F, Martienssen RA.** 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 727–741.
- Bray EA.** 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48–54.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J.** 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* **252**, 55–128.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J.** 2008. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant Journal* **53**, 739–749.
- Castro-Guerrero NA, Isidra-Arellano MC, Mendoza-Cozatl DG, Valdes-Lopez O.** 2016. Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc and phosphate deficiencies. *Frontiers in Plant Science* **7**, 600.
- Chen HM, Li YH, Wu SH.** 2007. Bioinformatic prediction and experimental validation of a microRNA-directed tandem trans-acting siRNA cascade in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 3318–3323.
- Contreras-Cubas C, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2013. Determining abundance of microRNAs and other small RNAs in legumes. *Methods in Molecular Biology* **1069**, 81–92.
- Contreras-Cubas C, Rabanal FA, Arenas-Huertero C, Ortiz MA, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2012. The *Phaseolus vulgaris* miR159a precursor encodes a second differentially expressed microRNA. *Plant Molecular Biology* **80**, 103–115.
- Covarrubias AA, Reyes JL.** 2010. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environment* **33**, 481–489.
- Cuellar-Ortiz SM, Arrieta-Montiel MDLP, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA.** 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell & Environment* **31**, 1399–1409.
- Dai X, Zhao PX.** 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* **39**, W155–W159.
- Doyle JJ, Luckow MA.** 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**, 900–910.
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillen G, Diaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sanchez F.** 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* **2**, 1819–1824.
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, et al.** 2007. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* **2**, e219.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC.** 2013. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* **25**, 2400–2415.
- Formey D, Iniguez LP, Pelaez P, Li YF, Sunkar R, Sanchez F, Reyes JL, Hernandez G.** 2015. Genome-wide identification of the *Phaseolus vulgaris* sRNAome using small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics* **16**, 423.
- Gallegos JAA, Shibata JK.** 1989. Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry-bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Field Crops Research* **20**, 81–93.
- Goettl W, Liu Z, Xia J, Zhang W, Zhao PX, An YQ.** 2014. Systems and evolutionary characterization of microRNAs and their underlying regulatory networks in soybean cotyledons. *PLoS ONE* **9**, e86153.
- González G, Mendoza FM, Covarrubias J, Morán N, Acosta-Gallegos JA.** 2008. Yield and seed quality of common bean grown in two planting dates at the Bajío region. *Agricultura Técnica México* **34**, 421–430.

- Goodstein DM, Shu S, Howson R, et al.** 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* **40**, D1178–D1186.
- Graham PH, Vance CP.** 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* **131**, 872–877.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, et al.** 2013. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**, 1494–1512.
- Hayashi S, Ishii T, Matsunaga T, Tominaga R, Kuromori T, Wada T, Shinozaki K, Hirayama T.** 2008. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1522–1535.
- Howell MD, Fahlgren N, Chapman EJ, Cumbie JS, Sullivan CM, Givan SA, Kasschau KD, Carrington JC.** 2007. Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* **19**, 926–942.
- Jeong DH, Park S, Zhai J, Gurazada SG, De Paoli E, Meyers BC, Green PJ.** 2011. Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. *Plant Cell* **23**, 4185–4207.
- Johnson C, Kasprzewska A, Tennesen K, Fernandes J, Nan GL, Walbot V, Sundaresan V, Vance V, Bowman LH.** 2009. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Research* **19**, 1429–1440.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B.** 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 19–53.
- Kline KG, Sussman MR, Jones AM.** 2010. Abscisic acid receptors. *Plant Physiology* **154**, 479–482.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL.** 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**, R25.
- Lee S, Park CM.** 2012. Regulation of reactive oxygen species generation under drought conditions in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 599–601.
- Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W.** 2012. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PLoS ONE* **7**, e39650.
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ.** 2008. Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology* **147**, 732–746.
- Mallory AC, Vaucheret H.** 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics* **38**, S31–S36.
- Megraw M, Cumbie JS, Ivanchenko MG, Filichkin SA.** 2016. Small genetic circuits and microRNAs: big players in polymerase II transcriptional control in plants. *Plant Cell* **28**, 286–303.
- Mi S, Cai T, Hu Y, et al.** 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**, 116–127.
- Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW.** 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* **147**, 105–131.
- Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC.** 2006. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Research* **34**, D731–D735.
- Naya L, Paul S, Valdes-Lopez O, Mendoza-Soto AB, Nova-Franco B, Sosa-Valencia G, Reyes JL, Hernandez G.** 2014. Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS ONE* **9**, e84416.
- Nova-Franco B, Iniguez LP, Valdes-Lopez O, et al.** 2015. The microRNA172c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean–*Rhizobium etli* nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiology* **168**, 273–291.
- Oliver MJ, Cushman JC, Koster KL.** 2010. Dehydration tolerance in plants. *Methods in Molecular Biology* **639**, 3–24.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K.** 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Sciences* **10**, 79–87.
- Osella M, Bosia C, Cora D, Caselle M.** 2011. The role of incoherent microRNA-mediated feedforward loops in noise buffering. *PLoS Computational Biology* **7**, e1001101.
- Padilla-Ramirez JS, Osuna-Ceja ES, Acosta-Diaz E, Acosta-Gallegos JA.** 2007. Indicators of dry bean performance under rainfed conditions at the highlands of Mexico. *Bean Improvement Cooperative Annual Report* **50**, 161–162.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR.** 2008. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant Journal* **53**, 731–738.
- Pelaez P, Trejo MS, Iniguez LP, Estrada-Navarrete G, Covarrubias AA, Reyes JL, Sanchez F.** 2012. Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC Genomics* **13**, 83.
- Roberts A, Pachter L.** 2013. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nature Methods* **10**, 71–73.
- Rosales MA, Ocampo E, Rodriguez-Valentin R, Olvera-Carrillo Y, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA.** 2012. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* **56**, 24–34.
- Rosales-Serna R, Kohashi-Shibata J, Acosta-Gallegos JA, Trejo-López C, Ortiz-Cereceres J, Kelly JD.** 2004. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field Crops Research* **83**, 203–211.
- Sanchez-Valdez I, Acosta-Gallegos JA, Ibarra-Perez FJ, Rosales-Serna R, Singh SP.** 2004. Registration of 'Pinto Saltillo' common bean. *Crop Science* **44**, 1865–1866.
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, et al.** 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* **46**, 707–713.
- Song QX, Liu YF, Hu XY, Zhang WK, Ma B, Chen SY, Zhang JS.** 2011. Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing. *BMC Plant Biology* **11**, 5.
- Song X, Li P, Zhai J, et al.** 2012. Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis. *Plant Journal* **69**, 462–474.
- Sosa-Valencia G, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2013. Signaling by microRNAs in response to abiotic stress. In: Sarwat M, Ahmad A, Abidin MZ, eds. *Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective*. New York: Springer, 51–67.
- Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, Barbazuk WB, Zhu JK, Yu O.** 2008. Novel and modulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* **9**, 160.
- Sunkar R.** 2010. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **21**, 805–811.
- Terán H, Singh SP.** 2002. Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Science* **42**, 64–70.
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**, 2481–2498.
- Valdes-Lopez O, Arenas-Huertero C, Ramirez M, Girard L, Sanchez F, Vance CP, Luis Reyes J, Hernandez G.** 2008. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell & Environment* **31**, 1834–1843.
- Valdes-Lopez O, Yang SS, Aparicio-Fabre R, Graham PH, Reyes JL, Vance CP, Hernandez G.** 2010. MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist* **187**, 805–818.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP.** 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3**, 12.
- Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert JL, Bartel DP, Crete P.** 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell* **16**, 69–79.
- Vlasova A, Capella-Gutierrez S, Rendon-Anaya M, et al.** 2016. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology* **17**, 32.
- Voinnet O.** 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669–687.



**Xia R, Meyers BC, Liu Z, Beers EP, Ye S.** 2013. MicroRNA superfamilies descended from miR390 and their roles in secondary small interfering RNA biogenesis in eudicots. *Plant Cell* **25**, 1555–1572.

**Xia R, Zhu H, An YQ, Beers EP, Liu Z.** 2012. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biology* **13**, R47.

**Xu ZY, Kim SY, Hyeon do Y, et al.** 2013. The Arabidopsis NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell* **25**, 4708–4724.

**Yan J, Gu Y, Jia X, Kang W, Pan S, Tang X, Chen X, Tang G.** 2012. Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 415–427.

**Zhai J, Jeong DH, De Paoli E, et al.** 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & Development* **25**, 2540–2553.


**Zhang K, Gan SS.** 2012. An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **158**, 961–969.

**Zheng Y, Wang Y, Wu J, Ding B, Fei Z.** 2015. A dynamic evolutionary and functional landscape of plant phased small interfering RNAs. *BMC Biology* **13**, 32.

**Zhu H, Xia R, Zhao B, An YQ, Dardick CD, Callahan AM, Liu Z.** 2012. Unique expression, processing regulation, and regulatory network of peach (*Prunus persica*) miRNAs. *BMC Plant Biology* **12**, 149.

SHORT COMMUNICATION

## Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes

Guadalupe Sosa-Valencia, Paulette S. Romero-Pérez, V. Miguel Palomar, Alejandra A. Covarrubias, and José L. Reyes 

Departamento de Biología Molecular De Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Col. Chamilpa, Cuernavaca, México

### ABSTRACT

We recently described the activity of miR1514a in response to water deficit in *Phaseolus vulgaris*. Pv-miR1514a targets a NAC transcription factor mRNA for cleavage and subsequently triggers NAC-derived phasiRNA formation. Here we show that accumulation and activity of miR1514a are also conserved in the model legume *Medicago truncatula*. Consistently, we identified Mtr-miR1514a and detected its increased accumulation in response to stress conditions, targeting a NAC TF mRNA for cleavage and triggering phasiRNA production. In *P. vulgaris*, miR1514a inhibition in transgenic hairy roots was reported to increase NAC 700 mRNA levels and to affect expression patterns of several genes, including that of a Sec 14 homolog. We report here that in adult plant roots exposed to dehydration conditions, where miR1514a levels increased and NAC 700 mRNA decreased, there was a reduction of Sec 14 homolog mRNA levels, suggesting a direct transcriptional effect. The functions of miR1514a, NAC 700 and derived phasiRNAs have just begun to be elucidated in common bean; future understanding of their activities in this and other legumes species will advance our knowledge of microRNA functions in plants.

### ARTICLE HISTORY

Received 15 December 2016  
Revised 12 January 2017  
Accepted 13 January 2017

### KEYWORDS

Dehydration; *Glycine max*; *Medicago truncatula*; microRNAs; phased siRNAs; *Phaseolus vulgaris*; Sec 14-like

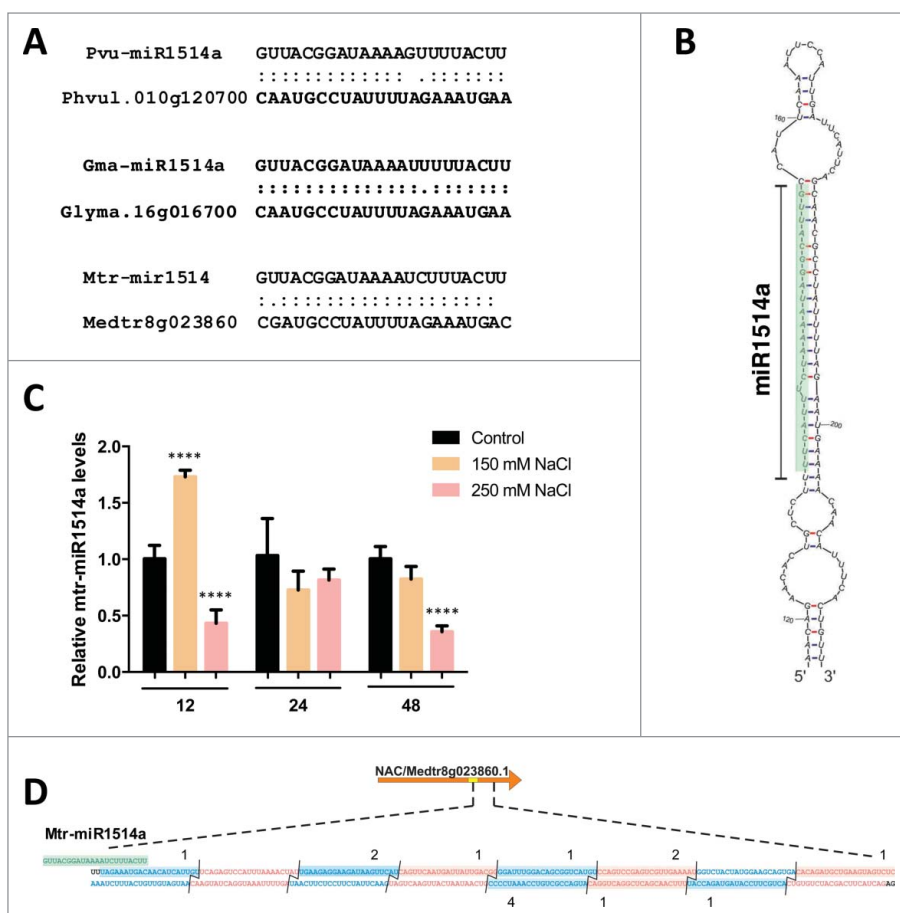
MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules of 21–22 nts in length that are known to regulate the expression of target mRNAs by complementary base-pairing, causing transcript degradation or inhibition of translation.<sup>1</sup> In plants miRNAs participate in several cellular processes, including development, hormone signaling and stress responses.<sup>2,3</sup>

Recently, we described the response of miR1514a when *Phaseolus vulgaris* (common bean) seedling or adult plant roots were exposed to water limiting conditions.<sup>4</sup> We further showed that this microRNA causes recognition and cleavage of an mRNA (Phvul.010 g120700, hereafter named NAC 700 mRNA) encoding for a member of the NAM-ATAF1,2-CUC2 family of transcription factors. Interestingly, upon cleavage the resulting 3'-end fragment is recruited for subsequent production of phased siRNAs or phasiRNAs.<sup>5</sup> Furthermore, our work suggested that the resulting small RNAs could have a functional role and we proposed that at least one phasiRNA modulates the abundance of its transcript of origin, NAC 700 mRNA, or other related transcripts with sequence homology in *P. vulgaris*. Potentially, this mechanism could be preserved in other legumes as well (see our working model further ahead).

As of now, the expression of miR1514a has been reported in common bean and in *Glycine max*.<sup>6,7</sup> However, previous studies have not identified a homolog of miR1514a in other legumes, such as *Medicago truncatula*. Our own initial screening using northern blot analyses did not reveal miR1514a expression in *M. truncatula*.<sup>7</sup> Nevertheless, a closer inspection of the *M. truncatula* genome revealed a transcribed region in

chromosome 4 containing a sequence with similarity to soybean and common bean miR1514a (Chr. 4, pos. 48984796–48985620, <http://medicago.jcvi.org> and Fig. 1A). The secondary structure prediction for this sequence showed a hairpin structure, consistent with its identity as a miRNA precursor transcript (Fig. 1B), and available sRNA-seq data revealed the presence of the mature small RNA corresponding to miR1514a in different *M. truncatula* tissues.<sup>8</sup> Furthermore, when 1-day-old *M. truncatula* seedlings were exposed to 150 mM NaCl, accumulation of Mtr-miR1514a increased after 12 h of treatment, and at later time points its accumulation returned to initial levels, as determined by RT-qPCR of the mature miRNA (Fig. 1C). This result indicates that, similar to what is observed in common bean, miR1514a responds to water deficit conditions in *M. truncatula*. The response observed in the early time points explored in both plant models could indicate that miR1514a activity is necessary early in the water deficit response process to be later replaced by other mechanisms.

Prediction of Mtr-miR1514a targets using the psRNA-Target server and the *M. truncatula* whole genome revealed as best target candidate the gene Medtr8g023860 (51.6% similarity with *P. vulgaris* NAC 700 protein), encoding a NAC transcription factor (base-pairing to miR1514a is shown in Fig. 1A). Previous analyses performed to identify microRNA targets in *M. truncatula* did not address those for miR1514a, as it has not been annotated in *M. truncatula*. However, we determined that Medtr8g023860 transcript is targeted for cleavage and has a significant score to

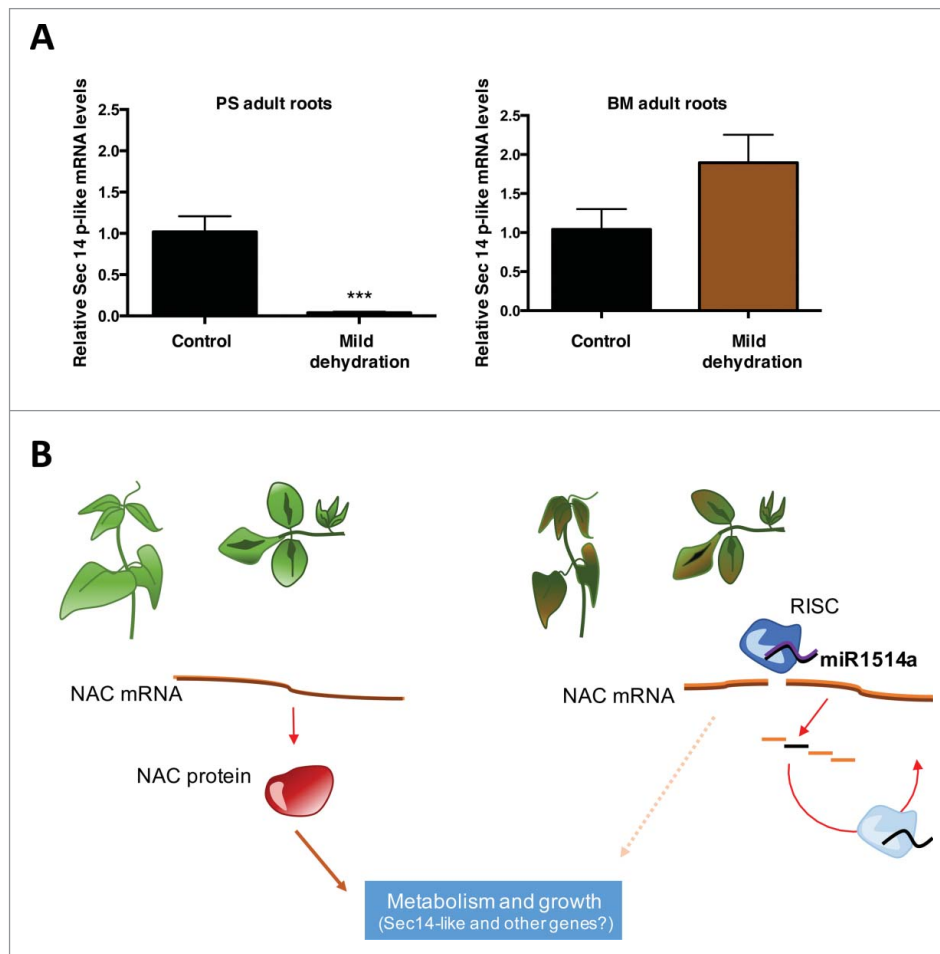


**Figure 1.** *Medicago truncatula* miR1514a targets a NAC TF mRNA and triggers phasiRNA formation (A) Sequence comparison between Pvu-miR1514a, Gma-miR1514a and Mtr-miR1514a, including base-pairing to target region in corresponding target mRNAs. (B) The secondary structure of Mtr-pre-miR1514a was predicted with mFold,<sup>13</sup> the position of the mature miRNA is shown in green and indicated with a bracket. (C) One-day old *M. truncatula* seedlings were subjected to two NaCl concentrations (150 or 250 mM) for the indicated times, and the relative accumulation for the mature Mtr-miR1514a in total RNA samples was determined by stem-loop RT-qPCR,<sup>14</sup> using U6 snRNA as reference gene. Three biological replicates were analyzed with 3 technical replicates for each sample. Asterisks indicate a significant difference when compared with control conditions, as determined by Two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test (\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ). (D) Base-pairing between Mtr-miR1514a (green) and its target Medtr.8 g023860 at the site of cleavage as defined by PARE analysis (vertical arrow<sup>8</sup>). PhasiRNAs with evidence of expression are indicated by red and blue highlighted boxes at the relevant sequence in Medtr.8 g023860 downstream of the miRNA cleavage site.<sup>8</sup> Numbers above the highlighted sequences indicate average reads per million considering different sRNA-seq data sets where reads were present.

produce phasiRNAs upon miR1514a processing (Fig. 1D), based on available sRNA-seq and PARE-analysis data sets.<sup>8</sup> Together, these results indicate that miR1514a is also expressed in *M. truncatula*, and moreover it is induced by stress in seedlings, targeting a NAC TF mRNA homologous to those present in soybean and common bean, to subsequently produce phasiRNAs.<sup>9</sup>

To explore a possible contribution of the miR1514a:NAC mRNA regulatory module to the tolerance to water deficit in legumes, we compared the accumulation levels of the microRNA, the NAC 700 transcript and one particular phasiRNA in two common bean cultivars with well-characterized contrasting terminal drought resistance. The drought-resistant Pinto Saltillo adult roots (PS) but not Mayo Madero (BM, drought sensitive) showed increased accumulation of miR1514a, and corresponding changes in NAC 700 mRNA and phasiRNAs,<sup>4</sup> suggesting that miR1514a and NAC 700 activities are related to the different drought resistance phenotypes analyzed. Still, further understanding about their individual contributions is needed to show a cause-effect relationship.

Interested in the role of miR1514a as a regulator of gene expression, we used the *P. vulgaris* transgenic *hairy roots* system generated by *Agrobacterium rhizogenes*. We first inhibited the miR1514a activity in transgenic *hairy roots* and explored the effects on gene expression at the transcriptome level.<sup>4</sup> Among the transcripts that showed differential accumulation, we identified a Sec 14p-like homolog (Phvul.006G137200). This mRNA increased when miR1514a activity was inhibited using a short tandem target mimicry strategy with a consequent NAC 700 mRNA increase (see Fig. 8 in ref. 4). Interestingly, accumulation of the Sec 14p-like homolog was also reduced upon dehydration treatment in PS roots (Fig. 2A), when miR1514a accumulation increased and NAC 700 mRNA was reduced (previously shown in Fig. 1C and Fig. 3A in ref. 4). This accumulation pattern contrasted with that found in the drought-sensitive BM cultivar, where the accumulation of Sec 14p-like mRNA in adult roots did not change in response to dehydration (Fig. 2A). Sec 14 proteins were initially identified as part of the machinery necessary for vesicle trafficking in budding yeast,<sup>10, 11</sup> and a soybean Sec 14 homolog is phosphorylated



**Figure 2.** Model for miR1514a functions in legumes. (A) Sec 14p-like (Phvul.006G137200) mRNA levels are reduced in PS but not in BM adult plant roots upon water deficit. Adult plants (29 d) were subjected to normal watering or mild dehydration (irrigation to 1/2 field capacity for 13 d<sup>15</sup>). Expression of Sec 14p-like mRNA was normalized to the levels of the reference Skp16 mRNA.<sup>16</sup> Asterisks indicate a significant difference compared with control conditions, as determined by multiple paired Student's t test (\*\*\*)  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ . (B) Under normal growth conditions, NAC 700 TF regulates processes related to normal growth and metabolism, perhaps including a Sec 14-like homolog. In response to stress conditions, miR1514a down-regulates a NAC TF and triggers phasiRNA formation in legumes.

in response to hyperosmotic stress.<sup>12</sup> It remains to be determined if expression of other genes responding to changes in NAC 700 mRNA accumulation in transgenic *hairy roots* also respond in plants subjected to water deficit. Nonetheless, this finding suggests that it is possible to uncover gene expression changes related to altered miR1514a regulation that are also reflected across cultivars with known water deficit responsiveness. However, to directly address whether the responsiveness of miR1514a to water deficit can be directly related to drought sensitivity in different *P. vulgaris* cultivars it would be necessary to determine its expression levels in a much larger set of common bean genotypes with known drought tolerance.

This work complements our recent findings demonstrating that miR1514a triggers phasiRNA formation contributing in this way to the modulation of *P. vulgaris* water deficit response. The role of miR1514a through regulation of NAC 700 TF mRNA may include downstream genes, such as a Sec 14-like protein, which might be also involved in responses to water deficit in common bean cultivars with different degrees of drought resistance and in a wider number of legume

species. The functions of miR1514a and NAC mRNA-derived phasiRNAs in legumes have only begun to be elucidated (Fig. 2B). Their characterization will broaden our understanding of their activities in plants and furthermore, suggests that individual factors could be used to define molecular markers valuable for selecting stress-resistant varieties of common bean and possibly other legumes as well.

### Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Acknowledgments

Guadalupe Sosa-Valencia and Miguel Palomar are doctoral students from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received a fellowship from CONACyT. Paulette S. Romero-Pérez is a doctoral student from the Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México and receives a fellowship from CONACyT. We are grateful to RM Solórzano for technical support received during this work.

## Funding

Research in our group is partially supported by grants from DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN-205015) and CONACYT (151571) to JLR.

## ORCID

José L. Reyes  <http://orcid.org/0000-0001-5129-9741>

## References

- Borges F, Martienssen RA. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16:727-41; PMID:26530390; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4085>
- Rogers K, Chen X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell* 2013; 25:2383-99; PMID:23881412; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Shriram V, Kumar V, Devarumath RM, Khare TS, Wani SH. MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Front Plant Sci* 2016; 7:817; PMID:27379117; <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00817>
- Sosa-Valencia G, Palomar M, Covarrubias AA, Reyes JL. The Legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *J Exp Botany* 2016; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erw380>.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 2013; 25:2400-15; PMID:23881411; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.114652>
- Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, Barbazuk WB, Zhu JK, Yu O. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* 2008; 9:160; PMID:18402695; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-160>
- Arenas-Huertero C, Perez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol* 2009; 70:385-401; PMID:19353277; <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-009-9480-3>
- Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:D731-5; PMID:16381968; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj077>
- Arikiti S, Xia R, Kakrana A, Huang K, Zhai J, Yan Z, Valdés-López O, Prince S, Musket TA, Nguyen HT, et al. An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. *Plant Cell* 2014; 26:4584-601; PMID:25465409; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.131847>
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD, Greene R. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* 1989; 108:1271-81; PMID:2466847; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.108.4.1271>
- Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 1990; 347:561-2; PMID:2215682; <http://dx.doi.org/10.1038/347561a0>
- Monks DE, Aghoram K, Courtney PD, DeWald DB, Dewey RE. Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 2001; 13:1205-19; PMID:11340192; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.13.5.1205>
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3406-15; PMID:12824337; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg595>
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 2007; 3:12; PMID:17931426; <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Rosales MA, Ocampo E, Rodriguez-Valentin R, Olvera-Carrillo Y, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiol Biochem* 2012; 56:24-34; PMID:22579941; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.04.007>
- Borges A, Tsai SM, Caldas DG. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep* 2012; 31:827-38; PMID:22193338; <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-011-1204-x>





OPEN

SUBJECT AREAS:

DROUGHT

STOMATA

LIGHT RESPONSES

INFRARED SPECTROSCOPY

Received  
24 September 2013

Accepted  
24 September 2013

Published  
9 October 2013

Correspondence and  
requests for materials  
should be addressed to  
E.C.-C. (enrique@cio.  
mx)

# Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored *in-vivo* using terahertz time-domain spectroscopy

E. Castro-Camus<sup>1</sup>, M. Palomar<sup>2</sup> & A. A. Covarrubias<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Optica A.C., Loma del Bosque 115, Lomas del Campestre, Leon, Guanajuato 37150, Mexico, <sup>2</sup>Depto. Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos, Mexico 62250.

The declining water availability for agriculture is becoming problematic for many countries. Therefore the study of plants under water restriction is acquiring extraordinary importance. Botanists currently follow the dehydration of plants comparing the fresh and dry weight of excised organs, or measuring their osmotic or water potentials; these are destructive methods inappropriate for *in-vivo* determination of plants' hydration dynamics. Water is opaque in the terahertz band, while dehydrated biological tissues are partially transparent. We used terahertz spectroscopy to study the water dynamics of *Arabidopsis thaliana* by comparing the dehydration kinetics of leaves from plants under well-irrigated and water deficit conditions. We also present measurements of the effect of dark-light cycles and abscisic acid on its water dynamics. The measurements we present provide a new perspective on the water dynamics of plants under different external stimuli and confirm that terahertz can be an excellent non-contact probe of *in-vivo* tissue hydration.

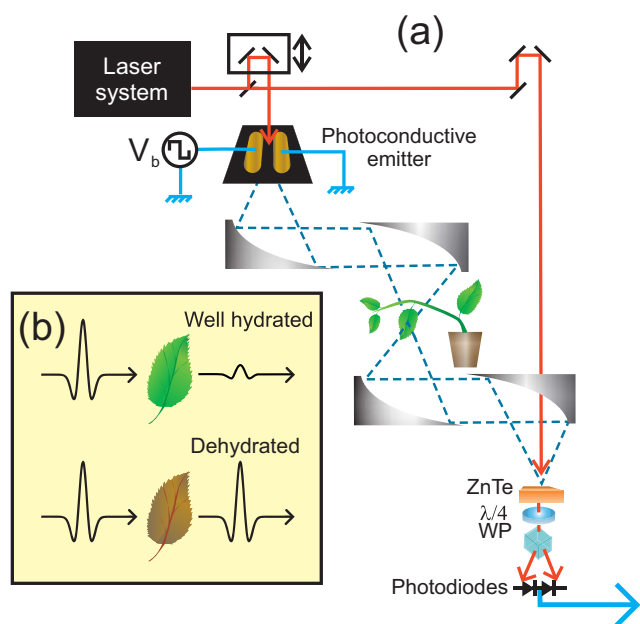
Terahertz time-domain spectroscopy (THz-TDS) is a technique developed over the last 30 years<sup>1,2</sup>. Although expensive, this technology is now commercially available and is starting to find applications within various fields<sup>3,4</sup> including chemistry and biology<sup>5,6</sup>. Most dehydrated biological tissues are transparent (or at least partially transparent) in this spectral region, while water is highly opaque in this band<sup>7</sup>; therefore, terahertz is an excellent non-contact probe of water content in biological tissues as schematically depicted in Fig. 1b<sup>8</sup>. Additionally, time-domain spectroscopy has the advantage of operating in the microwatt power regime with extraordinary signal to noise performance<sup>9</sup>; therefore, the extremely low radiation intensities used to probe the hydration state of leaves are expected to produce negligible heating effects on the tissue under examination. The terahertz spectral band refers to radiation with frequencies between 100 GHz and 3 THz (wavelength between 100  $\mu\text{m}$  and 3 mm). Because of these advantages, in recent years, microwave (i.e. sub-THz)<sup>10</sup> and THz<sup>11,12</sup> radiation has been used as a non-contact probe of water content in plant tissues. In addition, water distribution in plant tissue has been imaged using THz radiation<sup>13,14</sup>.

Although useful and informative, most of the methods commonly used to measure water content in plant tissues, such as water potential or relative water content, imply damage or separation of the organs of interest from the plant. Such procedures do not allow following changes of water content in real-time during short time periods upon particular stimuli.

In this article, we present a series of measurements of the *in-planta* water dynamics of *Arabidopsis thaliana* under various stimuli. In particular we followed the water loss of cauline leaves under water restriction in plants grown in two substrates with different water retention capacity. This was achieved by probing water content with broad band terahertz pulses. Similar measurements were done in plants under optimal irrigation. We conclude that the substrate water retention capacity plays an important role in the water content dynamics of the plant. In addition, we used this technique to detect the water content changes produced by stomatal closing during day/night cycles as well as induced by abscisic acid (ABA) treatments.

## Results

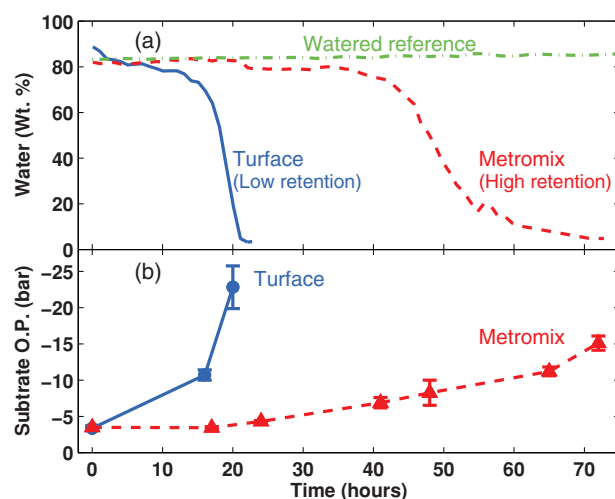
The terahertz transmission experiment is depicted in Fig. 1a. In brief, terahertz radiation is produced, transmitted through the leaf under study and detected after. The degree of attenuation of the radiation in the leaf can be related to the amount of water present in the tissue (Fig. 1b). By using an effective medium theory model<sup>15</sup> it is possible to



**Figure 1** | (a) Schematic representation of the terahertz time-domain spectrometer used to monitor the real-time leaf water content. Ultrashort laser pulses are converted into terahertz pulses using a photoconductive emitter. These pulses are collected from the emitter and refocused onto the leaf under study using off-axis parabolic mirrors. The terahertz radiation transmitted through the leaf is collected and refocused onto the ZnTe detector crystal by two additional parabolic mirrors. (b) Schematic representation of the principle of operation, by which THz measurements are performed for a hydrated and dehydrated leaf. Given that water is highly absorptive in the terahertz band, well-hydrated tissues (top) will attenuate the transmitted THz pulses more than dehydrated tissues.

determine the weight percentage of water in the leaf (ie. what percentage of the total weight of the leaf is actually water), this is denoted as *Wt. %* from now on. Further details concerning the terahertz measurement method and data analysis are presented in the Methods section.

**Detection of changes in leaf water content during water restriction.** After mounting a cauline leaf, as shown in Fig. 1a, the spectrometer was programmed to acquire a terahertz waveform every hour. As shown in Fig. 2a, the water content (weight percentage) from these two recordings indicate a clear difference in the water loss rate over a period of about 70 h, between cauline leaves from plants grown in Turface and those from plants grown in Metromix. As expected, the water loss rate was faster during water deprivation in leaves from plants maintained in a low water retention substrate. In both cases water loss seems to occur in three-phases. A first slow phase lasting 12 h with a water loss rate of  $-1.3\% \text{ h}^{-1}$  for plants grown in Turface, whereas for plants grown in Metromix lasted approximately 40 h with a rate of  $-0.2\% \text{ h}^{-1}$ . Then a second phase showing a faster water loss in both conditions, presenting a water loss rate of  $-14.6\% \text{ h}^{-1}$  for leaves from plants kept in Turface and  $-3.5\% \text{ h}^{-1}$  for those maintained in Metromix. After approximately 9 h for plants in Turface and 15 h for plants in Metromix, leaf water content was reduced to about 4% and further changes were not significant (Fig. 2a). In order to demonstrate the difference of water retention capacity of the two substrates, the osmotic potential of both soil types was measured as function of time after water supply was halted. In Fig. 2b the time dependent osmotic potentials are shown. Turface showed a rapid dehydration consistent with a significant decrease in osmotic potential over the



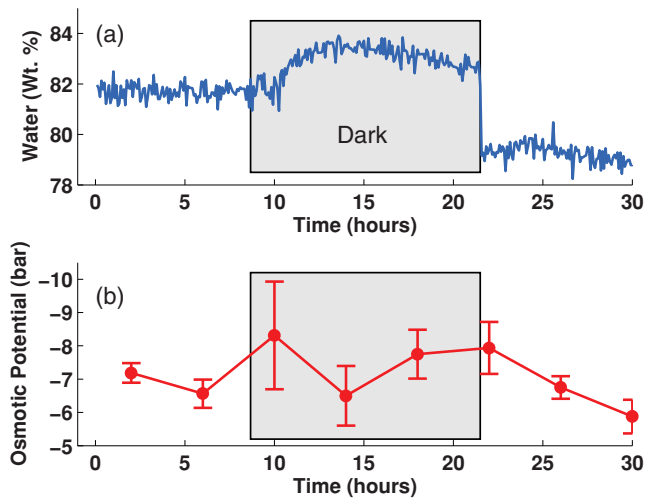
**Figure 2** | (a) Comparison of the water content (water weight percentage) from cauline leaves of Arabidopsis plants grown in two substrates with different water retention capacity: Metromix (higher retention, dashed line) and Turface (lower retention, continuous line). Irrigation was halted at  $t = 0$ . Leaf tissues from plants grown in Turface show faster water loss rate compared to plants grown in Metromix. Plants in Turface showed relatively slow dehydration over the first 8 to 10 h with a sudden rate change after approximately 15 hours of water supply halt, dehydration of the tissue became very rapid and tissues lost most of their water in the following 5 hours. Samples from Metromix showed a relatively steady tissue water content over the first 30 h and slower dehydration through the following 25 h, culminating with almost total water loss around 70 h after halting water supply. A continuously watered plant grown on Metromix substrate was also monitored as reference (dash-dotted line). (b) The osmotic potential of both substrates was also determined. This shows the difference in water retention capacity of these substrates.

first 20 hours. In comparison, Metromix showed a slower dehydration, in agreement with the observed reduction in its osmotic potential.

**Detection of changes in leaf water content during dark-light periods and ABA treatment.** We also detected a significant change in leaf water content between light and dark periods when following the dehydration process. The spectrometer was setup to acquire a terahertz waveform every 5 minutes in order to analyze this phenomenon in more detail. As shown in Fig. 3a, the water content increased over the first 3 h of darkness, and it stayed steady until a light period started again. These real-time measurements of leaf water content correlate very well with stomatal conductance measurements reported for light and dark periods<sup>16</sup>. We also performed a series of measurements of osmotic potential of cauline leaves from plants subjected to identical growth and treatment conditions (Fig. 3b), which show rather large uncertainties but correlate also consistently with the terahertz measurement. This indicates that changes in the average absorption coefficient reflect variations in the leaf tissue water content caused by the closing and opening of the stomata induced by dark and light periods, respectively as reported in Ref. 17.

In order to verify the ability of this THz method to detect water content differences caused by stomatal aperture/closure, the effect of ABA treatment was tested. The THz spectrometer was programmed to acquire a terahertz waveform every 2 minutes to detect variations in the water content due to stomata closure induced by the ABA treatment. Figure 4a shows that a transitory small but detectable increase in water content occurred just after the leaf was sprayed with ABA solution (at  $t = 0$ ). The increase of water content,

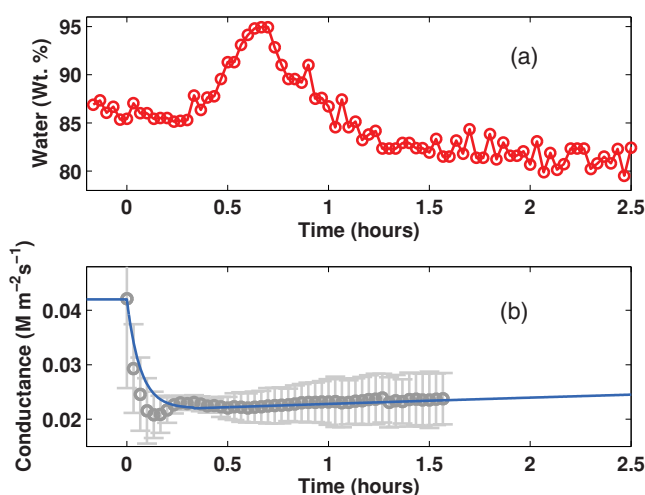




**Figure 3** | Changes in water content and osmotic potential in leaf tissues of Arabidopsis plants grown in Metromix during water loss, comparing day and night periods (a) Real-time water weight fraction recorded at 5 min intervals during the indicated time. (b) Osmotic potential of Arabidopsis leaves, values determined from a parallel experiment as the one described in (a). (Bars indicate standard error).

attributed to the stomatal closure induced by ABA is consistent with the light/dark observation. In addition the water conductance of Arabidopsis leaves was measured as function of time after application of ABA solution. The evolution of the stomatal conductance is presented in Fig. 4b, which shows a sudden drop, caused by the stomatal closure in the following minutes, and a slow recovery over the following hours. These data can be fitted by two exponentials with time constants 4 min and 969 min as depicted in the figure by a continuous line.

As can be appreciated in Fig. 4, THz measurements can detect a significant increase in leaf water content upon ABA treatment, followed by a rapid decrease. Simultaneously, the stomatal conductance reflects the effect of the ABA treatment, by a rapid drop and a



**Figure 4** | (a) Effect of ABA application on the water content of Arabidopsis cauline leaves. Water weight percentage determined at 2 min intervals reveals transitory leaf water content changes upon the stomatal closing induced by the ABA treatment (at  $t = 0$ ). (b) Stomatal conductance of Arabidopsis leaves after application of ABA. The gray dots are measured values with their respective uncertainties (Bars indicate standard error), the continuous curve is an approximation of conductance time dependence by a double exponential.

subsequent slow increase in stomatal conductance, these two observations although consistent in trend show different timescales. These results are consistent with the fact that the THz radiation is sensitive to water content variations in the leaf that are not only caused by the stomatal closing induced by ABA but also those changes resulting from the stomatal aperture adjustment and from the leaf's intake (or loss) of water by other mechanisms such as the dehydration of the substrate as shown in the first experiment presented in this article, therefore it is not expected that the timescales of both measurements should be identical.

## Discussion

The strong attenuation of terahertz radiation by water makes radiation in this spectral band a highly sensitive non-contact probe of hydration in plants as well as other materials<sup>18</sup>. In addition, a good number of dielectric materials, such as dehydrated biological tissue, are mostly transparent in this spectral region allowing us to determine the water content of leaves from their THz transmission. This technique offers significant advantages when compared to the traditional methods, such as pressure chambers or psychrometry, used in plant science to estimate water content in plant tissues. Unlike such procedures, THz spectroscopy is non-destructive, does not require contact with the sample, and allows continuous monitoring of leaf water content that could be affected by *in vivo* water uptake or water loss processes, therefore giving unprecedented capability to follow the plant water dynamics.

In this work, we tested the suitability of this technology to measure the changes of water content of leaves from Arabidopsis plants under optimal and suboptimal watering conditions, in two different substrates. The application of this technique to the analysis of the water content dynamics in cauline Arabidopsis leaves when plants are subjected to low water availability allowed us to follow the real-time water loss kinetics. The continuous registration of the data allowed distinguishing three stages or phases with different water loss rates during water restriction on both substrates, showing that even during the same treatment plants are facing periods with considerably different stress intensity which could lead to a different set of plant responses. The possibility to perform this kind of measurements allows a much more detailed monitoring of the water content in tissues, leading to a better interpretation of physiological, cellular or molecular data from particular experiments. In addition, we showed that this technique is sensitive enough to detect the changes in leaf tissue water content produced by the closing and opening of stomata induced by dark/light periods or by ABA treatment. The comparison between the leaf water content obtained by osmotic potential measurements and that obtained by the uninterrupted recording of THz transmission showed that this last procedure allowed a more sensitive and precise determination of the changes in water content during this process.

Currently THz-TDS is still a relatively expensive technology, as of the time of this publication TDS system list prices start on the order of one hundred thousand US dollars, and therefore the access to this kind of equipment is still limited. Yet the recent and rapid development of THz systems for industrial and research purposes opens real possibilities of this costs to drop significantly in the coming years which will at its time allow their implementation in plant biology laboratories<sup>19,20</sup>. In addition to dynamics, the development of a method that allows imaging water content in leaves and other tissues has been demonstrated<sup>21,22</sup>. The measurements presented here provide a new perspective on the water dynamics of Arabidopsis, in particular, and of plants in general. It is expected that the terahertz technique will provide unprecedented insights in the water dynamics of plants in the future. The development of compact, mobile and more cost effective experimental setups will enable them to be used in the search for selection markers in crop drought improvement programs.

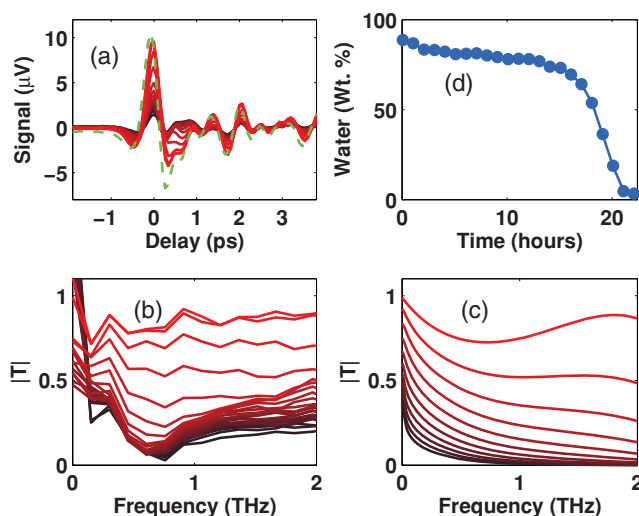


## Methods

**Sample preparation.** Wild type *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta ecotype) (At) were grown on Petri dishes with solid MS 1X pH 5.7 (4.3 g/L Murashige and Skoog salts, 1% sucrose, 0.5 g/L MES, 0.8% agar) in a growth chamber at a controlled temperature of 21°C, 16/8 hrs light/dark photoperiod, under 80–100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\sim 18 \text{ W m}^{-2}$ ) of light intensity and a relative humidity of 60–70% for two weeks. Seedlings were transplanted to pots (76.2 mm  $\times$  73.0 mm  $\times$  54.0 mm) containing substrates of Metro-Mix 200 or Turface MVP (Hummert International Earth City, MO USA), the latter one being the substrate with lower water retention. Plants were grown under the conditions described above and watered with nutritive solution ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  70 mM,  $\text{CuSO}_4$  0.5 mM,  $\text{NaMoO}_4$  2 mM,  $\text{CoCl}_2$  0.01 mM,  $\text{MnCl}_2$  14 mM,  $\text{ZnSO}_4$  1 mM,  $\text{NaCl}$  10 mM) and sterile water (every other time). When plants reached their reproductive stage (approximately after 4–5 weeks) they were exposed to progressive water loss by interrupting water supply (Time = 0). At this point, a potted plant was transferred to the THz-TDS setup for analysis, where it was maintained over the duration of the experiments at 21.5°C and 20–25% relative humidity, with a 12/12 Hr light/dark photoperiod. Because of their accessibility, terahertz pulses were propagated through *in planta* cauline leaves.

**Determination of osmotic potential.** Osmotic potential of cauline leaves was determined during the water loss treatment described above from plants grown in Turface MVP or Metro-Mix 200 (Hummert International, Earth City, MO USA). One cauline leaf from a treated and one from a well watered plant was collected every 4 hours and immediately frozen in liquid nitrogen and subjected to five cycles of freezing (1 min in  $\text{N}_2$  liquid), thawed (10 min at 25°C) and then centrifuged 20 min at 14000 rpm in an Eppendorf centrifuge. One microliter of the supernatant was collected and diluted in 9  $\mu\text{l}$  of sterile water. The osmolality of the sample was determined in a Vapor Pressure Osmometer (Wescor VAPRO Model 5600, Wescor, Inc., Logan UT USA) following the instructions of the manufacturer. The values obtained in mmol/Kg were converted to bars considering 1 Osm/Kg =  $-25 \text{ bar}^{23}$ .

**Determination of stomatal conductance.** Stomatal conductance was measured with a Li-Cor LI-6400 apparatus following manufacturer's instructions (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). During measurements, plants were maintained under similar environmental conditions as those present during THz evaluations. The cell ( $6 \text{ cm}^2$ ) parameters were as follows: 25°C, 200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and an air flow 300  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Environmental humidity was approximately 45%, slightly higher given the weather conditions at the time of the determinations.



**Figure 5** | (a) THz time-domain data set taken over a 23 h period. Measurements were taken from cauline leaves from *Arabidopsis* plants grown in Turface as described in Material and methods. Water supply was halted at time zero and THz pulses were recorded every hour. Each red line represents a measurement from each hour. The transmitted THz pulse measured at  $t = 0$  (darker red) is small and increase in amplitude upon plant dehydration as time passes (brighter red). The dashed (green) line corresponds to the reference pulse measured in the absence of sample. (b) Calculated transmission as function of frequency determined from the reference pulse and the pulses measured each hour (each line) showing that transmittance was low at early times (dark red lines), and increased over time (bright red lines). (c) Theoretical transmission calculated by effective medium theory for water weight fractions from 0% (dark red lines) to 100% (bright red lines). (d) The water weight fraction present in the leaf as a function of time after restriction of water supply.

**ABA treatment.** Abscisic acid (ABA) solution (100  $\mu\text{M}$ , prepared in ethanol) was sprayed on both sides of cauline leaves from *Arabidopsis* plants grown in Metro-Mix 200 under optimal conditions. This treatment was applied 15 min after the start of THz data acquisition.

**Terahertz spectroscopy.** A terahertz time-domain spectrometer (Fig. 5a) was built based on a Ti:Sapphire oscillator producing pulses of light with a duration of approximately 33 fs at 80 MHz repetition rate, with an average power of 200 mW. About 70% of the laser power was sent to a computer controlled delay line and subsequently used to produce terahertz pulses in a semi-insulating GaAs photoconductive emitter biased with a 100 V square wave at 12 KHz across a 400 mm gap. The terahertz radiation was collected by an off-axis parabolic mirror and refocused onto a cauline leaf. The radiation transmitted through the sample was then collected and refocused on a 1 mm thick [110] ZnTe crystal by two additional parabolic mirrors. The remaining 30% of the laser pulse was sent through a separate path to the ZnTe crystal in order to perform electro-optic detection of the terahertz pulse.

**Signal processing.** The hydration monitoring experiment consists in recording a terahertz pulse waveform  $E_f(t)$  in the time domain (Fig. 5a) at regular time intervals. Each of these waveforms represents a “snapshot” of leaf water content at the times recorded. A reference pulse  $E_{ref}(t)$  in the absence of leaf is also recorded (dashed line). A Fast Fourier Transform algorithm was used in order to obtain their amplitude and phase spectra as function of frequency  $f$ . The transmission spectra for each measurement are subsequently calculated as described in Ref. [24]. The amplitude of the transmission coefficient function for each measurement is shown in Fig. 5b. In order to determine the amount of water present in the leaf, effective medium theory can be used to theoretically calculate the transmission for any water fraction present in the tissue<sup>25</sup>, the calculated transmission spectra for water fractions from 0 to 100% (in 10% steps) are presented in Fig. 5c. A computer program was used to adjust the water fraction in the theoretical model to find the best fit between the theoretical and each experimental (in Fig. 5b) transmission spectra in order to determine the water content at each time. The resulting water fractions are shown in Fig. 5d.

- Jepsen, P. U., Cooke, D. G. & Koch, M. Terahertz spectroscopy and imaging—Modern techniques and applications. *Laser Photonics Rev.* 5, 124–166 (2011).
- Tonouchi, M. Cutting-edge terahertz technology. *Nat Photon* 1, 97–105 (2007).
- Lloyd-Hughes, J. & Jeon, T.-I. A review of the terahertz conductivity of bulk and nano-materials. *J. Infrared Millim. Terahertz Waves* 33, 871–925 (2012).
- Castro-Camus, E. Polarization-resolved terahertz time-domain spectroscopy. *J. Infrared Millim. Terahertz Waves* 33, 418–430 (2012).
- Brucherseifer, M. *et al.* Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing. *Appl. Phys. Lett.* 77, 4049–4051 (2000).
- Castro-Camus, E. & Johnston, M. B. Conformational changes of photoactive yellow protein monitored by terahertz spectroscopy. *Chem Phys Lett* 455, 289–292 (2008).
- Xu, J., Plaxco, K. W. & Allen, S. J. Absorption spectra of liquid water and aqueous buffers between 0.3 and 3.72 thz. *J Chem Phys* 124, 036101 (2006).
- Jördens, C., Scheller, M., Breitenstein, B., Selmar, D. & Koch, M. Evaluation of leaf water status by means of permittivity at terahertz frequencies. *J. Biol. Phys.* 35, 255–264 (2009).
- Davies, A. G., Linfield, E. H. & Johnston, M. B. The development of terahertz sources and their applications. *Phys Med Biol* 47, 3679–3689 (2002).
- Hadjiloucas, S., Karatzas, L. S. & Bowen, J. W. Measurements of leaf water content using terahertz radiation. *Microw. Theory Tech. IEEE Trans.* 47, 142–149 (1999).
- Breitenstein, B. *et al.* Introducing terahertz technology into plant biology: A novel method to monitor changes in leaf water status. *J. Appl. Bot. Food Qual.-Angew. Bot.* 84, 158–161 (2011).
- Hadjiloucas, S., Bowen, J. & Galvão, R. Analysis of spectroscopic measurements of leaf water content at terahertz frequencies using linear transforms. *J. Opt. Soc. Am.* 19, 2495–2509 (2002).
- Mittleman, D. M., Jacobsen, R. H. & Nuss, M. C. T-ray imaging. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2, 679 (1996).
- Hu, B. & Nuss, M. Imaging with terahertz waves. *Opt. Lett.* 20, 1716–1718 (1995).
- Gente, R. *et al.* Determination of leaf water content from terahertz time-domain spectroscopic data. *J. Infrared Millim. Terahertz Waves* 34, 316–323 (2013).
- Lascève, G., Leymarie, J. & Vavasseur, A. Alterations in light-induced stomatal opening in a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Cell Environ.* 20, 350–358 (1997).
- Fan, L.-M., Zhao, Z. & Assmann, S. M. Guard cells: a dynamic signaling model. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 537–546 (2004).
- Banerjee, D., Von Spiegel, W., Thomson, M., Schabel, S. & Roskos, H. Diagnosing water content in paper by terahertz radiation. *Opt Express* 16, 9060–9066 (2008).
- Scheller, M., Dürschmidt, S. F., Stecher, M. & Koch, M. Terahertz quasi-time-domain spectroscopy imaging. *Appl. Opt.* 50, 1884–1888 (2011).
- Scheller, M. & Koch, M. Terahertz quasi time domain spectroscopy. *Opt Express* 17, 17723–17733 (2009).
- Chan, W. L., Deibel, J. & Mittleman, D. M. Imaging with terahertz radiation. *Rep Prog Phys* 70, 1325–1379 (2007).
- Jansen, C. *et al.* Terahertz imaging: applications and perspectives. *Appl Opt.* 49, E48–E57 (2010).



23. Money, N. P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* **91**, 766–769 (1989).
24. Castro-Camus, E. & Johnston, M. B. Extraction of the anisotropic dielectric properties of materials from polarization-resolved terahertz time-domain spectra. *J Opt -Pure Appl Opt* **11**, 105206 (2009).

## Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support of CONACyT (Grants No. 131931 to E.C.-C. and 132258 to A.A.C.) as well as NANOFOT and Laboratorio de Óptica Ultrarrápida CIO. M.P. is supported by a CONACyT PhD fellowship.

## Author contributions

E.C.-C. conceived the study supported by A.A.C., M.P. grew the *Arabidopsis* samples and performed the osmotic potential and stomatal conductance experiments. E.C.-C. performed the spectroscopy experiments. E.C.-C. and A.A.C. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

## Additional information

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission information** is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

**How to cite this article:** Castro-Camus, E., Palomar, M. & Covarrubias, A.A. Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored *in-vivo* using terahertz time-domain spectroscopy. *Sci. Rep.* **3**, 2910; DOI:10.1038/srep02910 (2013).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>

# Hydration dynamics of *Arabidopsis thaliana* under water deficit conditions monitored *in-vivo* by THz spectroscopy.

Enrique Castro-Camus<sup>1</sup>, Miguel Palomar<sup>2</sup> and Alejandra A. Covarrubias<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones en Óptica A.C., Loma del Bosque 115, Lomas del Campestre, León, Guanajuato 37150, México

<sup>2</sup> Depto. Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología,

Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Author e-mail address: enrique@cio.mx

**Abstract:** Terahertz time-domain spectroscopy was used to monitor the tissue hydration dynamics of *Arabidopsis thaliana* under water deficit conditions. Terahertz spectroscopy is found to be an excellent non-destructive *in-vivo* probe of hydration. The plant leaves showed very slow dehydration over the first 16 to 18 hours while a very rapid loss of moisture was seen over the following 3 hours, this transient behavior might be caused by a defensive mechanism of the organism that activates when the soil moisture decreases below certain threshold.

**OCIS codes:** (300.0300) Spectroscopy; (300.6495) Spectroscopy, terahertz

Water stress in plants represents an area of research that has attracted enormous attention recently [1] given the need of crops that can grow in areas where water supply is limited and capable of resisting drought periods. At present, a number of physiologic, metabolic and molecular responses have been described in various plant species when they are subjected to water deficit conditions [2]. *Arabidopsis thaliana* is a small flowering plant with a relatively short life cycle and small genome, which is considered a model system in plant biology, where many different processes have been characterized, including the plant response to environmental stress. [3] These studies and those carried out in other plant species have led to establish that the plant response to water limitation is a complex process that involves many changes at different functional levels and that depends on many different factors [4]. A better understanding of this complex response needs of more detailed analyses combining the application of different techniques, which could allow an integration of the molecular and physiological plant reactions to water deficit.

So far most of the studies requiring monitoring moisture dynamics in plant tissues have used destructive methods to quantify the amount of water present in them. In this work we present terahertz time-domain spectroscopy (THz-TDS) for dynamic *in-vivo* determination of hydration dynamics in vegetative tissue which is a non-contact and non-destructive technique.

Wild type *Arabidopsis thaliana* (*Lansberg erecta* ecotype) (AT) were grown in Petri dishes with MS 1X pH 5.7 (4.3 g/L Murashige and Skoog salts, 1% sucrose, 0.5g/L MES, 0.8% agar) in a chamber at controlled temperature of 21°C, 16/8 hrs light/dark photoperiod, 80  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light intensity and a relative humidity of 60-80% for 2 weeks. Seedlings were transplanted to a low water retention substrate (Turface) and incubated for three weeks under the conditions described before and watered with nutritive solution. When plants reached reproductive stage (approximately five-weeks), plants were exposed to progressive water lose and cauline leaves were used for analyses because their location in the stem was optimal for the study.

A standard THz-TDS system was used for this study based on a Ti:Sapphire laser oscillator (33fs, 3.0nJ/pulse, 80MHz repetition rate). Terahertz transients were generated by photo-exciting a 400  $\mu\text{m}$  gap semi-insulating-GaAs photo-conductive emitter biased with a square wave (120V amplitude at 12kHz). Detection was performed using a 1mm thick [110] ZnTe electro-optic crystal.

A reference terahertz waveform  $E_{\text{ref}}$  was recorded as function of the pulse delay  $\delta$  before the sample was placed in the THz path. A live specimen of AT was placed next to the THz-TDS system. The stem was carefully bent and one of the cauline leaves (coming off the main stem) was fixed at the sample position using a semi-rigid card-board holder, softly pressing it to avoid any damage to plant tissues. At this moment, water supply to the plant was interrupted and a time-domain waveform  $E_i$  was recorded every 5 minutes for 24 hours. All measurements were done in normal atmospheric air in order to avoid any additional stress on the plant by  $\text{CO}_2$  deficit.

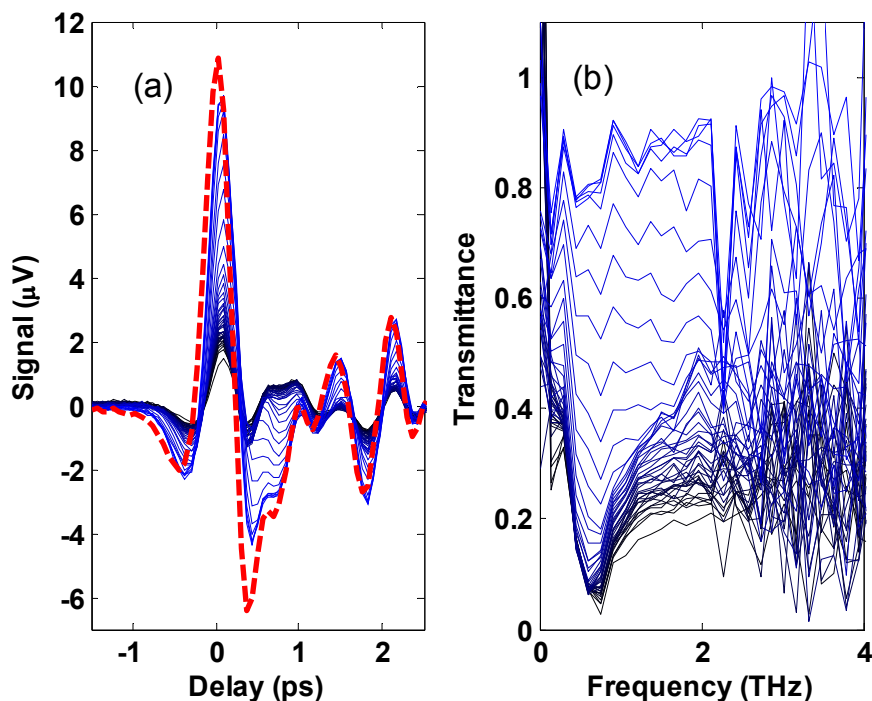


Fig. 1. (a) Continuous curves are terahertz waveforms of pulses transmitted through a AT leaf. (each curve represents 30 minute interval starting at time=0 (in darker color) and finishing at time=24 hours (in lighter color) . The dashed thick curve is the reference in absence of sample. (b) Transmittance calculated from the spectra of measurements shown in (a).

Waveforms acquired at half hour interval are shown in Fig. 1a. It is clear from the plot that the amplitude of the transmitted pulse changed significantly across the 24 hour period. Given that water presents strong absorption (causing low transmittance) these curves represent an indirect measure of the amount of water in the plant tissue at different times.

The transmittance of the leave as function of time at 0.9 THz is shown in Fig. 2. The plot presents a very slow riser in transmission over the first 16 to 18 hours. During the following 3 to 4 hours there is a very fast transmission increase from  $\sim 0.2$  to  $\sim 0.85$  related to a very fast moisture loss. This sudden change of the water content in the tissue might be associated to the activation of a defensive mechanism of the plant that resulted in a restriction of the water supply to the leaves in order to minimize the loss of moisture. This transient behavior could be a reaction not only to the water deficit experienced by the plant but also to the rate of change of water available, which is relatively fast in the case of the substrate used in these samples. By weighing another sample, we determined that the initial humidity in the substrate was of 0.28 ml/g (milliliters of water per gram of dry substrate) and that the loss of humidity was exponential with a time constant of  $0.05 \text{ h}^{-1}$ .

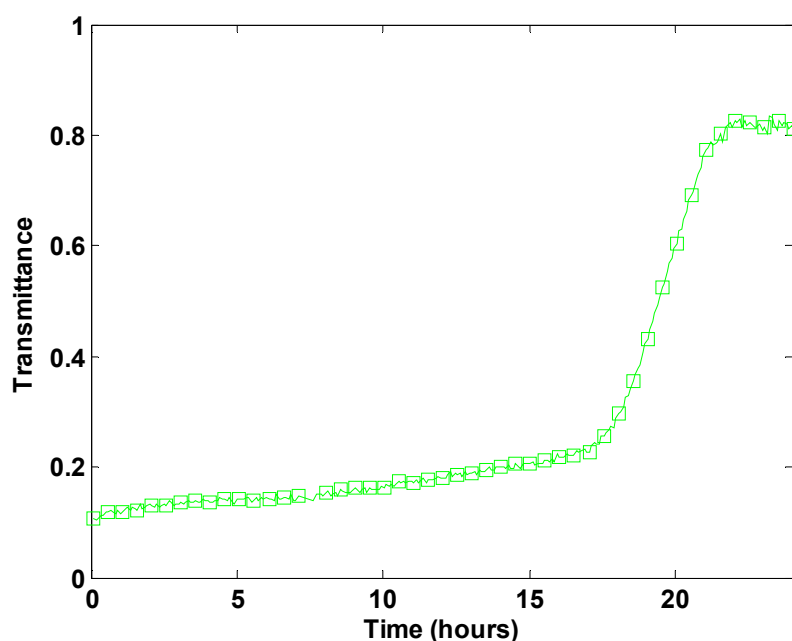


Fig. 2. Terahertz transmission as function of time at 0.9 THz from Arabidopsis leaves. There is a relatively slow change in transmission over the first ~17 hours, then a sudden change is observed and transmittance abruptly changes across the following 3 hours.

Terahertz time-domain spectroscopy was used to successfully monitor the *in-vivo* hydration dynamics in leaves of *A. thaliana* under water stress. It was observed that the leaves moisture shows very little susceptibility to the soil water contents unless the soil hydration goes below certain threshold, if this happens the moisture of the leaves rapidly decreases. This could be attributed to the reach of a threshold in which the ‘defensive’ responses in this leaf were lost or drastically reduced given the fast decrease in water availability in this organ during this experiment.

This technique is, to our knowledge, the first non-contact and non-destructive method to monitor *in-vivo* hydration dynamically in plant tissues. We believe it will be very useful in the future to understand the effects of water deficit on vegetable tissues. This at its time is of enormous importance to improve drought resistant crops.

- [1] Zhu, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53, 247 (2002)
- [2] Ingram, J. and Bartels, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47, 377 (1996)
- [3] Bray, E. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. 2, 48 (1997)
- [4] Koorneef, M. and Meinke, D. The development of Arabidopsis as model plant. *Plant Journal* 61, 909 (2010)

We would like to thank funding from CONACyT (project 131931).



## Non-coding RNAs in the plant response to abiotic stress

Cecilia Contreras-Cubas · Miguel Palomar ·  
Mario Arteaga-Vázquez · José Luis Reyes ·  
Alejandra A. Covarrubias

Received: 3 April 2012 / Accepted: 7 June 2012 / Published online: 4 July 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** As sessile organisms, plants have to cope with the ever-changing environment as well as with numerous forms of stress. To react to these external cues, plants have evolved a suite of response mechanisms operating at many different levels, ranging from physiological to molecular processes that provide the organism with a wide phenotypic plasticity, allowing for fine tuning of the reactions to these adverse circumstances. During the past decade, non-coding RNAs (ncRNAs) have emerged as key regulatory molecules, which contribute to a significant portion of the transcriptome in eukaryotes and are involved in the control of transcriptional and post-transcriptional gene regulatory pathways. Although accumulated evidence supports an important role for ncRNAs in plant response and adaptation to abiotic stress, their mechanism(s) of action still remains obscure and a functional characterization of the ncRNA repertoire in plants is still needed. Moreover, common features in the biogenesis of different small ncRNAs, and in some cases, cross talk between different gene regulatory pathways may add to the complexity of these pathways and could play important roles in modulating stress responses. Here we review the various ncRNAs that have been reported to participate in the response to abiotic stress in plants, focusing on their importance in plant adaptation and evolution. Understanding how

ncRNAs work may reveal novel mechanisms involved in the plant responses to the environment.

**Keywords** Abiotic stress · Argonaute proteins (AGO) · Dicer-like proteins · Small non-coding RNAs (sncRNAs) · Water deficit

### Abbreviations

AGO	Argonaute protein
DCL	Dicer-like protein
dsRNA	Double-stranded RNA
dsRBD	dsRNA-binding domain
ncRNA	Non-coding RNA
hcsiRNA	Heterochromatic siRNAs
miRNA	MicroRNA
lncRNA	Long non-coding RNA
sncRNA	Small non-coding RNA
siRNA	Small interfering RNA
tasiRNAs	Trans-acting RNA
TGS	Transcriptional gene silencing
PTGS	Post-transcriptional gene silencing

### Introduction

Plants are exposed to ever-changing environmental conditions including drought, freezing and salinity. All these abiotic stresses cause water deficit, a condition that results in a decreased efficiency of most cellular functions. The survival of plants to these drastic environmental changes depends on the adjustment of many physiological and cellular processes achieved by fine tuning gene expression and protein activities through transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational mechanisms (Ingram and Bartels 1996).

---

C. Contreras-Cubas · M. Palomar · J. L. Reyes ·  
A. A. Covarrubias (✉)  
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de  
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apdo. Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Mor., Mexico  
e-mail: crobles@ibt.unam.mx

M. Arteaga-Vázquez  
Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada,  
Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., Mexico



Modulation of gene expression is a key level of regulation during water deficit, and signal transduction pathways preceding these responses have been described in addition to some of the participating molecules (see below). Hormones that are normally produced in a time- and space-specific manner during plant development and growth also play an important role during periods of stress. For instance, abscisic acid (ABA) is a key hormone that regulates seed dormancy, a particular condition where as much as 90 % of water is lost (Finkelstein et al. 2002). ABA is also involved in the response to those abiotic stresses leading to water limitation (Bray 2002; Umezawa et al. 2010). By triggering stomatal closure and promoting the activation and repression of a battery of genes, among other activities, ABA enables the plant to deal with the loss of water that may otherwise cause severe and irreversible damage (Zhu 2002). Furthermore, ABA modulates stress responses at the post-transcriptional and epigenetic levels (Chinnusamy et al. 2008), indicating it is a key control element of plant protective mechanisms.

Gene regulation by small non-coding RNAs (sncRNAs) is another important mechanism by which plants respond, adjust, survive and ultimately adapt to stressful conditions (Sunkar et al. 2007; Covarrubias and Reyes 2010). sncRNAs are regulatory molecules that are present in plants and animals (Voinnet 2009), capable of sequence-dependent gene silencing at the transcriptional and post-transcriptional level. In eukaryotes, they are mainly comprised of microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs); however, additional types have been described depending on the organisms such as trans-acting siRNAs (tasiRNAs) and repeat-associated siRNAs (rasi-RNAs) in plants, Piwi-interacting RNAs (pi-RNAs) in animal germline, *Tetrahymena thermophile* small-scan RNAs (scnRNAs) involved in histone methylation and DNA elimination, 21U-RNAs in *Caenorhabditis elegans* germline, which are generated by different protein components of the RNA interference (RNAi) machinery and that seem to perform different functions (Chu and Rana 2007; Ghildiyal and Zamore 2009). RNA interference is a process in which double-stranded RNA suppresses the expression of homologous genes, also known as post-transcriptional gene silencing (PTGS). This phenomenon is widely distributed among different species and evolutionarily conserved (Fire et al. 1998; Liu and Paroo 2010). The basic factors of the RNAi machinery have been identified in diverse eukaryotes and ancestral forms are present in prokaryotes, suggesting that this is an ancient mechanism of gene regulation (Makarova et al. 2009; Karginov and Hannon 2010). In plants, the core components of the RNAi machinery and some microRNA families have been detected even in the most ancient land plants (Li et al. 2011).

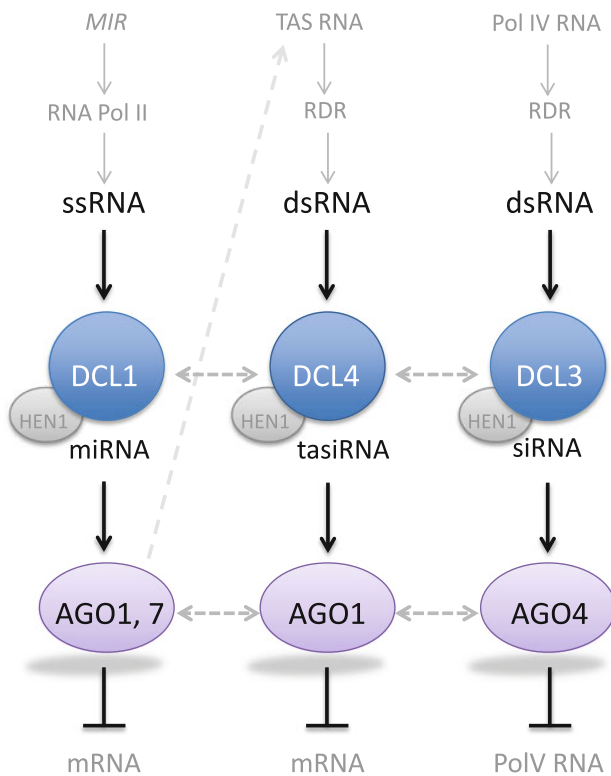
Most of our current knowledge regarding the molecular basis of sncRNA-based silencing phenomena in plants

comes from studies in *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) and thanks to current genome sequencing initiatives, interesting evolutionary insights are emerging rapidly from agriculturally important plant species including maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*) and most recently soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) (International Rice Genome Sequencing 2005; Schnable et al. 2009; Goodstein et al. 2012).

Here we review the different kinds of ncRNAs that participate in water deficit responses, from microRNAs to long non-coding RNAs (lncRNA), and highlight the importance of these molecules in the plant response and adaptation to this adverse environmental condition. We also focus on the importance of particular core proteins, the intercommunication that exists between the ncRNA pathways and how this correlates with the plant response to abiotic stress.

### The non-coding RNA biogenesis pathways

ncRNAs are diverse in both their origin and function. They are involved in transcriptional (TGS) and post-transcriptional gene silencing (PTGS), and participate in a wide range of cellular processes (Chen 2010). Plants have a great diversity of sncRNAs currently including microRNAs, tasiRNAs, heterochromatic siRNAs (hcsiRNAs) and lncRNAs. All sncRNAs have common features in their biogenesis (Fig. 1). MicroRNA genes (*MIR* genes) are transcribed by RNA polymerase II (Pol II), whose transcripts adopt a hairpin structure with a 5' cap and a 3' poly-A tail (Lee et al. 2004; Xie et al. 2005a). The production of secondary siRNAs depends on the activity of an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) to synthesize a double-stranded RNA from the targeted RNA, from which the secondary siRNAs will be generated (Vazquez et al. 2004; Voinnet 2008). In addition, Pol IV (NRPD), a plant-specific RNA polymerase, is also needed to produce most types of siRNAs (Herr et al. 2005; Onodera et al. 2005). Nevertheless, it has also been shown that at intergenic low-copy number loci, Pol II is essential for siRNA-mediated TGS at these or homologous loci. In addition, Pol II also recruits Pol IV to promote hcsiRNA biogenesis, and Pol V to induce TGS at heterochromatic loci (Zheng et al. 2009). The miRNA- or siRNA-producing primary transcript is then cleaved by an RNase type III known as Dicer-like protein (DCL) in a successive manner leading to small RNA duplexes with a 2-nt overhang at the 3'-end (Park et al. 2002; Kurihara and Watanabe 2004). Then, a 2'-*O*-methyl group is added to the ribose of the 3'-end nt of each strand of the final product, which usually is a duplex of 20- to 24-nt RNA (Yu et al. 2005; Yang et al. 2006). This modification is the product of the Hua Enhancer 1 (HEN 1)



**Fig. 1** Common features in plant sncRNA pathways. The microRNA, tasiRNA and hcsiRNA pathways have common features such as the cleavage of the dsRNA or precursor by a DCL protein and the methylation of the dsRNA produced duplex by HEN1. Each pathway specifically feeds into a AGO-containing protein complex where the sncRNA is recruited. The discontinuous lines denote the crosstalk between each pathway. Specific pathway proteins are also indicated

methyl transferase activity that seemed to be plant specific, however, subsequently this activity was also described for the germline Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in *Drosophila melanogaster* (Drosophila) and mice (Kirino and Mourelatos 2007; Saito et al. 2007). In plants, HEN1-directed methylation protects sncRNAs from the addition of one to five uridine residues to the 3'-ends of sncRNAs, a mark for degradation via the exoribonuclease, small RNA degrading nuclease (SDN) (Li et al. 2005; Yu et al. 2005; Ramachandran and Chen 2008).

Depending on the nature of the RNA species, the duplex RNA can stay in the nucleus or can be exported to the cytoplasm via HASTY, the homolog of the human Exportin 5 (Park et al. 2005). The final destination of the sncRNA is its recruitment to an effector protein, a member of the Argonaute (AGO) protein family that assists the sncRNA in its target recognition by base complementarity, and finally TGS or PTGS occurs.

In summary, all sncRNA-based silencing mechanisms share at least four consensus biochemical steps: (1) induction by double-stranded RNA (dsRNA), (2) dsRNA processing into sncRNAs of a particular size, (3)

methylation of the sncRNAs species and (4) incorporation of the sncRNAs to effector complexes containing a member of the AGO family of proteins that associate with a partially or fully complementary target DNA or RNA, in order to induce regulation of gene expression through transcriptional or post-transcriptional mechanisms (Chen et al. 2002; Chapman and Carrington 2007; Chen 2008; Voinnet 2009) (Fig. 1). Some key differences characterize particular silencing pathways such as the sncRNA precursor secondary structure (double-stranded RNA or hairpin structure), sncRNA size (20- to 24-nt in length), cellular localization, and most importantly the DCL protein that processes them, the AGO protein to which they associate, and the accessory interacting proteins that form each of the ribonucleoprotein complexes.

**The key proteins in the sncRNA pathways**

DICER-like proteins

DICER proteins process dsRNAs into 20- to 24-nt sncRNA species. There are four different *DCL* loci in the *Arabidopsis* genome, named after their homology to *Drosophila*'s Dicers (Schauer et al. 2002). *Arabidopsis* DCLs contain the following distinctive domains: an N-terminal DEXH-box RNA-helicase-c motif, a DUF283 (domain of unknown function) domain, a PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domain, two ribonuclease-III motifs and at least one double-stranded-RNA (dsRNA)-binding domain at the C-terminus (Schauer et al. 2002). DCLs are determinant for routing to a particular sncRNA pathway as each DCL protein cleaves the dsRNAs into specific sizes. For instance, DCL1 is involved in the generation of 21- or 22-nt RNA duplexes corresponding to the miRNA and miRNA\* duplex (Park et al. 2002). DCL2 generates 22-nt siRNAs involved in virus defense (Xie et al. 2004). DCL3 produces endogenous hcsiRNAs that mediate TGS and DCL4 is involved in tasiRNAs production (Xie et al. 2004, 2005b; Dunoyer et al. 2005). The characteristics of each type of sncRNA will be further described.

DCL gene number varies in different plant species. *Arabidopsis* has four *DCL* genes, rice and maize have five, and *Populus trichocarpa* (poplar) has six (Liu et al. 2009a; Qian et al. 2011). Analysis of *Arabidopsis*, rice and poplar genomes has suggested that all plants have a basic set of four *DCL* genes and that in monocotyledonous plants a fifth type of DCL has evolved, which has a highly divergent dsRNA-binding domain (dsRBD) that probably distinguishes it from other DCL functions (Margis et al. 2006).

The specialization described for DCL proteins also involves accessory proteins, which may contribute to an

accurate substrate recognition cleavage and to the subsequent recruitment of other factors to conform to a specific effector pathway.

### ARGONAUTE proteins

AGO proteins are the effectors in all sncRNA pathways known to date. AGO proteins recruit sncRNAs to form a ribonucleoprotein complex generally termed RNA-induced silencing complex (RISC) that by sequence complementarity will identify the transcripts to be silenced. Most AGO proteins in these complexes cleave their target RNAs by a site-specific endonucleolytic activity. Those AGO proteins lacking this activity repress their interacting transcripts by reducing their stability, by interfering with their translation or by inducing transcriptional silencing (Mallory and Vaucheret 2010; Joshua-Tor and Hannon 2011). The first AGO protein to be studied in plants was *Arabidopsis* AGO1, discovered in a screen for genes required for proper development (Bohmert et al. 1998). The *ago* mutants received their name due to the pleiotropic leaf phenotype that resembles the limbs of an argonaute squid (Bohmert et al. 1998). AGO proteins have a molecular mass of approximately 100 kDa and contain a conserved N-terminal domain, a PAZ domain, a MID (middle) domain, a PIWI (P ELEMENT-INDUCED WIMPY TESTIS) domain, and a non-conserved C-terminus (Vaucheret 2008; Ender and Meister 2010).

*Arabidopsis* contains ten different AGO proteins grouped in three clades: AGO1, AGO5 and AGO10 are in the first clade; AGO2, AGO3 and AGO7 are in the second one; and AGO4, AGO6, AGO8 and AGO9 form the third clade (Vaucheret 2008).

These proteins differ in their cellular localization and also in their tissue and developmental distribution (Schmid et al. 2005; Mallory and Vaucheret 2010). AGO1 and AGO4 are widely expressed, while other AGO proteins have specific expression patterns, such as AGO9 and AGO10 that are expressed in reproductive organs and shoot apical meristem (SAM), respectively (Lynn et al. 1999; Olmedo-Monfil et al. 2010). In *Arabidopsis*, AGO1, AGO4 and AGO7 proteins have slicer activity, i.e., an endonucleolytic activity conferred by the aspartate–aspartate–histidine (DDH) motif present in the PIWI domain, that entails cleavage of the target RNA at the phosphodiester bond opposite to the 10- and 11-nt of the base-paired sncRNA (Song et al. 2004; Baumberger and Baulcombe 2005; Qi et al. 2006; Montgomery et al. 2008a).

Co-immunoprecipitation assays indicate that each AGO protein preferentially loads a specific type of sncRNA (Mi et al. 2008). Thus, AGO1 preferentially binds microRNAs containing a uridine (U) at the 5'-end, AGO2 and AGO4 recruit mostly siRNAs that initiate with adenosine (A), and

AGO5 binds siRNAs that have a cytosine (C) at their 5'-end (Mi et al. 2008). The preference for a specific nucleotide depends on the binding pocket of the MID domain, which interacts with the 5'-end of the sncRNA (Ma et al. 2005; Frank et al. 2010). The association of a specific AGO protein to the silencing complex ultimately defines the effector pathway for a particular sncRNA. Although different accessory proteins associate with RISC complex in animals, to date in plants the only known interaction is that between AGO4 and Pol V during transcriptional silencing (El-Shami et al. 2007). Defining the activity of individual AGO proteins and their interacting factors will greatly help to understand silencing pathway functions in plants.

### RNAi machinery in the stress response

The RNAi machinery proteins act primarily as part of complexes. The DCL proteins have been reported to interact with other proteins, usually containing a dsRBD. Even though a deficiency in these proteins leads to pleiotropic phenotypes, they are sometimes related to particular responses as many of them were initially identified in mutant screens under specific treatments. That was the case of HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), initially identified as a component of the signaling pathways in hormone responses (Lu and Fedoroff 2000). Amongst the phenotypes that the *hyl1* mutant exhibits are delayed flowering, the upward bending of leaves (leaf hyponasty), reduced fertility, hyposensitivity to auxin and cytokinin, and hypersensitivity to ABA (Lu and Fedoroff 2000). Because HYL1 contains two dsRBDs and a nuclear localization domain, it was a good candidate to interact with the RNAi machinery. Later on, it was shown that HYL1 directly interacts with DCL1 to provide accuracy to the cleavage of pri- and pre-microRNAs (Kurihara et al. 2006; Dong et al. 2008). In addition, SERRATE another dsRNA binding protein (dsRBP) was found to interact with DCL to promote together with HYL1, the precise cleavage of pri-microRNAs and microRNA precursors (Hiraguri et al. 2005; Dong et al. 2008). Similarly, DRB4 (also a dsRBP) specifically interacts with DCL4 (Hiraguri et al. 2005). The study of the interactions between the different proteins participating in the sncRNAs biogenesis indicates that the specialization of each complex is given in part by a combination of specific protein–protein interactions and the identity of their interacting partners, which leads to the recognition and preferential cleavage of particular RNA substrates.

Many forms of stress affect the levels of some of the proteins that participate in the sncRNA biogenesis pathways. In a recent study in *Medicago truncatula*, a bioinformatic analysis revealed that there are three putative DCL

genes and twelve *AGO* genes; from these, the *MtDCL1* and *MtAGO1* transcripts (involved in microRNA biogenesis) accumulate in response to water deficit (Capitao et al. 2011). This observation correlates with a reduction in the levels of two miRNAs, miR162 and miR168, that in turn down-regulate both *DCL1* and *AGO1* transcripts, respectively (Capitao et al. 2011). In maize, it was shown that in 3-week-old seedlings subjected to drought or salt stress, the paralogs of *DCL*, *AGO* and *RDR* genes exhibit different expression patterns in leaves, suggesting that these proteins may play pivotal roles in modulating specialized regulatory mechanisms in response to abiotic stresses (Qian et al. 2011). Furthermore, it was recently shown that the deficiency of *DCL1* and *HEN1* proteins observed in mutants *absg1* and *absg2*, respectively, leads to ABA super-sensitivity during germination (*absg*). In addition, the *absg1* mutant also showed sensitivity to salt and osmotic stress (Zhang et al. 2008). Whether these phenotypes are caused by the reduced abundance of the whole microRNA population or due to the lack of specific ABA responsive microRNAs is still unknown. Taken together, these observations indicate that components of the sncRNA biogenesis machinery strongly associate with stress response pathways.

### MicroRNAs

Plant microRNAs are 20- to 24-nt RNAs that act at the post-transcriptional level by either target degradation or translational repression (Chen 2004; Voinnet 2009). They participate in almost every cellular process (Voinnet 2009). Their presence in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii* is evidence that microRNAs constitute an ancient gene regulatory pathway (Molnar et al. 2007; Zhao et al. 2007). Several studies have revealed that most plant microRNA (*MIR*) genes form independent Pol II transcription units with their own promoter sequences (Xie et al. 2005a; Voinnet 2009). The first discovered plant microRNAs were found to primarily participate in developmental processes. However, using as discovery criteria the distinctive characteristics of conserved microRNAs, it was later reported the identification of miR395, a microRNA induced by sulfate starvation (Jones-Rhoades and Bartel 2004), and miR399 regulating the *PHO2* mRNA, encoding an E2 ubiquitin conjugase enzyme involved in phosphate homeostasis (Fujii et al. 2005; Chiou et al. 2006), extending the microRNAs regulatory functions as modulators of the plant stress response.

New sequencing technologies have revealed a vast universe of microRNAs in eukaryotes. Currently, there are 4,169 annotated mature microRNAs in 47 plant species in the current version (ver. 18.0) of the microRNA registry

database (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones et al. 2006). From these, only 51.6 % are conserved and 48.4 % are family or species specific. As the number of annotated microRNAs increases, it is evident that the conserved families are fewer than the non-conserved ones. Evolutionary conserved microRNAs are in general abundantly expressed and their targets are usually transcription factors that regulate developmental and growth processes (Mallory and Vaucheret 2006; Voinnet 2009; Cuperus et al. 2011). Non-conserved microRNAs are less abundant, sometimes with very low expression levels and their predicted targets are seldom experimentally confirmed (Voinnet 2009; Cuperus et al. 2011). The difficulty to systematically characterize these young microRNAs is probably due to the fact that they are induced in particular groups of plant species, and/or under a specific stress or metabolic condition or that they are expressed in a tissue- or cell type-specific manner. Regarding their predicted targets, these belong to a group of proteins that are related to a particular stress response and with a broader range of cellular and physiological activities (Table 1). However, some conserved microRNAs are also involved in stress responses and adaptation. For instance, miR159 accumulates upon ABA and water limitation treatments in *Arabidopsis* germinating seeds, and modulates the transcript levels of MYB33 and MYB101 transcription factors (Reyes and Chua 2007). Another example is miR169, whose target is the NFYA transcription factor, involved in ABA and drought responses. Under these conditions *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is highly induced, while miR169 levels decrease (Li et al. 2008).

Recent deep sequencing analyses have provided an interesting landscape of microRNA-directed gene regulation during water deficit. Currently, there are studies in more than six plant species that show a large number of microRNAs that are regulated during water deficit (Table 2). Interestingly, the plant response varies in each species, depending on the plant family or habitat, and while the majority of them have a differential accumulation profile, few microRNAs share a common accumulation pattern amongst the different plants species studied to date. The differences in the microRNA accumulation profile do not only occur across species, but also in different genotypes from the same species and at different developmental stages. *Glycine max* (soybean) seedlings from drought-sensitive and tolerant genotypes subjected to water deficit showed a differential microRNA accumulation profile, while the levels of five microRNAs (miR166-5p, miR169f-3p, miR1513c, miR397ab and miR-seq13) increased in the drought-sensitive genotype when compared to the tolerant genotype (Kulcheski et al. 2011).

Interestingly, recent evidence indicates that microRNA biogenesis could be post-transcriptionally regulated under



**Table 1** Targets of conserved and non-conserved microRNAs accumulated under water deficit

microRNA	Plant species	Target	Validation	References
miR123	Pe(↑)	Development/cell death domain	(+)	Cohen et al. (2010)
miR156	At(↑), Os(↓)	SPL	(+)	Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR159	At(↑)	MYB	(+)	Reyes and Chua (2007)
miR159.2	Pv(↑)	Chlatriin heavy chain	(−)	Arenas-Huertero et al. (2009)
miR167	At(↑)	ARF	(+)	Liu et al. (2008)
miR168	At(↑)	AGO1	(+)	Liu et al. (2008), Vazquez et al. (2004)
miR169	At(↓), Os(↑)	NFY	(+)	Li et al. (2008), Zhou et al. (2010), Liu et al. (2009b)
miR171	At(↑)	SCL	(+)	Liu et al. (2008)
miR319	At(↑), Os(↓)	TCP	(+)	Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR393	At(↑), Pv(↑), Os(↑)	TIR1	(+)	Jones-Rhoades and Bartel (2004), Liu et al. (2008), Arenas-Huertero et al. (2009), Sunkar and Zhu (2004)
miR395	Os(↑)	APS	(+)	Jones-Rhoades and Bartel (2004), Zhou et al. (2010)
miR396	At(↑), Os(↓)	GRL	(+)	Jones-Rhoades and Bartel (2004), Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR397	At(↑)	Laccase	(+)	Sunkar and Zhu (2004)
miR398	Td(↑)	CSD	(+)	Jones-Rhoades and Bartel (2004), Kantar et al. (2011)
miR474	Td(↑)	Kinesin	(+)	Kantar et al. (2011)
miR528	Ta(↓)	Similar to plantacyanin	(−)	Kantar et al. (2011)
miR894	Ta(↑)	Similar to protein phosphatase PP2A-4	(−)	Kantar et al. (2011)
miR1432	Ta(↑)	Phenylalanine tRNA synthase- like	(−)	Kantar et al. (2011)
miR1450	Ta, Td(↑)	Mn superoxide dismutases	(−)	Kantar et al. (2011)
miR1510	Gm(↑)	LRR (leucine-rich-repetitions)- containing proteins	(+)	Kulcheski et al. (2011)
miR1513	Gm(↑)	F-BOX domain proteins	(+)	Kulcheski et al. (2011)
miR1514	Pv(↑)	PsEMF1-related	(−)	Arenas-Huertero et al. (2009)
miR1867	Ta, Td(↑)	Putative protein, DUF1242 superfamily	(−)	Kantar et al. (2011)
miR2002	Os(↑)	Caltractin	(−)	Jian et al. (2010)
miR2003	Os(↑)	HEAT repeat family protein	(−)	Jian et al. (2010)
miR2005	Os(↑)	Nitrate and chloride transporter	(−)	Jian et al. (2010)
miR2007	Os(↑)	DNA binding protein	(−)	Jian et al. (2010)
miR2118	Pv(↑)	U170K related	(−)	Arenas-Huertero et al. (2009)
miR2119	Pv(↑)	ADH1	(−)	Arenas-Huertero et al. (2009)
miRS1	Pv(↑)	bHLH	(−)	Arenas-Huertero et al. (2009)
miRSeq11	Gm(↑)	Peroxidase activity	(+)	Kulcheski et al. (2011)
miRSeq15	Gm(↑)	Translation initiation factor	(+)	Kulcheski et al. (2011)

At, *Arabidopsis thaliana*; Gm, *Glycine max*; Os, *Oryza sativa*; Pe, *Populus euphratica*; Pv, *Phaseolus vulgaris*; Ta, *Triticum aestivum*; Td, *Triticum dicoccoides*

↑ and ↓ signs denote up-regulation and down-regulation of the microRNA during water deficit, respectively

stress conditions, suggesting a more sophisticated and versatile scenario for the regulation of the plant response to water deficit. A study using *P. euphratica*, a typical stress-resistant plant that grows in desert areas, showed that dehydration or salinity treatments induced different microRNA and precursor accumulation profiles, where it was

shown that miR171a precursor reached its maximum accumulation after 2 h of treatment, while the mature miR171 maximum accumulation occurred after 4 h (Qin et al. 2011). Distinctive accumulation patterns between microRNA precursors and mature microRNAs have also been observed in animals, where it was suggested that

**Table 2** ABA, drought and salt responsive microRNAs

microRNA	Up-regulated	Down-regulated	Treatment	References
miR102		Pe	Drought	Cohen et al. (2010)
miR123	Pe	Pe	Drought	Cohen et al. (2010)
miR129	Pe	Pe	Drought	Cohen et al. (2010)
miR156	At	Os/Zm	Drought/salt	Jung and Kang (2007), Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR157	At		Drought	Zhou et al. (2010)
miR158	At		Salt	Sunkar and Zhu (2004)
miR159	At		ABA/drought/salt	Reyes and Chua (2007), Zhou et al. (2010)
miR159.2	Pv		ABA/drought/salt	Arenas-Huertero et al. (2009), Contreras-Cubas et al. (2011)
miR160	At		ABA	Liu et al. (2007)
miR162	Zm		Salt	(Jung and Kang 2007)
miR166	Gm sg	Gm rg	Drought	(Kulcheski et al. 2011)
miR167	At	Os/Zm	ABA/drought/salt	Jung and Kang (2007), Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR168	At, Zm	Os	Drought/salt	Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR169	At, Gm sg, Mt, Os, Zm	At, Gm rg, Os	ABA/drought/salt	Jung and Kang (2007), Kulcheski et al. (2011), Li et al. (2008), Liu et al. (2008), Wang et al. (2011b), Zhou et al. (2010)
miR171	At		Drought/salt	Sunkar and Zhu (2004), Zhou et al. (2010)
miR172		Os	Drought	Liu et al. (2008)
miR319	At	Os	ABA/drought/salt	Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010)
miR393	At, Mt, Pv, Os		ABA/drought/salt	Arenas-Huertero et al. (2009), Liu et al. (2008), Sunkar and Zhu (2004), Wang et al. (2011b), Zhou et al. (2010)
miR394	At		Salt	Zhou et al. (2010)
miR395	Zm		Salt	Jung and Kang (2007)
miR396	At	Os, Zm	Drought/salt	Jung and Kang (2007), Liu et al. (2008), Zhou et al. (2010), Kulcheski et al. (2011), Liu et al. (2008), Sunkar and Zhu (2004)
miR397	At, Gm sg	Gm rg, Os	ABA/drought/salt	Zhou et al. (2010)
miR398	Mt	At	ABA/drought/salt	Sunkar and Zhu (2004), Wang et al. (2011b)
miR402	At		ABA	Sunkar and Zhu (2004)
miR408	Mt	Os	Drought	Liu et al. (2008), Trindade et al. (2010)
miR417	At		ABA	Ding et al. (2009)
miR482		Gm rg	Drought	Kulcheski et al. (2011)
miR1514	Pv		ABA	Arenas-Huertero et al. (2009)
miR2005	Os		Drought	Liu et al. (2008)
miR2006	Os		Salt	Liu et al. (2008)
miR2007	Os		Drought	Liu et al. (2008)
miR2118	Pv		ABA/drought	Arenas-Huertero et al. (2009)
miR2119	Pv		ABA	Arenas-Huertero et al. (2009)
miR1513c	Gm sg	Gm rg	Drought	Kulcheski et al. (2011)
miR4415b	Gm sg/rg		Drought	Kulcheski et al. (2011)
miRS1	Pv		ABA/salt	Arenas-Huertero et al. (2009)
miRSeq07	Gm sg/rg		Drought	Kulcheski et al. (2011)
miRSeq11	Gm sg		Drought	Kulcheski et al. (2011)
miRSeq13	Gm sg	Gm rg	Drought	Kulcheski et al. (2011)
miRSeq15	Gm sg		Drought	Kulcheski et al. (2011)

For Gm, sg and rg denote sensitive and resistant genotypes, respectively

At, *Arabidopsis thaliana*; Gm, *Glycine max*; Os, *Oryza sativa*; Pe, *Populus euphratica*; Pv, *Phaseolus vulgaris*; Mt, *Medicago truncatula*; Zm, *Zea mays*

microRNA precursors from human monocytes are more easily degraded than mature microRNAs (Schmittgen et al. 2008). A contrasting situation was found for *P. euphratica* miR1447 and miR408 in response to stress treatments, where the precursor levels increased while the mature microRNA levels were decreased (Qin et al. 2011). A detailed and systematic analysis is needed to understand the extent and functional role of pre-microRNAs processing mechanisms during the stress response.

Insights into the functional role of a precursor-processing mechanism influencing microRNA activity come from studies in *Arabidopsis* showing that the highly conserved miR159 and miR319 precursors are unusually long and contain more than one conserved region in their stem-loop precursor named alternative conserved regions (ACRs) (Li et al. 2011). The ACRs encode small RNAs denoted as ACR5 and ACR3, depending on their 5'- or 3'-positioning along their precursor molecule, resulting from sequential DCL1 cleavage of the precursor to generate the mature microRNAs (Li et al. 2011). In *Arabidopsis* and other plant species, the ACR small RNAs accumulate at much lower levels than the microRNAs encoded in the same precursor. In sharp contrast, in some other plant species, at certain developmental stage- and/or tissue-specific conditions, the ACR small RNAs show similar or higher expression levels than the microRNAs (Tuteja et al. 2009; Li et al. 2011). Remarkably, the ACR species are up-regulated in the *Arabidopsis rdr2* mutant and in the *dcl2 dcl3 dcl4* triple mutant (Li et al. 2011). Taken together with the observation that microRNAs and tasiRNAs are accumulated in the *Arabidopsis rdr2* mutant (Lu et al. 2006), these data suggest a post-transcriptional mechanism regulating microRNA biogenesis, where sncRNAs encoded in the same precursor are differentially produced. Interestingly, the ACR3 equivalent present in *P. vulgaris* pre-miR159a is induced by stress conditions in contrast to miR159 which shows a distinctive accumulation profile (Contreras-Cubas et al. 2011). These findings alert on the different levels and mechanisms by which the biogenesis of sncRNAs might be modulated and lead to consider possible differences depending on the species and on their particular developmental features and growth conditions.

Differential processing of pre-microRNA provides novel regulatory alternatives to microRNA-mediated gene regulation. Example of this is the existence of microRNA variants of different size. It is known that the 22-nt microRNAs specifically participate in the RDR6-dependent production of siRNAs (see below) (Cuperus et al. 2010). In *Arabidopsis*, miR168 is produced from two loci, *MIR168a* and *MIR168b*. The first locus produces mainly 21-nt species, while *MIR168b* produces both 21- and 22-nt species. Noteworthy, these microRNA species differentially regulate AGO1 homeostasis (Vaucheret 2009). It was previously

established that *MIR168* is transcriptionally co-regulated with *AGO1*, and that miR168 directs cleavage of *AGO1* transcript, while the protein product mediates the stabilization of miR168, so a balance between both molecules is achieved (Vaucheret et al. 2006). By dissecting the contribution of each locus, a differential role for each RNA species was proposed; while 21-nt miR168 stabilizes AGO1 in response to endogenous and environmental fluctuations, 22-nt miR168 ensures the basal cleavage of AGO1 mRNA (Vaucheret 2009). This size-dependent microRNA alternate function raises the possibility that an even finer regulation of the biogenesis process could take place during stress conditions and that the role of a particular sncRNA might be redefined by the plasticity of the biogenesis machinery. This effect can also be exemplified by the hierarchical and coordinated action of DCL proteins in mutants as revealed during viral infections in *Arabidopsis* plants infected with the cauliflower mosaic virus (CaMV), where the processing of the 35S RNA leader is the result of the combined action of DCL2, DCL3, and DCL4, facilitated by DCL1 (Moissiard and Voinnet 2006). Thus, while stress responses are clearly regulated by the direct effect of certain miRNAs on their target mRNAs, there is an additional regulation level acting at the microRNA biogenesis process that opens the possibility to uncover novel regulatory mechanisms during the plant stress response.

### Trans-acting siRNAs

tasiRNAs are 21-nt RNAs that are generated in a microRNA-dependent cleavage of endogenous non-coding mRNAs *in trans* (Vazquez et al. 2004). In *Arabidopsis*, miR173, miR390 and miR828 direct the cleavage of the non-coding TAS1/2, TAS3 and TAS4 transcripts, respectively (Montgomery et al. 2008a, b). The cleaved product recruits RDR6, which synthesizes the complementary strand, producing a dsRNA that is a DCL4 substrate (Xie et al. 2005b; Howell et al. 2007). The resulting tasiRNAs regulate developmental processes. TAS3 tasiRNAs negatively regulate the AUXIN RESPONSE FACTOR 3 (ARF3), involved in the patterning of leaves and floral organs, and also ARF2, ARF3, and ARF4 releasing repression of lateral root growth (Fahlgren et al. 2006; Marin et al. 2010). Interestingly, miR390 is specifically loaded into AGO7 in contrast to miR173 and miR828 that are associated to AGO1 (Montgomery et al. 2008a, b). Moreover, it has been shown that only AGO1 loaded with 22-nt length microRNAs, but not with 21-nt, can associate to RDR6 and trigger the tasiRNA pathway (Chen et al. 2010a; Cuperus et al. 2010). The tasiRNA pathway has been described in moss, indicating that the antiquity of this pathway might reflect the importance of these sncRNAs in



plant development, particularly in the establishment of organ polarity (Talmor-Neiman et al. 2006).

Although tasiRNAs have not yet been implicated in abiotic stress responses, a recent study revealed that *Arabidopsis* roots under hypoxia conditions exhibited increased levels of TAS1, TAS2 and TAS3 tasiRNAs (Moldovan et al. 2010). This increase was probably caused by the enhanced expression of miR173 and miR390 upon stress. Future and more detailed studies might uncover the participation of tasiRNAs in the plant stress response.

### Heterochromatic siRNAs

Before the use of high-throughput sequencing technologies it was believed that microRNAs dominated the sncRNA landscape. Soon, 24-nt siRNAs were found in *Arabidopsis* and it was shown that they were preferentially loaded into AGO4 (Zilberman et al. 2003). hcsiRNAs are essential components of the RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway, an ancient RNA-based, sequence-specific pathway conserved in plants that induces a distinctive pattern of de novo DNA methylation and chromatin modifications that establishes epigenetic modifications directed mainly against invasive nucleic acids [e.g. transposable elements (TEs) and repetitive sequences] (Matzke and Birchler 2005; Matzke et al. 2009; Law and Jacobsen 2010). RdDM was first observed in tobacco plants infected with viroids but it has been most extensively studied in *Arabidopsis* (Wassenegger et al. 1994; Law and Jacobsen 2010). RdDM is an elaborate gene silencing mechanism that uses small RNAs and components of the RNA interference (RNAi) machinery. Millions of 21- to 24-nt hcsiRNAs are present in plants, making them the most abundant class of small RNAs (80 %) (Jones-Rhoades et al. 2006; Chen 2009; Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009). The biogenesis of hcsiRNAs required for targeting DNA methylation in RdDM (as they provide sequence specificity) has been suggested to initiate with the activity of the multi-subunit plant-specific Pol IV by producing single-stranded RNA (ssRNA) transcripts that are thought to be the substrate of RDR2, which in turn generates dsRNA that is processed into 24-nt hcsiRNAs by the activity of DCL3 with partially redundant contributions from DCL2 and DCL4, and loaded into AGO4-containing complexes (Zilberman et al. 2003; Xie et al. 2004; Gascioli et al. 2005; Herr et al. 2005; Lu et al. 2006; Pikaard et al. 2008). AGO4 interacts with Pol V (another multi-subunit plant-specific RNA polymerase), to form an hcsiRNA-protein complex containing also DOMAINS REARRANGED METHYL TRANSFERASE 2 (DRM2) and other proteins that, by a mechanism still poorly understood, induce DNA methylation at those regions showing sequence complementarity to hcsiRNAs (Cao and Jacobsen 2002; Herr et al. 2005; Onodera et al. 2005; Pikaard

et al. 2008; Matzke et al. 2009). Additional components of RdDM include DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (DRD1) (Kanno et al. 2004), a putative chromatin-remodeling factor needed for Pol V chromatin association and CLASSY 1 (CLSY1) (Smith et al. 2007), another putative chromatin-remodeling factor involved at an early stage of hcsiRNA production, possibly at the level of Pol V or RDR2 activity (Matzke et al. 2009; Law and Jacobsen 2010).

In plants, DNA methylation can occur at cytosine bases in all sequence contexts: the symmetric CG and CHG contexts (where H can be A, T or C) and the asymmetric CHH context. DNA methylation in plants predominantly occurs on TEs and other repetitive genomic elements (Henderson and Jacobsen 2007; Matzke et al. 2009; Law and Jacobsen 2010). DRM2 catalyses de novo DNA methylation in plants, while DNA methylation is maintained by at least three different pathways, DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) maintains CG methylation, CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3), a plant-specific DNA methyltransferase, maintains CHG methylation, and asymmetric CHH methylation is maintained through persistent de novo methylation by DRM2 (Vongs et al. 1993; McCallum et al. 2000; Cao et al. 2003; Kankel et al. 2003; Kanno et al. 2004; Matzke et al. 2009; Law and Jacobsen 2010). The large majority of hcsiRNAs are produced from regions of the genome containing TEs, and repetitive elements that produce double-stranded RNA (dsRNA) either by self-generation (e.g. transcripts corresponding to inverted repeats able to generate dsRNA by sequence complementarity) or generated by the activity of RDR2; very few are found in protein-coding genes (Xie et al. 2004; Law and Jacobsen 2010). In *Arabidopsis*, mutations in several RdDM components, including *NRPD*, *RDR2* and *DCL3* result in a dramatic reduction in hcsiRNAs (Xie et al. 2004; Matzke et al. 2009; Law and Jacobsen 2010).

While production of hcsiRNAs and TGS have been reported in response to biotic stress induced by bacterial, viral or fungal infection (Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009), there are only few examples of TGS mediated by hcsiRNAs during abiotic stress in plants. An interesting example of this phenomenon has been recently described in *Arabidopsis* seedlings subjected to heat stress (HS) for the regulation of a *copia*-type retrotransposon named *ONSEN* (Ito et al. 2011). *Arabidopsis* mutants affected in the hcsiRNA biogenesis pathway (*nRPD2*, *rdr2* and *dcl3*), subjected to HS, showed increased levels of both *ONSEN* transcripts and production of *ONSEN* extrachromosomal DNA copies. After a recovery period *ONSEN* transcripts and extrachromosomal DNA gradually decreased, indicating that hcsiRNA-mediated regulation is responsible for the restriction of *ONSEN* transcript levels upon HS but not during the recovery period. Interestingly, a

transgenerational effect was observed in these mutants as high frequency of new *ONSEN* insertions was detected in the progeny of stressed plants. The analysis of the insertion patterns showed that the retrotransposition took place only during flower development and before gametogenesis, suggesting that the hcsiRNA pathway plays an important role in controlling transgenerational retrotransposition triggered by abiotic stress. Surprisingly, *ONSEN* insertions were able to confer heat responsiveness to nearby genes, indicating that hcsiRNAs may also participate in new regulatory networks modulating the plant response to stress (Ito et al. 2011). This is a fine example that offers tools to investigate the role of retrotransposons and hcsiRNAs in the environmental adaptation of plants. Additional cases of transgenerational transmission in plants mediated by hcsiRNAs have been documented regarding changes in homologous recombination frequency in response to stress. In a recent study Boyko et al. (2010) demonstrated that during abiotic stress, transgenerational responses in *Arabidopsis* are dependent on DNA methylation mediated by hcsiRNAs because in *dcl2 dcl3* double mutants homologous recombination frequency (HRF) was compromised, while in a *dcl2* single mutant stress tolerance was impaired. Furthermore, modifications induced by histone deacetylases AtHD2C and HDA6 contribute to water deficit and ABA responses in *Arabidopsis* (Sridha and Wu 2006; Chen et al. 2010b). Previous studies have shown that loss of HDA6 reactivated transcription of an RdDM target (Aufsatz et al. 2002), and HDA6 has been proposed to interact with the DNA methyltransferase MET1 (To et al. 2011). In addition, HD2C interacts with the DNA methyltransferase AtDNMT2 (Song et al. 2010), thus together these results indicate a connection between histone deacetylases and DNA methyltransferases, suggesting that HDA6 and HD2C are part of a sncRNA regulatory pathway that participate in water deficit and ABA responses.

The sessile nature of plants invokes the prevalence of mechanisms allowing fast responses that can be spread rapidly to other tissues. By performing elegant grafting experiments between wild-type and *dcl* mutants, Molnar et al. (2010) demonstrated the mobile nature of siRNAs and their ability to mediate epigenetic modifications in the recipient cells. Thus, sncRNAs can also function as mobile signals, capable to mediate silencing at distance upon specific stimuli. Based on these observations, it will be interesting to elucidate the possible role of mobile sncRNAs during water deficit response.

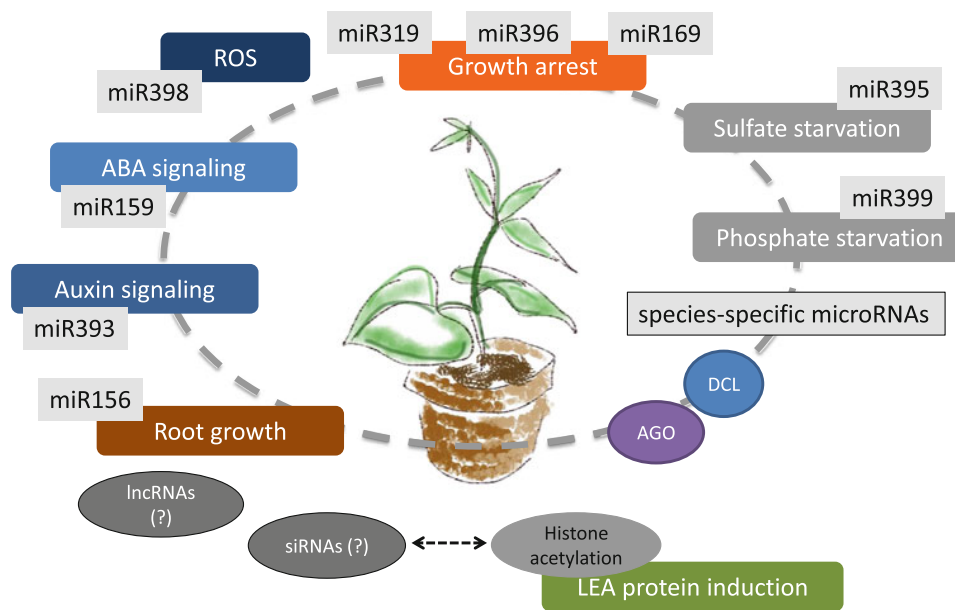
### Long-ncRNAs

lncRNAs are a distinct class of ncRNAs that widely differs from the small RNAs we have addressed so far because

they range from 300-nt to over 10-kb long (Rinn et al. 2007). These ncRNAs do not contain open reading frames (ORF) and mainly act as gene regulators. There are more examples of the function of lncRNAs in animals than in any other eukaryotic organisms, including plants. For instance, among the 231 ncRNAs that are expressed along the human homeobox (HOX) loci, the antisense lncRNA HOTAIR mediates epigenetic changes by inducing *in trans* a heterochromatin state that may involve the recruitment of the Polycomb chromatin-remodeling complex (Rinn et al. 2007).

An example of the role of plant lncRNAs is represented by the regulation exerted by COOLAIR and COLDAIR transcripts, which are transcribed during cold stress from the floral repressor FLOWERING LOCUS C (FLC) that is repressed by prolonged cold and silenced by the polycomb repressive complex 2 (PRC2) in a process known as vernalization (De Lucia et al. 2008). Through the characterization of FLC-derived transcripts, Swiezewski et al. (2009) found the up-regulation of a cold-induced long non-coding antisense intragenic RNA (COOLAIR), overlapping with the FLC locus. Expression of COOLAIR occurs earlier than the appearance of vernalization marks and is involved in FLC transcriptional repression. These findings suggest that cold-induced long non-coding antisense transcripts act during the very first steps right before the epigenetic memory is established through the Polycomb complex (Swiezewski et al. 2009). In another study, Heo and colleagues reported another lncRNA within an intron of the FLC gene different from COOLAIR that they termed COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA (COLDAIR). In contrast to COOLAIR, COLDAIR is in the sense direction relative to FLC transcription. Using RNA immunoprecipitation (RIP) assays they found that COLDAIR associates *in vivo* with PRC2 during vernalization and targets FLC (Heo and Sung 2011). So, even when these two lncRNAs act *in cis* on the epigenetic silencing of FLC during vernalization, they do so at different time points: while the antisense transcript COOLAIR is involved in the early response, the intronic sense transcript COLDAIR most likely recruit PRC2 to FLC at a later step to establish silencing (Heo and Sung 2011).

In an effort to identify lncRNAs that are transcribed during abiotic stress in *Arabidopsis*, Ben Amor et al. (2009) performed a genome-wide analysis of ncRNAs. From the 76 ncRNAs found, a novel lncRNA was accumulated in *dcl1* mutants, and it was shown that this lncRNA does not generate either tasiRNAs or microRNAs. They also analyzed the expression of lncRNAs under abiotic stress conditions (phosphate starvation, salt or water stress) and found that 26 lncRNAs were differentially expressed. Among these, npe60 showed a 100-fold increase upon salt treatment. Five lncRNAs showed differential



**Fig. 2** Small ncRNAs have been recognized to participate in stress responses. Numerous microRNAs have been reported to participate during stress responses, but how they accomplish their tasks is not fully understood, however, we can outline their global effects on different plant processes. Here we depict only those miRNAs that have repeatedly appeared in different plant species along with cellular processes that may be affected based on the identity of characterized targets (see text for references). Other non-conserved microRNAs can participate in species-specific responses to stress. In addition, the effect of stress on the abundance/activity of enzymes involved in

sncRNA biogenesis could also influence plant responses to adverse conditions by affecting microRNA activity (depicted by a *dashed circle* including CLD and AGO proteins). Finally, insights from epigenetic mechanisms in the form of gene activation/inactivation through histone modifications (histone acetylation) and/or from other non-coding RNAs (lncRNAs or siRNAs) are included to suggest their potential involvement. *ROS* reactive oxygen species, *LEA* late embryogenesis abundant, *ABA* abscisic acid, the *dashed double sided arrow* indicates potential interactions between epigenetic signals

expression in leaves compared to roots, but only the overexpression of npc536 (complementary to an mRNA encoding a Golgi-transport complex related protein) showed a heightened root growth phenotype under salt conditions (Ben Amor et al. 2009). This points out to the importance of lncRNAs in the plant stress response. However, additional detailed studies are still needed to fully appreciate the participation of lncRNAs during plant stress responses.

**Concluding remarks**

ncRNA-mediated gene regulation is an ancient and conserved mechanism essential for proper plant development and survival to adverse environmental conditions. The diversity of the ncRNA pathways parallels the complex landscape of the eukaryotic regulatory pathways. Plants have evolved sophisticated gene regulation pathways and, as high-throughput sequencing data is obtained and the analysis of factors participating in these pathways has advanced, we have begun to better understand the biological roles that ncRNAs play during plant responses to their ever-changing environment (highlighted in Fig. 2).

In this review, we focused on well-described plant ncRNA pathways that are although diverse in origin, modes of action and targets, share features that reflect common evolutionary origins. The conservation of the core proteins of the complexes (Dicers and Argonautes) likely reflects a common ancestry and the later diversification and specialization during plant adaptation (see Fig. 1). The silencing machinery is present in the unicellular algae *C. reinhardtii* (Molnar et al. 2007), thus pre-dating appearance of land plants and suggesting that the early presence of RNA-based silencing pathways in photosynthetic organisms has permitted selection for divergence and functional specialization.

With respect to microRNA origins, two hypotheses have been proposed. The first one considers a gene duplication event involving inverted repeats that generated a proto-*MIR* that mostly depended on processing by DCL3 and DCL4 and the later specialization of the other DCL proteins (Voinnet 2009). By contrast, the model of “spontaneous evolution” proposes that stem-loop structured RNA molecules originated from miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and became fixed in the genome (Felippes et al. 2008; Voinnet 2009). In either case, microRNAs could have originated from siRNA-like

producing loci that established themselves in the genome and later on adopted a stem-loop precursor structure that allowed them to be functionally selected. Furthermore, a single microRNA could even be subjected to ensuing specialization, as it seems to be the case for miR159 and miR319, which are highly conserved in all land plants and have evolved from a common ancestor. Even when they separated early in the evolutionary time scale, their mature sequences share 80 % identity and even their precursor structure is conserved. In contrast, they have clearly different time and tissue-specific expression profiles and also different targets (Li et al. 2011). So even when these miRNAs share common characteristics, other factors such as their time of expression and tissue specificity make an important difference in their function. Environmental stress is an additional factor that could have shaped one or more sncRNA pathways during evolution either from the protein or the sncRNA standpoint, serving as a selective pressure to diversify already existing pathways.

As discussed above, the course of the sncRNA pathway is determined by the nature of the transcripts entering the pathway and by the protein–protein interactions that take place between the participating factors. It is important to consider that these proteins are themselves tissue- and time-specifically expressed. Thus, depending on the developmental stage of the plant, different protein complexes might be formed and they may be restricted by their expression pattern. For instance, miR390 is first produced by the microRNA biogenesis machinery, ubiquitously present in the plant, but is subsequently loaded into AGO7 for the generation of TAS3 tasiRNAs. Thus, the expression pattern of miR390 and, independently, that of AGO7 contribute to shape the final distribution of TAS3-derived tasiRNAs and their sites of function. In another example of possible alternative combinations, recent deep sequencing data in several *Arabidopsis* organs revealed that 30 % of AGO1-associated sncRNAs are 24-nt in size, thus depending on AGO1 localization and expression levels, other sncRNAs can be loaded onto it (Wang et al. 2011a). What is the composition and the function of those complexes formed by the 24-nt siRNAs interacting with AGO1 is something that still remains to be determined. These results indicate that there is an evident cross talk between factors of the different sncRNA pathways, contributing to the diversity of these mechanisms and the potential to regulate some of these sncRNAs by external signals such as drought or other stimuli. Thus, the final outcome of a sncRNA silencing pathway will be defined not only by the sncRNA being recruited to a specific multi-protein silencing complex but also by the nature of the components interacting within the complex, in turn defined by the particular conditions present in the cell and influenced by developmental states and environmental cues. Researchers

are now assembling large amounts of data on the small ncRNAs present in particular stress conditions, the next challenge will be to elucidate their functions based on what and how protein factors participate in the assembly of specific RNA silencing complexes. Future research in the field will not be short in surprises.

**Acknowledgments** We apologize to colleagues whose work was omitted due to space constraints. This work was partially supported by DGAPA-UNAM (IN208212 and IN205112). CC-C and MP received PhD fellowships from CONACyT-Mexico.

## References

- Arenas-Huertero C, Perez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol* 70:385–401
- Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJ (2002) HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J* 21:6832–6841
- Baumberger N, Baulcombe DC (2005) *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11928–11933
- Ben Amor B, Wirth S, Merchan F, Laporte P, d'Aubenton-Carafa Y, Hirsch J, Maizel A, Mallory A, Lucas A, Deragon JM, Vaucheret H, Thermes C, Crespi M (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. *Genome Res* 19:57–69
- Bohmer K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* 17:170–180
- Boyko A, Blevins T, Yao Y, Golubov A, Bilichak A, Ilynskyy Y, Hollunder J, Meins F Jr, Kovalchuk I (2010) Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. *PLoS One* 5:e9514
- Bray EA (2002) Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Environ* 25:153–161
- Cao X, Jacobsen SE (2002) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the *DRM* and *CMT3* methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(Suppl 4):16491–16498
- Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M, Jacobsen SE (2003) Role of the *DRM* and *CMT3* methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 13:2212–2217
- Capitao C, Paiva JA, Santos DM, Feveteiro P (2011) In *Medicago truncatula*, water deficit modulates the transcript accumulation of components of small RNA pathways. *BMC Plant Biol* 11:79
- Chapman EJ, Carrington JC (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 8:884–896
- Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303:2022–2025
- Chen X (2008) A silencing safeguard: links between RNA silencing and mRNA processing in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 14:811–812
- Chen X (2009) Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:21–44
- Chen X (2010) Small RNAs—secrets and surprises of the genome. *Plant J* 61:941–958
- Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D (2002) *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. *Development* 129:1085–1094



- Chen HM, Chen LT, Patel K, Li YH, Baulcombe DC, Wu SH (2010a) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15269–15274
- Chen LT, Luo M, Wang YY, Wu K (2010b) Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *J Exp Bot* 61:3345–3353
- Chinnusamy V, Gong Z, Zhu JK (2008) Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol* 50:1187–1195
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL (2006) Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:412–421
- Chu CY, Rana TM (2007) Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 213:412–419
- Cohen D, Bogeat-Triboulot MB, Tisserant E, Balzergue S, Martin-Magniette ML, Lelandais G, Ningre N, Renou JP, Tamby JP, Le Thiec D, Hummel I (2010) Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 11:630
- Contreras-Cubas C, Rabanal FA, Arenas-Huertero C, Ortiz MA, Covarrubias AA, Reyes JL (2011) The *Phaseolus vulgaris* miR159a precursor encodes a second differentially expressed microRNA. *Plant Mol Biol*. doi:10.1007/s11103-011-9847-0
- Covarrubias AA, Reyes JL (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ* 33:481–489
- Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA, Carrington JC (2010) Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nat Struct Mol Biol* 17:997–1003
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of *MIRNA* genes. *Plant Cell* 23:431–442
- De Lucia F, Crevillen P, Jones AM, Greb T, Dean C (2008) A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16831–16836
- Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y (2009) Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Ann Bot* 103:29–38
- Dong Z, Han MH, Fedoroff N (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9970–9975
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet* 37:1356–1360
- El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21:2539–2544
- Ender C, Meister G (2010) Argonaute proteins at a glance. *J Cell Sci* 123:1819–1823
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC (2006) Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 16:939–944
- Felippes FF, Schneeberger K, Dezulian T, Huson DH, Weigel D (2008) Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA* 14:2455–2459
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14(Suppl):S15–S45
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811
- Frank F, Sonenberg N, Nagar B (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465:818–822
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15:2038–2043
- Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H (2005) Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing *trans*-acting siRNAs. *Curr Biol* 15:1494–1500
- Ghildiyal M, Zamore PD (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10:94–108
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 40:D1178–D1186
- Griffiths-Jones S (2004) The microRNA registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109–D111
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140–D144
- Henderson IR, Jacobsen SE (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447:418–424
- Heo JB, Sung S (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331:76–79
- Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308:118–120
- Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 57:173–188
- Howell MD, Fahlgren N, Chapman EJ, Cumbie JS, Sullivan CM, Givan SA, Kasschau KD, Carrington JC (2007) Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* 19:926–942
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377–403
- International Rice Genome Sequencing P (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800
- Ito H, Gaubert H, Bucher E, Mirouze M, Vaillant I, Paszkowski J (2011) An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472:115–119
- Jian X, Zhang L, Li G, Wang X, Cao X, Fang X, Chen F (2010) Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. *Genomics* 95:47–55
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787–799
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:19–53
- Joshua-Tor L, Hannon GJ (2011) Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003772
- Jung HJ, Kang H (2007) Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Plant Physiol Biochem* 45:805–811
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddelloh JA, Riddle NC, Verbsky ML, Richards EJ (2003) *Arabidopsis*

- MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163:1109–1122
- Kanno T, Mette MF, Kreil DP, Aufsatz W, Matzke M, Matzke AJ (2004) Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 14:801–805
- Kantar M, Lucas SJ, Budak H (2011) miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 233:471–484
- Karginov FV, Hannon GJ (2010) The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell* 37:7–19
- Kirino Y, Mourelatos Z (2007) Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol* 14:347–348
- Kulcheski FR, de Oliveira LF, Molina LG, Almerao MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimaraes FC, Albdenor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GA, Margis R (2011) Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* 12:307
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12753–12758
- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12:206–212
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11:204–220
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051–4060
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15:1501–1507
- Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK (2008) The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20:2238–2251
- Li Y, Li C, Ding G, Jin Y (2011) Evolution of MIR159/319 microRNA genes and their post-transcriptional regulatory link to siRNA pathways. *BMC Evol Biol* 11:122
- Liu Q, Paroo Z (2010) Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu Rev Biochem* 79:295–319
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 52:133–146
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14:836–843
- Liu Q, Feng Y, Zhu Z (2009a) Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomics* 9:277–286
- Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, Zhou H, Qu LH, Chen YQ (2009b) Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett* 583:723–728
- Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the *Arabidopsis* *HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* 12:2351–2366
- Lu C, Kulkarni K, Souret FF, MuthuValliappan R, Tej SS, Poethig RS, Henderson IR, Jacobsen SE, Wang W, Green PJ, Meyers BC (2006) MicroRNAs and other small RNAs enriched in the *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res* 16:1276–1288
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* 126:469–481
- Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434:666–670
- Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, Koonin EV (2009) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct* 4:29
- Mallory AC, Vaucheret H (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* 38(Suppl):S31–S36
- Mallory A, Vaucheret H (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22:3879–3889
- Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM (2006) The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett* 580:2442–2450
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A (2010) miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their *AUXIN RESPONSE FACTOR* targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22:1104–1117
- Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6:24–35
- Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21:367–376
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000) Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol* 18:455–457
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y (2008) Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133:116–127
- Moissiard G, Voinnet O (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19593–19598
- Moldovan D, Spriggs A, Yang J, Pogson BJ, Dennis ES, Wilson IW (2010) Hypoxia-responsive microRNAs and *trans*-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 61:165–177
- Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447:1126–1129
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328:872–875
- Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC (2008a) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in *TAS3 trans*-acting siRNA formation. *Cell* 133:128–141
- Montgomery TA, Yoo SJ, Fahlgren N, Gilbert SD, Howell MD, Sullivan CM, Alexander A, Nguyen G, Allen E, Ahn JH, Carrington JC (2008b) AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20055–20062
- Olmedo-Monfil V, Duran-Figueroa N, Arteaga-Vazquez M, Demesa-Arevalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464:628–632
- Onodera Y, Haag JR, Ream T, Nunes PC, Pontes O, Pikaard CS (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and

- DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120:613–622
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12:1484–1495
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3691–3696
- Pikaard CS, Haag JR, Ream T, Wierzbicki AT (2008) Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci* 13:390–397
- Qi Y, He X, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443:1008–1012
- Qian Y, Cheng Y, Cheng X, Jiang H, Zhu S, Cheng B (2011) Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Rep* 30:1347–1363
- Qin Y, Duan Z, Xia X, Yin W (2011) Expression profiles of precursor and mature microRNAs under dehydration and high salinity shock in *Populus euphratica*. *Plant Cell Rep* 30:1893–1907
- Ramachandran V, Chen X (2008) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* 321:1490–1492
- Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* 49:592–606
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human *HOX* loci by noncoding RNAs. *Cell* 129:1311–1323
- Ruiz-Ferrer V, Voinnet O (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 60:485–510
- Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC (2007) Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev* 21:1603–1608
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002) *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7:487–491
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37:501–506
- Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C (2008) Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44:31–38
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reilly AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambrose C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddeloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112–1115
- Smith LM, Pontes O, Searle I, Yelina N, Yousafzai FK, Herr AJ, Pikaard CS, Baulcombe DC (2007) An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:1507–1521
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434–1437
- Song Y, Wu K, Dhaubhadel S, An L, Tian L (2010) *Arabidopsis* DNA methyltransferase AtDNMT2 associates with histone deacetylase AtHD2s activity. *Biochem Biophys Res Commun* 396:187–192
- Sridha S, Wu K (2006) Identification of *AtHD2C* as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 46:124–133
- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2001–2019
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 12:301–309
- Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C (2009) Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* 462:799–802
- Talmor-Neiman M, Stav R, Klipcan L, Buxdorf K, Baulcombe DC, Arazi T (2006) Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis. *Plant J* 48:511–521
- To TK, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo T, Kakutani T, Toyoda T, Kimura H, Yokoyama S, Shinozaki K, Seki M (2011) *Arabidopsis* HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genet* 7:e1002055
- Trindade I, Capitao C, Dalmay T, Fevereiro MP, Santos DM (2010) miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231:705–716
- Tuteja JH, Zabala G, Varala K, Hudson M, Vodkin LO (2009) Endogenous, tissue-specific short interfering RNAs silence the chalcone synthase gene family in *Glycine max* seed coats. *Plant Cell* 21:3063–3077
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* 51:1821–1839
- Vaucheret H (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* 13:350–358
- Vaucheret H (2009) AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One* 4:e6442
- Vaucheret H, Mallory AC, Bartel DP (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of *MIR168* and *AGO1* and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol Cell* 22:129–136
- Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert JL, Bartel DP, Crete P (2004) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell* 16:69–79
- Voinnet O (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* 13:317–328



- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669–687
- Vongs A, Kakutani T, Martienssen RA, Richards EJ (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 260:1926–1928
- Wang H, Zhang X, Liu J, Kiba T, Woo J, Ojo T, Hafner M, Tuschl T, Chua NH, Wang XJ (2011a) Deep sequencing of small RNAs specifically associated with *Arabidopsis* AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *Plant J* 67:292–304
- Wang T, Chen L, Zhao M, Tian Q, Zhang W (2011b) Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics* 12:367
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567–576
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2:E104
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005a) Expression of *Arabidopsis* *MIRNA* genes. *Plant Physiol* 138:2145–2154
- Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC (2005b) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12984–12989
- Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X (2006) HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 34:667–675
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307:932–935
- Zhang JF, Yuan LJ, Shao Y, Du W, Yan DW, Lu YT (2008) The disturbance of small RNA pathways enhanced abscisic acid response and multiple stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 31:562–574
- Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, Wang XJ, Qi Y (2007) A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21:1190–1203
- Zheng B, Wang Z, Li S, Yu B, Liu JY, Chen X (2009) Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 23:2850–2860
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247–273
- Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot* 61:4157–4168
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299:716–719