



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Phenotypic variation in plants

*Roles for epigenetics*

Lauss, K.

#### Publication date

2017

#### Document Version

Other version

#### License

Other

[Link to publication](#)

#### Citation for published version (APA):

Lauss, K. (2017). *Phenotypic variation in plants: Roles for epigenetics*.

#### General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

**Summary**

The characteristics of a plant are referred to as its phenotype. The features of a phenotype are primarily governed by the DNA of an individual (its genotype), the individual's environment and the interactions between these two. The DNA of a species, also called its genome, can change over generations through processes like mutations in the DNA sequence and large-scale rearrangements of the DNA. Particular spontaneous changes in the DNA sequence can be favorable in certain environments and allow plants to adapt to their local environment through natural selection. Such processes result in genotypic and phenotypic variation within a plant species.

Besides genetic, also epigenetic variation plays a role in variation in plant phenotypes. Epigenetics refers to chemical modifications of the DNA and the proteins (histones) associated with the DNA (the 'epigenome') and can influence gene activity in way that can be passed on through cell divisions and into following generations.

In this thesis we aim to contribute to the understanding of the complex relationship between epigenome and phenotype. Our major focus is on DNA methylation, a particular epigenetic modification that occurs on cytosine bases, one of the four components of DNA. Intensive DNA methylation is often associated with genomic regions that are inactive. We studied the role played by the epigenome in a phenomenon called heterosis, whilst focusing on particular phenotypic traits of *Arabidopsis thaliana* hybrids. A hybrid is the progeny of a cross between two parental lines that have a different genome and/or epigenome, and heterosis describes the superior or inferior performance of a hybrid as compared to its parents (i.e. the hybrid produces a higher yield of fruits than either of the parental lines). We created hybrids between parents with strong differences in DNA methylation but only few differences in DNA sequence and grew these hybrids together with their parents under identical

conditions, enabling us to study the effect of the epigenome on the plant phenotype. These so-called epigenetic hybrids (epiHybrids) displayed heterosis in various traits indicating that variation in the epigenomes of the parents is sufficient to cause heterosis. Moreover, we identified DNA sequence regions (candidate regions) that differ in epigenetic profile between the parents, and these candidate regions likely underly two of the heterotic phenotypes observed, i.e. shorter flowering time and increased plant height. On four of the epiHybrids and their parents, we performed molecular analysis. We studied the DNA methylation pattern and activity (RNA expression) of their entire genomes, and describe our observations at the previously identified candidate regions. We also report the occurrence of “communication” events between homologous DNA sequences on different chromosomes that have contrasting DNA methylation patterns. This for example resulted in DNA regions obtaining a similar DNA methylation profile as their homologous region. Such events are termed trans-chromosomal (de)methylation events. If trans-chromosomal (de)methylation events result in a heritable change in epigenetic profile, it is called paramutation.

Paramutation can result in non-Mendelian segregation patterns of phenotypes. Multiple cases of paramutation have been described in a variety of organisms. In this thesis, we studied paramutation at the *b1* gene of maize. The *b1* gene is involved in the anthocyanin pigmentation pathway, which regulates (purple) plant pigmentation in maize. The two *b1* gene versions (alleles) that engage in paramutation are termed *B'* and *B-l*. They have the same DNA sequence but vary in their epigenetic modifications, meaning they are epigenetically different alleles (epialleles). In *B-l*, the *b1* gene is more highly expressed than in *B'*, causing strong purple pigmentation in *B-l* plants and little purple pigmentation in *B'* plants. This difference in gene expression is due to differences between the two alleles in epigenetic modifications at a regulatory DNA sequence.

---

The regulatory sequence in *B'* is subject to high DNA methylation as well as repressive modifications at its surrounding histone proteins while in *B-I* the sequence exhibits lower DNA methylation and activating modifications at its histone proteins. Upon combining these two alleles in a cross between a *B'* and a *B-I* plant, the paramutation process occurs: *B-I* heritably acquires the epigenetic pattern of *B'*, resulting in light purple plants.

The mechanism behind paramutation is ill-understood. Most evidence points towards a model wherein small RNAs derived from the inducing (*B'*) allele act on the susceptible (*B-I*) allele and trigger its DNA methylation and silencing. The mechanism that is at the basis of this model is called RNA-dependent DNA Methylation (RdDM). This RdDM-based model of paramutation is being challenged by the observation that small RNAs, the presumed triggers of the process, are produced in seemingly similar quantities from *B'* and *B-I* alleles and even from an allele that does not undergo paramutation (neutral *b1* allele).

In this thesis, we aim to study the mechanism of paramutation by focusing on early steps of the paramutation process at the *b1* gene. Therefore, we performed DNA methylation analysis and small RNA sequencing in maize embryos. We identified an RdDM-targeted region at the regulatory element of the susceptible *B-I* allele that may well play a role in paramutation. And, we found that (in contrast with expectations) the regulatory element in *B'* does not show the classical features of an RdDM-targeted locus. Our results indicate that features of both epialleles, *B'* and *B-I*, are relevant for the occurrence of paramutation at the *b1* locus. We propose a model for how this may work.

In this thesis we studied the contribution of epigenetic variation to heterosis in Arabidopsis and the mechanism of paramutation in maize. Heterosis is a phenomenon heavily researched and exploited in crop breeding but not fully understood yet. While we demonstrate that

## Summary

---

epigenetic variation in parental lines can be sufficient for heterosis, definite answers on the underlying mechanism remain to be elucidated in future research. There are indications that paramutation-phenomena play a role in certain heterotic phenotypes. Paramutation can occur between DNA regions with contrasting epigenetic profiles, and when generating a hybrid between plants having differences in their epigenomes, there are numerous of such DNA regions. A better understanding of the mechanisms underlying paramutation will elucidate the relevance of this phenomenon in heterosis and the role of paramutation in phenotypic variation in general, and it may allow to predict which regions in genomes are prone to paramutation.

In sum, we broaden the knowledge and appreciation of the role and mechanisms of epigenetics in the phenotypic variation in plants. But, the truth lies in the future.

---

**Samenvatting**

Het totaal van alle eigenschappen van een plant wordt zijn fenotype genoemd. De kenmerken van het fenotype worden voornamelijk bepaald door het DNA van de plant (genotype), de omgeving van de plant, en de interacties tussen deze twee factoren. Het DNA van een soort, ook wel genoom genoemd, kan veranderen door verscheidene processen, zoals mutaties in de DNA-basevolgorde en het vormen van nieuwe combinaties van chromosoomdelen. Sommige specifieke spontane veranderingen in de DNA-basevolgorde kunnen in bepaalde omstandigheden ten voordeel strekken. Zij geven de plantensoort de mogelijkheid zich aan te passen aan de plaatselijke omgeving middels natuurlijke selectie. Zulke processen leiden tot verschillen in zowel het genotype als het fenotype van plantensoorten.

Niet alleen veranderingen in de primaire basevolgorde van het DNA leiden tot variatie in een plant fenotype, ook zogenaamde epigenetische veranderingen dragen eraan bij. Met epigenetica wordt de chemische modificatie van het DNA en/of de eraan geassocieerde eiwitten (histonen) bedoeld (het 'epi-genoom'). Deze modificaties kunnen de genactiviteit beïnvloeden. Na celdeling kan deze informatie doorgegeven worden aan de volgende generatie.

In dit proefschrift willen we kennis opdoen over de complexe relaties tussen het epi-genoom en het fenotype. Wij richten ons op DNA-methylering, een specifieke epi-genetische modificatie die op de cytosine base (een bouwsteen van het DNA) kan voorkomen. DNA-methylering in een gebied in het genoom is meestal geassocieerd met inactiviteit van de DNA-basevolgorden die er in aanwezig zijn.

We bestudeerden de rol die het epigenoom speelt bij een verschijnsel dat heterose genoemd wordt. Dit deden we in *Arabidopsis thaliana* hybrides. Een hybride is het nageslacht van een kruising tussen twee plantensoorten die een verschillend genoom en/of epigenoom hebben. Men spreekt dan

## Samenvatting

---

van heterose als de hybride betere of slechtere eigenschappen heeft dan elk van beide ouders (bv. de hybride produceert meer fruit dan elk van beide ouders). We hebben hybrides gemaakt tussen planten die sterke verschillen in DNA-methylering hebben maar weinig verschillen in de DNA-basevolgorde. Deze hybrides worden ook wel epi-genetische hybrides genoemd (epi-hybrides). We hebben deze hybrides en hun ouders laten groeien onder uniforme omstandigheden. Zo konden we het effect van het epi-genoom op het fenotype van de plant bestuderen in afwezigheid van variabiliteit in omgevingsfactoren. We hebben verschillende heterose-effecten gevonden. Dit suggereert dat verschillen in het epi-genoom van de ouders volstaan voor het veroorzaken van heterose; genetische verschillen zijn niet nodig. We hebben ook de DNA-gebieden geïdentificeerd waar er verschillen in het epi-genoom tussen de planten waren. Deze gebieden herbergen waarschijnlijk genen wier expressie de kenmerken reguleren waarin we heterose vonden, namelijk kortere bloeitijd en grotere planthoogte. We kenschetsen ze daarom als 'kandidaatsgebieden'. Aan vier van de epi-hybrides en hun ouders hebben we moleculaire analyses verricht: We hebben het DNA-methyleringspatroon en de genactiviteit (in termen van RNA expressie) van het hele genoom gemeten en hier beschreven voor voornoemde kandidaatsgebieden. We namen verder een zekere communicatie waar tussen verschillende, maar homologe DNA-basevolgorden, welke oorspronkelijk verschilden in DNA-methyleringspatroon. De communicatie leidde er bijvoorbeeld toe dat DNA-gebieden vergelijkbare DNA-methyleringsprofielen kregen als de homologe gebieden al hadden. Zulke gebeurtenissen worden trans-chromosomale (de)methylering processen genoemd en heten paramutatie als ze leiden tot *erfelijke* veranderingen in het epi-genetische profiel.

Paramutatie kan leiden tot fenotypische effecten die niet volgens de Wetten van Mendel overerven. Er zijn verschillende gevallen van

paramutatie bekend. In dit proefschrift hebben we paramutatie van het *b1* gen in mais bestudeerd. Het *b1* gen is betrokken bij anthocyaan pigmentatie; het reguleert de paarse kleur in mais. De twee versies van het *b1* gen (allelen) die betrokken zijn bij paramutatie, worden *B'* en *B-1* genoemd. Ze hebben dezelfde DNA basevolgorde maar verschillen epi-genetisch (het zijn zogenaamde 'epi-allelen'). In *B-1* planten komt het *b1* gen sterker tot expressie dan in *B'* planten. Dit leidt tot nogal paarse pigmentatie in *B-1* planten en veel minder paarse pigmentatie in *B'* planten. Dit verschil in genexpressie gaat gepaard met epi-genetische modificatie van een regulerend stuk DNA: in *B'* bevat dit stuk regel-DNA veel methyleringen en wordt het omgeven door repressieve histonmodificaties. In *B-1* heeft dit stuk DNA juist weinig methylering en activerende histonmodificaties. Kruising van *B-1* met *B'* planten leidt tot een paramutatie proces: *B-1* neemt het epi-genetische patroon van *B'* over. Dit heeft slechts licht gepigmenteerde planten tot gevolg: het fenotype van *B'* wordt in alle nakomelingen gevonden.

De mechanismen achter paramutatie zijn niet helemaal duidelijk. Het meeste bewijs is er voor een model waarin kleine-RNAs, die afgeschreven worden van het inducerende *B'* allel, ervoor zorgen dat het vatbare *B-1* allel gemethyleerd en geïnactiveerd wordt. Het mechanisme waar dit model op gebaseerd is wordt 'RNA-gedreven DNA methylering' genoemd ('RdDM'). Echter, men heeft gerapporteerd dat het kleine RNA in gelijke hoeveelheden wordt geproduceerd in planten met het *B-1* allel, in planten met het *B'* allel, alsook in planten met een neutraal *b1* allel. Daarom lijkt dit model niet volledig.

In onze studie bestudeerden we daarom de mechanismen van paramutatie verder door ons te richten op de eerste stappen in dit proces bij het *b1* gen. Hiertoe hebben we DNA methyleringsanalyses en basevolgordebepalingen van klein-RNA uitgevoerd op mais embryo's. We identificeerden een gebied in de regulerende basevolgorde van het



vatbare *B-1* allel dat onderhevig is aan RdDM. Dit gebeid zou een rol kunnen spelen in de paramutatie. In tegenstelling tot de verwachtingen vonden we dat de regulerende basevolgorde in *B'* niet de klassieke eigenschappen heeft van een door RdDM gecontroleerd locus. Onze resultaten geven aan dat de eigenschappen van *beide* epi-allelen, dwz zowel van *B'* als van *B-1*, relevant zijn voor paramutatie van het *b1* locus.

In dit proefschrift en in het eraan ten grondslag liggende werk hebben we de effecten van epi-genetische variatie op heterose (in Arabidopsis) alsook mechanismen van paramutatie (in mais) bestudeerd. Het fenomeen van heterose wordt gebruikt bij het kweken van gewassen en is veel bestudeerd, maar nog onvolledig begrepen. Ondanks dat we konden laten zien dat epi-genetische variatie in planten voldoende is voor heterose, moet het onderliggende mechanisme nog verder bestudeerd en opgehelderd worden.

Er zijn aanwijzingen dat paramutatie een rol kan spelen bij heterose. Paramutatie kan voorkomen tussen DNA gebieden met verschillende epi-genetische profielen. Als hybrideplanten gemaakt worden door het kruisen van twee epi-genetisch verschillende planten, dan zijn er veel van dit soort gebieden. Een betere kennis van de voor paramutatie verantwoordelijke mechanismen is nodig voor het begrijpen van de effecten die bij heterose optreden, alsook voor het voorspellen welke gebieden vatbaar zijn voor paramutatie.

Kortom, we hebben kennis opgedaan van mechanismen waarmee epi-genetica het fenotype van planten mede kan bepalen. Meer toekomstig onderzoek zal echter de volledige waarheid boven water moeten halen.

Vertaald door Ilona Vuist

---

## Zusammenfassung

Der Phänotyp beschreibt die speziellen (oft visuellen) Eigenschaften einer Pflanze. Diese Eigenschaften werden durch die DNS eines Individuums (Genotyp), der Umwelt in der die Pflanze wächst und Interaktionen zwischen Genotyp und Umwelt, geformt. Die DNS, oder besser das Genom einer Spezies, kann sich über Generationen verändern, zum Beispiel durch Prozesse wie Umformungen im Genom oder Mutationen in der DNS Sequenz. Spezielle spontane Veränderungen in der DNS können in einer bestimmten Umgebung von Vorteil sein. Dies ermöglicht Pflanzen sich speziell an ihre lokale Umwelt anzupassen (durch "Natürliche Selektion"). Neben genetischen Faktoren spielen auch epigenetische Faktoren eine Rolle in der Variation von Pflanzen Phänotypen. Epigenetik beschreibt chemische Modifikationen an der DNS und an Proteinen (Histonen) die mit der DNS assoziiert sind (das "Epigenom"). Epigenetische Veränderungen können die Aktivität von Genen beeinflussen, in einer Weise die an Tochterzellen und sogar in folgende Generationen weitergegeben werden kann.

Mit dieser Doktorarbeit, wollten wir einen Beitrag zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Epigenome und Phänotyp leisten. Unser Fokus liegt auf DNS Methylierung, einer bestimmten epigenetischen Modifikation die an einem der Bausteine der DNS (Cytosin-Basen) stattfindet. Intensive DNS Methylierung ist häufig an inaktiven genomischen Regionen zu finden.

Wir erforschten die Rolle der Epigenetik in dem Phänomen der Heterosis. Dafür analysierten wir bestimmte phänotypische Eigenschaften von *Arabidopsis thaliana* Hybriden. Ein Hybrid ist der Nachkomme einer Kreuzung von Eltern mit verschiedene Genomen und Epigenomen. Heterosis beschreibt Hybriden die, im Vergleich zu den Elternteilen, eine erhöhte/ erniedrigte Leistungsfähigkeit in bestimmten Merkmalen aufweisen, zum Beispiel, wenn der Hybrid mehr Ertrag produziert als die

## Eltern-Linien.

Wir kreierten Hybriden von Eltern-Linien die ausgeprägte Unterschiede in DNS Methylierung aufwiesen, sich aber in ihrer DNS Sequenz kaum unterschieden. Diese epigenetischen Hybriden ("epiHybriden"), ließen wir, zusammen mit den Eltern-Linien, in identischen Wachstums-Bedingungen aufwachsen. Dadurch bekamen wir die Möglichkeit (hauptsächlich) epigenetische Effekte auf Phänotypen zu analysieren. Diese epiHybriden zeigten Heterosis-Effekte in diversen Merkmalen, was darauf hinwies, dass unterschiedliche Epigenome in Eltern-Linien ausreichend sind um Heterosis zu verursachen. Außerdem konnten wir Regionen in der DNA mit unterschiedlichen epigenetischen Merkmalen identifizieren, die wahrscheinlich zu den beobachteten Heterosis-Effekten in Blüte-Zeit und Pflanzen-Höhe, beitragen.

Vier epiHybriden und deren Eltern erforschten wir auch auf molekularer Ebene. Wir analysierten DNA Methylierungsmuster und (Gen) Aktivität (RNA Expression) im gesamten Genom und wir beschrieben unsere Beobachtungen an den vorher identifizierten Kandidaten-Regionen. Des weiteren, beschreiben wir "Kommunikation" zwischen homologen DNA Sequenzen auf unterschiedlichen Chromosomen mit verschiedenen DNA Methylierungsmustern. Dies führt dazu, dass die empfängliche homologe DNS Region dasselbe DNS Methylierungsmuster erhält, wie die induzierende homologe Region. Solche Prozesse werden "trans-chromosomale (De) Methylierung" genannt. Wenn trans-chromosomale (De) Methylierungen zu vererbaren Veränderungen im epigenetischen Muster führen, fallen sie in die Kategorie Paramutation.

Paramutation kann in nicht-mendelischen Segregierungsmustern von Phänotypen resultieren. Diverse Fälle von Paramutation wurden in vielen Organismen beschrieben. In dieser Doktorarbeit, erforschten wir Paramutation am *b1* Gene von Mais.

---

Das *b1* Gen ist in Anthocyanen-Pigmentierung (violett) von Mais Pflanzen involviert.

Die zwei *b1* Gene Versionen (Allele) an denen Paramutation passiert heißen *B'* und *B-1*. Diese haben dieselbe DNA Sequenz aber unterschiedliche epigenetische Modifikationen. Das heißt es sind epigenetisch unterschiedliche Allele (epiAllele). Das *b1* Gen ist höher exprimiert in *B-1* als in *B'* was eine intensive violette Pigmentierung in *B-1* Pflanzen und eine niedrige violette Pigmentierung in *B'* Pflanzen verursacht.

Die Unterschiede in der Gen Expression sind das Ergebnis von unterschiedlichen epigenetischen Modifikationen an einem Regulierungselement in den Allelen. Dieses Element ist stark methyliert an seiner DNA in *B'* aber weniger methyliert in *B-1*. Wenn diese zwei Allele während einer Kreuzung zwischen *B'* und *B-1* Pflanzen kombiniert werden passiert Paramutation: *B-1* erhält das epigenetische Muster von *B'* was niedrige violette Pflanzen-Pigmentierung in der Pflanze (mit dem veränderten *B-1*) verursacht. Diese Veränderung im epigenetischen Muster von *B-1* ist vererbbar.

Der Mechanismus der Paramutation ist nicht komplett verstanden. Die meisten Beweise führen zu einem Model in dem kleine regulatorische RNS von *B'* auf *B-1* agieren und seine DNA-Methylierung verursachen. Dieses Model basiert auf dem Prozess der "RNS-abhängigen DNS Methylierung (RaDM)": Das RaDM-Model für Paramutation.

Es gibt allerdings Diskrepanzen zwischen einigen experimentelle Beobachtungen und diesem Model: Kleine regulatorische RNS, die Moleküle die den Prozess initiieren, werde nicht nur von *B'* sondern auch (in vergleichbaren Mengen) von *B-1* produziert, und sogar auch von einem ähnlichen Allele das keine Paramutation erfahren kann.

In dieser Doktorarbeit, erforschten wir auch den Mechanismus von Paramutation indem wir uns auf die frühen Stadien des Prozesses am *b1*

## Zusammenfassung

---

Gen fokussierten. Wir analysierten DNS Methylierung und kleine regulatorische RNS in Mais Embryonen. Dabei entdeckten wir eine RdDM-Region am regulatorischen Element von *B-1* die möglicherweise eine Rolle bei Paramutation spielt.

Weiters fanden wir keine klassischen Eigenschaften von RdDM-Regionen an dem regulatorischen Element von *B'* (entgegen unseren Erwartungen). Unsere Ergebnisse implizieren das Eigenschaften von beiden Allelen, *B'* und *B-1*, relevant sind für den Paramutationsprozess am *b1* Gen.

In dieser Doktorarbeit erforschten wir auch den Beitrag von Epigenetik zu Heterosis in Arabidopsis.

Heterosis ist ein Phänomen das bereits intensiv erforscht wurde und extensiv in der Pflanzenzucht genützt wird. Nichtdestotrotz, ist das Phänomen nicht vollständig erklärbar. Wir zeigten hier das epigenetische Unterschiede in Eltern-Linien ausreichen um Heterosis zu verursachen, aber definitive Antworten zu dem Mechanismus der zu Heterosis führt müssen durch zukünftige Forschung gegeben werden. Es gibt Indizien das Paramutations-Phänomene eventuell eine Rolle in bestimmten Heterosis Phänotypen spielen könnten. Paramutation passiert an DNA Regionen mit unterschiedlichen epigenetischen Mustern und die Erzeugung von Hybriden kreiert viele solche Situationen. Ein besseres Verständnis vom Mechanismus hinter Paramutation könnte Fragen zur Relevanz von Paramutation in Heterosis, aber auch Phänotypischer Variation generell liefern. Ein Ziel für zukünftige Forschung liegt in der Vorhersage von Regionen in Genomen die Paramutation erfahren könnten.

In Summe, erweitern wir das Wissen und die Wertschätzung der Rolle von Epigenetik in Pflanzen Phänotypen.