

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Establecimiento de herramientas moleculares para el estudio de la participación del complejo de metiltransferasa de mRNA en el crecimiento y desarrollo de *Marchantia polymorpha*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**QFB. Omar Guillermo Rosas Bringas**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. José Luis Reyes Taboada  
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Elizabeth Córdoba Martínez  
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**Dr. Enrique Merino Pérez  
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**Cuernavaca, Morelos, Septiembre 2020**



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.

## Agradecimientos

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Enrique Merino Pérez y la Dra. Elizabeth Córdoba Martínez.

A la Unidad de Transformación y Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología de la UNAM y al M. en C. Carlos Chávez por la asesoría brindada durante el proyecto.

A la Biol. Rosa María Solorzano por el apoyo técnico durante mi proyecto de Maestría.

Al Dr. Eduardo Sandoval Sánchez por la asesoría a distancia para la implementación de las condiciones de crecimiento de *Marchantia polymorpha*.

A Maura Qin de empresa *Shenzhen Liweida Optoelectronics Co., Ltd*, por la asesoría para la compra, instalación y uso de lámparas de rojo lejano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para los estudios de Maestría en el Posgrado de Ciencias Bioquímicas (No. de registro de CVU: 488918).

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONACYT FC-2015-184.

# Índice General

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
Modificaciones químicas en el flujo de la información genética.....	3
N <sup>6</sup> -metiladenosina en mRNA como mecanismo de regulación post-transcripcional.....	5
Complejo metiltransferasa de m <sup>6</sup> A en mRNA.....	7
Proteínas con actividad de desmetilasa que remueven a m <sup>6</sup> A de mRNAs.....	10
Proteínas que reconocen a m <sup>6</sup> A en mRNA y sus funciones biológicas.....	11
Modificación post-transcripcional por m <sup>6</sup> A en plantas.....	13
Patrón de distribución de m <sup>6</sup> A en el transcriptoma de <i>A. thaliana</i> .....	13
Metiltransferasas, desmetilasas y proteínas efectoras en plantas.....	15
<i>Marchantia polymorpha</i> : un modelo para estudiar la evolución temprana de las plantas.....	19
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
PRINCIPAL.....	24
ESPECÍFICOS.....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
Identificación de los genes y análisis filogenético.....	25
Análisis de promotores.....	25
Cultivo axénico y condiciones de crecimiento para <i>M. polymorpha</i> .....	25
Condiciones para la generación de estructuras reproductivas de <i>M. polymorpha</i> y la formación del esporófito.....	26
Aseptización de esporas.....	27
Extracción de RNA y PCR cuantitativo en tiempo real.....	27
Construcción de los vectores binarios.....	28
Transformación de germinados de esporas <i>M. polymorpha</i> mediante <i>Agrobacterium</i> .....	29
Genotipificación por PCR de talos masculinos y femeninos.....	30
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>

Identificación de los genes homólogos del complejo de metiltransferasa en <i>M. polymorpha</i> .....	32
Análisis <i>in silico</i> de los promotores de genes relacionados al complejo de metiltransferasa de m <sup>6</sup> A en RNA mensajero en <i>A. thaliana</i> y <i>M. polymorpha</i> .....	34
Generación de un cultivo axénico y establecimiento de condiciones de crecimiento para <i>M. polymorpha</i> .....	38
Establecimiento de las condiciones para el crecimiento de la fase reproductiva de <i>M. polymorpha</i> .....	39
Acumulación de transcritos de los genes que codifican para las sub-unidades del complejo de metiltransferasa de m <sup>6</sup> A de mRNA en <i>M. polymorpha</i> .....	43
La metodología de transformación de gemas de <i>M. polymorpha</i> mediante <i>Agrobacterium</i> no genera líneas transgénicas estables.....	44
Generación de líneas transgénicas que dirigen un microRNA artificial contra <i>MpMTA</i> , <i>MpWTAP</i> y <i>MpMTB</i> usando talos inmaduros desarrollados a partir de esporas.....	50
Diseño de micros RNAs artificiales para <i>M. polymorpha</i> .....	50
Transformación de germinados de esporas de <i>M. polymorpha</i> mediante <i>Agrobacterium</i> ....	53
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
El complejo de metiltransferasa se encuentra conservado en Briofitas.....	61
Las regiones promotoras de los genes del complejo de metiltransferasa poseen una gran variedad de elementos <i>cis</i> que corresponden a diferentes tejidos y responden a diferentes condiciones.....	62
Establecimiento de las condiciones de crecimiento para <i>M. polymorpha</i> .....	64
Genes identificados en la vía de metilación m <sup>6</sup> A presentan una mayor acumulación de transcritos en estructuras reproductivas sexuales.....	66
La transformación de <i>M. polymorpha</i> por germinados de esporas para la generación de líneas transgénicas estables.....	68
Diseño de microRNAs artificiales para la generación de mutantes de <i>M. polymorpha</i> .....	71
Obtención de líneas transgénicas de los diferentes amiRNAs.....	72
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Modificaciones químicas reversibles que regulan el flujo de la información genética.....	3
Figura 2.- Modificaciones químicas en mRNA eucarionte.....	5
Figura 3.- Perfil de distribución de m <sup>6</sup> A en mRNA eucarionte.....	7
Figura 4.- Diversas funciones moleculares de m <sup>6</sup> A.....	9
Figura 5.- Destino de los mRNA dependiendo de la región en donde se ubique la marca de metilación m <sup>6</sup> A y/o las proteínas efectoras que la reconozcan.....	13
Figura 6.- Patrones de distribución de m <sup>6</sup> A a lo largo de los transcritos en <i>A. thaliana</i> .....	14
Figura 7.- Efecto de la reducción de m <sup>6</sup> A en mRNA en <i>A. thaliana</i> .....	16
Figura 8.- La actividad del promotor de MTA está limitada a tejidos en desarrollo en <i>A. thaliana</i> ..	16
Figura 9.- Fenotipos por la pérdida de la función de FIP37 en <i>A. thaliana</i> .....	17
Figura 10. La modificación m <sup>6</sup> A en mRNA regula diversos procesos en el desarrollo de la planta..	19
Figura 11. Inferencias filogenéticas de clados principales.....	20
Figura 12.- Diferentes etapas de crecimiento de <i>M. polymorpha</i> .....	21
Figura 13.- Ciclo de vida de <i>M. polymorpha</i> .....	23
Figura 14.- Árbol filogenético con las proteínas que presentan el dominio MT-A70 en plantas y otros organismos.....	34
Figura 15.- Representación gráfica de la ubicación de probables elementos en <i>cis</i> en los promotores de los genes que codifican para las proteínas del complejo de metiltransferasa m <sup>6</sup> A en RNA mensajeros.....	37
Figura 16.- Generación del cultivo axénico de <i>M. polymorpha</i> .....	38
Figura 17.- Estructuras reproductivas masculinas de <i>M. polymorpha</i> .....	40
Figura 18.- Efecto de la intensidad de luz roja lejana en el desarrollo y crecimiento de <i>M. polymorpha</i> .....	41
Figura 19. Formación del esporófito de <i>M. polymorpha</i> .....	42
Figura 20. Seguimiento de la germinación de las esporas de <i>M. polymorpha</i> .....	42
Figura 21. Análisis cuantitativo por RT-PCR de los genes relacionados a la vía de metilación m <sup>6</sup> A relativo a <i>MpEF1a</i> en distintas etapas de crecimiento de <i>M. polymorpha</i> .....	44
Figura 22.- Efecto de la presencia de MSO durante la selección de plantas transformadas por el método de agar-trap en gemas de <i>M. polymorpha</i> .....	46

Figura 23. Gemas de <i>M. polymorpha</i> TAK-I antes y después de agregar la solución de selección con 10 µg/mL de higromicina a las placas con el medio Gamborg.....	47
Figura 24. Selección de <i>M. polymorpha</i> en presencia de G418 posterior a la transformación mediante el uso de Agar-Trap de gemas.....	48
Figura 25. Aparente resistencia al antibiótico Kanamicina posterior a la transformación de gemas de <i>M. polymorpha</i> .....	49
Figura 26. Fenotipo de las plantas Tak-1 con <i>MpWTAP::EGFP-GUS</i> que habían presentado aparente resistencia a kanamicina, y que fueron crecidos posteriormente con el antibiótico G-418.....	50
Figura 27. Diseño de amiRNAs para <i>M. polymorpha</i> .....	52
Figura 28. Localización de los tres amiRNAs independientes diseñados para cada una de los transcritos de los genes blanco <i>MpMTA</i> , <i>MpWTAP</i> y <i>MpMTB</i> .....	53
Figura 29. Ensayos de transformación de esporas de <i>M. polymorpha</i> .....	54
Figura 30. Generación de plantas transgénicas resistentes al antibiótico higromicina mediante la transformación de germinados de esporas de <i>M. polymorpha</i> .....	55
Figura 31. Obtención de plantas resistentes en la segunda ronda de selección con Higromicina con el protocolo de transformación de germinados de esporas.....	56
Figura 32. Ejemplo de la genotipificación para identificar el sexo de las líneas independientes transgénicas de <i>M. polymoprha</i> .....	57
Figura 33. Establecimiento de las líneas isogénicas usando gemas.....	58
Figura 34. Comparación de los fenotipos por la sobre-expresión de <i>MpMIR160</i> , usado como control de expresión de amiRNA y como control para las condiciones de crecimiento.....	59
Figura 35. Crecimiento de talos provenientes de plantas transgénicas independientes que fueron transformadas con el vector de expresión de amiRWTAP.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-Identificación de las proteínas homólogas que conforman el complejo de metilación de m <sup>6</sup> A.....	32
Tabla 2-Análisis de los elementos en <i>cis</i> de las regiones promotoras de MTA y WTAP en <i>A. thaliana</i> y <i>M. polymorpha</i> .....	35

## RESUMEN

La N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) ha sido identificada como la modificación más abundante en mRNAs eucariontes y RNA largos no codificantes. Esta modificación es dinámica, al ser modulada por proteínas como metiltransferasas, desmetilasas y de reconocimiento; además, participa en varios aspectos celulares y funciones moleculares, incluyendo la traducción, estabilidad y maduración del RNA. La metiltransferasa de m<sup>6</sup>A es un complejo multiproteico compuesto principalmente por METTL3, METTL4 y WTAP. En la planta *A. thaliana*, la eliminación de WTAP ha revelado que m<sup>6</sup>A participa en el control de las células del meristemo apical del brote, y al igual que las mutantes nulas de *mettl3*, exhiben un fenotipo embrionario-lethal. Se ha reportado que existen 13 proteínas que presentan el dominio de reconocimiento a m<sup>6</sup>A. Lo anterior dificulta llevar a cabo estudios para determinar con exactitud la participación de la metilación en el desarrollo de *Arabidopsis*. Las Briofitas son consideradas como el grupo de las plantas basales, en las que destaca la hepática *Marchantia polymorpha* que es considerada como un nuevo modelo en el estudio de las plantas por la disponibilidad de su genoma, herramientas moleculares disponibles, rápido crecimiento y su poca redundancia génica que la convierten en un modelo versátil para el estudio de preguntas evolutivas, celulares y moleculares. Por estas razones, proponemos utilizar a *M. polymorpha* como un modelo de estudio de la metilación m<sup>6</sup>A, sin embargo, para lograrlo es necesario establecer el modelo en el laboratorio. En el presente trabajo nos dedicamos al acondicionamiento correcto de todas las etapas de crecimiento de *M. polymorpha* junto con los protocolos que son esenciales para cualquier estudio. Al mismo tiempo implementamos la metodología de transformación de germinados de espора mediante *Agrobacterium*, ya que la transformación por gemas no dio resultados positivos. Se identificaron los genes homólogos del complejo metiltransferasa y solamente 3 genes relacionados al reconocimiento de m<sup>6</sup>A, lo que disminuye los problemas de redundancia génica en comparación con otras plantas. La acumulación de transcritos nos sugiere que la metilación pueda tener una participación relevante en las estructuras reproductivas sexuales. Esperamos que este trabajo, que incluye la recopilación y adaptación de protocolos, permitan continuar el estudio de la metilación de m<sup>6</sup>A y otras preguntas con *M. polymorpha* en el laboratorio.

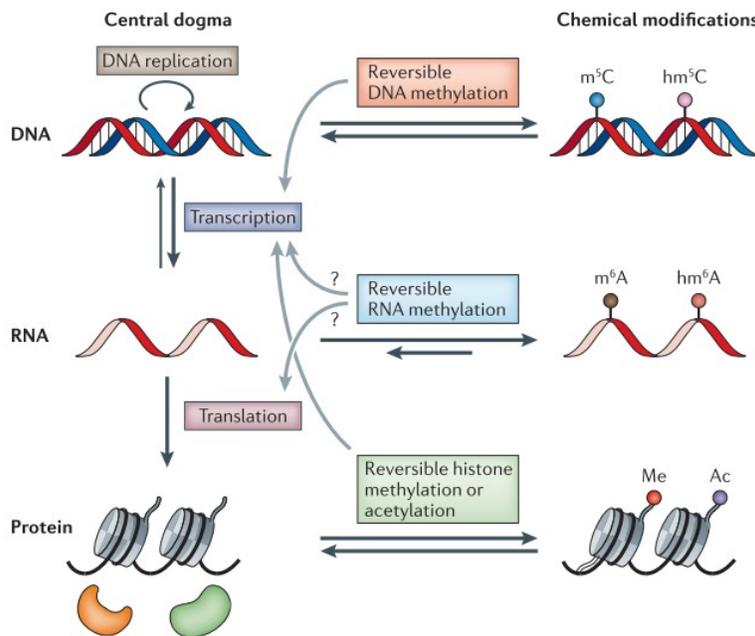
## ABSTRACT

N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) has been identified as the most abundant modification in eukaryotic messenger RNA and long non-coding RNA. This modification is dynamic, as it is modulated by methyltransferase, demethylase and recognition proteins; furthermore, influences many aspects of cell and molecular function, including RNA translation, stability and maturation. The m<sup>6</sup>A methyltransferase is a multi-component complex comprising mainly by METTL3, METTL14 and WTAP. In the plant *A. thaliana*, elimination of WTAP has revealed that m<sup>6</sup>A participates in the control of shoot stem cell fate, and the same as the *mettl3* null mutant, exhibits embryonic lethality; moreover, it has been reported 13 proteins that contains the m<sup>6</sup>A recognition domain. The above makes difficult to carry out studies to exactly determine the methylation involvement in the plant development. The Bryophytes are considered as the group of basal plants, in which the liverwort *Marchantia polymorpha* stands out as a novel model in the plant fields due to the genome access, available molecular tools, fast growth and little genetic redundancy turning it into a versatile model suitable to address evolutionary, cellular and molecular questions. For those reasons, we propose use *M. polymorpha* as a model to m<sup>6</sup>A studies, nevertheless to make this possible, is necessary to establish the model in the laboratory. In the present work, we dedicate to fitting-out the conditions for all *M. polymorpha* growth stages joined with the protocols that are essentials for it study. Simultaneously, we implemented the Agrobacterium-mediated transformation from sporelings meanwhile the gemmae transformation did not show positive results. We identified methyltransferase homologous genes and only 3 genes related to m<sup>6</sup>A recognition, decreasing the genetic redundancy compared to other plants. The transcript accumulation suggests us that the methylation could be more relevant in the sexual reproductive structures. We hope this work, which include a set and adaptation of protocols, could allow to continue the m<sup>6</sup>A methylation study and carry out other questions with *M. polymorpha* in the laboratory.

# INTRODUCCIÓN

## Modificaciones químicas en el flujo de la información genética.

El dogma central de la biología molecular implica que la información genética, DNA, se hereda y tiene un flujo de información a RNA, el cual posteriormente es traducido a proteína (**Figura 1**). Estas biomoléculas son cruciales en los sistemas biológicos para la transferencia y expresión de la información genética. Además, tanto en el DNA como las proteínas histonas y el RNA, pueden presentar modificaciones químicas reversibles y dinámicas que están involucradas en la regulación de la expresión génica (Kohli y Zhang 2013). Se han encontrado más de cien modificaciones químicas en los RNAs de eucariontes que pueden impactar en los diferentes procesos bioquímicos y biológicos (Cantara et al. 2011; Machnicka et al. 2013, He 2010). Muchas son particularmente abundantes en los RNA de transferencia (tRNA), afectando la traducción (Agris 2015; Phizicky y Hopper 2015; F.-Y. Wei et al. 2015).

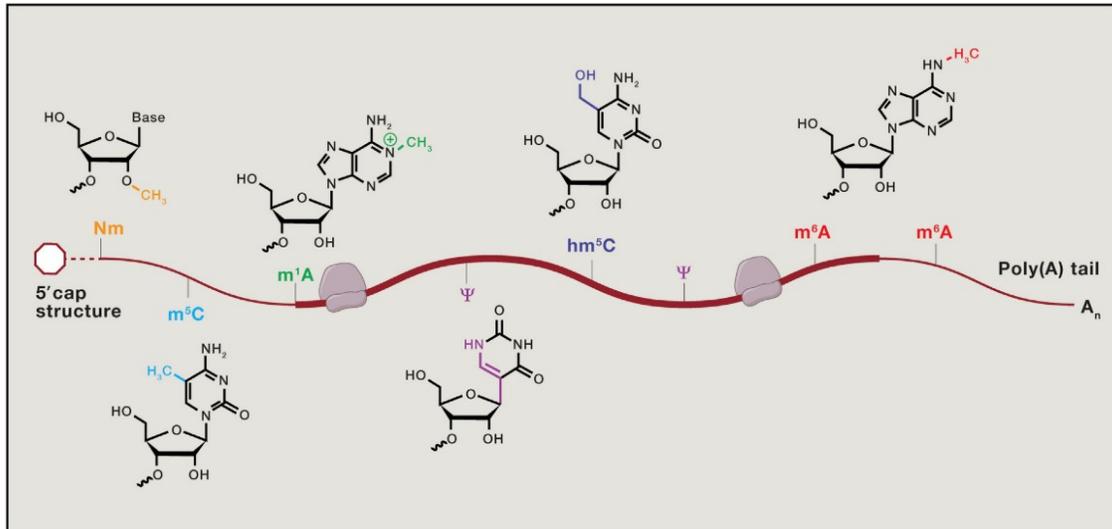


**Figura 1.- Modificaciones químicas reversibles que regulan el flujo de la información genética.** En el dogma central, la información genética se transfiere a partir de DNA al RNA, y posteriormente a proteínas. Las modificaciones epigenéticas del DNA y las modificaciones de histonas tienen una participación importante en la regulación de la diferenciación y desarrollo celular. Las modificaciones reversibles de RNA (por ejemplo, la N<sup>6</sup>-metiladenosina y N<sup>6</sup>-hidroximetiladenosina) agregan un nivel adicional en la regulación dinámica de los procesos biológicos (Fu et al. 2014).

En el caso particular de los RNA mensajeros (mRNA), la N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) es la modificación más abundante con un promedio de uno a tres sitios metilados por transcrito; además existen otras modificaciones como la 7-metilguanilato (m<sup>7</sup>G) denominada como 5'cap y la poliadenilación en 3'-UTR que se encuentran en los mRNA y que presentan actividades reguladoras. En la **Figura. 2**, se esquematizan las diferentes modificaciones químicas en los mRNA.

Algunas de las modificaciones que se han descrito hasta el momento para diferentes RNAs, incluyendo mRNA, son:

- **N<sup>1</sup>-metiladenosina (m<sup>1</sup>A).** Es una modificación que se ha descrito que regula la estructura y estabilidad de tRNAs y rRNAs (Helm, Giegé, and Florentz 1999; Sharma et al. 2013). Estudios han mostrado su presencia en mRNAs también (Dominissini et al. 2016). Su distribución es única en la proximidad de los sitios de inicio de la traducción y en el primer sitio de *splicing*. Aunque su función permanece incierta, se ha descrito que promueve la traducción de mRNAs.
- **5-Metilcitosina (m<sup>5</sup>C).** Existe en mRNAs eucariontes en niveles inferiores que m<sup>6</sup>A. Sus implicaciones biológicas no se han descrito, sin embargo, sus derivados oxidados 5-hidroxi-metilcitosina y 5-formilcitosina, participan en la exportación al núcleo, en el desarrollo del cerebro y en la respuesta a infecciones (Huber et al. 2015; Delatte et al. 2016).
- **Pseudouridina  $\Psi$ .** Generada por la isomerización de la uridina, esta base modificada es relativamente abundante en rRNAs y tRNAs. Recientemente se ha identificado en mRNAs de eucariontes (Schwartz, Bernstein, et al. 2014; Carlile et al. 2014). La pseudouridina altera el apareamiento de bases, afectando la estructura del RNA y la recodificación mediante una regulación traduccional (Fernández et al. 2013).
- **2'-O-metilación (2'-OMe).** Es una modificación que reside en el grupo 2'-hidroxil de la ribosa de los cuatro ribonucleósidos. Se encuentra en la mayoría de los RNAs eucariontes junto con los mRNAs y puede inhibir la edición del RNA de Adenosina a Inosina de manera *in vitro* (Beal, Maydanovych, y Pokharel 2007).



**Figura 2.- Modificaciones químicas en mRNA eucariote.** Representación esquemática de las modificaciones químicas en transcritos de RNA eucariotes. Varias de estas modificaciones mapean únicamente en las regiones con la estructura 5' cap, 5' o 3'-UTR, o en regiones codificantes del transcrito (Roundtree et al. 2017).

Por mucho tiempo, las modificaciones en RNA han sido consideradas estáticas, sin embargo, se ha descubierto diversas proteínas que se encuentran involucradas en situar estas modificaciones en los RNAs, en su reconocimiento y la eliminación de las marcas, formando una regulación dinámica. Algunas de estas proteínas pueden compartirse entre modificaciones y llevar a cabo la regulación de diversos procesos bioquímicos y biológicos (Meyer y Jaffrey 2014; Kirchner e Ignatova 2015), al presentarse en distintas regiones de RNA, con una o varias modificaciones en diferentes grupos de transcritos, como una respuesta a distintas condiciones.

### **N<sup>6</sup>-metiladenosina en mRNA como mecanismo de regulación post-transcripcional.**

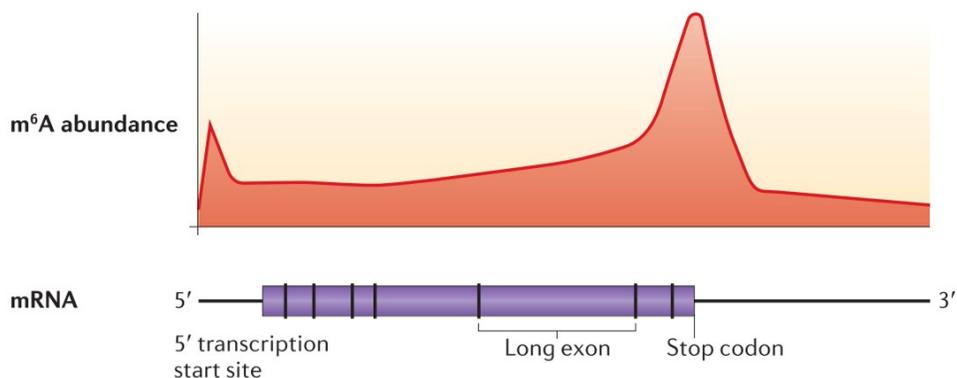
Una de las modificaciones más abundantes en el RNA es la metilación en el grupo amino de la posición 6 en la estructura de la adenosina (m<sup>6</sup>A), la cual ha sido identificada como una de las modificaciones más abundantes en mRNAs y en RNAs largos no codificantes (lncRNA) en eucariotes como levaduras, plantas, moscas y mamíferos (Krug, Broni, y Bouloy 1979; Beemon y Keith 1977; Horowitz et al. 1984; Joseph A. Bokar 2005; Jia et al. 2011). m<sup>6</sup>A también existe en otras clases de RNA de eucariotes como los RNAs pequeños nucleares (snRNAs), y tRNAs (Bjork et

al. 1987; Maden 1990; Shimba et al. 1995; Agris, Vendeix, and Graham 2007; Piekna-Przybylska et al. 2008), mientras que en bacterias y arqueas se encuentra en rRNAs.

Esta modificación presenta dos características importantes en su detección: 1) m<sup>6</sup>A es similar a Adenina, por lo cual se aparea con Timina y 2) m<sup>6</sup>A no es susceptible a las modificaciones químicas que permitan su detección. Por estas características, se han desarrollado métodos indirectos que implican el uso de anticuerpos para inmunoprecipitar el RNA con la metilación para posteriormente realizar una secuenciación masiva, lo que ha permitido la caracterización de esta modificación en los transcriptomas. Se ha observado que esta modificación química ocurre en el sitio consenso RRACH de los mRNA, donde R es cualquier purina y H es una base diferente a guanina. Este motivo de metilación fue determinado mediante los análisis de los metilomas de m<sup>6</sup>A en humanos, ratones (Dominissini et al. 2012; Meyer et al. 2012), levaduras (Schwartz et al. 2013b) y plantas (Li et al. 2014b; Luo et al. 2014), y se encuentra conservado en diversas organismos.

Se ha estimado que la proporción de m<sup>6</sup>A en mRNA aislado es de 0.1-0.4% de las adenosinas totales, lo cual representa aproximadamente 3-5 sitios de m<sup>6</sup>A por mRNA. La distribución de m<sup>6</sup>A en los transcriptomas analizados han mostrado que esta modificación no está distribuida equitativamente a lo largo del transcriptoma, sino que se encuentra enriquecida cerca del codón de paro y el 3'-UTR, en exones largos, y con menor abundancia en 5'-UTR (**Figura 3**). Algunos transcritos que presentan m<sup>6</sup>A están conservados entre humano y ratón (Batista et. al. 2014).

Diversos estudios han asociado la presencia de esta modificación con numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos, incluyendo la inmunoregulación (Li et al. 2017), la diferenciación y pluripotencia celular (Geula et al. 2015), el control del ciclo circadiano (Fustin et al. 2013), la meiosis en levaduras (Agarwala et al. 2012), el desarrollo en plantas (Bodi et al. 2012; Shen et al. 2016; Růžička et al. 2017), el desarrollo en pez cebra (Walser y Lipshitz 2011), las infecciones virales (Kennedy et al. 2016; Lichinchi et al. 2016), la obesidad (Jia et al. 2011) y la carcinogénesis (Wei et al. 2017; Wang et al. 2017).



**Figura 3.- Perfil de distribución de m<sup>6</sup>A en mRNA eucariote.** Perfiles transcriptómicos de humano y ratón de m<sup>6</sup>A en mRNA revelan que la metilación está enriquecida alrededor del codón de parada, en el 3'-UTR y en exones largos. El 5' cap contiene la modificación N<sup>6</sup>,2'-O-dimetiladenosina (m<sup>6</sup>Am), que puede también enriquecida por el anticuerpo específico a m<sup>6</sup>A (Fu et al. 2014).

### Complejo metiltransferasa de m<sup>6</sup>A en mRNA.

El establecimiento de m<sup>6</sup>A en mRNA es llevado a cabo por un complejo multiprotéico de metiltransferasa que fue identificado en un inicio por ensayos de metilación *in vitro* (Narayan y Rottman 1988). Dentro de este complejo multiprotéico, un elemento clave para llevar a cabo la metilación es la proteína metiltransferasa 3 (METTL3) que se ha identificado que presenta el dominio MT-A70, el cual puede interactuar con S-adenosil metionina (SAM) y transferir el grupo metilo a la adenosina (Bokar et al. 1997). METTL3 es parte de una familia de metiltransferasas dependientes de SAM que se encuentran altamente conservadas en mamíferos (Schapira 2016). Mediante análisis genéticos, se ha observado que la delección de *METTL3* en *A. thaliana* (Zhong et al. 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Agarwala et al. 2012), *Drosophila melanogaster* (Hongay y Orr-Weaver 2011) y en células de mamíferos (Dominissini et al. 2012; Wang et al. 2018), conduce a una disminución significativa o drástica de m<sup>6</sup>A en los mRNA. Cabe señalar que METTL3 no lleva a cabo la formación de m<sup>6</sup>A en rRNA o en snRNA (Shimba et al. 1995). Adicionalmente, se ha descrito que la proteína METTL3, además de su función como metiltransferasa, puede llevar a cabo el reconocimiento de la metilación y promover la traducción, independientemente de su actividad catalítica (Lin et al. 2016).

Análisis proteómicos de los interactores de METTL3 han mostrado que METTL14 es una proteína requerida para la adición de m<sup>6</sup>A (Liu et al. 2014b; Ping et al. 2014; Wang et al. 2014). METTL14 pertenece a la familia de metiltransferasas MT-A70; no obstante, presenta un dominio degenerado para la unión al SAM y no tiene la actividad catalítica de metiltransferasa. Las

estructuras cristalográficas del complejo METTL3-METTL14 han demostrado que METTL3 es la única proteína con unión a SAM y con la actividad catalítica (Śledź y Jinek 2016). A pesar de que METTL14 no transfiere el grupo metilo al mRNA, tiene un papel importante en la unión del SAM y del mRNA a partir de su interacción con METTL3, de esta manera participa en el posicionamiento del grupo metilo para transferir a la adenosina, potenciando la actividad enzimática del complejo (Śledź y Jinek 2016; Xiang Wang et al. 2016). Se ha observado que, similar a METTL3, METTL14 participa en diversos procesos biológicos. Se sabe que la ausencia de METTL14 causa un bloqueo en la auto-renovación de las células madre embrionarias, defectos en el desarrollo de embriones y defectos en la gametogénesis en animales (Wang et al. 2014; Geula et al. 2015; Lin et al. 2017), al igual que se encuentra involucrada en el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Cui et al. 2017).

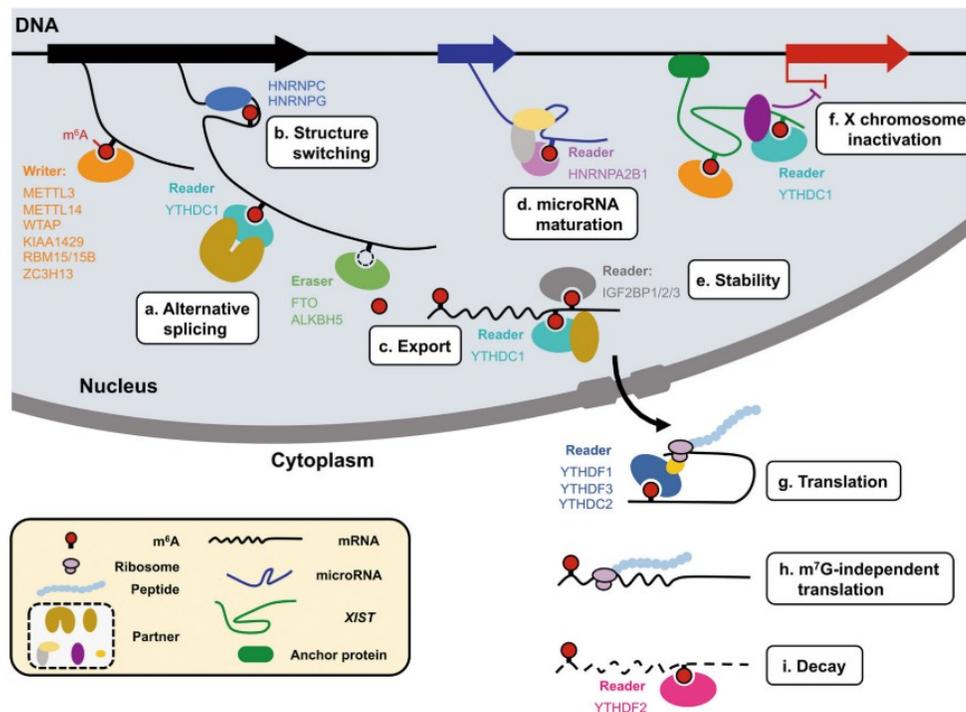
El tercer componente que forma el núcleo del complejo de metilación es la proteína WTAP, un factor de *splicing*. Inicialmente fue identificada por Fray y colaboradores en plantas, en donde fue nombrada como FIP-37 (Zhong et al. 2008) como proteína que interacciona con MTA (este último es el homólogo en *A. thaliana* de METTL3). Se sabe que esta proteína se une a la metiltransferasa, y se ha demostrado en levaduras y mamíferos que es esencial para la metilación en mRNA (Agarwala et al. 2012; Jianzhao et al. 2014b; Ping et al. 2014; Schwartz et al. 2014a). La principal función descrita de WTAP en el complejo de metiltransferasa, es el de actuar como una proteína de andamiaje que localiza a METTL3 y a METTL14 en dominios nucleares de regiones de intercromatina, y que se encuentran enriquecidos con factores de procesamiento de pre-mRNA (denominados '*nuclear speckles*') (Ping et al. 2014), facilitando la modificación de m<sup>6</sup>A. Se ha observado que la falta de WTAP causa la pérdida de localización de METTL3 y METTL14 en estos contextos, provocando una disminución de m<sup>6</sup>A en mRNA.

Si bien las proteínas METTL3, METTL14 y WTAP (**Figura 4**) forman el núcleo del complejo de metiltransferasa, el cual se encuentra altamente conservado en distintas especies (Liu et al. 2014a; Wang et al. 2014; Ping et al. 2014; Zhong et al. 2008), se han determinado actualmente otros interactores que forman parte del complejo, y que participan en la regulación de m<sup>6</sup>A.

La proteína KIAA1429 fue identificada como otro componente del complejo de metiltransferasa (Schwartz et al. 2014b), el cual interacciona con WTAP y regula el *splicing* alternativo de pre-mRNAs involucrados en la determinación del sexo en *Drosophila* (Ortega et al. 2003). Se ha observado que la ausencia de KIAA1429 disminuye cuatro veces los niveles de m<sup>6</sup>A en células

humanas A549 (Schwartz et al. 2014b), sugiriendo una participación regulatoria en el complejo de metiltransferasa.

Patil y colaboradores determinaron que la proteína RBM15 y su parólogo RBM15B, dirigen la metilación en los residuos de adenosina en mRNA y en el lncRNA XIST en humano (Patil et al. 2016). Mediante un análisis de inmunoprecipitación, se observó que RBM15/RBM15B se une y recluta al complejo METTL3-WTAP en sitios específicos para llevar a cabo la metilación por m<sup>6</sup>A, sugiriendo un mecanismo de activación selectiva del complejo de metiltransferasa hacia XIST, involucrado en la inactivación del cromosoma X. Su homólogo, Spenito (Nito) en *Drosophila* es necesario en el complejo metiltransferasa para la formación de m<sup>6</sup>A en mRNAs (Lence et al. 2016).



**Figura 4.- Diversas funciones moleculares de m<sup>6</sup>A.** En células eucariotas, los niveles de m<sup>6</sup>A en RNA son regulados de manera dinámica por las metiltransferasas y desmetilasas, y reconocida por las proteínas efectoras. La diversidad de los procesos celulares que involucran m<sup>6</sup>A resulta principalmente por la contribución de varios efectores. m<sup>6</sup>A nuclear modula el *splicing* alternativo, cambios en la estructura secundaria, exporte de mRNA, procesamiento de microRNAs, la estabilidad de mRNA y la inactivación del cromosoma X dependiente de XIST, mientras que m<sup>6</sup>A citoplasmático aumenta la eficiencia de traducción de mRNA y acelera el decaimiento de mRNA (Yang et al. 2018).

La proteína ZC3H13 es otro componente del complejo de metiltransferasa que regula la metilación. Se ha descrito que esta proteína es necesaria para la localización nuclear del complejo ZC3H13-WTAP-VIRILIZER y regula la auto-renovación de las células madre embrionarias mediante la metilación m<sup>6</sup>A (Wen et al. 2018). Esta actúa como un adaptador entre RBM15/Nito y WTAP promoviendo la metilación en mRNAs (Knuckles et al. 2018). En *Drosophila* su homólogo Xio, participa en la vía de determinación del sexo, participando en el control del *splicing* alternativo vía metilación m<sup>6</sup>A (Guo et al. 2018).

Existe otra proteína homóloga de METTL3, METTL16, que controla los niveles de SAM y lleva a cabo la formación de m<sup>6</sup>A en el snRNA U6 y en el mRNA de *MAT2A* que codifica a la S-adenosilmetionina sintetasa, generando una retroalimentación negativa en la homeostasis de SAM. Es una metiltransferasa que no interacciona con el complejo anteriormente descrito. La actividad de METTL16 se lleva a cabo en una secuencia y estructura específica. Aunque la modificación química es la misma (m<sup>6</sup>A) los sitios principalmente se encuentran localizados en intrones o enlaces exón-intrón, distintos a los sitios comunes de m<sup>6</sup>A marcados por METTL3-METTL14-WTAP (Mendel et al. 2018; Pendleton et al. 2017).

### **Proteínas con actividad de desmetilasa que remueven a m<sup>6</sup>A de mRNAs.**

La modificación m<sup>6</sup>A puede ser revertida a adenosina, de tal manera que se pueden controlar los procesos dependientes de la metilación. FTO, fue la primera proteína con actividad de desmetilasa de RNA identificada que remueve el grupo metilo de m<sup>6</sup>A en mRNA *in vitro* e *in vivo* (Fu et al. 2013; Jia et al. 2011). La proteína FTO pertenece a la familia de proteínas de ALKBH. FTO posee actividad de desmetilasa hacia m<sup>1</sup>A en tRNAs, m<sup>6</sup>Am (N<sup>6</sup>,2'-O-dimetiladenosina) en snRNA y en m<sup>6</sup>A internos y cap-m<sup>6</sup>Am en mRNA (J. Wei et al. 2018). Se ha observado que su ausencia promueve el crecimiento celular y la auto-renovación de las células madre en humanos, participa en la proliferación de tumores (Cui et al. 2017), además de regular la diferenciación de pre-adipocitos en ratón (Zhao et al. 2014).

ALKBH5 es la segunda desmetilasa de m<sup>6</sup>A identificada en mamíferos que participa en distintas funciones biológicas. ALKBH5 se encuentra localizada principalmente en sitios de procesamiento de RNA y afecta el exporte de mRNAs y el metabolismo de RNA de una manera dependiente de la

desmetilación de m<sup>6</sup>A (Zheng et al. 2013). Se ha observado que la ausencia de ALKBH5 en ratones disminuye la fertilidad masculina (Bartosovic et al. 2017), mientras que su sobre-expresión favorece la proliferación y tumorigénesis (Zhang et al. 2017). Ambas desmetilasas se han descrito en procesos como el *splicing* alternativo, el procesamiento de 3'-UTR, la estabilidad de mRNA, la traducción y en vías de respuesta a la ausencia de aminoácidos (Tang et al. 2018).

### **Proteínas que reconocen a m<sup>6</sup>A en mRNA y sus funciones biológicas.**

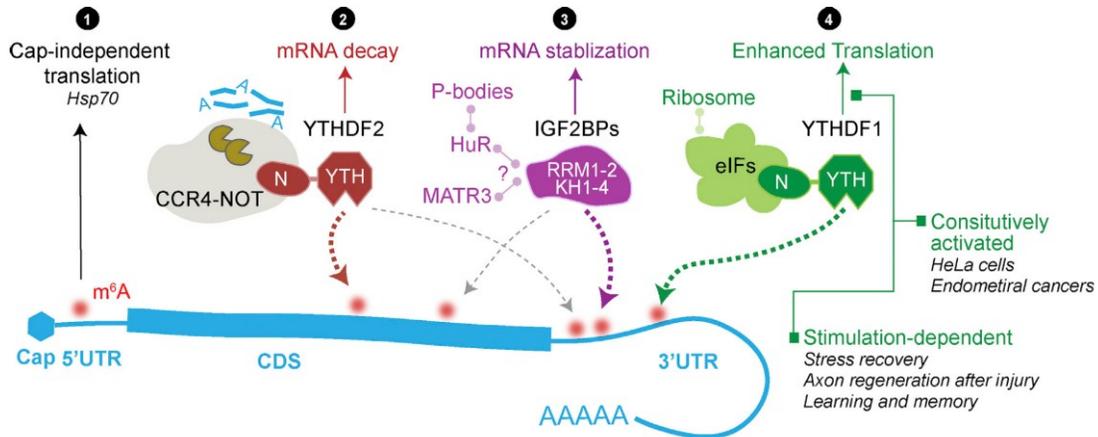
Una vez que los transcritos adquieren las marcas de metilación generadas por las metiltransferasas, se requiere de proteínas que reconozcan a los transcritos metilados en un contexto específico, lo cual impactará en la regulación post-transcripcional del metabolismo de los mRNA. En los últimos años se han identificado, mediante técnicas como inmunoprecipitación de RNA-proteína y espectrometría de masas, varias proteínas de unión a RNA (RBP, del inglés *RNA Binding Proteins*) que reconocen las marcas de m<sup>6</sup>A sobre los mRNA en animales (Dominissini et al. 2012; Xu et al. 2014; Arguello, DeLiberto y Kleiner 2017; Edupuganti et al. 2017; Wu et al. 2017) y que llevan a cabo distintas funciones biológicas (**Figura 4**).

La familia de las proteínas que contienen el dominio homólogo a YT521-B (YTH) fueron las primeras proteínas descritas que reconocían la metilación m<sup>6</sup>A. Esta familia se encuentra conformada en humanos por dos grupos, YTHDF-1-3 y YTHDC1-2, las cuales se han descrito como proteínas efectoras de la metilación m<sup>6</sup>A ya que presentan una afinidad de 10-50 veces más alta a mRNA metilados con m<sup>6</sup>A que a los mRNA no metilados (Hausmann et al. 2016; Theler et al. 2014; Zhu et al. 2014). YTHDF2, es una proteína citoplasmática que promueve la degradación de los transcritos blancos (Du et al. 2016; Wang et al. 2014); en cambio se sugiere que las proteínas YTHDF1 y YTHDF3 promueven la traducción de los transcritos blanco en células Hela mediante el reclutamiento de factores de inicio de la traducción (Shi et al. 2017; Wang et al. 2015). Por otro lado, la proteína nuclear YTHDC1, participa en la regulación del *splicing* alternativo (Xiao et al. 2016), en acelerar el transporte de mRNA (Roundtree, et al. 2017) y en promover el decaimiento de ciertos transcritos (Shima et al. 2017); mientras que YTHDC2 se encuentra involucrada en la estabilización y traducción de mRNA. Con lo que respecta a su importancia en los procesos biológicos, se ha observado que el reconocimiento de m<sup>6</sup>A es esencial para la esporulación en

*Saccharomyces cerevisiae* (Schwartz et al. 2013a), en la diferenciación de células madre embrionarias de ratón (Geula et al. 2015), en el desarrollo en pez cebra (B. S. Zhao et al. 2017), en regular la espermatogénesis (Hsu et al. 2017) y la ovogénesis, y desarrollo en *Drosophila* (Hongay y Orr-Weaver 2011).

Existe un grupo diferente de proteínas que reconocen, de manera directa o indirecta, a m<sup>6</sup>A que presentan dominios de unión a RNA (RBD del inglés, *RNA Binding Domain*) incluyendo dominios con homología K (KH), dominios de reconocimiento de motivos en RNA (RRM) y dominios ricos en arginina/glicina (RGG), los cuales se unen a RNA con m<sup>6</sup>A (Shi, Wei, y He 2019). Entre las proteínas que reconocen directamente a m<sup>6</sup>A en RNAs son las proteínas de unión a mRNA del factor de crecimiento 2 similar a la insulina 1-3 (IGF2BP1-3) y promueven su estabilidad, almacenaje y traducción (Nicastro, Taylor y Ramos 2015; Huang et al. 2018). Se ha descrito que el factor de iniciación eucarionte 3 (eIF3) promueve la traducción de mRNAs reconociendo la modificación m<sup>6</sup>A (Meyer et al. 2015). La presencia de m<sup>6</sup>A puede modificar la estructura local del RNA y consecuentemente modular las interacciones RNA-proteína, fenómeno que se ha denominado como “interruptor-m<sup>6</sup>A” (m<sup>6</sup>A-switch) (Liu et al. 2015). Entre este grupo de proteínas se encuentran las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (HNRNPs), las cuales regulan el *splicing* alternativo o el procesamiento de transcritos blanco mediante la unión de estructuras secundarias afectadas por la modificación m<sup>6</sup>A, en lugar de una unión directa al sitio metilado (Alarcón et al. 2015; Liu et al. 2015; Liu y Zhang 2018).

Se ha observado que las funciones de estas proteínas lectoras son dependientes del contexto celular en el cual se acumulen (**Figura 5**). Trabajos recientes han mostrado que la proteína YTHDF1 contribuye en la regulación de la traducción en procesos como el aprendizaje y memoria (Shi et al. 2018), en la cual la formación de recuerdos de largo plazo recae en la producción de nuevas proteínas, de las cuales los transcritos se encuentran metilados por m<sup>6</sup>A; del mismo modo este efecto se observa en la recuperación de un estrés por arsenito de sodio (Wang et al. 2015) y durante la regeneración de axones inducido por daño, en la cual los genes asociados a la regeneración se encuentran altamente metilados (Weng et al. 2018). También se sabe que en otros tipos celulares, YTHDF1 promueve la traducción constitutiva de los transcritos metilados (Liu et al. 2018).



**Figura 5.- Destino de los mRNA dependiendo de la región en donde se ubique la marca de metilación  $m^6A$  y/o las proteínas efectoras que la reconozcan.** (1) Regulación dependiente de la región: 5' UTR  $m^6A$  está ligado a una traducción independiente del cap. (2 y 3) Regulación dependiente por efector: YTHDF2 e IGF2BPs pueden afectar la estabilidad de los mRNA en direcciones opuestas. (4) Regulación dependiente por estímulos ejemplificado por YTHDF1 (Shi et al. 2019).

La metilación tipo  $m^6A$  en el transcriptoma es un proceso dinámico, en el cual existen rutas de señalización entre la metiltransferasa, las desmetilasas y las proteínas efectoras para llevar a cabo funciones específicas en un contexto celular determinado. Esto hace que sea una vía dinámica que responde a distintos estímulos, como por ejemplo en el desarrollo, en el cual las células se diferencian y proliferan para formar diferentes tejidos. Con una distinta regulación en la metilación de los transcritos y dada la diversidad de los tipos de reconocimientos de la metilación es posible observar que, en un mismo transcrito, la función será determinada por el contexto celular en el que se encuentre (Shi et al. 2019).

### Modificación post-transcripcional por $m^6A$ en plantas.

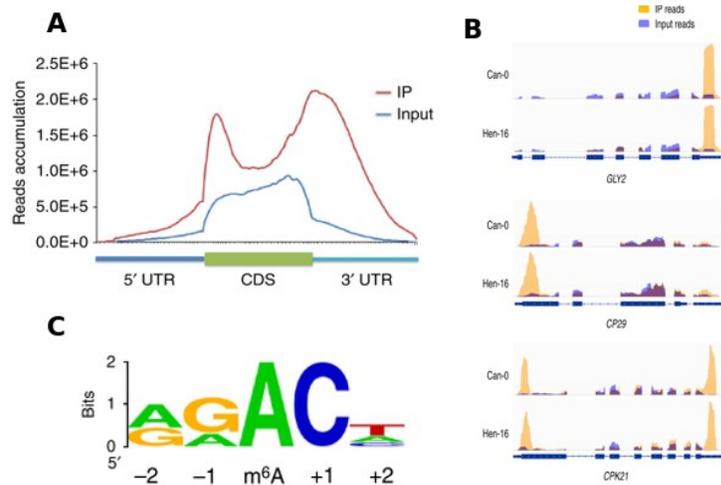
#### Patrón de distribución de $m^6A$ en el transcriptoma de *A. thaliana*.

En contraste con mamíferos, existen muy pocos reportes en plantas sobre la función de la modificación de  $m^6A$  en mRNA. En exploraciones a nivel global se ha reportado el perfil de  $m^6A$  en el transcriptoma de plantas completas *A. thaliana* (Luo et al. 2014), hojas, flores y raíces (Wan et al. 2015, Anderson et al. 2018), así como en callos y hojas de arroz (Li et al. 2014), se ha detectado

que la modificación m<sup>6</sup>A se encuentra aproximadamente en 60% de mRNAs totales analizados en cada etapa.

Análisis de dos ecotipos de *A. thaliana* (Can-0 y Hen-16) mostraron que m<sup>6</sup>A es una modificación en mRNA altamente conservada, junto con el motivo de metilación RRACH, como se ha descrito en otras especies. La metilación en *A. thaliana* también se encuentra enriquecida cerca del codón de paro y dentro de 3' UTR, como se ha detallado en levaduras y mamíferos, pero, además se observó un enriquecimiento cerca del codón de inicio y 5' UTR, una propiedad distinta a otros metilomas de m<sup>6</sup>A conocidos (Luo et al. 2014; Li et al. 2014a) (**Figura 6**). Los transcritos que se encuentran metilados en 5'UTR y codón de inicio, están, en su mayoría, relacionados al cloroplasto, lo cual sugiere una regulación del cloroplasto mediante la metilación m<sup>6</sup>A.

Dada la importancia de estos estudios en el transcriptoma y la diferencia en la distribución de m<sup>6</sup>A, resulta interesante llevar a cabo análisis de los transcritos metilados en distintas condiciones, así como en distintas especies de plantas y la implementación de herramientas que permitan una mayor resolución y confiabilidad.



**Figura 6.- Patrones de distribución de m<sup>6</sup>A a lo largo de los transcritos en *A. thaliana*.** (A) Acumulación de las lecturas después de inmunoprecipitar m<sup>6</sup>A (m<sup>6</sup>A-IP) a lo largo de las distintas regiones de los transcritos (5'UTR, CDS y 3' UTR). (B) Ejemplos de sitios de m<sup>6</sup>A conservados entre los ecotipos Can-0 y Hen-16. El color naranja representa las lecturas después de realizar la m<sup>6</sup>A-IP, mientras que el color morado representa las lecturas antes de realizar la inmunoprecipitación. (C) Secuencia motivo RRACH se encuentra conservada en los regiones pico de m<sup>6</sup>A (Luo et al. 2014).

## Metiltransferasas, desmetilasas y proteínas efectoras en plantas.

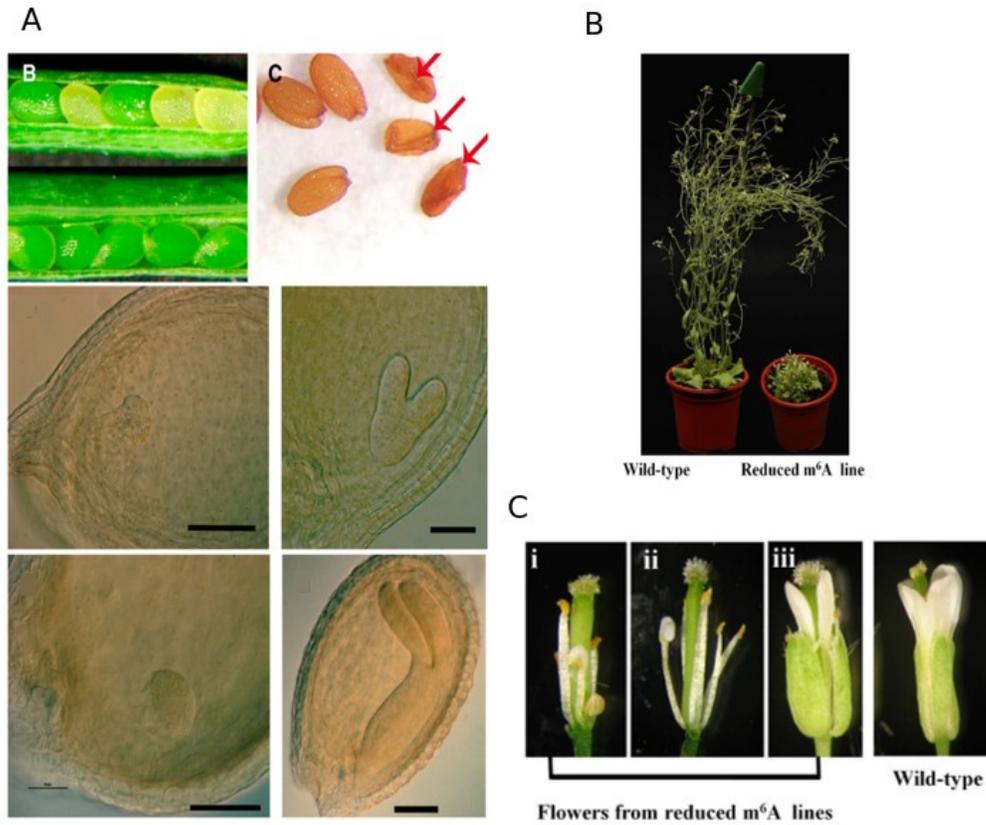
En *A. thaliana*, se identificó el homólogo de METTL3, MTA, como un componente activo del complejo de metiltransferasa para m<sup>6</sup>A (Zhong et al. 2008), el cual interacciona con FIP37 (el homólogo de WTAP en animales), y su ausencia afecta la metilación en mRNA (Shen et al. 2016). Esto resalta la alta conservación del complejo de metiltransferasa en eucariontes.

Se ha observado que el nivel de m<sup>6</sup>A en mRNA presenta variaciones dependiendo del tejido, presentando un nivel mayor en los botones florales. Esta variación correlaciona con los niveles de expresión de MTA en *A. thaliana* (Bodi et al. 2012). Se sabe que la inactivación de MTA provoca el arresto en el desarrollo de embriones en la fase globular (Vespa 2004; Zhong et al. 2008), acoplado a una pérdida de metilación en mRNA. (**Figura 7-A**).

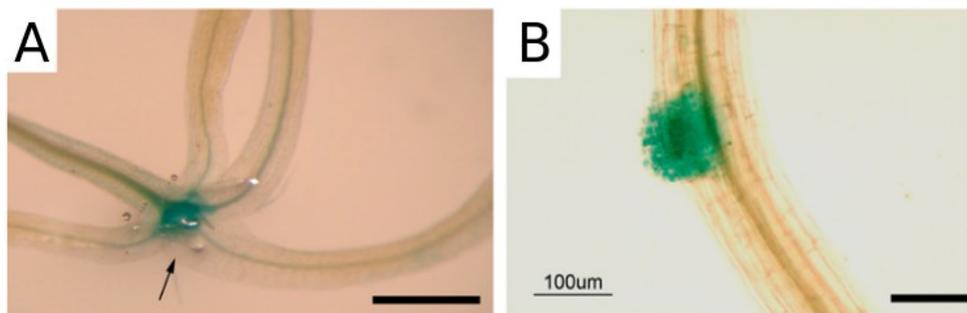
Además, se ha observado que cuando se dirige la expresión de MTA (por el promotor ABI3) solo a etapas embrionarias, el fenotipo de embrionario letal se revierte; sin embargo, dado que su expresión se ve afectada en otras etapas del desarrollo de la planta, se genera un crecimiento anormal, una reducción en la dominancia apical, la presencia de tricomas con mayores ramificaciones y un desarrollo incorrecto de órganos florales, además de provocar la disminución de los niveles de m<sup>6</sup>A en mRNA y un aumento en la expresión de genes relacionados a estrés (Bodi et al., 2012) (**Figura 7-B y C**).

Análisis de expresión de la región promotora de MTA empleando el gen reportero GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) sugirieron que MTA tiene una expresión limitada a meristemos apicales, óvulos, polen, anteras, desarrollo de semillas y en primordios de raíz lateral (Zhong et al. 2008), los cuales se consideran como tejidos con alta división celular (**Figura 8**).

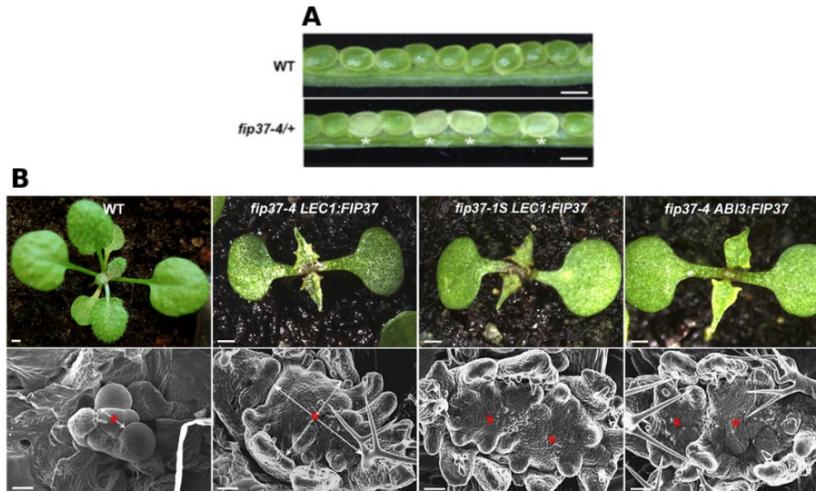
Por otro lado, FIP37 en *A. thaliana*, es un componente central en el complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A, el cual se encuentra involucrado en la modificación en mRNA implicados en el mantenimiento del meristemo apical, estabilizando a los mRNA que participan en el desarrollo de los órganos aéreos. Se ha observado que plantas deficientes en FIP37 muestran un fenotipo de letalidad en embriones, como se observa con la ausencia de MTA, mientras que en la fase post-embrionaria resulta en un arresto en la producción y desarrollo de hojas (Shen et al. 2016) (**Figura 9**).



**Figura 7.- Efecto de la reducción de m<sup>6</sup>A en mRNA en *A. thaliana*.** A) Semillas deficientes en MTA muestran arresto en la fase globular (Zhong et al. 2008). B) Las plantas mutantes *ABI3:MTA* que presentaron una reducción en los niveles de m<sup>6</sup>A son más compactas, presentan inflorescencias cortas, muestran reducción en la dominancia apical y C) se observan defectos florales por una reducción de m<sup>6</sup>A. Algunos estambres muestran conversión parcial a pétalos (i,ii), y el orden de los órganos también se puede ver afectado (iii) (Bodi et al. 2012).



**Figura 8.- La actividad del promotor de MTA está limitada a tejidos en desarrollo en *A. thaliana*.** Expresión de GUS en órganos de plantas transformadas. A) En plántulas jóvenes, la expresión de GUS se encuentra concentrada en meristemos apicales (flecha) Bar = 5 mm. B) En raíz, la expresión de GUS se observa principalmente durante en primordios de la raíz lateral. Bar = 100  $\mu$ m. (Zhong et al. 2008)



**Figura 9.- Fenotipos por la pérdida de la función de FIP37 en *A. thaliana*.** A) Silicuas disectadas a partir de plantas WT y plantas mutantes de *fip37*. El asterisco indica las semillas que muestran un color blanco anormal y que posteriormente fallan en desarrollarse. B) La pérdida de la función de *FIP37* en la etapa post-embrionaria resulta en SAMs (*shoot apical meristem* o meristemo apical del brote) alargados. El panel superior muestra las plántulas de 15 días de crecimiento, mientras que el panel inferior muestra los SAMs correspondientes examinados por microscopía electrónica de barrido. Las barras de escala, 1 mm (panel superior) y 50  $\mu$ m (panel inferior) (Shen et al. 2016).

Se han identificado otros componentes que participan en el establecimiento de los niveles de  $m^6A$  en *A. thaliana*, incluyendo a MTB (homólogo de METTL14), VIRILIZER y la ubiquitin ligasa E3 HAKAI. Se ha observado que la disminución en la acumulación de estas proteínas reduce los niveles de la modificación  $m^6A$ , provocando fenotipos pleiotrópicos (Růžička et al. 2017). Cabe resaltar que se ha reportado que los niveles de transcritos de los componentes del complejo de metiltransferasa no se encuentran significativamente modulados por un estrés abiótico (Hu et al. 2019), lo cual no necesariamente indica que no tengan una participación bajo condiciones normales y en estrés, ya que aún falta evaluar los niveles de estas proteínas en estas condiciones.

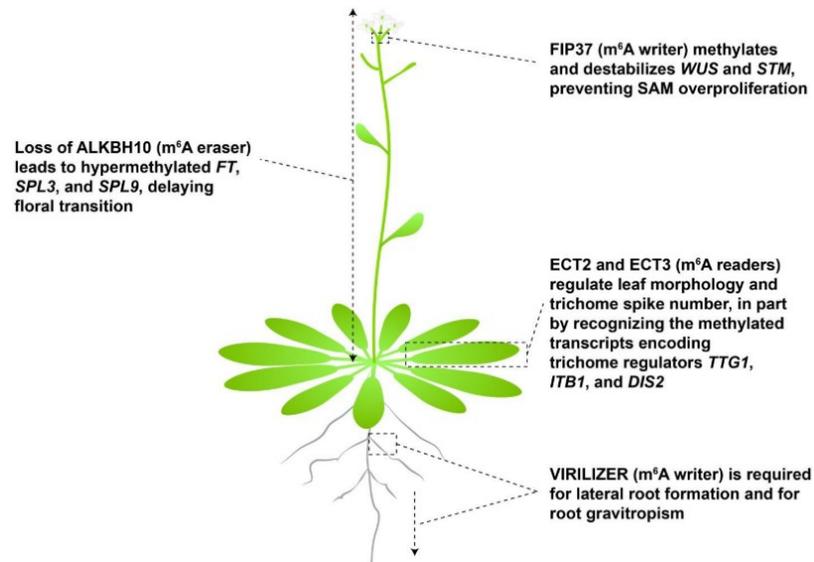
Se han determinado por análisis bioinformáticos trece miembros de la familia ALKBH en *A. thaliana* (Mielecki et al. 2012), de los cuales solo dos proteínas han sido identificadas con la actividad de desmetilasa de  $m^6A$ . ALKBH9B mostró revertir la modificación en cadenas sencillas de RNA *in vitro*, y su ausencia resulta en una hipermetilación del RNA del virus de mosaico de alfalfa (AMV), mediando la infección sistémica por la interacción con proteínas virales (Martínez-Pérez et al. 2017). Otra desmetilasa identificada es ALKBH10B que participa en la transición floral, controlando los niveles de transcritos de *SPL3*, *SPL9*, y *FLOWERING LOCUS T* (Duan et al. 2017). Análisis de expresión por microarreglos han mostrado que los niveles de expresión de los

miembros de ALKBH se encuentran modulados en diferentes condiciones de estrés abiótico (Hu, Manduzio y Kang 2019).

Mientras que en animales se han descrito diferentes proteínas RBPs (*RNA-Binding Protein*) encargadas del reconocimiento de las marcas m<sup>6</sup>A y su participación en diferentes procesos biológicos, en *A. thaliana* recientemente se describieron trece proteínas homólogas a YTH, denominadas ECT (del inglés, *Evolutionary conserved C-terminal region*), aunque solo algunos trabajos hablan acerca de su participación en la planta. Se sabe que ECT2 está involucrada en el desarrollo de tricomas y se relocaliza en gránulos de estrés ante una exposición a calor, sugiriendo un rol en el control del mRNA bajo condiciones de estrés (Scutenaire et al. 2018). Mediante análisis moleculares y de secuenciación, se observó que ECT2 reconoce un gran número de transcritos marcados con m<sup>6</sup>A que se encuentran involucrados en el desarrollo de tricomas, sugiriendo que ECT2 incrementa la estabilidad de estos transcritos (Wei et al. 2018). Mediante la generación de mutantes sencillas y dobles, se demostró que ECT2, ECT3, y ECT4 regulan la sincronización de la organogénesis en plantas (Arribas-Hernández et al. 2018). Estudios adicionales muestran que la expresión de las proteínas ECTs en *A. thaliana* y arroz está altamente regulada por diferentes tipos de estreses abióticos (Hu et al. 2019), por lo que es importante llevar a cabo estudios para determinar su participación en estas condiciones.

A pesar de que los estudios de metiltransferasas, desmetilasas y proteínas efectoras en plantas no ha sido tan explorado en comparación con su contraparte en animales, la acumulación de evidencias ha demostrado claramente que estos factores son esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Shen et al. 2016, Růžička et al. 2017, Duan et al. 2017) (**Figura 10**). Sin embargo, dichos procesos pueden ser afectados por distintos tipos de estrés abiótico, en el cual la metilación m<sup>6</sup>A puede tener un papel importante al ser una respuesta dinámica (Vandivier y Gregory 2018). El hecho de que las proteínas efectoras se modulen más por el estrés abiótico que las metiltransferasas y desmetilasas, sugiere que la decodificación de las marcas de metilación presenta una regulación en mRNA que es vital en la supervivencia y adaptación de las plantas, por lo que es importante llevar a cabo más estudios de esta vía del metabolismo de RNA en plantas, expandiendo nuestro conocimiento sobre la conservación y evolución de las proteínas que participan en la vía en distintas plantas, y sus consecuencias para el crecimiento y adaptación a

diversos ambientes. Esto podría aportar potenciales nuevos blancos para la ingeniería de cultivos que podrán adaptarse a las condiciones adversas.

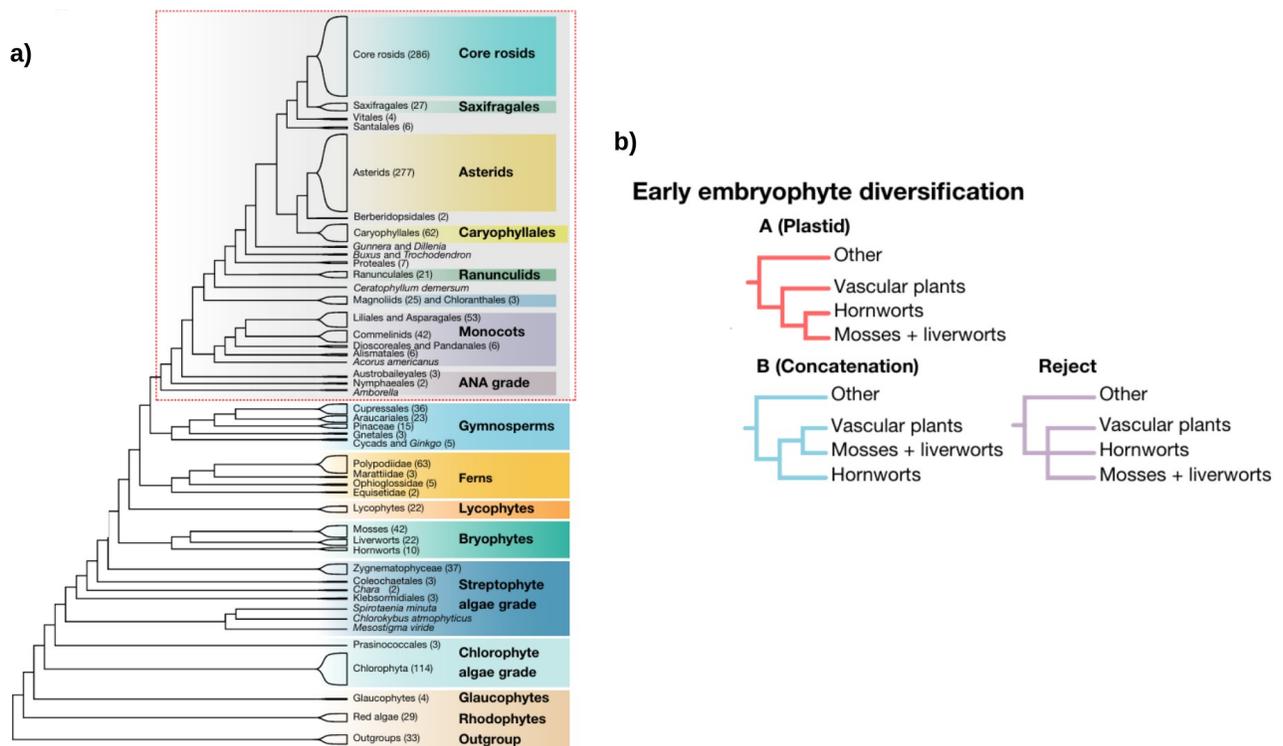


**Figura 10. La modificación m<sup>6</sup>A en mRNA regula diversos procesos en el desarrollo de la planta.** Funciones regulatorias conocidas y sus correspondientes metiltransferasas, desmetilasas y proteínas efectoras representadas en una planta adulta de *A. thaliana* (Vandivier y Gregory 2018).

### ***Marchantia polymorpha*: un modelo para estudiar la evolución temprana de las plantas.**

El origen y la diversificación temprana de las embriofitas a partir de un ancestro acuático marca un intervalo de innovación sin precedentes en la historia de la vida de las plantas, y es uno de los eventos más críticos de la evolución para la vida en nuestro planeta (Bowman, Floyd y Sakakibara 2007). Las embriofitas se dividen en plantas no vasculares (briofitas) y plantas vasculares (traqueofitas: licopodios, helechos, gimnospermas y angiospermas). El phylum Bryophyta está conformado por los musgos, antoceros y hepáticas. Las briófitas son consideradas como el grupo de más temprana diversificación entre las embriofitas (Shaw, Szövényi y Shaw 2011) y dentro de sus características están la ausencia de un sistema vascular, de una pared celular lignificada, la presencia de espermas con motilidad y la dominancia de la generación de un gametofito haploide sobre la generación de un esporofito diploide durante su ciclo de vida (Shimamura 2016a). Las briofitas algunas veces se han resuelto como un grado evolutivo (Qiu et al. 2006; Chang y Graham 2011; Wickett et al. 2014; Bowman 2017), con las hepáticas, musgos y antoceros como grupos

hermanos sucesivos para las Traqueofitas. Sin embargo, como parte del proyecto de *One Thousand Plant Transcriptomes Initiative*, se han secuenciado 1124 especies y los últimos análisis filogenómicos han reportado a las briofitas como monofiléticas (Leebens-Mack et al., 2019), con los antoceros como grupo hermano del clado de musgos y hepáticas (**Figura 11**). Mientras que la relación filogenética entre los musgos, antoceros y hepáticas es aún debatida, la posición de las hepáticas como uno de los linajes tempranos de plantas terrestres es inequívoco, y su relación y estudio es crítico para entender la evolución de características fundamentales dentro de las plantas terrestres, como la tolerancia a la desecación.



**Figura 11.- Inferencias filogenéticas de clados principales.** Las inferencias filogenéticas se basaron en el análisis ASTRAL a partir de los datos transcriptómicos de 1153 especies de plantas. a) Relaciones entre clados principales; en el cuadro punteado rojo se señala el clado de plantas con flor. El número de especies está señalado entre paréntesis. b) Orden alternativo de las ramas en la diversificación temprana de las embriofitas; A y B muestran los resultados de los análisis filogenéticos basados en los genes nucleares y del plástido, junto con la hipótesis del orden de las ramas que se rechaza.

Dentro de las hepáticas, la especie mejor caracterizada es *M. polymorpha*. Evidencia paleontológica y filogenética sugieren que pertenece al linaje de plantas terrestres basales y que es un organismo descendiente directo de las primeras plantas que colonizaron ambientes terrestres (Chang y Graham 2011; Bowman et al. 2007). *M. polymorpha* pertenece al orden de las

Marchantiales, grupo de plantas que presentan una anatomía sencilla, con un cuerpo que se denomina talo, y está delimitado por una epidermis superior y una epidermis inferior la cual encierra al parénquima fotosintético y de almacenamiento. Presenta cámaras aéreas conectadas a poros aéreos para facilitar el intercambio gaseoso, y rizoides en la región ventral, estructuras que sirven de anclaje al sustrato. *M. polymorpha* es una especie dioica, con plantas femeninas que portan un cromosoma X y plantas masculinas con un cromosoma Y, además de 8 autosomas (Okada et al. 2000). Mientras que los talos de ambas son morfológicamente idénticos, sus estructuras reproductivas son sexualmente dimórficas; el órgano reproductor masculino, anteridióforo, tiene forma de disco lobulado, mientras que el órgano reproductor femenino, arquegoniόforo, tiene forma de sombrilla estrellada (Bowman, Araki, y Kohchi 2016) (**Figura. 12**).

*M. polymorpha* tiene un ciclo de vida predominante asexual, en el que es haploide. Su ciclo comienza con la formación de los talos que crecen unos sobre otros formando una especie de alfombra verde bifurcándose en dos lóbulos. Presenta una superficie ventral, en la cual se encuentran los rizoides (que son estructuras unicelulares), y una superficie dorsal la cual posee cámaras de intercambio gaseoso con poros epidermales y tejido subepidermal que forma filamentos fotosintéticos. En la superficie dorsal, se desarrollan unas estructuras con forma de copa denominados conceptáculos, donde se generan y acumulan gemas, las cuales tienen forma de disco aplanado y a partir de las que se puede generar un nuevo organismo completo haploide (reproducción asexual) (Bowman 2016).



**Figura 12.-** Diferentes etapas de crecimiento de *M. polymorpha*. A) Talos, gemas y conceptáculos. B) Órgano reproductor masculino o anteridióforo (anteridio). C) Órgano reproductor femenino o arquegoniόforo (arquegonio). D) Formación del esporófito (fotos descargadas de <https://www.openplant.org/marchantia>).

La reproducción sexual de *M. polymorpha* se lleva a cabo en un limitado periodo de tiempo, entre primavera y otoño, en donde se desarrollan los gametangioforos sobre el talo, anteridióforo para

organismos masculinos y arquegonióforo para organismos femeninos. En cada arquegonio se presenta el desarrollo de una sola ovocélula mientras que en cada anteridio produce numerosos gametos masculinos motiles (células de esperma o anterozoides). Estos últimos buscan una ovocélula por algún medio (principalmente agua) para poder fecundarlo (**Figura 13**). Posterior a la fecundación, el cigoto se desarrolla en un esporófito dentro del arquegonio. Conforme el esporófito crece, el vientre del arquegonio también crece y se forma una estructura denominada caliptra, la cual protege el crecimiento del esporófito joven. Seguido de divisiones meióticas en la cápsula, las esporas son liberadas y estas germinarán y darán inicio al crecimiento del gametofito haploide (Shimamura 2016).

Actualmente, el uso de *M. polymorpha* como modelo experimental en estudio de la genómica comparativa es cada vez más frecuente. Una de las características que hace de *M. polymorpha* un modelo ideal es su rápido crecimiento, fácil propagación sexual y asexual (Bowman 2016). En años recientes por un esfuerzo conjunto de diferentes grupos de investigación se ha realizado la secuenciación de su genoma (Bowman, Araki, y Kohchi 2016) y se han desarrollado numerosas técnicas de biología molecular, entre las que destaca su transformación genética (Kubota et al. 2013; Tsuboyama y Kodama 2014; Ishizaki et al. 2008; 2015; Sugano et al. 2014). Estas características junto con su posición en uno de los nodos evolutivos interesantes para estudiar la biología molecular de las plantas, se considera a *M. polymorpha* como un modelo atractivo para responder preguntas evolutivas, moleculares, celulares y de desarrollo.

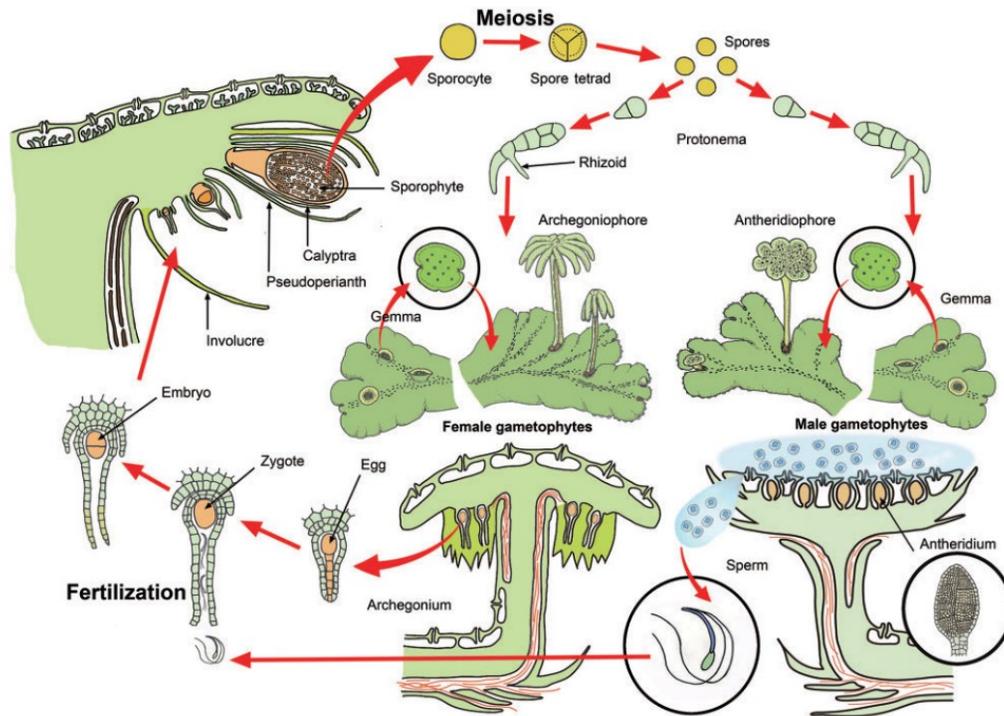


Figura 13.- Ciclo de vida de *M. polymorpha*. (Shimamura, 2016).

Dado que el estudio de la modificación de m<sup>6</sup>A en *A. thaliana* pueda ser complicada por los fenotipos letales y pleiotrópicos, además de la gran cantidad de proteínas que pueden participar en el metabolismo del RNA, en el presente trabajo se propuso a *M. polymorpha* como modelo de estudio, aprovechando las ventajas que presenta, para la exploración y caracterización de las bases evolutivas y la conservación de la participación de la vía m<sup>6</sup>A de mRNA en procesos moleculares y celulares durante el desarrollo de la planta con el fin de poder descubrir que mecanismos se han conservado durante la historia evolutiva de las plantas para tener características fundamentales como la adaptación a condiciones adversas.

## HIPÓTESIS

Dados los antecedentes que nos indican que la metilación de adenosinas en la posición 6 en mRNA está implicada en procesos como la formación de las estructuras reproductivas y las divisiones meióticas en distintos organismos, se propone que la maquinaria de metilación de mRNA tendrá un papel en el desarrollo de los gametóforos y/o el esporofito de la hepática *Marchantia polymorpha*.

## OBJETIVO

### PRINCIPAL

Establecer las herramientas moleculares necesarias para llevar a cabo el estudio de la metilación m<sup>6</sup>A en *Marchantia polymorpha*.

### ESPECÍFICOS

1. Determinar los genes relacionados con la vía de metilación m<sup>6</sup>A en mRNA en *M. polymorpha*.
2. Realizar un análisis de los elementos en *cis* presentes en la región promotora de los genes de la metiltransferasa de m<sup>6</sup>A en *A. thaliana* y *M. polymorpha*.
3. Establecer las condiciones adecuadas para el crecimiento de las etapas del ciclo de vida, asexual y sexual de *M. polymorpha*.
4. Evaluar la dinámica de expresión de los genes que codifican para las subunidades del complejo de metiltransferasa de mRNA *M. polymorpha*.
5. Establecer las condiciones necesarias para la transformación de *M. polymorpha*.
6. Determinar el efecto de alterar la expresión de los homólogos de METTL3 y WTAP del complejo proteico de metiltransferasa de mRNA.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Identificación de los genes y análisis filogenético

Las secuencias de proteínas de distintos organismos (ver ANEXO II) que presentan el dominio MT-A70 fueron seleccionadas de la base de datos de *Phytozome* (<https://www.phytozome.jgi.doe.gov>). Las secuencias completas fueron usadas para llevar a cabo el alineamiento con MAFFT. El árbol filogenético fue construido mediante el algoritmo de máxima similitud y evaluada por el método de *bootstrap* usando 100-1000 réplicas en software MEGA X. La representación gráfica del árbol fue generada usando la paquetería ggtree en R.

## Análisis de promotores

Se extrajo la secuencia promotora de los genes *AtMTA* y *AtFIP37* de la base de datos *AtcisDB* (<https://agris-knowledgebase.org/AtcisDB/>) para *A. thaliana*; para los genes *MpMTA* y *MpWTAP* la secuencia se extrajo de la base de datos *Phytozome*. Se consideró como promotor la secuencia río arriba a partir del inicio de la transcripción 5'-UTR hasta llevar al 3'-UTR de gen río arriba. Se ingresó la secuencia en la base de datos *PLACE* (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) y se sometieron a análisis. Todos los elementos de distribuyeron en categorías discretas dependiendo de su descripción y se realizó los conteos de los elementos y representación gráfica mediante un programa escrito en Python.

## Cultivo axénico y condiciones de crecimiento para *M. polymorpha*

Para generar un cultivo axénico de *M. polymorpha* como indica Takenaka y colaboradores en 2000, se recolectaron gemas de 1-3 conceptáculos. Las gemas se sumergieron en una solución de 0.5-1% hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) y 0.02% Tritón X-100. Se lavaron por aproximadamente 5 minutos con ligera agitación. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se realizaron cuatro lavados con 1 mL de agua estéril, por 1-2 minutos, dejando que las gemas se sumergieran para poder descartar la mayoría del sobrenadante. Finalmente, se agregó 500 µL de agua estéril para su posterior siembra en placas con medio de cultivo Gamborg's B5 0.5X adicionado con 100 µg/mL cefotaxima.

Una vez realizado los cultivos axénicos, la línea masculina, ecotipo Takaragaike-1 (TAK-I), y la línea femenina, ecotipo Takaragaike-2 (TAK-II), se propagaron por crecimiento de gemas en placas de 10 cm diámetro con medio Gamborg's B 0.5X suplementado con 1% sacarosa y 1% de agar, sellados con cinta microporosa en cámaras de crecimiento Percival con luz LED blanca [60-70  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$  a 22 °C, como describe Okada y colaboradores (Okada et al. 2000)] en fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad. En el ANEXO VI se encuentra la composición de cada uno de los medios de crecimiento empleados.

### **Condiciones para la generación de estructuras reproductivas de *M. polymorpha* y la formación del esporófito.**

Se transfirieron cultivos de *M. polymorpha* de 2-3 semanas (crecidos en cámaras de crecimiento Percival) a discos de tierra (*jiffy pots*) llenados con una mezcla de tierra y arena, en macetas que permitieran un nivel de humedad adecuada para el correcto crecimiento de la planta evitando la contaminación e inhibición de la generación de estructuras reproductivas. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 20-22 °C bajo luz fluorescente en día largo (16 horas luz, 8 horas oscuridad).

Para inducir el desarrollo de las estructuras reproductivas de *M. polymorpha*, plantas con un tiempo de 1-2 semanas en cultivo en tierra (1 mes de edad) fueron suplementadas con luz roja lejana (730 nm) a una intensidad aproximada de 15-20  $\mu\text{mol}$  fotón  $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$  (*Liweda* LVS9P30G-12), como son reportadas por Chiyoda y colaboradores en 2008. Después de 2-3 semanas se observó la formación de las estructuras reproductivas.

Para inducir la formación del esporófito, primero se colocaron unas gotas de agua (NO DESTILADA) sobre un anteridióforo (>5 mm de diámetro). Después de unos minutos, cuando los espermatozoides fueron liberados dentro de la gota del agua (la suspensión debe tener un color blanco nubloso), se recolectó la suspensión de espermatozoides con una pipeta Pasteur de vidrio. Posteriormente, se aplicó la solución con los espermatozoides colectados a arquegonióforos que tenían un tamaño cerca de 2~3 mm de diámetro. Después de aproximadamente un mes, se tuvieron esporangios maduros.

Se sabe que un esporangio fácilmente se rompe y libera esporas en condiciones de baja humedad. Para prevenir que el esporangio se rompa, se recomienda mantener las plantas en una cámara

húmeda. Los esporangios se recolectaron 3-4 semanas después de cruzar las plantas, se mantuvieron en un desecador por 7-14 días, y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

### **Aseptización de esporas**

Para la aseptización de esporas (Ishizaki et al. 2008), se tomó un esporangio y se agregó 100 µL de agua estéril; con la ayuda de una punta de pipeta se fragmentó el esporangio para poder resuspender las esporas por pipeteo. Se dejó por 1 minuto para la acumulación del debris celular y se transfirieron 100 µL de la suspensión de esporas a un tubo nuevo estéril (sin transferir el debris). Después se ajustó a un volumen de 500 µL con agua estéril y se agregó una solución de esterilización 2X (Composición de la solución: 0.5% hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) y 0.2% Tritón X-100) por 1-2 minutos. Se centrifugó por 1 minuto a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Finalmente se agregó 100 µL de agua estéril por esporangio al pellet de esporas.

Para la transformación de *M. polymorpha* mediante esporas, una de las claves es una correcta aseptización de las esporas, por lo que se recomienda ampliamente respetar los tiempos establecidos, concentraciones de los reactivos, no tomar el debris celular, y buenas prácticas de trabajo en la campana de flujo laminar.

### **Extracción de RNA y PCR cuantitativo en tiempo real**

La extracción de RNA total de talos de *M. polymorpha* se llevó a cabo recolectando aproximadamente 100 mg de tejido, incluyendo nodos apicales; para el RNA total de los gametóforos, se recolectaron 2-3 anteridióforos  $\geq 5$  mm de diámetro y 3-4 arquegonióforos de 10-15 mm de alto - respectivamente - para cada réplica; para germinados de esporas, se sembraron 100 µL de la suspensión de esporas aseptizadas sobre discos de celofán dulce en medio Gamborg's B5 0.5X, 1% sacarosa y 1% agar en las condiciones antes mencionadas y se incubaron por 7 días. Una vez recolectados los diferentes tejidos, se homogeneizaron con mortero y pistilo en N<sub>2</sub> líquido para posteriormente extraer RNA total usando el Kit *Rneasy plant mini* (#74904, Qiagen) siguiendo el protocolo de manufactura. Las muestras de RNA total fueron cuantificadas usando un Nanodrop ND-1000 Spectrometer y su integridad fue corroborada por gel de agarosa 1% con 1 % cloro (Aranda et. al., 2012).

El cDNA fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA total, tratado con DNase I (#EN0521 ThermoFisher). La transcripción reversa fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µL con 0.5 µg/µL Oligo(dT) y 200 unidades de *RevertAid Reverse Transcriptase* (#EP0441, ThermoFisher). El cDNA fue diluido 1:10 veces adicionando agua libre de nucleasas.

Para qPCR, primero se determinó la eficiencia de los oligonucleótidos contra los genes de referencia *MpEF1α* y contra los genes blanco (los oligonucleótidos diseñados se encuentran en regiones de unión de exón-exón). Los experimentos de amplificación fueron llevados a cabo usando el sistema *Step One Real Time PCR system*. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 15 µL que contiene 7.5 µL de 2X *SYBR-GREEN Mastermix* (#1176202K, Invitrogen), 2.5 pmol de oligonucleótidos *forward* y *reverse* y 1 µL de cDNA diluido de las muestras. Tres réplicas técnicas para cada reacción y tres réplicas biológicas fueron realizadas. El análisis fue llevado a cabo en R y las gráficas realizadas utilizando la paquetería ggplot. Para consultar los oligonucleótidos utilizados, revisar la lista que se encuentran en ANEXO I.

## **Construcción de los vectores binarios**

- **Construcción de vectores de RNA de interferencia**

Para generar las líneas transgénicas de interés, se realizaron construcciones en las cuales se clonó en el vector pENTR<sup>TM</sup>-SD/D-TOPO<sup>TM</sup> (#K2402020, Invitrogen) un fragmento de aproximadamente 300 pb que abarca parte de la región CDS y el 3'-UTR de los genes *MpMTA* y *MpWTAP*. Se corroboró su correcta clonación mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos, y posteriormente se realizó la reacción de recombinación con el vector binario pBA-DC-RNAi que produce un *hairpin* para silenciar el gen de interés mediante el promotor constitutivo 35S de CaMV. La correcta recombinación de cada construcción se confirmó mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos. Una vez confirmadas las construcciones, se transformaron en *A. tumefaciens* para continuar con la transformación de *M. polymorpha*.

- **Construcción de vectores para el análisis de promotores.**

Para llevar a cabo el análisis del patrón de expresión de *MpMTA* y *MpWTAP*, se clonó en el vector pENTR<sup>TM</sup>-SD/D-TOPO<sup>TM</sup> (#K2402020, Invitrogen) un fragmento que abarca del final del 3'-UTR del gen más próximo río arriba al inicio del 5'-UTR del gen de interés. Para el gen *MpMTA* se clonó un

fragmento de 2821 pb y para *MpWTAP* un fragmento de 3000 pb. Se corroboró su correcta clonación mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos, y posteriormente se realizó la reacción de recombinación con los vectores binarios pKGWFS7 el cual expresaría a GUS-GFP y pMpGW107 el cual expresaría Citrina. La correcta recombinación de cada construcción se confirmó mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos. Una vez confirmadas las construcciones, se transformaron en *A. tumefaciens* para continuar con la transformación en *M. polymorpha*.

- **Construcción de los microRNAs artificiales**

Para un análisis funcional se realizó el diseño de tres microRNAs artificiales (amiRNA) independientes para cada gen de interés. El precursor de microRNA endógeno *MpmiR160* fue usado como templado y esqueleto para el diseño de las construcciones las cuales generan una sola especie de RNA de 21 nucleótidos de largo que son complementarios al transcrito del gen blanco (Ver ANEXO V). El correcto plegamiento fue comprobado usando el software Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/>) . Los esqueletos de *MpmiR160* que contienen los microRNA artificiales independientes fueron sintetizados por IDT (*Integrated DNA Technologies*). Cada uno de los amiRNAs fueron clonados en un vector pENTR mediante las enzimas de restricción *Ascl* y *NotI*, para posteriormente realizar la recombinación en el vector pMpGWB103, donde la expresión de los amiRNAs estaría dirigida por el promotor *MpEF1α*. La correcta recombinación de cada construcción se confirmó mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos. Una vez confirmadas las construcciones, se transformaron en *A. tumefaciens* para continuar con la transformación en *M. polymorpha*.

### **Transformación de germinados de esporas *M. polymorpha* mediante *Agrobacterium*.**

La transformación de *M. polymorpha* fue realizada de acuerdo con la metodología de Ishizaki y colaboradores en 2008:

- **Preparación del cultivo de *Agrobacterium*:** La cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* (Donada por la Dra. Elizabeth Córdoba, Instituto de Biotecnología) se transformó con los vectores de interés que fueron usados para el presente trabajo. Se inoculó un pre-cultivo a partir de una sola colonia positiva para la construcción de interés, en 5 mL de medio LB a 28 °C con agitación por 2 días. Posteriormente, se tomó 1 mL del

pre-cultivo saturado de *Agrobacterium* y se adicionó a 5 mL de medio OM51C con 100  $\mu$ M acetoseringona para resuspender las células. El cultivo de *Agrobacterium* se dejó creciendo por 6 horas a 28 °C con agitación constante.

- **Transformación de *M. polymorpha* mediante *Agrobacterium*:** A partir de una suspensión de esporas previamente aseptizadas se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de la suspensión y se transfirió a 25 mL de medio OM51C (Takenaka et al. 2000; ver ANEXO VI) en un matraz de 125 mL. Las esporas se cultivaron en las condiciones de crecimiento antes mencionadas por 9-11 días con agitación constante de 130 rpm. Posteriormente, 0.25-0.5 mL del cultivo de *Agrobacterium* fue adicionado al cultivo líquido de germinados suplementado con 100  $\mu$ M acetoseringona. El co-cultivo se mantuvo a 22°C con una agitación constante de 130 rpm por 48-72 horas. Los germinados fueron colectados con una malla de nylon de 40  $\mu$ m (#EF16400, Daigger) y lavadas tres veces con 20 mL de agua estéril. Posteriormente, fueron transferidos a medio Gamborg's B5 0.5X con 1% sacarosa, 1 % agar y 10  $\mu$ g/mL higromicina (ó 5  $\mu$ g/mL G-418, según sea el caso) para selección de plantas transformadas, y 100  $\mu$ g/mL Cefotaxima. Cada talo que presentó resistencia en el medio de selección se consideró como línea independiente. Se llevaron a cabo dos rondas de selección de 1-2 semanas cada una, trasplantando los talos que crecieron en medio selectivo. Las plantas sobrevivientes después fueron transferidas a medio sin selección Gamborg's B5 0.5X 1% sacarosa y 1% agar hasta observar la formación de gemas, las cuales fueron almacenadas en agua a 4 °C para un uso posterior.

Las gemas de cada línea independiente se sembraron en medio de selección por 1-2 semanas con el fin de eliminar posibles falsos positivos. Las gemas obtenidas posteriormente se les denominó G2 y son utilizadas para los experimentos subsecuentes, propagación y almacenamiento.

Se verificó por PCR la inserción del gen de interés, el gen de resistencia y se realizó la genotipificación para separar plantas masculinas y femeninas después de la extracción de DNA genómico.

### **Genotipificación por PCR de talos masculinos y femeninos.**

Para llevar a cabo el aislamiento del DNA genómico en la genotipificación por PCR, se tomaron aproximadamente secciones de 3 mm x 3 mm de talo que posteriormente fue molido en 50  $\mu$ L de

buffer de extracción (Composición del buffer: 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 1 M KCl, 10 mM EDTA) en hielo. El extracto crudo fue incubado a 95°C por 15 minutos y en hielo por 5-10 minutos. Finalmente se diluyó 10 veces con agua destilada estéril para ocupar 1 µL como templado usando la DNA polimerasa *Phiere Hot Start II* (#F122L, Thermo Scientific). Para la detección del género de los talos, se ocuparon un mix de oligonucleótidos que amplifican un fragmento específico del DNA genómico, *rbm27* y *rhf73*, para detectar plantas masculinas y femeninas (Fujisawa et al. 2001).

## RESULTADOS

### Identificación de los genes homólogos del complejo de metiltransferasa en *M. polymorpha*.

Como punto de partida para realizar los objetivos de este proyecto, se identificaron los genes relacionados con la metilación m<sup>6</sup>A en mRNA mediante un alineamiento *BLAST* con las secuencias de proteínas de *M. polymorpha* disponibles en la base de datos *Phytozome* y *MarpolBase* (Bowman 2017), utilizando como referencia las secuencias reportadas en *A. thaliana* (Růžička et al. 2017; Bodí et al. 2012; Shen et al. 2016). De esta manera se identificaron proteínas en *M. polymorpha* y *Physcomitrella patens* que presentan un alto porcentaje de identidad con los dominios correspondientes a la familia de MT-A70 correspondientes a METTL3 y METTL14, dominio de WTAP, así como 3 genes que presentan el dominio de YT521-B presente en las proteínas ECT (**Tabla 1** y Tabla suplementaria I).

**Tabla 1.- Identificación de las proteínas homólogas que conforman el complejo de metilación de m<sup>6</sup>A.** Se representa su código de identificación de acuerdo con la base de datos de *Phytozome* y *MarpolBase* y el número de proteínas encontradas.

Dominio identificado	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Referencia)	<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
MT-A70	AtMTA (AT4G10760.1)	Mapoly0036s0127 (MpMTA)	Pp3c1_32590
	AtMTB (AT4G09980.1)	Mapoly0005s0162 (MpMTB)	Pp3c5_5900
	At1G19340	Mapoly0005s0290 (MpMTB-like)	Pp3c6_26980 Pp3c10_21330
WTAP	AtFIP37	Mapoly0061s0094 (MpWTAP)	Pp3c8_10480
YT521-B	AtECT(13 miembros)	MpECT (3 miembros)	PpECT (4 miembros)

Para METTL3 se identificó un solo homólogo, al igual que para WTAP. En el caso de METTL14, se encontraron dos proteínas homólogas que presentan el dominio MT-A700, sin embargo, al examinar el porcentaje de identidad y los dominios, solo una de las proteínas (Mapoly0005s0162) muestra una mayor identidad a METTL14 reportado en *A. thaliana*. No obstante, para la proteína Mapoly0005s0290 no existe evidencia para descartarla como un componente del complejo de metiltransferasa en *M. polymorpha*, por lo que es necesario llevar a cabo estudios posteriores para determinar su participación.

A partir de la identificación de proteínas homólogas del complejo de metiltransferasa en distintas especies, y usando solamente secuencias proteicas de plantas representativas (Tabla suplementaria II), se construyó un árbol filogenético con el objetivo de determinar si las proteínas con el dominio de MT-A70 identificadas podrían encontrarse en grupos específicos (**Figura 14**). La proteína identificada como MpMTA se agrupó en un clado donde se encuentran las proteínas METTL3 de otros organismos (**Figura 14** clado color verde); dentro de este mismo grupo se localiza la proteína AtMTA. También se logró definir un segundo clado, en el cual se encuentran las proteínas METTL14 de otros organismos, mientras que en plantas podemos observar que dentro de este clado se encuentra AtMTB, lo cual nos sugiere que la proteína identificada en *M. polymorpha* dentro de este grupo presentará características similares a METTL14 (clado color azul en **Figura 14**). Por último, se observó un grupo adicional que presenta el dominio MT-A70, en el cual se encuentran proteínas que no se han caracterizado ni se ha descrito su función hasta el momento, dentro del complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A. En este grupo observamos a la proteína Mapoly0005s0290, denominada MpMTB-like.

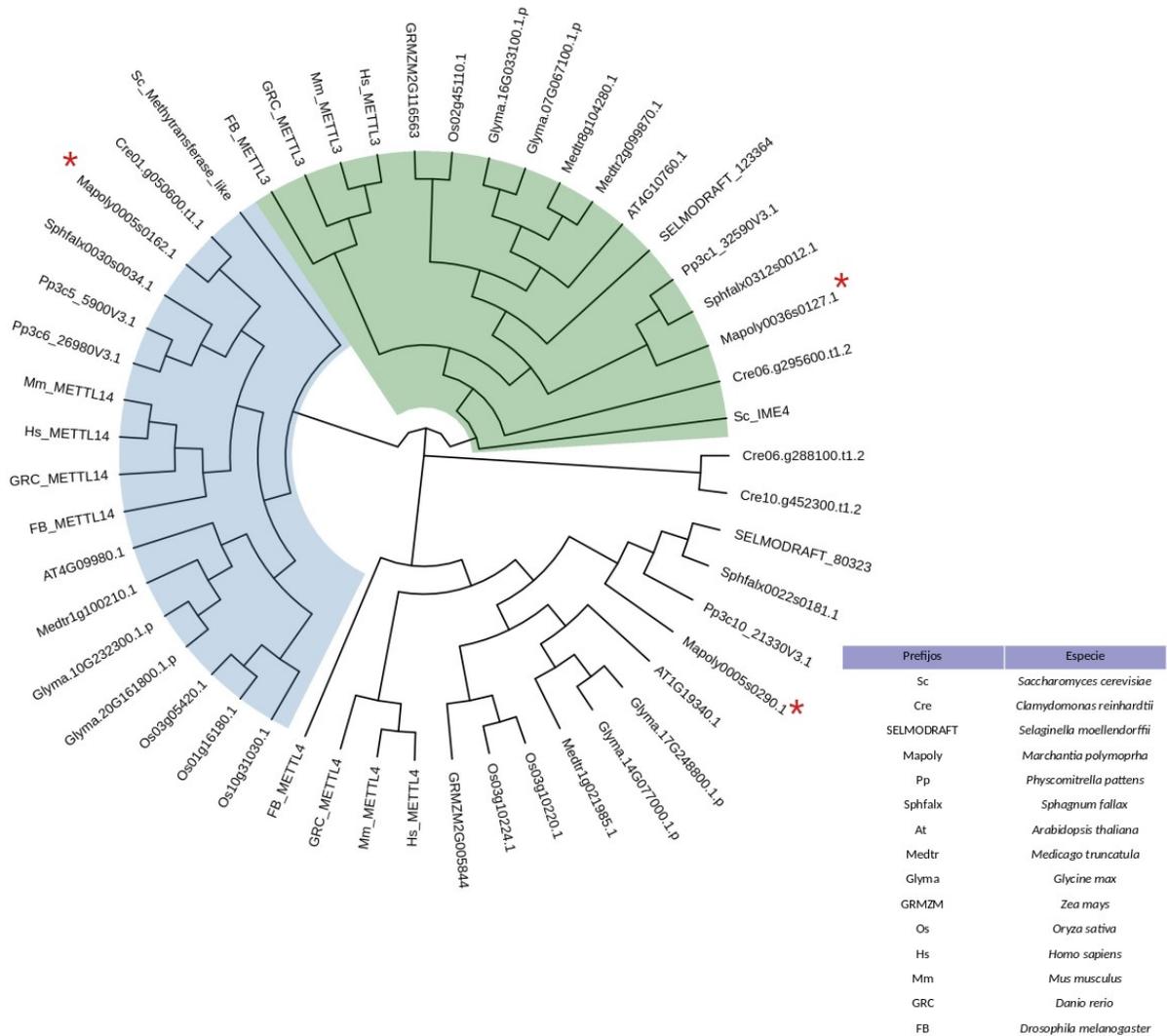


Figura 14.- Árbol filogenético con las proteínas que presentan el dominio MT-A70 (PFAM PF05063) en plantas y otros organismos. Se observan tres posibles grupos en donde se encuentran las proteínas MTA (verde), MTB (azul) y un grupo extra que presenta el dominio MT-A70 que no se ha descrito como parte del complejo de metiltransferasa. En \* se marcan los códigos de identificación de *M. polymorpha*. Las especies y su código de acceso se encuentran en la tabla suplementaria II.

### Análisis *in silico* de los promotores de genes relacionados al complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A en RNA mensajero en *A. thaliana* y *M. polymorpha*.

Para identificar los probables elementos *in cis* presentes en los promotores de los genes relacionados a metilación de *A. thaliana* (*AtMTA*, *AtFIP37*) y de *M. polymorpha* (*MpMTA*, *MpWTAP*), se realizó un análisis *in silico* con ayuda de la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1999), de las regiones promotoras de los cuatro genes, esto con el fin de realizar un análisis comparativo

entre *A. thaliana* y el modelo *M. polymorpha* utilizado en este trabajo. Se consideró como promotor la región comprometida entre el sitio de inicio de la transcripción y el final del 3' UTR del gen río arriba. Los resultados condensados se muestran en la **Tabla 2**, así como un esquema de localización espacial de dichos elementos en la **Figura 15** y una tabla con todos los elementos encontrados por la base de datos PLACE en la Tabla suplementaria III y su representación gráfica en por promotor en la Figura suplementaria I.

**Tabla 2.- Análisis de los elementos en cis de las regiones promotoras de MTA y WTAP en *A. thaliana* y *M. polymorpha*.** Se muestran las categorías de diferentes procesos y/o respuestas a los cuales pertenecen los elementos *cis* encontrados, el tamaño de los promotores considerados para el análisis, así como el número de elementos encontrados por categoría en cada promotor.

Categoría*	Descripción	No. de elementos identificados			
		<i>pAtMTA</i> (3000pb)	<i>pAtFIP37</i> (1700 pb)	<i>pMpMTA</i> (2821 pb)	<i>pMpWTAP</i> (3000 pb)
<b>Relacionado a ABA</b>	Elementos relacionados con ácido abscísico	12	2	0	2
<b>Tejido específico</b>	Elementos de expresión tejido-específica (incluye semilla, polen, hoja)	324	171	144	324
<b>Relacionado a sequía</b>	Elementos relacionados con la respuesta a deshidratación.	30	20	14	34
<b>Relacionado a GA</b>	Elementos relacionados a ácido giberélico.	22	16	19	24
<b>Relacionado a luz</b>	Elementos relacionados con expresión regulada por luz.	66	25	25	40
<b>Relacionado con frío</b>	Elementos relacionados con la respuesta a baja temperatura.	9	3	0	5
<b>Ritmo circadiano</b>	Elementos relacionados con el control del ritmo circadiano	4	3	6	6
<b>Relacionado con auxinas</b>	Elementos relacionados con auxinas.	14	5	4	9

\* Los elementos se agruparon en categorías discretas de acuerdo a características particulares. El desglose de las categorías se muestra en el Anexo III.

Dentro de la categoría “Relacionado a ABA” se incluyeron todos los elementos con una referencia directa a la secuencia consenso de los elementos de respuesta a ABA (ABRE). El promotor de *AtMTA* mostró el mayor número de elementos de esta categoría, mientras que en el promotor de los otros genes contenía un menor número de estos elementos. En la categoría de “Relacionado a

GA” se incluyeron a los elementos en *cis* relacionados con ácido giberélico, en el que observamos la presencia de varios elementos en los cuatro promotores. También se encontraron elementos en *cis* en la categoría “Relacionado con auxinas”, fitohormona que regula el crecimiento y desarrollo de la planta, con un menor número de elementos en los promotores en comparación con ácido giberélico.

En el análisis se incluyeron a los elementos en *cis* anotados con alguna referencia explícita de su relación con una expresión tisular particular en la categoría de “Tejido-específico”. Esta resultó ser la categoría más sobrerrepresentada en todos los promotores de los genes analizados y se incluyó elementos en *cis* relacionados con la expresión específica en raíz, células guarda, semilla, embrión y polen. Dentro de esta categoría una proporción importante de elementos encontrados en los promotores está relacionada a raíz y polen (**Figura 15**, ver Anexo III y Figura suplementaria I). En la categoría “Relacionado a sequía” se incluyeron los elementos en *cis* anotados con alguna referencia directa de ser encontrados en genes que se inducen por deshidratación; en esta categoría se encontraron, por ejemplo, elementos con sitio de unión a factores transcripcionales tipo MYC, factores necesarios para la expresión de genes involucrados en deshidratación. Cabe destacar que los elementos con unión al factor transcripcional MYB se encuentran en una categoría distinta pero que algunos de ellos también participan en la respuesta a déficit hídrico. Entre otras condiciones ambientales, se encontraron elementos con una relación directa a bajas temperaturas bajo la categoría “Relacionado con frío”. El promotor de *MpMTA* no mostró elementos en esta categoría.

Se observaron elementos en *cis* dentro de la categoría “Ritmo circadiano” en los cuatro promotores evaluados. Por último, debido a la notable presencia de elementos en *cis* con alguna anotación referente a la regulación por luz, se incluyeron en la categoría “Relacionados con luz”. Los cuatro promotores presentan un número elevado de elementos en *cis*, siendo la categoría más representada después de “Tejido-específico”.

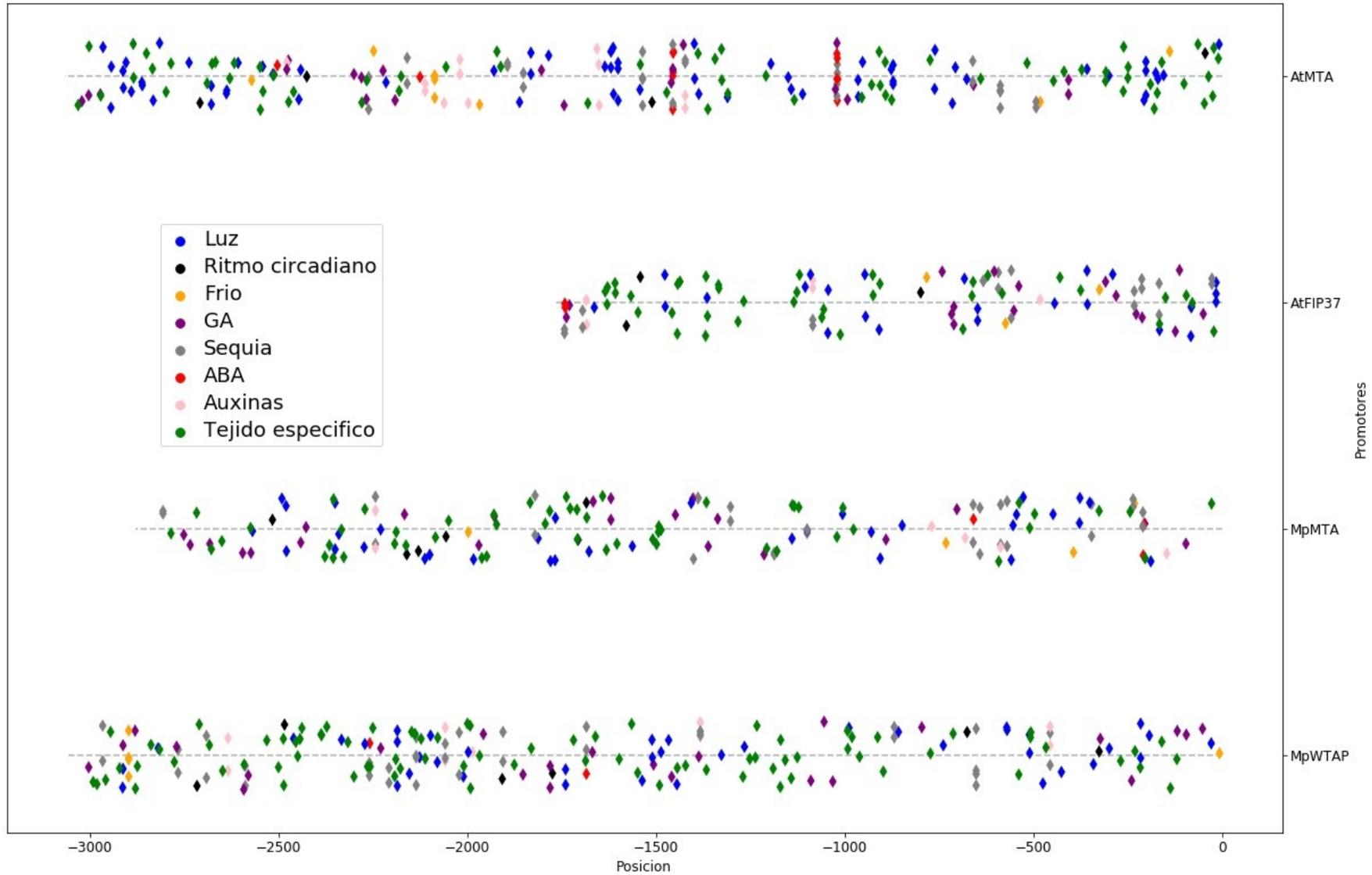
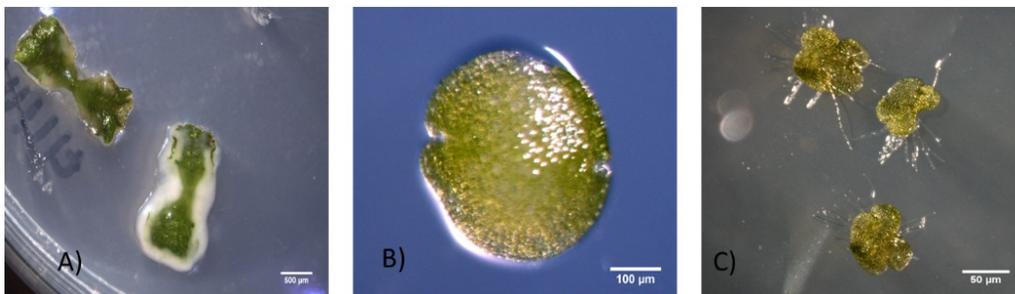


Figura 15.- Representación gráfica de la ubicación de probables elementos en *cis* en los promotores de los genes que codifican para las proteínas del complejo de metiltransferasa m<sup>6</sup>A en RNA mensajeros. Para una descripción más precisa de cada uno de los elementos encontrados en los promotores, ver Anexo III. En esta gráfica, la categoría “Tejido-específica” solo muestra los elementos en *cis* relacionados con polen y raíz.

## Generación de un cultivo axénico y establecimiento de condiciones de crecimiento para *M. polymorpha*.

Para poder trabajar con *M. polymorpha*, especie modelo que se propuso para este proyecto, primero se generó un cultivo axénico con el fin de eliminar factores externos que pudieran afectar experimentos futuros, como la transformación mediante *Agrobacterium*, extracción de RNA y DNA, respuestas a estrés, etc.

Utilizando protocolos reportados (Vujičić et al. 2010; Takenaka et al. 2000) y con la asesoría de M. en C. Carlos Chávez (Unidad de Transformación y Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto de Biotecnología) se aseptizaron gemas a partir de talos no axénicos de *M. polymorpha* trabajados en el laboratorio (**Figura 16 A**) y se mantuvieron en propagación. Posteriormente se seleccionaron cultivos libres de contaminación (**Figura 16 B y C**), los cuales se mantuvieron con siembras consecutivas mediante gemas asegurando que la contaminación no se presente de nuevo y poder eliminar cualquier estrés presente por la aseptización con el fin de obtener una población de plantas homogéneas y un material biológico adecuado para su estudio.



**Figura 16.- Generación del cultivo axénico de *M. polymorpha*.** A) Talos no axénico de 14 días, B) gema de un cultivo axénico, y C) talo axénico de 7 días en papel celofán dulce.

Los cultivos se mantuvieron en condiciones asépticas y en continua propagación mediante gemas; además, se generaron cultivos en macetas con sustrato (*Jiffy Peat Pellet*) (Rövekamp et. al., 2016), las cuales son condiciones idóneas de crecimiento para generar estructuras reproductivas y realizar posteriores cruces, etapas del desarrollo que se plantearon utilizar en el proyecto.

Para controlar las condiciones de crecimiento de *M. polymorpha*, y establecer un trabajo con las mismas condiciones publicadas de otros laboratorios (Okada et al. 2000; Chiyoda et al. 2008), ajustamos la intensidad y tiempo de luz, y temperatura de las cámaras de crecimiento Percival.

### **Establecimiento de las condiciones para el crecimiento de la fase reproductiva de *M. polymorpha*.**

Con el cultivo axénico y el establecimiento de las condiciones adecuadas (Chiyoda et al. 2008) se completó el crecimiento de la fase vegetativa de *M. polymorpha*, la cual consiste en el desarrollo de talos y la formación de conceptáculos y gemas. Antecedentes nos sugieren que la metilación m<sup>6</sup>A en mRNA está implicada en procesos como la diferenciación y la organogénesis (Zhong et al. 2008; Bodi et al. 2012), además de análisis de transcriptomas de diferentes tejidos publicados de *M. polymorpha* (Bowman et al. 2017) que muestran que los genes implicados en la vía de metilación son más abundantes en las estructuras reproductivas. Debido a esto, el siguiente objetivo fue establecer las condiciones adecuadas para la generación de las estructuras reproductivas de la fase sexual (formación de anteridio y arquegonio) de *M. polymorpha*, la cual da lugar, posteriormente de la fertilización, al esporófito.

Para inducir la formación de las estructuras reproductivas se han reportado las siguientes condiciones de crecimiento:

- Día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad)
- Temperatura moderada (15-22 °C)
- Luz blanca (50-60  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- Luz Roja Lejana (730 nm, 15  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Con esta información, ajustamos las diferentes condiciones reportadas para la generación de estructuras reproductivas. Entre los factores más importantes fueron las condiciones de humedad e intensidad lumínica. Dado que en los cuartos de crecimiento del Instituto de Biotecnología no es posible ajustar a una humedad adecuada para *M. polymorpha*, como alternativa se usaron macetas con un domo con el cual fue posible controlar el nivel de humedad, evitando un exceso

que podría conducir a una contaminación del material; éstas también contaban con espacio suficiente para el crecimiento de las estructuras reproductivas.

Otro de los factores determinantes es la intensidad de luz roja lejana (730 nm), esencial para inducir la generación de las estructuras reproductivas (Shimamura 2016b). En un inicio se empleó una lámpara LED de luz roja lejana con la cual fue posible generar los anteridióforos de *M. polymorpha* TAK-1 (**Figura 17**), sin embargo, se observó que estas lámparas generaban un estrés en nuestros cultivos (**Figura. 18 A**) debido a la alta intensidad luminosa a la que se encontraban sometidas. Cabe mencionar que durante el crecimiento de las estructuras reproductivas de *M. polymorpha*, se observó que la línea trabajada en el laboratorio, anotada como TAK-II (línea femenina), en realidad era TAK-I. Debido a que ambas líneas tienen un crecimiento idéntico en fase asexual no es posible diferenciarlas a simple vista sin embargo, mediante PCR de DNA genómico se pueden identificar fragmentos cromosómicos específicos (Fujisawa et al. 2001). Después de realizar la genotipificación de todos los cultivos correspondientes a *M. polymorpha*, no se encontró la línea femenina reportada en el laboratorio por lo que fue solicitada y donada por el grupo de laboratorio Dr. Kohchi (Universidad de Kyoto, Japón).

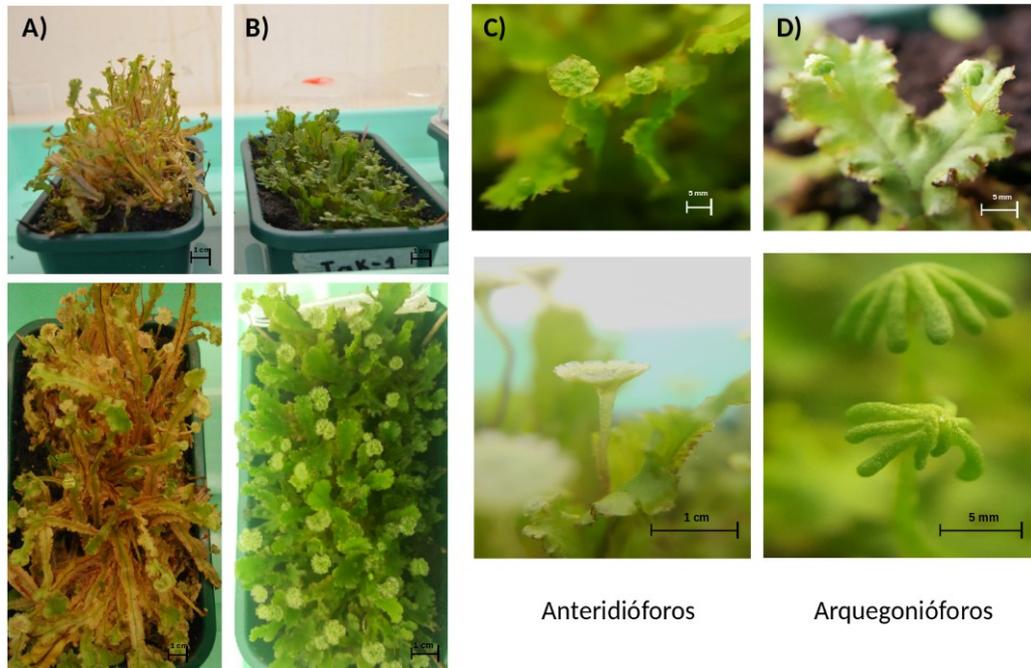


**Figura 17.- Estructuras reproductivas masculinas de *M. polymorpha*.** Crecimiento de las estructuras reproductivas masculinas (anteridióforos) las primeras dos semanas en condiciones con alta intensidad de luz roja lejana.

Una vez ajustada la intensidad de las lámparas de luz roja lejana e instaladas en los cuartos de crecimiento, finalmente se logró observar las estructuras reproductivas masculinas y femeninas de *M. polymorpha* (**Figura 18 B, C y D**) con un crecimiento adecuado hasta su maduración.

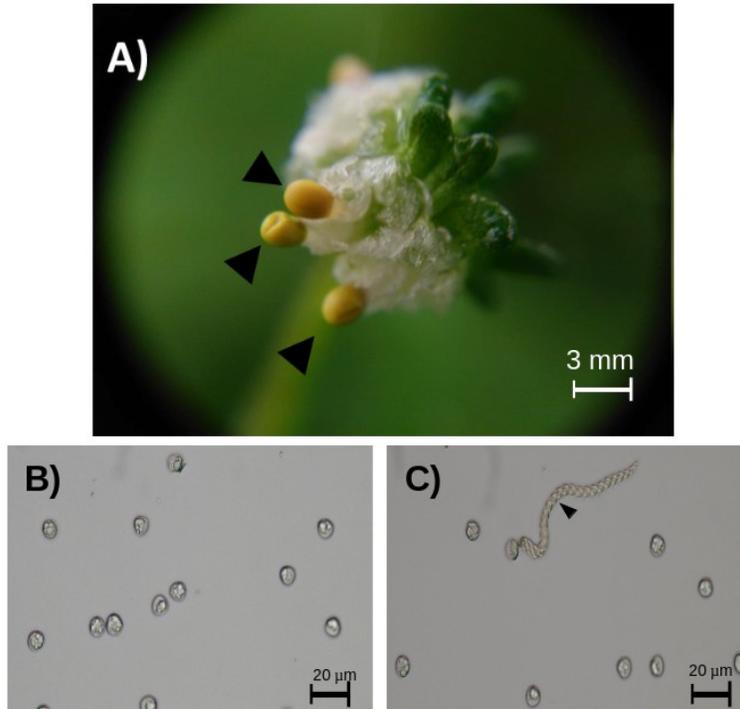
Una vez obtenidas las estructuras reproductivas, se llevaron a cabo las cruces entre TAK-I y TAK-II con el fin de obtener esporófitos. Las cruces se realizaron colocando una gota de agua en el

anteridióforo para provocar la liberación de los espermias, y posteriormente se transfirió la suspensión con los espermias, de manera ventral, en el arquegonióforo. Se observó la formación del esporofito entre 3 y 4 semanas después de la fertilización (**Figura 19**).

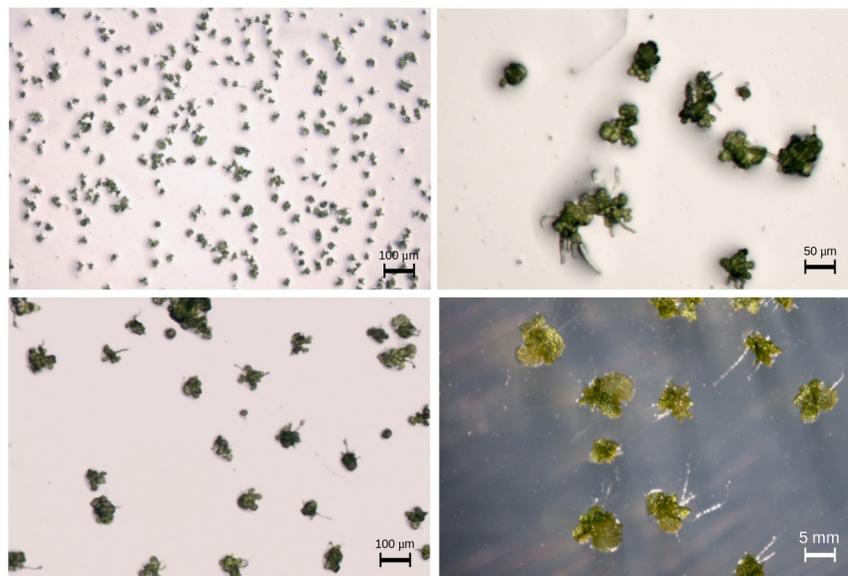


**Figura 18.- Efecto de la intensidad de luz roja lejana en el desarrollo y crecimiento de *M. polymorpha*.** A) *M. polymorpha* Tak-I con una mayor con intensidad de luz roja lejana por más de tres semanas. B) Plantas bajo condiciones reportadas de intensidad de luz roja lejana por más de tres semanas. C y D) Estructuras reproductivas masculinas (TAK-I) y femeninas (TAK-II), respectivamente.

Se sabe que un esporangio contiene cerca de  $1 \times 10^6$  esporas y su viabilidad es importante para completar el ciclo de vida de *M. polymorpha* en el laboratorio, además de su uso en la transformación mediante *Agrobacterium* (Ishizaki et al. 2008). Los esporangios generados (**Figura 19**) se colectaron y se dejaron secar para posteriormente inducir su germinación en condiciones *in vitro* (**Figura 20**) logrando de esta manera establecer el crecimiento de las todas las etapas de crecimiento de *M. polymorpha*.



**Figura 19. Formación del esporófito de *M. polymorpha*.** A) Arquegoniόforo con esporόfitos. Las puntas de flechas señalan los esporangios. B y C) Esporas observadas en el microscopio. La punta de flecha indica la estructura denominada elater, esencial para liberaci3n de las esporas. Fotos tomadas con la ayuda de M.C. Coral Martίnez.

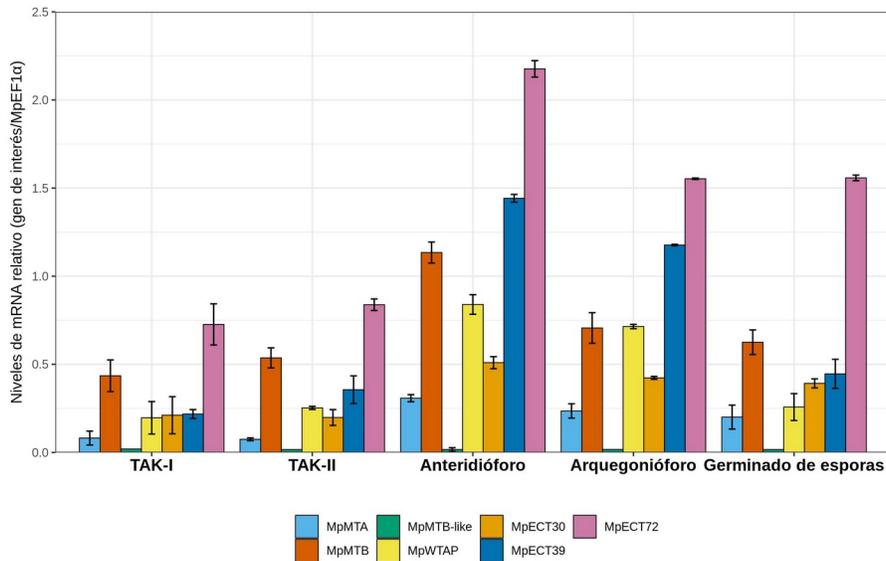


**Figura 20. Seguimiento de la germinaci3n de las esporas de *M. polymorpha*.** Las imάgenes superiores muestran la germinaci3n de las esporas despu3s de 7 dίas. La figura inferior izquierda muestra el crecimiento de los talos inmaduros a los 10 dίas; la figura inferior derecha muestra los talos desarrollados a partir de esporas a los 16 dίas.

## Acumulación de transcritos de los genes que codifican para las sub-unidades del complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A de mRNA en *M. polymorpha*.

Una vez que se establecieron las condiciones adecuadas para el crecimiento de *M. polymorpha* en su fase vegetativa y reproductiva, se colectaron tres replicas con muestras de talos (cada réplica contiene 100 mg de talo de 14 días de crecimiento de TAK-I y TAK-II, incluyendo los nodos apicales), de los gametóforos ( 2-4 anteridióforos  $\geq$  5 mm de diámetro y 3-6 arquegonióforos de 10-15 mm de alto fueron recolectados, respectivamente, por réplica) y germinados de 7 días a partir de esporas, en inglés denominado *sporelings*, para extracción de RNA total. Se sintetizó el cDNA a partir del RNA total de las distintas muestras y se llevó a cabo la determinación de la abundancia de los transcritos de interés por RT-qPCR. Se realizó las curvas estándar de cada par de oligonucleótidos para determinar la eficiencia y la concentración adecuada para llevar a cabo el análisis de expresión relativa con respecto al gen de referencia en *MpEF1 $\alpha$*  recomendado para análisis de expresión (Saint-Marcoux et al. 2015).

Para tener un panorama general de la expresión de estos genes en todas las etapas de desarrollo evaluadas, se analizó la expresión relativa con respecto al gen de referencia *MpEF1 $\alpha$* , el cual se expresa de manera similar en todas las etapas. De acuerdo con este análisis (**Figura 21**, Figura suplementaria II-A), se observó una baja acumulación de los transcritos (con respecto a *MpEF1 $\alpha$* ) que codifican a las proteínas del complejo de metilación (*MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB*) en las distintas etapas de desarrollo evaluadas, solo se observó un ligero aumento en estructuras reproductivas. Los transcritos correspondientes de *MpMTB-like* presentaron una acumulación menor que los otros transcritos en todas las etapas de crecimiento evaluadas. Además de los genes del complejo de metilación, también se evaluaron los niveles de acumulación de los genes efectores de m<sup>6</sup>A en mRNA *MpECT30*, *MpECT39* y *MpECT72* (Tabla suplementaria I). Se observó que existe poca acumulación de los transcritos correspondientes a los tres genes efectores *MpECT* con respecto a *MpEF1 $\alpha$* , siendo los transcritos de *MpECT39* y *MpECT72* los que presentan una mayor acumulación en las estructuras reproductivas, mientras que el transcrito *MpECT30* presentó una acumulación similar en las distintas etapas evaluadas.



**Figura 21. Análisis cuantitativo por RT-PCR de los genes relacionados a la vía de metilación m<sup>6</sup>A relativo a *MpEF1α* en distintas etapas de crecimiento de *M. polymorpha*.** Se muestran los niveles de acumulación de los genes de interés con respecto al gen de referencia ( $2^{-\Delta Cq}$ ) en las etapas: Talos masculinos y femeninos de 14 días, anteridióforos, arquegoniόforo y germinado de esporas (también denominado talos inmaduros a partir de espora) de 7 días. La figura suplementaria II-A muestra los mismos resultados en una escala logarítmica. Las barras de error representan el error estándar de tres replicas biológicas.

Una vez obtenidos los datos, nos interesamos en observar la acumulación relativa de los transcritos de los genes de interés de las distintas etapas con respecto al talo masculino de 14 días (Figura suplementaria II-B), en donde observamos que en las estructuras reproductivas se encuentra una mayor acumulación con respecto al talo masculino de los transcritos que codifican para las subunidades del complejo de metilación, mientras que el transcrito del gen determinado como *MpMTB-like* no mostró cambios en las distintas etapas, permaneciendo constante. En cuanto a los transcritos de los genes efectores *ECT*, observamos una mayor acumulación de los tres transcritos con respecto al talo masculino de 14 días, siendo *MpECT39* el que presenta mayor cambio.

### **La metodología de transformación de gemas de *M. polymorpha* mediante *Agrobacterium* no genera líneas transgénicas estables**

Para poder estudiar el papel que llevan a cabo las proteínas involucradas en la modificación de m<sup>6</sup>A durante el desarrollo de *M. polymorpha*, se planteó generar líneas transgénicas que tuvieran

afectada la expresión de *MpMTA* y *MpWTAP* mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi) contra los transcritos de los genes para obtener mutantes tipo *knock-down*.

Para lograr este objetivo decidimos en un inicio usar el protocolo de transformación por gemas mediante *Agrobacterium*, también conocido como G-AgarTrap reportado por Tsuboyama-Tanaka 2015, ya que las gemas son de fácil manipulación, de rápido crecimiento, no se requiere la formación del esporófito y era un protocolo que estaba siendo implementada en el laboratorio.

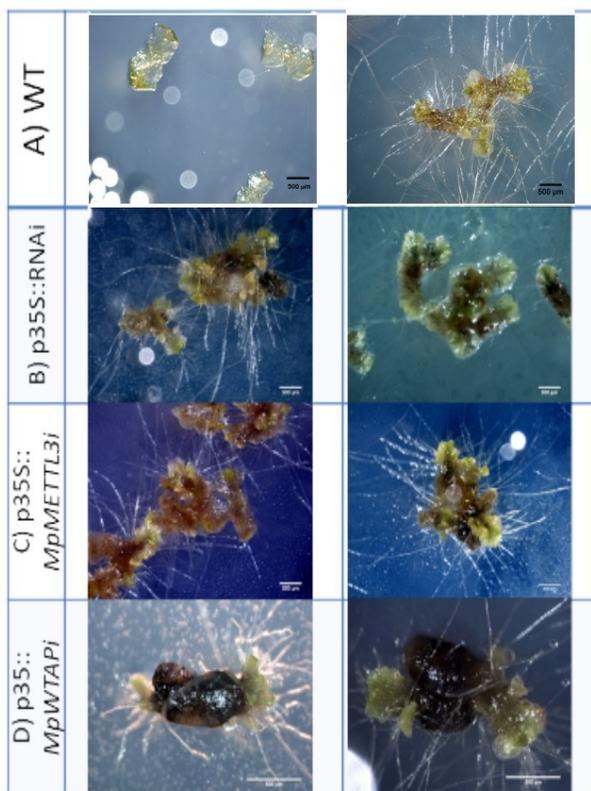
Las gemas provenientes del cultivo axénico se utilizaron para la generación de líneas transgénicas. La transformación a partir de gemas consiste principalmente en 3 etapas:

- a) Pre-cultivo individual de las gemas de *M. polymorpha* y de las cepas de *A. tumefaciens*.
- b) Inoculación de *M. polymorpha* con *A. tumefaciens*.
- c) Selección de plantas transgénicas.

Utilizando esta metodología, se trató de transformar plantas con las siguientes construcciones: *p35S::Mpmtai*, *p35S::Mpwtapi* y *p35S::RNAi* (vector vacío pBA-DC-RNAi, anexo IV, control positivo de transformación) (**Figura 22**). Durante las primeras semanas de crecimiento, aparentemente presentaban resistencia al MSO (L-metionina-S-sulfoximina), un inhibidor de la glutamina sintetasa. Como control negativo de selección, se utilizaron gemas WT. Se observó el crecimiento de talos que fueron co-cultivados con agrobacterias con construcciones *p35S::Mpmtai* y *p35S::RNAi* en el medio suplementado con el herbicida. A partir de estos talos se obtuvieron gemas (G1), las cuales se sembraron en medio con selección para el aislamiento de líneas isogénicas, sin embargo, no se observó un crecimiento adecuado que nos permitiera obtener líneas transgénicas.

A partir de las G1 correspondiente a cada construcción, se realizó PCR para verificar la inserción del T-DNA dentro del genoma de *M. polymorpha*, utilizando oligos específicos para la amplificación del gen de resistencia a MSO y el promotor 35S, sin embargo, no se pudo observar un amplicón en ambos casos, incluso en plantas de las cuales se obtuvieron las G1 (Figura suplementaria III-A). En cuanto al crecimiento de estas plantas G1, una vez transferidas a medio suplementado con MSO para su selección, se observó un crecimiento aberrante ya que los talos se tornaban negros, no crecían adecuadamente y generaban muchos rizoides (**Figura 22 C y D**), lo cual en un principio se

consideró como posibles fenotipos del silenciamiento de nuestros genes de interés, sin embargo, el hecho de que no observáramos la presencia de la inserción de T-DNA en las plantas y que las plantas que se co-cultivaron con agrobacterias con el vector control creciera de manera similar, nos indicó que las plantas generadas no eran transgénicas y los fenotipos pudieran deberse a la presencia del herbicida MSO. Los mismos resultados se obtuvieron al transformar la línea femenina, TAK-II, la cual se había reportado que presentaba una mayor eficiencia de transformación en gemas (Tsuboyama-Tanaka and Kodama 2015). A pesar de seguir la metodología reportada por Tsuboyama y colaboradores, no se pudieron obtener líneas transgénicas mediante gemas usando MSO, por lo cual concluimos que el medio de selección con MSO no es el adecuado para poder llevar a cabo la selección de líneas transgénicas a partir de gemas en estas condiciones.

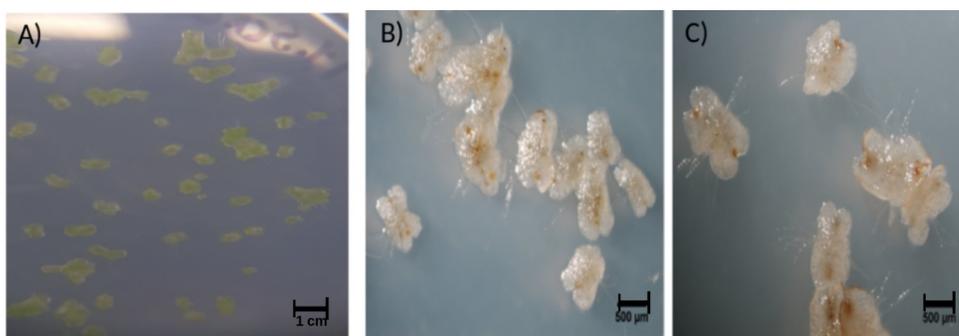


**Figura 22.- Efecto de la presencia de MSO durante la selección de plantas transformadas por el método de agar-trap en gemas de *M. polymorpha*.** A) Plantas WT por 14 días en medio Gamborgs suplementado con 5  $\mu$ M de MSO. B), C) y D) Plantas “aparentemente resistentes” al medio Gamborg suplementado con 5  $\mu$ M de MSO después del co-cultivo con las células de *Agrobacterium* con B) *p35S::RNAi*, C) *p35S::MpMTAi* y D) *p35S::MpWTAPI*, las cuales más adelante se comprobaron que no eran líneas transgénicas.

Dado los problemas que se tuvieron con el anterior vector (nombre del vector) que confería “resistencia” a MSO, se realizaron de nuevo las construcciones de los RNAi contra *MpMTA* y

*MpWTAP* mediante la reacción de recombinación con el vector binario *pHGWIWG(II)* (donado por la Dra. Catalina Arenas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí) el cual se utiliza para expresión del RNA de interferencia de interés mediante el promotor 35S de CaMV. Para este vector se reporta que confiere resistencia a higromicina en plantas. Posterior a la recombinación, se realizó la secuenciación de las regiones de RNAi y finalmente se transformó *A. tumefaciens*.

Se procedió nuevamente con la transformación de las gemas de *M. polymorpha*, tanto de TAK-I y TAK-II. Después de dos semanas en el medio de selección, no se observaron plantas sobrevivientes de las distintas construcciones (**Figura 23**). Para determinar la causa de esto, decidimos revisar los vectores donados en los cuales determinamos que este vector anotado con resistencia a higromicina no presentaba el gen de resistencia a higromicina, ya que por PCR se determinó que la resistencia que tenía para plantas era a Neomicina/Kanamicina (Figura suplementaria III-D, E).

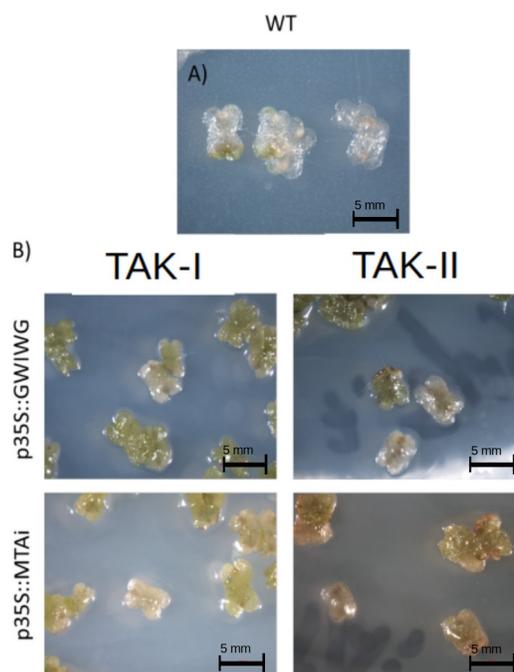


**Figura 23.** Gemas de *M. polymorpha* TAK-I antes y después de agregar la solución de selección con 10 μg/mL de higromicina a las placas con el medio Gamborg. A) Gemas de *M. polymorpha* antes de agregar el antibiótico Higromicina. B) y C) Gemas transformadas con los vectores *pH-MpMTAi* y *pH-MpWTAPi*, respectivamente, después de dos semanas en el medio de selección.

A pesar del resultado por la incorrecta anotación y verificación de los vectores, es importante notar el fenotipo de la selección cuando se usa uno de los antibióticos reportados para *M. polymorpha*, como higromicina (**Figura 24**), comparando con el uso de MSO (**Figura 22 B, C, D**), en donde no se observa un ennegrecimiento de los pro-talos ni generación excesiva de rizoides con el uso de higromicina, además de que en las primeras dos semanas el 100% de las plantas no transformadas mueren.

Dado que los vectores anteriores presentaban la resistencia de Neomicina/Kanamicina, se ocuparon para transformar *M. polymorpha* y su selección con el antibiótico G418, dada su mayor

eficacia observada anteriormente. Se observó que después de una semana las gemas WT mueren en presencia del antibiótico, mientras que en las posibles plantas transformadas con *p35S::GWIWG* (vector vacío) y *p35S::MTAi*, a las dos semanas “aparentemente” algunas plantas parecían haber sobrevivido (**Figura 24**). Estas se trasplantaron a otro medio con este mismo antibiótico para llevar a cabo la segunda ronda de selección por 1-2 semanas y poder eliminar todos los falsos positivos. En la primera ronda de selección el porcentaje de plantas aparentemente resistentes fue de alrededor del 15% mientras que en la segunda este porcentaje disminuyó a menos del 5% o en algunas construcciones no fue posible obtener plantas resistentes. Por estas razones, como se mencionará posteriormente, se decidió utilizar otra estrategia.

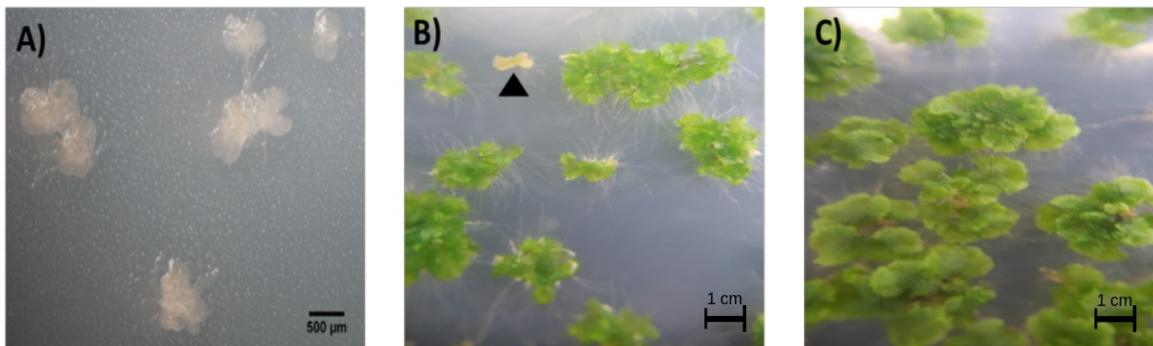


**Figura 24. Selección de *M. polymorpha* en presencia de G418 posterior a la transformación mediante el uso de Agar-Trap de gemas.** A) Gemas WT de *M. polymorpha* en presencia de G-418 por dos semanas. B) Plantas de TAK-I y TAK-II posterior a la transformación con *p35S::GWIWG* y *p35S::MTAi* por una semana en G-418 (Primera ronda de selección).

Al mismo tiempo, para conocer donde y cuando se podrían expresar nuestros genes de interés en *M. polymorpha*, también se planteó realizar las construcciones de los promotores de estos genes dirigiendo la expresión de proteínas reporteras. Para las construcciones se consideró como región promotora de *Mpmett13* 2800 pb, y de *Mpwtap* 3000 pb, las cuales se clonaron en el vector de entrada *pENTR*. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de recombinación con el vector destino *pKGWFS7* que contiene los genes que codifican para las proteínas reporteras *EGFP* y *GUS* (Figura

suplementaria III-B). Se transformó a *A. tumefaciens* con estas construcciones para posteriormente utilizarlas en la transformación por gemas.

La generación de líneas transgénicas con este vector binario *pKGWFS7* confiere resistencia a kanamicina en plantas. Como no se tenía establecida la concentración necesaria de este antibiótico para la selección en *M. polymorpha*, ya que hasta el momento no se han reportado su uso para esta especie, primero se realizaron curvas de tolerancia de este antibiótico en diferentes concentraciones. Se determinó que la concentración mínima letal para *M. polymorpha* es de 100 µg/mL kanamicina, tanto en la línea masculina, como femenina. Se usó la concentración mínima letal para permitir que las líneas transgénicas sobrevivieran, sin embargo, es importante mencionar que en las concentraciones altas de kanamicina se observaron gemas WT sobrevivientes lo cual nos ocasionaría la obtención de falsos positivos (además de que la kanamicina después de una semana se vuelve inestable por la luz). Tomando en cuenta estas observaciones, llevamos a cabo la transformación por el método AgarTrap realizando varias rondas de selección semanalmente para asegurarnos de seleccionar solo las plantas resistentes al antibiótico durante las primeras semanas. Conforme el talo se desarrollaba se observó que solamente las zonas en contacto con el medio de selección morían (**Figura 25**).

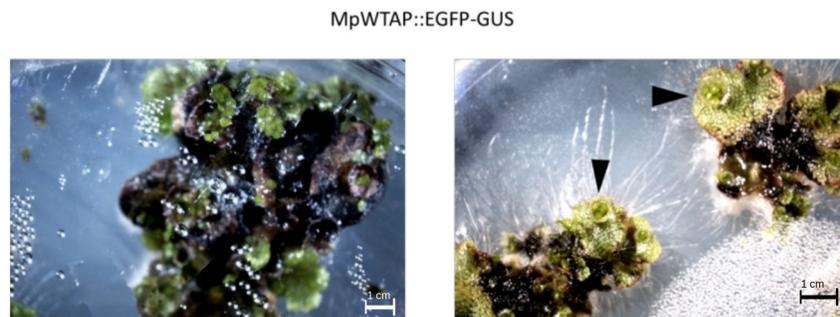


**Figura 25. Aparente resistencia al antibiótico Kanamicina posterior a la transformación de gemas de *M. polymorpha* para la generación de líneas para el análisis de promotores. A) Gemas WT de *M. polymorpha* en 100 µg/mL kanamicina después de dos semanas. B) plantas transformadas con el vector binario *pKGWFS37* en la cuarta ronda de selección (G0). La flecha en negro señala un talo que no sobrevivió en esta ronda. C) plantas transformadas con el vector *MpWTAP::EGFP Gus* en la cuarta ronda de selección (G0).**

Debido a los problemas que se observaron al utilizar kanamicina como antibiótico para la selección, y a que MSO no funcionó como marcador de selección, se decidió utilizar para los experimentos posteriores los marcadores de selección ya reportados para *M. polymorpha*:

gentamicina, clorsulfon, G-418 e higromicina. El antibiótico G418 presenta una mayor eficiencia en la selección de plantas transgénicas de *M. polymorpha* en comparación con kanamicina (Ishizaki et al. 2015).

Tomando en cuenta el fenotipo observado de las plantas con el antibiótico kanamicina, se sembraron los talos aparentemente resistentes a este antibiótico en un medio con G-418 (**Figura 26**). Este antibiótico presenta el mismo mecanismo de acción que Kanamicina, pero es mucho más específico para organismos eucariontes y más estable (Ishizaki et al. 2015). Posterior a las dos semanas de transferir los talos a este medio de selección observamos que la mayoría de los talos presentaron necrosis, indicándonos que estas plantas eran falsos positivos junto con la presencia de posiblemente líneas quiméricas (plantas con regiones que no se transformaron y con regiones transformadas), la cuales la kanamicina no logro disminuir (**Figura 25**). Los talos sobrevivientes dieron a la formación de gemas (G1) las cuales se sembraron en el medio de selección con G-418 obteniendo ninguna línea con resistencia. También se realizó PCR a los talos de los cuales se obtuvieron las gemas sin lograr observar la presencia del transgén (Figura suplementaria III-C).



**Figura 26.** Fenotipo de las plantas Tak-1 con *MpWTAP::EGFP-GUS* que habían presentado aparente resistencia a kanamicina y que fueron crecidos posteriormente con el antibiótico G-418 (5 ug/mL). Se observan segmentos necróticos. En la imagen de lado derecho, las flechas negras señalan los conceptáculos que formaron gemas provenientes de tejido transformado (G1).

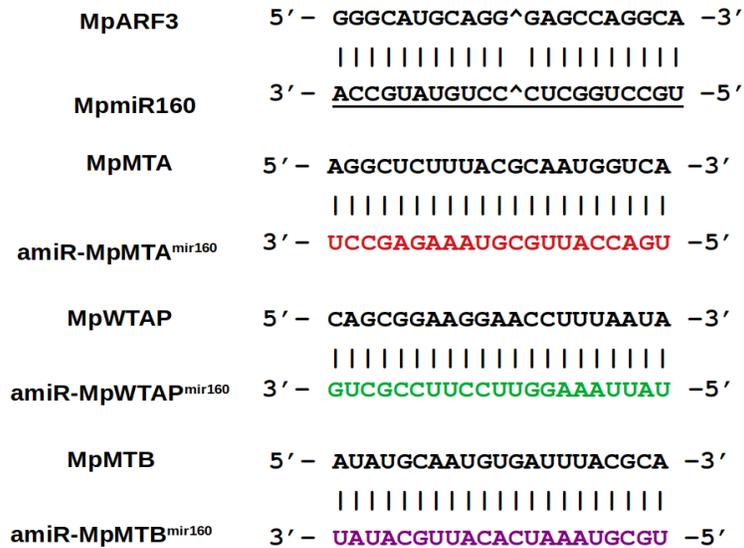
### **Generación de líneas transgénicas que dirigen un microRNA artificial contra *MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB* usando talos inmaduros desarrollados a partir de esporas.**

#### **Diseño de micros RNAs artificiales para *M. polymorpha*.**

Dado los resultados anteriores y la poca o nula eficiencia de transformación que se obtuvo con el método de transformación Agar-Trap para gemas, se optó por cambiar de metodología de

transformación usando los talos inmaduros desarrollados a partir de esporas para la generación de líneas transgénicas en *M. polymorpha*, ya que, en este punto, se había logrado completar todas las etapas de crecimiento de la planta y se habían obtenido esporas. Al mismo tiempo, dado los problemas que se tuvo utilizando vectores de silenciamiento mediante RNAi, se decidió cambiar la estrategia por la expresión de un microRNA artificial (amiRNA) que tuviera como blanco alguno de nuestros genes de interés (Flores-Sandoval et al. 2016). Dado los problemas presentados con los vectores utilizados anteriormente, nos dimos a la tarea de conseguir vectores diseñados exclusivamente para *M. polymorpha* (Ishizaki et al. 2015), los cuales cumplen con las características para una mayor eficiencia de transformación. Se utilizaron los vectores *pMpGWB103* y *pMpGWB107* que fueron donados por la Dra. Nayelli Marsch Martínez del LANGEBIO (CINVESTAV, Irapuato). El vector *pMpGWB103* fue utilizado para la expresión de los amiRNAs, los cuales han sido reportados para realizar mutantes *knock-down* de manera específica en *M. polymorpha* (Flores-Sandoval et al. 2016; Rövekamp, Bowman y Grossniklaus 2016; Jones and Dolan 2017).

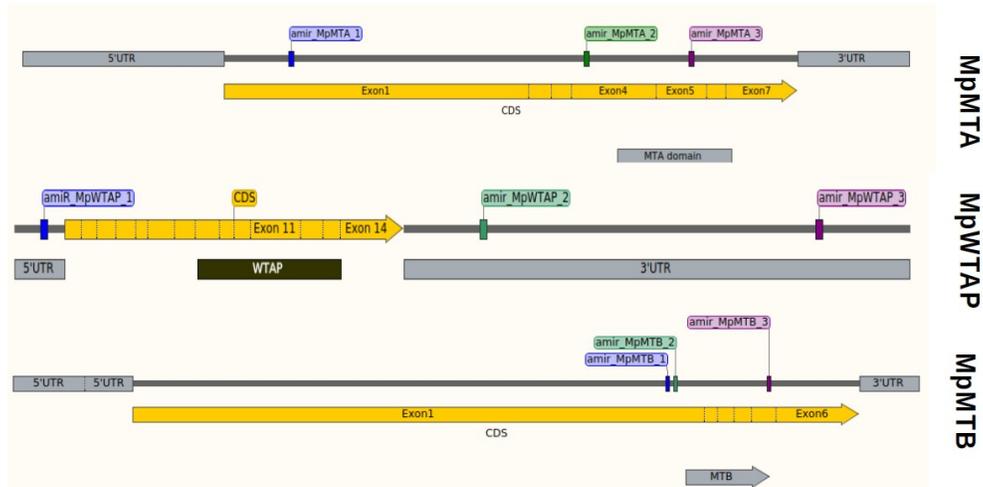
Para llevar a cabo los diseños de los amiRNAs con blanco a los transcritos de los genes *MpMTA*, *MpWTAP*, y *MpMTB*, primero se determinaron los posibles *off-targets*, lo cual se realizó tomando segmentos de 21 nucleótidos y realizando un alineamiento en la base de datos *MarpolBase*. Se seleccionaron las secuencias que presentaron menos de 10 posibles *off-targets*, y posterior a seleccionar los candidatos para el diseño de los amiRNAs, se utilizó el precursor endógeno de *MpmiR160* como esqueleto y templado para el diseño de las construcciones reemplazando la secuencia de miRNA y miRNA\* de 21 nucleótidos que complementa con el transcrito del gen blanco (**Figura 27**, ver Anexo V).



**Figura 27. Diseño de amiRNAs para *M. polymorpha*.** Las secuencias contienen 21 nucleótidos y se muestra su apareamiento con los transcritos blanco de *MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB*. En la parte superior se muestra el *MpmiR160* endógeno y su transcrito blanco *MpARF3*.

Dentro de la estructura tallo-asa del precursor *MpmiR160*, la secuencia mirRNA presenta un apareamiento imperfecto con la secuencia de miRNA\*. En nuestras construcciones, la secuencia original de miR160 fue reemplazada con la secuencia complementaria del gen de interés (*amiRMTA*), y la secuencia de miR160\* fue reemplazada con la secuencia (*amiRMTA\**), que aparea imperfectamente con el amiRNA para formar la estructura tallo-asa característica del precursor miRNA. Para diseñar el amirRNA\*, los *mismatches* fueron introducidos en la misma posición como el gen endógeno *miR160* (posiciones: 4, 9, 15 del amiRNA), con el fin de mantener exactamente las mismas propiedades físicas del microRNA endógeno. En el *miR160/miR160\** endógeno, el *mismatch* en la posición 9 es G/U y no genera una burbuja física en el tallo-asa. Adicionalmente, las secuencias fueron seleccionadas para que las posiciones 17-19 del amirRNA fuesen ricas en GC y que la primera base del amiRNA fuese un uracilo.

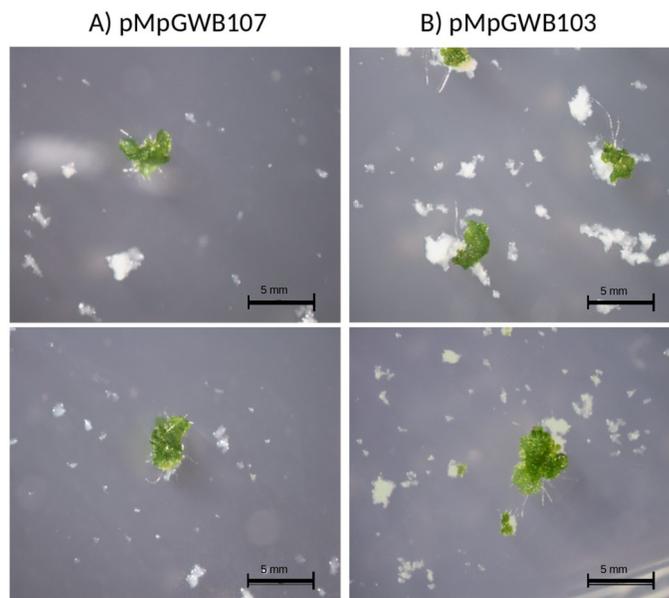
Siguiendo los parámetros previamente descritos (Flores-Sandoval et al. 2016), se realizó el diseño de tres amiRNAs independientes para los transcritos blanco *MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB* (**Figura 28**). Cada amiRNA se insertó en el esqueleto del vector *pENTR* mediante las enzimas de restricción *NotI* y *Ascl*. Finalmente se realizó la recombinación con el vector *pMpGWB103* para obtener los amiRNAs fusionados al promotor constitutivo de *MpEF1α*.



**Figura 28. Localización de los tres amiRNAs independientes diseñados para cada una de los transcritos de los genes blanco *MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB*.** Se representan los transcritos de los tres genes señalando en cajas grises las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, y en amarillo la región codificante y sus exones. A lo largo de los transcritos se localizan los amiRNAs independientes.

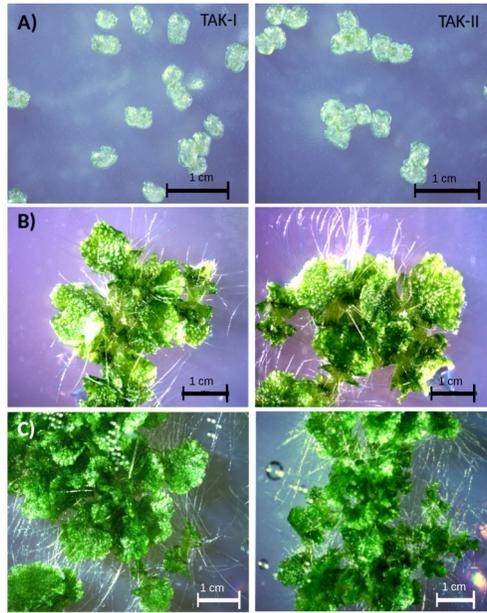
### **Transformación de germinados de esporas de *M. polymorpha* mediante *Agrobacterium*.**

Para llevar a cabo esta metodología, primero se recolectaron y prepararon los esporangios, lo cual consiste en separar los esporangios de los arquegonióforos y dejarlos secando por aproximadamente 7-10 días para su posterior almacenamiento a 4°C. Como las esporas provienen de un cultivo en condiciones no axénicas, es necesario aseptizarlas ya que la metodología consiste en el crecimiento en un cultivo líquido 0M51C suplementado con vitaminas por lo que se debe eliminar toda posible contaminación.



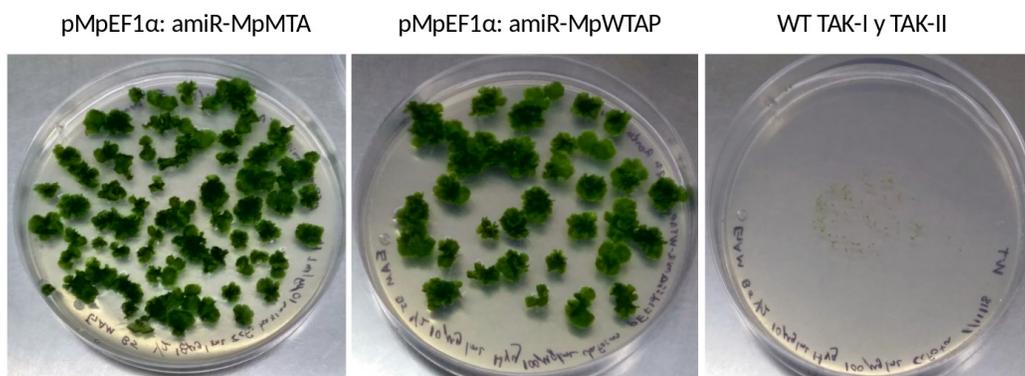
**Figura 29. Ensayos de transformación de esporas de *M. polymorpha*.** En un primer intento de transformación, usando la suspensión de esporas de dos esporangios y utilizando los vectores A) pMpGWB107 y B) pMpGWB103, se obtuvieron muy pocas plantas resistentes a higromicina en la primera ronda de selección.

Durante los primeros intentos de transformación por este método con los vectores control (*pMpGWB103* para la expresión de amiRNAs y *pMpGWB107* para análisis de promotores), se obtuvieron proporciones muy bajas de plantas resistentes (**Figura 29**), por lo cual se requirió estandarizar cada uno de los pasos de la metodología previamente a la transformación con los vectores de interés. Una vez que se logró establecer la asepsia y el manejo de los cultivos líquidos, se crecieron esporas por 7 días en medio líquido (Ishizaki et al. 2008). Posteriormente se inocularon con el cultivo de *A. tumefaciens*, transformados previamente con los vectores control. Se dejó el co-cultivo por 48 horas en agitación constante, y finalmente, se recolectaron los germinados de esporas. Se llevaron a cabo lavados de los germinados para eliminar el exceso de *Agrobacterium* y se sembraron en medio con higromicina para la selección de plantas transformadas y cefotaxamina para inhibir el crecimiento *Agrobacterium* en nuestras plantas. Se realizaron dos rondas de selección de 1-2 semanas cada una y por último se transfirieron a medio sin selección. Mediante PCR se determinó la presencia del transgén de resistencia a higromicina obteniendo líneas transgénicas estables para masculinos y femeninos (**Figura 30** y figura suplementaria III-F).



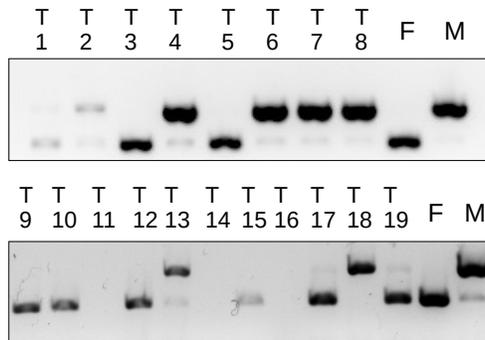
**Figura 30. Generación de plantas transgénicas resistentes al antibiótico higromicina mediante la transformación de germinados de esporas de *M. polymorpha*.** A) Talos de 12 días de ambas líneas WT, TAK-I y TAK-II, que presentaron sensibilidad a higromicina en el medio Gamborg. Talos de 12 días de crecimiento transformados con los vectores B) pMpGW107 y C) pMpGWB103 que presentaron resistencia a higromicina en el medio Gamborg al final de la segunda ronda de selección, en las cuales se encuentran presentes plantas masculinas y femeninas.

Una vez que se logró estandarizar el método (tanto en condiciones de luz, volumen de *Agrobacterium* y tiempo de co-cultivo, ver Materiales y métodos), se llevó a cabo la generación de plantas transgénicas de los amiRNAs (**Figura 31**), obteniendo más de 200 líneas resistentes al antibiótico y que presentaron el gen de resistencia a higromicina (Figura suplementaria III-G), confirmando ser líneas transgénicas. Se generaron líneas transgénicas con los diferentes amiRNAs para los transcritos de los genes blanco *MpMTA*, *MpWTAP* (**Figura 31**) y *MpMTB*. Después de la primera ronda de transformación se tomaron aprox. 100 plantas para la segunda ronda de selección con el antibiótico. Posteriormente a la segunda ronda de selección, se tomaron 30-50 plantas para su crecimiento en medio sin selección considerándolas como líneas independientes, esto con el fin de producir gemas y poder propagarlas.



**Figura 31. Obtención de plantas resistentes en la segunda ronda de selección con higromicina con el protocolo de transformación de germinados de esporas.** Después de dos semanas, se obtuvieron plantas resistentes a higromicina, tiempo en el que también se observa que todas las esporas de la línea silvestre, tanto de TAK-I y TAK-II, presentaron sensibilidad.

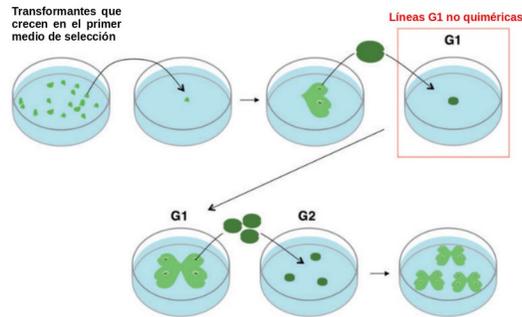
Al transformar las esporas, se obtiene una población mixta de plantas masculinas y femeninas, por lo que fue necesario identificar y separar las plantas transgénicas de acuerdo a su género. Se llevó a cabo la genotipificación por PCR para amplificar fragmentos específicos de DNA genómico (Fujisawa et al. 2001). Generalmente la extracción de DNA genómico se lleva a cabo mediante CTAB sin embargo, se observó que para *M. polymorpha* se requiere bastante tejido para obtener una cantidad aceptable de DNA genómico. Esto implica dejar crecer mucho las plantas y cortar un gran segmento para realizar la genotipificación, resultando ser ineficiente para la gran cantidad de plantas que se tenían que mantener y revisar. Debido a esto, se estandarizó un método que nos permite realizar la genotipificación con aproximadamente un segmento de 3 x 3 mm de la planta (ver Materiales y Métodos), de manera rápida y sencilla. Con el uso de este método se logró separar plantas de acuerdo a su género (**Figura 32**).



**Figura 32. Ejemplo de la genotipificación para identificar el sexo de las líneas independientes transgénicas de *M. polymorpha*.** Cada carril representa el resultado de la amplificación de las regiones cromosómicas específicas del género a partir de DNA de una sola planta (G1), que fue transformada con la construcción *pEF1a:amiR-MpMTA*, resistente después de dos rondas de selección. Se uso DNA genómico de TAK-I, masculino (M) y de Tak-II, femenino (F) como control para la genotipificación.

Se ha descrito que al transformar *M. polymorpha* mediante *Agrobacterium*, las diferentes plantas transgénicas obtenidas puede presentar múltiples eventos de transformación en un tejido multicelular (Ishizaki et al. 2016), por lo tanto, una planta generada a partir de la transformación de germinados de esporas (Ishizaki et al. 2008) o explante de talos (Kubota et al. 2013) puede presentar quimerismo después de la ronda de selección (**Figura 33**). Para prevenir este potencial quimerismo de talos resistentes al antibiótico de selección, las líneas isogénicas fueron obtenidas a partir de gemas las cuales se forman asexualmente y provienen de una sola célula en los conceptáculos (G1) (Barnes y Land 1908; Hughes 1971), las cuales se usaron posteriormente.

De esta manera, una vez confirmadas las líneas independientes, se llevó a cabo la siembra de las plantas G1 de las cuales se obtendrán las plantas G2 que serán usadas en un futuro para los análisis respectivos. Cabe destacar que las G1 se sembraron en medio con selección por dos semanas para eliminar posibles falsos positivos, y posteriormente en medio sin selección para mantener las líneas.



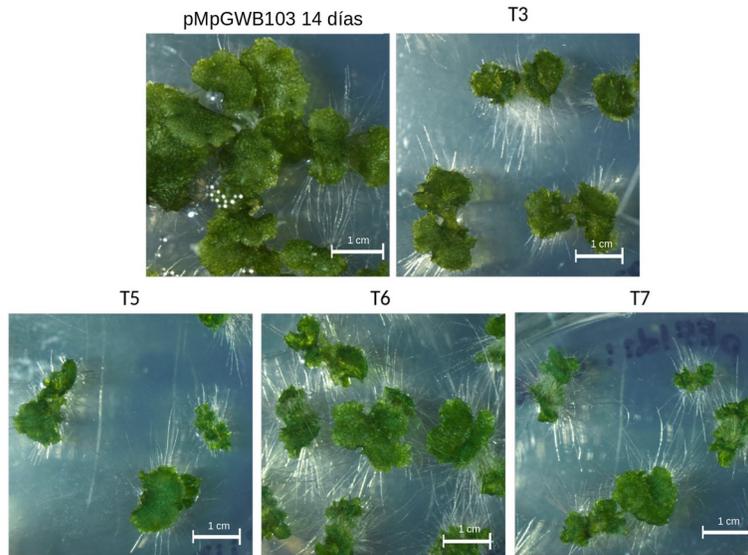
**Figura 33. Establecimiento de las líneas isogénicas usando gemas.** Las plantas transformadas después de la primera ronda de selección pueden ser quiméricas. Una gema se desarrolla a partir de una sola célula; de esta forma, una línea isogénica (G1) puede ser establecida por la selección de una sola gema de aquellas plantas formadas después de la transformación. Una vez establecidas, múltiples líneas isogénicas pueden ser usadas mediante el cultivo de gemas G2 formadas de la planta G1 (modificado de Ishizaki et al. 2016).

Se consideró utilizar como un control positivo de transformación, a parte de los vectores vacíos, la construcción que sobre-expresa el MpMIR160, ya que ha sido ocupada para transformar *M. polymorpha* y presenta fenotipos muy evidentes como la reducción del número de gemas y la disminución de nodo apicales (Flores-Sandoval et al. 2018). En resultados preliminares, se observaron fenotipos similares a los reportados por Flores-Sandoval y colaboradores en el 2018, como el crecimiento lento de los talos (**Figura 34 B**), en comparación a plantas con el vector vacío (**Figura 34 A**). Mientras que en los conceptáculos de la línea control se observaba la acumulación de gemas, las plantas transformadas con *MpMIR160* mostraron poca formación de estos propágulos.



**Figura 34. Comparación de los fenotipos por la sobre-expresión de *MpMIR160*, usado como control de expresión de amiRNA y como control para las condiciones de crecimiento.** A) Imagen izquierda muestra la línea transgénica con el vector *pMpGWB103* por 14 días mientras que la imagen derecha muestra el conceptáculo con gemas de un talo de un mes de edad; B) Fenotipos observados por una línea transgénica (G1) con la construcción *pEF1a:MpMIR160* en donde se observa de izquierda a derecha: Talos con 14 días; talo con un mes de edad (se señalan los conceptáculos); acercamiento a conceptáculo de un talo con 25 días de crecimiento; se observa un fenotipo similar al observado por Flores-Sandoval y colaboradores en 2018, en donde reportan un número reducido de gemas, crecimiento lento y disminución de nodos apicales a 35 días de crecimiento (B, imagen en el extremo derecho).

En un inicio, al sembrar las gemas G1 de algunas líneas independientes transformadas con la construcción expresora de amiRWTAP, observamos distintos crecimientos de las plantas transgénicas (**Figura 35**). Entre los fenotipos preliminares que observamos, fue un menor crecimiento con respecto a la planta transformada con el vector control, y el crecimiento irregular en los lóbulos de algunas líneas transgénicas (T5 y T7). Para lograr una mejor comparación, es necesario en un futuro trabajar con la G2 y analizar con más detalle y más réplicas si este aparente fenotipo se repite, además de que es necesario determinar los niveles de acumulación del amiRNA junto con el transcrito blanco para determinar que los posibles fenotipos que se pudieran observar en un futuro, sean a causa de que el amiRNA este disminuyendo los niveles del transcrito de interés. Esto también se propone como perspectiva para las diferentes líneas transgénicos de amiRMTA y amiRMTB.



**Figura 35. Crecimiento de talos provenientes de plantas transgénicas independientes que fueron transformadas con el vector de expresión de amiRWTAPE.** Cada talo proviene de las gemas (G1) de plantas transgénicas independientes en medio Gamborg suplementado con higromicina. Se observa un crecimiento lento en comparación a la línea control a los 14 días de crecimiento.

Dado que se logró implementar en el laboratorio el método de transformación de talos inmaduros a partir de esporas y con las condiciones adecuadas, por último, se decidió obtener líneas transgénicas para el análisis de promotores con este método para que puedan ser usadas en estudios posteriores. Debido al tiempo, estas líneas solo quedaron en la generación G1 y aún es necesario que sean corroboradas.

También, por último, se probó utilizar vectores con el gen de resistencia a BASTA/MSO, y obtener plantas transgénicas por el método de talos inmaduros a partir de espora, sin embargo, no se logró generar ninguna línea transgénica, lo cual nos confirma que BASTA/MSO en las condiciones establecidas, no funciona como un medio de selección para *M. polymorpha*.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### **El complejo de metiltransferasa se encuentra conservado en Briófitas.**

Dado que en un principio en este trabajo se planteó estudiar el complejo de metiltransferasa que participa en la vía de metilación de m<sup>6</sup>A, primero nos dimos a la tarea de identificar las proteínas homólogas al complejo principal de metilación que se han descrito en *A. thaliana* en la planta *M. polymorpha* mediante un análisis *in silico*. Se identificaron proteínas que contenían a los dominios MT-A70 y WTAP, lo cual nos sugiere la conservación del mecanismo y la importancia de la metilación en plantas, desde plantas basales pertenecientes al grupo de las Briófitas (*M. polymorpha* y *P. patens*). Adicionalmente, también se identificaron proteínas homólogas a proteínas efectoras encargadas de reconocer a los RNAs mensajeros metilados en *A. thaliana*, en *M. polymorpha*, las cuales presentaron el dominio ECT. En *A. thaliana* se han encontrado 13 miembros, mientras que en *M. polymorpha* y *P. patens* solo se determinaron 3 y 4 miembros respectivamente. Debido al reducido número de proteínas efectoras que se encuentran en estas plantas, resaltan como modelos atractivos para estudiar en un futuro la participación de las proteínas efectoras, sin la posible redundancia y complejidad que podría presentar en *A. thaliana*.

En nuestro análisis se lograron identificar tres proteínas con el dominio de MT-A70 presentes en *M. polymorpha* (MpMTA, MpMTB y MpMTB like) sin embargo, la identificación de los dominios no es suficiente para afirmar su homología en secuencia con las proteínas ya descritas que forman el complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A en otros organismos. Por esta razón, se decidió llevar a cabo un análisis filogenético usando las secuencias completas de proteínas de plantas y otros organismos eucariontes que contienen el dominio MT-A70 (Bokar et al. 1997). En el árbol filogenético obtenido, podemos observar la formación de tres ramas, las cuales cada una agrupa a las proteínas METTL3, METTL14 y a un grupo adicional de proteínas que presentan el dominio MT-A70 (**Figura 14**). En el grupo donde se encuentran las proteínas determinadas como METTL3 en otros organismos (Zhong et al. 2008, Agarwala et al. 2012, Hongay y Orr-Weaver 2011, Dominissini et al. 2012), encontramos un solo miembro de *M. polymorpha* (MpMTA), al igual que en el grupo de las proteínas determinadas como METTL14 (MpMTB en *M. polymorpha*) (Liu et al. 2014b; Ping et al. 2014, Růžička et al. 2017). Por otro lado, se encontró que existe un grupo adicional de proteínas con el dominio MT-A70 en donde se localizan proteínas anotadas como METTL4 en otros

organismos, pero que no han sido descritas que participen en el complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A hasta el momento, por lo cual no se puede descartar que tengan un papel relevante en la metilación de RNA.

En el análisis filogenético también se observó que existe una clara división entre las proteínas del complejo de metiltransferasa que se encuentran en plantas basales como las briofitas, formando un sub-grupo, entre las proteínas que se encuentran en plantas angiospermas que se observan en un mismo sub-grupo, y entre las proteínas que se encuentran en animales, formando también otro sub-grupo. Esto nos muestra que, aún con la lejana relación que existe entre algunas plantas con otros organismos, es posible observar la alta conservación de las proteínas de este complejo de metiltransferasa en los distintos grupos de plantas y animales analizados.

**Las regiones promotoras de los genes del complejo de metiltransferasa poseen una gran variedad de elementos *cis* que corresponden a diferentes tejidos y responden a diferentes condiciones.**

Dado que la secuencia promotora de un gen puede poseer diferentes elementos *cis* que nos pueden sugerir en qué condiciones o tejidos de la planta se pudiera expresar una proteína de interés, y dado que se propuso y se realizaron construcciones transcripcionales para en un futuro analizar la expresión de proteínas reporteras mediada por los promotores de *MpMTA* y *MpWTAP*, se realizó un análisis *in silico* de los promotores de estos genes y de los promotores de sus homólogos *AtMTA* y *AtFIP32* en *A. thaliana*. El análisis de elementos en *cis* de los promotores mostró que existen varias categorías compartidas en los genes evaluados (**Tabla 2, Figura 15; Anexo III**), lo cual nos sugiere que estos genes pueden expresarse en condiciones similares en estos dos organismos. El análisis mostró que tanto los promotores de los genes de *A. thaliana* y *M. polymorpha* poseen, varios elementos en *cis* dentro de la categoría de sequía, y están presentes antes del 5'-UTR de los genes en cuestión lo cual nos sugiere que la expresión de estos genes en condiciones de sequía pudiera tener alguna participación en la respuesta a estrés. También se observó de manera interesante que mientras los promotores de los genes en *A. thaliana* presentan diversos elementos en *cis* de respuesta a ABA, estos no se encuentran presentes en el promotor de *MpMTA* o no son abundantes en el promotor de *MpWTAP*, por lo cual es posible que

el papel que tuvieran los genes de *M. polymorpha* en la respuesta a sequía podría no estar mediada por la hormona ABA.

También se encontraron elementos *cis* relacionados a otras fitohormonas, en las cuales se observó con mayor representación las relacionadas con ácido giberélico, presente en los promotores de los cuatro genes. Esta hormona regula la germinación, el crecimiento e incluso en la regulación en la reproducción de la planta (Vandenbussche, et al., 2007) además de controla el desarrollo del polen en plantas con flor. Estos análisis nos sugieren que posiblemente el complejo de metilación m<sup>6</sup>A de mRNA tenga una participación importante en la respuesta al ácido giberélico.

Otras de las categorías más representadas en este análisis son las relacionadas por luz y tejido-específico. Las plantas son extremadamente sensibles y su desarrollo es afectado por señales ambientales de luz. Particularmente, *M. polymorpha* muestra una plasticidad morfológica dependiente del ambiente y principalmente por la luz, a lo largo de su ciclo de vida (Komatsu, et al., 2019). La presencia de estos elementos en *cis* nos sugiere que los genes del complejo de metilación evaluados puedan tener una participación importante durante el desarrollo de las plantas en respuesta a luz como la transición a la formación de un órgano de la planta, o en el caso de *M. polymorpha*, la transición a formar estructuras reproductivas.

En cuanto a la categoría de elementos en *cis* relacionados a tejido-específico, es importante mencionar que estas dos plantas poseen órganos muy diferentes e incluso complicados de comparar. En ambas plantas se encontraron elementos relacionados en semilla, sin embargo, este órgano no está presente en *M. polymorpha*. Un análogo a la semilla, en cuanto a la función de dispersión y formación de un nuevo individuo en *M. polymorpha*, podría ser las esporas y las gemas, tejidos de propagación sexual y asexual respectivamente, por lo cual la presencia de estos elementos en *cis* nos podría sugerir que estos genes tienen una participación durante la generación de estos tejidos. También se encontraron en los promotores un número elevado de elementos relacionados al polen. Al igual que la semilla, el polen no es un tejido presente en *M. polymorpha*, pero su análogo en cuanto a células sexuales encargadas de la fecundación podrían ser los espermias que provienen del anteridio en la planta masculina, lo cual nos puede sugerir que estos genes que codifican para el complejo de metiltransferasa de m<sup>6</sup>A en mRNA puedan participar durante el desarrollo de estas estructuras. Entre otra clase de elementos en *cis* encontrados en todos los promotores analizados fue "ROOTMOTIFTAPOX1", el cual se ha descrito

que es específico en raíces y en plantas regenerativas (Leach et al., 1991), por lo que resultaría interesante poder evaluar estos genes en *M. polymorpha* en la regeneración, después de generar un daño sobre la planta.

Por lo anterior, podemos observar que los elementos en *cis* arrojados por nuestro análisis *in silico*, se encuentran compartidos en categorías similares en ambas especies, con excepción de los elementos en *cis* de respuesta a ABA, los cuales casi no tuvieron presencia en los genes de *M. polymorpha*. Con esta evidencia, a pesar de ser un análisis *in silico*, esta información da soporte a la hipótesis de que los dos genes que codifican a proteínas del complejo de metilación son regulados de manera similar y puedan tener una participación importante durante el desarrollo de *M. polymorpha*. Es importante señalar que el análisis *in silico* es especulativo y la relevancia de los elementos en *cis* particulares de los promotores evaluados, en relación con la expresión de los mismos, debe ser confirmada experimentalmente.

### **Establecimiento de las condiciones de crecimiento para *M. polymorpha***

Dado que *M. polymorpha* se considera un modelo reciente para el estudio en plantas, decidimos establecer su crecimiento utilizando las mismas condiciones reportadas en la literatura, esto con el fin de evaluar y reproducir experimentos con una mayor confiabilidad. Se estableció como primer objetivo obtener cultivos axénicos de *M. polymorpha*. Para la aseptización de los cultivos, fue importante considerar la concentración de hipoclorito de sodio comercial y Tritón X-100 que se iban a utilizar, ya que observamos que en concentraciones elevadas se afecta el desarrollo de las gemas y el crecimiento de talos. Una vez ajustadas las concentraciones para la aseptización (ver Materiales y Métodos), se propagaron las plantas por 3-4 generaciones subsecuentes con el fin de recuperar a las plantas de un estrés causado por la solución usada.

Una vez que los cultivos no presentaron contaminantes, procedimos a establecer las condiciones de crecimiento para la fase asexual con las condiciones reportadas en la literatura. Para esto, primero ajustamos la intensidad de las luces LED de las cámaras de crecimiento utilizadas, a fin de que obtener una intensidad similar a la utilizada con lámparas incandescentes, como se reporta para el crecimiento de *M. polymorpha* (Chiyoda et al. 2008). Para el ajuste de intensidad de la luz LED blanca fue necesario utilizar un luxómetro específico para LEDs (LED Light Meter DT-3809), ya que la medición con luxómetros comunes puede resultar incorrecta y guiarnos a una intensidad

diferente a la necesitada; adicionalmente, al usar LEDs blancos, el espectro de luz emitido no es el más adecuado para las plantas por lo que consideramos ajustar la luz lo más cercano a las condiciones reportadas. Una vez establecidas las condiciones para el ciclo asexual, los talos se crecieron de manera *in vitro* usando celofán dulce (**Figura 16 C**) en el medio Gamborg's B5 ½. El empleo de celofán dulce se planteó para facilitar la colecta de tejido para posteriores análisis con el propósito de no dañar el tejido al momento de la recolección.

Para llevar a cabo el establecimiento de las condiciones para el ciclo sexual de *M. polymorpha*, en el cual se induce el crecimiento de las estructuras reproductivas, es necesaria la presencia de luz roja lejana (730 nm) y temperatura menor o igual a 21°C, sin embargo, las condiciones de los cuartos de crecimiento no eran adecuadas para el desarrollo de esta planta. Como alternativa se utilizaron lámparas LED de rojo lejano y se ajustó su intensidad ya que observamos que la intensidad también era un factor determinante. Una intensidad alta generaba un estrés severo en la planta, como se mostró en la **Figura 18A**; mientras que una intensidad baja no genera las estructuras reproductivas. Medir correctamente la intensidad de la luz roja lejana no es posible con luxómetros comunes, para ello se requieren de adaptadores (o dispositivos) especiales, los cuales no se contaban en el laboratorio, sin embargo, con el asesoramiento del personal donde se adquirieron las lámparas (Maura Qin de empresa *Shenzhen Liweida Optoelectronics Co., Ltd*) se ajustó el voltaje y altura a las cuales se debían colocar las lámparas para obtener la intensidad de aproximadamente  $15 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz roja lejana necesaria para *M. polymorpha*. De esta manera, se logró observar un mejor crecimiento de nuestros cultivos y la generación de estructuras reproductivas (**Figura 18 C y D**).

Para completar el ciclo de vida de *M. polymorpha* en el laboratorio, fue necesaria la formación del esporófito, para el cual el agua es un vehículo importante para que se lleve a cabo la fecundación de la célula huevo en el arquegonio con los espermias del anteridio. En un primer intento por realizar las cruces de las líneas TAK, se utilizó agua destilada en la extracción de espermias de los anteridios para transferirlos a un arquegonio, sin embargo, no se observó la formación del esporófito después de 4 semanas e hipotetizamos que las plantas podrían ser estériles y no producían espermias. Por ello, se extrajeron espermias y se observó su presencia en microscopio de contraste de fases, en donde pudimos observar que presentaban motilidad, lo cual nos sugería que eran viables.

En la naturaleza, *M. polymorpha* principalmente lleva a cabo su fertilización cuando hay precipitaciones, por lo que el agua cae en los anteridióforos y posteriormente al arqueogonio. Siguiendo un proceso similar, decidimos usar agua potable en lugar de agua destilada estéril, y transcurridas 3 semanas después de la fertilización, se logró observar el esporofito (**Figura 19**). Posiblemente, el hecho de que el agua destilada y el agua potable presenten potenciales osmóticos distintos fue un factor determinante para crear un ambiente adecuado en el que se mantuviera la viabilidad y vigor de los espermatozoides durante la fertilización de los gametos.

Una vez que se logró la formación de los esporófitos, se colectaron estas estructuras y se dejaron secar por 7-14 días, paso necesario para posteriormente poder inducir la germinación de las esporas de manera *in vitro* en medio Gamborg's B5 ½. Cabe mencionar que para una inducción correcta de la germinación de esporas es necesario la presencia de todo el espectro de luz, siendo la luz roja la más importante (Nakazato, Kadota, y Wada 1999), y debido a que las cámaras de crecimiento PERCIVAL presentan LED blancos (las cuales no cubren todo el espectro de luz) se suplementó el crecimiento de las esporas con luz LED roja (600-700 nm), obteniendo una germinación de las esporas hasta la formación de talos (**Figura 20**) y subsecuentemente gemas.

De esta manera, finalmente se establecieron las distintas etapas del ciclo de vida de *M. polymorpha* en el laboratorio con condiciones similares a las reportadas en la literatura (Chiyoda et al. 2008, Okada et al. 2000, Takenaka et al. 2000) cumpliendo unos de los objetivos más importantes para poder continuar con el presente trabajo. El establecimiento de las condiciones correctas para el crecimiento de *M. polymorpha* en el laboratorio también contribuye a que este modelo pueda utilizarse para proyectos futuros, mediante la generación de material biológico reproducible y confiable.

### **Genes identificados en la vía de metilación m<sup>6</sup>A presentan una mayor acumulación de transcritos en estructuras reproductivas sexuales.**

Una vez que establecimos las condiciones necesarias para el ciclo de vida de *M. polymorpha*, decidimos explorar los niveles de acumulación de los transcritos de los genes que se identificaron como componentes de la vía de metilación de m<sup>6</sup>A en las distintas etapas de desarrollo de la planta. Para tener una mejor idea de la acumulación de estos transcritos se realizó el tratamiento de datos de qRT-PCR con respecto al gen de referencia *MpEF1α* (**Figura 21** y Figura suplementaria

II-A). Observamos una baja acumulación de los transcritos correspondientes al complejo de metilación (*MpMTA*, *MpMTB* y *MpWTAP*) en los talos de 14 días de ambos géneros y un aumento ligero en las estructuras reproductivas sexuales y en germinados de 7 días a partir de espora (Figura suplementaria II-B). En cambio, los transcritos de los genes efectores (*MpECT30*, *MpECT39* y *MpECT72*) fueron los que presentaron una mayor acumulación en estas estructuras, destacando *MpECT39* y *MpECT72*, en comparación del talo de 14 días. Bowman y colaboradores en 2018 publicaron la recopilación de experimentos de secuenciación de RNA en distintas etapas y condiciones de crecimiento de *M. polymorpha*. Con estos datos exploramos los niveles de cada uno de los transcritos de los genes relacionados con la metilación en las condiciones reportadas (Figura suplementaria II-C). Observamos que los niveles de expresión de estos transcritos se encuentran más representados en el anteridióforo. Al analizar los valores individuales de los transcritos primarios, observamos que presentan un nivel de expresión bajo (menos de 100 lecturas normalizadas) en comparación con *MpEF1α* (Figura suplementaria II-D). A pesar de que las etapas y condiciones los RNA-seq no son las mismas que las evaluadas por qRT-PCR podemos observar un comportamiento similar en las estructuras reproductivas.

La acumulación del transcrito del gen *MpMTB-like* fue muy baja en todas las etapas evaluadas por qRT-PCR con respecto al gen de referencia y no mostró diferencias con respecto al talo además de que presentó lecturas bajas en los experimentos de RNAseq. Esta evidencia sugiere que, al menos en las etapas analizadas, este gene no participa en el complejo metiltransferasa, sin embargo, se deben seguir otras estrategias para corroborar dicha hipótesis.

Los resultados de acumulación de los transcritos de los diferentes genes homólogos a los componentes encontrados para la vía de metilación de m<sup>6</sup>A en las diferentes etapas de desarrollo analizadas de *M. polymorpha*, nos sugieren una posible participación de la metilación en tejidos donde ocurre la gametogénesis y diferenciación celular, debido a lo cual consideramos que es necesario en un futuro, evaluar las diferentes líneas generadas sobre-expresoras de los amiRNA, que nos permitan caracterizar la función de las proteínas de esta vía, además de un análisis del patrón de expresión de los promotores para determinar su localización en las distintas estructuras, ya que proponemos que puedan tener una función específica en estos órganos e la planta.

Para determinar la participación del complejo de metilación en *M. polymorpha*, principalmente en las estructuras reproductivas sexuales donde observamos una mayor acumulación de transcritos,

es necesario llevar a cabo la detección de la metilación de m<sup>6</sup>A en mRNA de estas etapas. Una manera de detectar la metilación es mediante la técnica de *dot-blot* (Nagarajan *et.al.* 2019). Esta técnica consiste, brevemente, en fijar el mRNA purificado en una membrana de nylon mediante UV para posteriormente detectar la metilación con un anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A, sin embargo, uno de los factores más importantes de la técnica es la cantidad y calidad del mRNA que se debe usar y que proviene de la purificación del RNA total. En el caso específico de *M. polymorpha*, observamos que las cantidades de RNA total que se obtenían de los distintos tejidos eran bajas y por lo tanto también el mRNA. Debido a los problemas en la extracción de RNA total llevamos a cabo el establecimiento de un protocolo con CTAB con una mayor cantidad de tejido (Ver ANEXO VI). Esta metodología nos indica ocupar hasta 5 g de tejido para obtener hasta 200 µg de RNA total, sin ningún contaminante e integro. Con esta metodología esperamos facilitar la obtención de mRNA en distintas etapas para la detección de m<sup>6</sup>A por *dot-blot* y otras técnicas, para así en un futuro poder determinar los niveles de metilación m<sup>6</sup>A de los mRNA en estos tejidos al igual que determinar por m<sup>6</sup>A-seq (Dominissini *et al.* 2013) si los transcritos que se encuentran metilados son los mismos o existen diferencias para cada una de las etapas del desarrollo de la planta.

### **La transformación de *M. polymorpha* por germinados de esporas para la generación de líneas transgénicas estables.**

Para llevar a cabo el estudio de la metilación de m<sup>6</sup>A en *M. polymorpha* era necesario la generación de líneas transgénicas estables. Se han reportado distintas metodologías para la transformación de *M. polymorpha* en las que destaca la transformación de esporas, talos y gemas mediante *Agrobacterium*. Dado que en un principio solo se podía crecer la planta de manera asexual en el laboratorio, se propuso utilizar el método de transformación de gemas por *Agar-Trap*, ya que era considerado por sus autores como un método sencillo y rápido de transformación (Tsuboyama-Tanaka and Kodama 2015). En un principio, se propuso utilizar RNA de interferencia para silenciar los genes de interés, por ser vectores disponibles en el laboratorio y su uso regular en plantas. Los vectores con los que se contaba en su momento contenían al gen *Bar* que conferían resistencia al antibiótico fosfotricina (herbicida BASTA) y a su análogo MSO (compuestos que inhiben a la enzima glutamina sintetasa, presente en planta), y que es ampliamente utilizado como marcador de selección en *A. thaliana*, sin embargo, no se obtuvieron plantas transformantes. Al realizar la selección de plantas “transgénicas” se observaba que el

herbicida provocaba estrés en plantas wt (control negativo de selección) y un estrés más severo en las plantas sometidas a selección para encontrar individuos transgénicos (**Figura 22**). La resistencia al herbicida BASTA no ha sido reportada en la literatura científica hasta el momento, y a inicio del presente proyecto solo se conocía de un grupo que trabajaba con *M. polymorpha* que había generado aparentemente líneas transgénicas con resistencia al herbicida BASTA (Garcias 2016, Tesis Licenciatura) sin embargo no pudimos tener acceso a las líneas transgénicas para poder comprobar y tener controles positivos, además de que en nuestra experiencia nunca pudimos obtener mediante las condiciones reportadas, líneas transgénicas con este marcador de resistencia, posiblemente debido a que la translocación del herbicida no es eficiente y/o existan otros factores que no permitan la transformación y selección adecuada.

Debido a lo anterior, se decidió trabajar con los marcadores de selección reportados en la literatura (Ishizaki et al. 2015), para los cuales existe la evidencia de la sensibilidad a los distintos antibióticos y que han demostrado su efectividad en la generación de plantas transgénicas de *M. polymorpha*, sin embargo, no se logró obtener la proporción de plantas transformadas que se reportan por Tsuboyama y colaboradores utilizando el método de Agar-Trap, ya que después de dos rondas de selección obteníamos menos del 2 plantas resistentes, en lugar de más de 60 plantas transformadas por cada 100 gemas como mencionan los autores. Estos resultados eran muy parecidos incluso cuando utilizábamos diferentes marcadores de selección como Higromicina y G-418. Adicionalmente, no hay reportes de estudios publicados en *M. polymorpha* en los que se hayan generado plantas transgénicas mediante la transformación de gemas por este método, y considerando las características de las gemas, las cuales son tejidos completamente diferenciados, podría ser un aspecto importante para que sean menos susceptibles a una transformación mediante *Agrobacterium*. Cabe mencionar que, en comunicación con Tsuboyama y colaboradores, un posible factor determinante en la transformación por este método es la permeabilización de las membranas junto con la humedad del ambiente (datos no publicados), sin embargo consideramos que la metodología no es reproducible ni es útil para la generación de líneas transgénicas de *M. polymorpha*, ya que ni con el uso de vectores con marcadores de selección adecuados, el uso de distintas cepas de *Agrobacterium*, variaciones en concentraciones de reactivos, tiempos de co-cultivo, intensidad o duración de luz, el uso de permeabilizantes de membrana y control de la humedad, permitieron la generación de líneas transgénicas (**Figura 23-26**).

Los métodos reportados para transformar *M. polymorpha*, citados en la literatura y ocupados por los laboratorios que usan este modelo, son mayormente los que utilizan regeneración de talos (Kubota et al. 2013) y por germinados de esporas (Ishizaki et al. 2008). Estos tejidos se caracterizan por presentar células aún no diferenciadas que se dividen activamente haciendo posible su transformación mediante *Agrobacterium*. Con los resultados que se obtuvieron por la metodología de *Agar-Trap* por gemas, junto con los antecedentes que nos reporta la literatura, y gracias a que posteriormente logramos implementar las condiciones necesarias para la generación de esporófitos en el laboratorio, se consideró establecer la transformación de germinados de esporas de *M. polymorpha*.

En un principio, durante la implementación de esta metodología se observó que, al germinar las esporas en los cultivos líquidos por 7 días (Takenaka et al. 2000; ver ANEXO VI), los germinados de esporas eran de un menor tamaño y en menor cantidad a los reportados, es decir, presentaban un crecimiento lento obteniendo menos de 10-20 plantas transformadas (**Figura 29**). En comunicación con los laboratorios que trabajan y han generado líneas transgénicas de esta planta, nos mencionaron que el crecimiento de *M. polymorpha* en este paso se realiza en luz continua de 24 horas, e incluso algunos laboratorios mencionan que llevan a cabo todos sus experimentos en esta condición, a pesar de que no sea algo natural para la planta. En el laboratorio no fue posible mantener las cámaras de crecimiento por 24 horas de luz continua, por lo que la alternativa fue monitorear y usar cultivos líquidos por 12-15 días, en los cuales observamos el germinado de las esporas de un mayor tamaño.

Otras consideraciones que se tuvieron que tomar en cuenta al momento de establecer el protocolo de transformación por esporas, fue el volumen de *Agrobacterium* utilizado y el tiempo de co-cultivo. En un principio no resultaba eficiente debido a que nuestra cepa de *Agrobacterium* crecía demasiado en los cultivos líquidos y formaba grumos con los germinados de esporas, lo cual imposibilitaba su eliminación. Después de establecer las condiciones adecuadas, se obtuvieron más de 200 líneas resistentes al antibiótico correspondiente (**Figura 30**), confirmando el porque es uno de los protocolos más citados para la generación de plantas transgénicas de *M. polymorpha* (Althoff et al. 2014; Koi et al. 2016; Flores-Sandoval et al. 2015; Ishizaki et al. 2013; Rövekamp, Bowman, and Grossniklaus 2016; Flores-Sandoval et al. 2016; Monte et al. 2019) y logrando el

establecimiento de las condiciones adecuadas para el laboratorio para la generación de líneas transgénicas para futuros trabajos.

Cabe mencionar, que también es posible la transformación de las esporas en agar (Tsuboyama and Kodama 2014), el cual se ha reportado en otros trabajos y que probamos posteriormente en el laboratorio. Con esta metodología obtuvimos plantas transgénicas para algunas construcciones (datos no mostrados), siendo el único protocolo de Agar-Trap que funciona para la transformación por esta metodología. Ambos protocolos se pueden ocupar para la generación de líneas transgénicas de *M. polymorpha* por esporas, cada uno con sus ventajas y desventajas, no obstante, recomendamos la transformación en medio líquido al estar ya completamente establecida en el laboratorio.

### **Diseño de microRNAs artificiales para la generación de mutantes de *M. polymorpha***

Como ya se mencionó anteriormente, para llevar a cabo una estandarización correcta de la transformación por germinados de esporas de *M. polymorpha*, se consiguieron posteriormente vectores con las características adecuadas para la generación de líneas transgénicas (Ishizaki et al. 2015). Para realizar el estudio de la metilación m<sup>6</sup>A en mRNAs, se diseñaron amiRNAs (Flores-Sandoval et al. 2016) con el objetivo de generar mutantes *knock-down* específicas para los genes *MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB*.

El diseño de los amiRNAs se llevó a cabo tomando en cuenta las características del *MpMIR160* endógeno, corroborando que las secuencias diseñadas presenten el mismo patrón de plegamiento, analizándolas con el software *Mfold*. La expresión de los amiRNAs se llevará cabo con el promotor constitutivo de *MpEF1 $\alpha$* , es cual presenta una expresión ubicua en *M. polymorpha*, a comparación del promotor constitutivo 35S de CaMV que se ha visto que no se expresa en meristemos y en algunos tejidos de las estructuras reproductivas (Althoff et al. 2014). De esta manera, se diseñaron tres amiRNAs independientes para cada gen, los cuales son complementarios a distintas regiones de los transcritos (**Figura 28**), con el fin de establecer y concluir con una mayor confianza los fenotipos observados al comparar plantas con amiRNAs diferentes. Además de la clonación de los amiRNAs de los genes de interés, se clonó el gen *MpMIR160* para expresarlo con el promotor constitutivo de *MpEF1 $\alpha$* , el cual servirá como un

control en la metodología de transformación y funcionamiento de los amiRNAs, debido a que ya se han reportado fenotipos evidentes cuando se sobre-expresa este microRNA (Flores-Sandoval et al. 2018).

### **Obtención de líneas transgénicas de los diferentes amiRNAs**

Una vez generadas las construcciones para silenciar a los genes *MpMTA*, *MpWTAP* y *MpMTB*, se transformaron y obtuvieron plantas transgénicas G2. Para la obtención de la generación G2, cada talo resistente en el medio de selección que produce las gemas G1, se les consideró como un evento de transformación (línea independiente) y las gemas que se generan a partir de esos talos, son clonas de las plantas transformadas, las cuales se pueden propagar para obtener la G2 y ser utilizadas posteriormente para su genotipificación, evaluación de fenotipos y demás experimentos. Para el caso de las plantas transformadas con los vectores *pMpEF1α:amiRMTA* y *pMpEF1α:amiRWTAP*, se comprobaron por PCR que contenían al gen *hptII* que confiere resistencia a higromicina (Figura suplementaria III-G), corroborando así la obtención de líneas transgénicas con las construcciones de interés. Para el caso de *pMpEF1α:amiRMTB*, solo se transformaron germinados de esporas y se obtuvieron varias líneas que presentaban resistencia a higromicina, por lo cual se tiene como perspectiva corroborar por PCR que las plantas sean transgénicas.

Durante la selección de líneas transgénicas, existe una población de plantas masculinas y femeninas, las cuales se deben separar mediante genotipificación por PCR, ya que ambas líneas son morfológicamente idénticas. Para llevar a cabo la genotipificación, es necesario la extracción de DNA genómico, el cual normalmente se lleva a cabo mediante CTAB y es necesario tener un fragmento grande de tejido, lo cual implica obtener plantas de un mayor tamaño y no resulta viable debido al espacio que se necesita para mantenerlas y el tiempo que debe esperarse hasta obtener la cantidad de tejido adecuado, además de que el corte de un segmento grande de tejido puede provocar un daño al crecimiento de la planta. Por lo tanto, decidimos establecer un método sencillo y rápido para la genotipificación en *M. polymorpha*, el cual consiste en recolectar un fragmento de 3 x 3 mm, homogeneizarlo en una solución de extracción y realizar PCR directa, finalizando la genotipificación de múltiples líneas en 1-2 horas (Materiales y métodos, **Figura 32**).

Con ayuda de este método se pudo llevar a cabo la separación de líneas femeninas y masculinas, de manera rápida, sencilla y confiable, y sin causar un daño excesivo a la planta.

Se ha reportado también que en la transformación de *M. polymorpha* se obtienen líneas transgénicas con múltiples inserciones, en un rango de 1 a 4 (Ishizaki et al. 2008; Tsuboyama and Kodama 2014). En nuestra consideración, no es necesario llevar a cabo la determinación del número de inserciones en todas las líneas transgénicas por las siguientes razones: 1) el rango de inserciones reportado es bajo; 2) la preparación del material y el tiempo invertido es exponencial dependiendo del número de líneas independientes; y 3) en la transformación por germinados de esporas se obtienen más de 200 líneas independientes por construcción. Por lo tanto, al tener un elevado número de líneas es posible evaluar fenotípicamente un conjunto de ellas observando un comportamiento homogéneo. En el caso de que los fenotipos de las líneas independientes de la misma construcción muestren comportamientos diferentes podría considerarse evaluar el número de inserciones de ese conjunto de plantas.

Entre las alternativas para la determinación del número de copias del T-DNA en el genoma se ha reportado el uso de *Southern Blot* (Kubota et al. 2013; Ishizaki et al. 2008; Tsuboyama y Kodama 2014) y mediante qPCR (Tsuboyama-Tanaka y Kodama 2015). La determinación del número de inserciones mediante qPCR consiste en la extracción del DNA genómico y determinación de Cq entre un gen unicopia en *M. polymorpha* MpPHOT (Ogasawara et al. 2013) y un fragmento del T-DNA, como el gen de resistencia. No obstante, consideramos que el análisis y metodología reportada por Tsuboyama y colaboradores no estaba correctamente aplicado: los fragmentos reportados no cumplen con los requisitos ideales para qPCR además de que el protocolo no es específica como se llevó a cabo el análisis, en el cual son necesarias las curvas estándar absolutas para una cuantificación del número de copias y una eficiencia de oligonucleótidos ( $\geq 95\%$ ), lo cual es determinante para calcular el número de inserciones (Yang et al. 2005). Esto se debe a que obtener simplemente los Cq de los distintos genes y determinar que el resultado de la relación sea igual a uno no significa que presenten el mismo número de copias ya que son muchos los factores los que participan en la determinación del Cq. Nosotros, en cambio, proponemos un protocolo más detallado para determinar el número de copias de T-DNA en *M. polymorpha* y que pueda ser ocupado en caso de ser necesario (Ver ANEXO VI).

Dado que no contábamos con alguna línea transgénica previa que nos indicara que el diseño de los amRNAs era funcional, adicionalmente se generaron plantas transgénicas que sobre-expresaran a MpMIR160, del cual ya se tiene un fenotipo reportado. Observamos resultados similares a los reportados por Flores-Sandoval y colaboradores en 2018 en las líneas transgénicas que generamos (**Figura 34**), en comparación con las líneas transformadas con los vectores control, las cuales no mostraron fenotipos diferentes a la planta WT. Estos resultados nos sugieren que los amiRNAs que diseñamos pueda ser funcionales, ya que se utilizó la secuencia de la estructura tallo-asa del precursor MpmiR160 y la secuencia original de miR160 fue reemplazada con la secuencia complementaria de nuestros genes de interés. Aun así, para poder determinar si los amiRNAs diseñados son en efecto funcionales, es necesario evaluar en distintas líneas independientes el nivel de silenciamiento que se lleva a cabo sobre los transcritos blanco, además de que se podría considerar también, de manera complementaria, realizar un 5'-RACE para determinar su especificidad sobre el transcrito (Flores-Sandoval et al. 2016; 2018).

Al sembrar gemas G1 de líneas independientes transformadas con la construcción que expresa a amiRWTAP, se observó que estas líneas presentaban un crecimiento menor (plantas más pequeñas) comparado con plantas transformadas con el vector vacío, además de un crecimiento irregular en los lóbulos de algunas líneas (**Figura 35**). Estas observaciones son solo preliminares, y aunque nos sugieren que nuestras líneas pudieran presentar un fenotipo, es necesario en un futuro analizar líneas G2, hacer un análisis con más replicas y detallado, y determinar los niveles de acumulación del amiRNA y del transcrito blanco, esto con el fin de ver si los posibles fenotipos que pudieran tener nuestras líneas sean a causa de que el amiRNA tenga un efecto sobre el transcrito blanco. Esto también se propone como perspectiva para las líneas generadas de amiRMTA y amiRMTB.

## CONCLUSIONES.

Con los resultados y consideraciones mostradas en el presente trabajo, se pudieron implementar todas las condiciones necesarias para el crecimiento de *M. polymorpha* y se pudieron generar todas las etapas del ciclo de vida de este organismo en el laboratorio, por lo que con esto se pueden realizar en un futuro, estudios tanto en la fase asexual como sexual en condiciones similares a las reportadas en la literatura. Esto también permitió estandarizar e implementar protocolos que son esenciales para el trabajo con *M. polymorpha* la generación de cultivos axénicos, la extracción de RNA en altas concentraciones para análisis posteriores de los niveles de metilación en transcritos y la genotipificación. Al mismo tiempo, para la condiciones y equipo que se tienen en el laboratorio, optimizamos la transformación de germinados de esporas junto con el mantenimiento de las líneas generadas para un futuro, además de comprobar que la transformación por gemas no es un método confiable y reproducible para utilizarse en la generación de líneas transgénicas, como se encuentra reportado. De esta manera sentamos las condiciones y herramientas necesarias para continuar con el estudio de la metilación m<sup>6</sup>A en *M. polymorpha*, cosas que también se pueden utilizar para otros proyectos en los que se plantee el uso de este organismo.

Por otro lado, si bien no se logró determinar la participación de la vía de metilación m<sup>6</sup>A en mRNAs durante el desarrollo de *M. polymorpha* y por consecuencia, comprobar o refutar nuestra hipótesis, fue posible identificar los posibles genes que podrían participar en el complejo de metilación, así como la generación de diferentes líneas expresoras de amiRNAs que pueden afectar la acumulación del transcrito de los genes de *MpWTAP*, *MpMTA* y *MpMTB*.

## PERSPECTIVAS

Dado los resultados obtenidos en el siguiente trabajo, se proponen las siguientes perspectivas:

- Corroborar los niveles de expresión tanto de los amiRNA como de los transcritos de los genes de interés.
- Evaluar diferentes etapas del desarrollo de la planta, a fin de observar si las diferentes plantas transgénicas generadas presentan fenotipos de interés.

- Analizar los niveles de metilación en las distintas etapas de crecimiento, mediante *dot-blot*, con el fin de detectar si existen alteraciones en los niveles de esta modificación en el mRNA.
- Se propone también el uso de alternativas para la detección y determinación de niveles de metilación de m<sup>ó</sup>A por técnicas como LC-MS (cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas) (Thüring et al. 2017) y TLC (cromatografía de capa fina) (Bodi and Fray 2017) las cuales nos confieren una mayor precisión y especificidad en la medición.
- En dado caso que las diferentes líneas generadas con los amiRNAs no llegaran a disminuir considerablemente los niveles de los transcritos blancos y/o no se vea un efecto en las plantas transgénicas, se propone también generar mutantes nulas ya sea mediante recombinación homóloga (Ishizaki et al. 2013) o por CRISPR-CAS9 (Sugano et al. 2014),

## LITERATURA CITADA

- Acosta-Maspons, A., González-Lemes, I. and Covarrubias, A.A., (2019). "Improved protocol for isolation of high-quality total RNA from different organs of *Phaseolus vulgaris* L." *BioTechniques*, 66(2): 96-98.
- Agarwala, Sudeep D., Hannah G. Blitzblau, Andreas Hochwagen, and Gerald R. Fink. (2012). "RNA Methylation by the MIS Complex Regulates a Cell Fate Decision in Yeast." *PLoS Genetics* 8 (6): 1-13.
- Agris, Paul F., Franck A.P. Vendéix, and William D. Graham. (2007). "tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification." *Journal of Molecular Biology* 366 (1): 1-13.
- Agris, Paul F. (2015). "The Importance of Being Modified: An Unrealized Code to RNA Structure and Function." *RNA (New York, N.Y.)* 21 (4): 552-54.
- Alarcón, Claudio R., Hyeseung Lee, Hani Goodarzi, Nils Halberg, and Sohail F. Tavazoie. (2015). "N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) Marks Primary MicroRNAs for Processing." *Nature* 519 (7544): 482-85.
- Althoff, Felix, Sarah Kopschke, Oliver Zobell, Kentaro Ide, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, and Sabine Zachgo. (2014). "Comparison of the MpEF1 $\alpha$  and CaMV35 Promoters for Application in *Marchantia Polymorpha* Overexpression Studies." *Transgenic Research* 23 (2): 235-44.
- Anderson, S.J., Kramer, M.C., Gosai, S.J., Yu, X., Vandivier, L.E., Nelson, A.D., Anderson, Z.D., Beilstein, M.A., Fray, R.G., Lyons, E. and Gregory, B.D., (2018). "N<sup>6</sup>-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in Arabidopsis". *Cell reports*, 25(5), pp.1146-1157.
- Aranda, P.S., Lajoie, D.M. and Jorcyk, C.L., (2012). "Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis", 33(2), pp.366-369.
- Arguello, A. Emilia, Amanda N. DeLiberto, and Ralph E. Kleiner. (2017). "RNA Chemical Proteomics Reveals the N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A)-Regulated Protein-RNA Interactome." *Journal of the American Chemical Society* 139 (48): 17249-52.
- Arribas-Hernández, Laura, Simon Bressendorff, Mathias Henning Hansen, Christian Poulsen, Susanne Erdmann, and Peter Brodersen. (2018). "An m<sup>6</sup>A-YTH Module Controls Developmental Timing and Morphogenesis in Arabidopsis." *The Plant Cell*, tpc.00833.2017.
- Barnes, Charles R., and W. J. G. Land. (1908). "Bryological Papers. II. The Origin of the Cupule of *Marchantia*." *Botanical Gazette* 46 (6): 401-9.
- Bartosovic, Marek, Helena Covelo Molaes, Pavlina Gregorova, Dominika Hrossova, Grzegorz Kudla, and Stepanka Vanacova. (2017). "N<sup>6</sup>-Methyladenosine Demethylase FTO Targets Pre-mRNAs and Regulates Alternative Splicing and 3'-End Processing." *Nucleic Acids Research* 45 (19): 11356-70.
- Beal, Peter A., Olena Maydanovych, and Subhash Pokharel. (2007). "The Chemistry and Biology of RNA Editing by Adenosine Deaminases." *Nucleic Acids Symposium Series (2004)* 51 (51): 83-84.
- Beemon, Karen, and Jerry Keith. (1977). "Localization of N<sup>6</sup>-Methyladenosine in the Rous Sarcoma Virus Genome." *Journal of Molecular Biology* 113 (1): 165-79.
- Bjork, G R, J U Ericson, C E D Gustafsson, T G Hagervall, Y H Jonsson, and P M Wikstrom. (1987). "Transfer RNA Modification." *Annual Review of Biochemistry* 56 (1): 263-85.

- Bodi, Zsuzsanna, and Rupert G. Fray.** (2017). "Detection and Quantification of N6-Methyladenosine in Messenger RNA by TLC." In *Methods in Molecular Biology*, 1562:79–87. Humana Press, New York, NY.
- Bodi, Zsuzsanna, Silin Zhong, Surbhi Mehra, Jie Song, Neil Graham, Hongying Li, Sean May, and Rupert George Fray.** (2012). "Adenosine Methylation in Arabidopsis mRNA Is Associated with the 3' End and Reduced Levels Cause Developmental Defects." *Frontiers in Plant Science* 3 (March): 48.
- Bokar, J A, M E Shambaugh, D Polayes, A G Matera, and F M Rottman.** (1997). "Purification and cDNA Cloning of the AdoMet-Binding Subunit of the Human mRNA (N6-Adenosine)-Methyltransferase." *RNA (New York, N.Y.)* 3 (11): 1233–47.
- Bokar, Joseph A.** (2005). "The Biosynthesis and Functional Roles of Methylated Nucleosides in Eukaryotic mRNA." In , 141–77. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bowman, John.** (2017). "Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia Polymorpha* Genome," 287–304.
- Bowman, John L.** (2016). "A Brief History of *Marchantia* from Greece to Genomics." *Plant and Cell Physiology* 57 (2): 210–29.
- Bowman, John L., Takashi Araki, and Takayuki Kohchi.** (2016). "*Marchantia*: Past, Present and Future." *Plant and Cell Physiology* 57 (2): 205–9.
- Bowman, John L., Sandra K. Floyd, and Keiko Sakakibara.** (2007). "Green Genes-Comparative Genomics of the Green Branch of Life." *Cell* 129 (2): 229–34.
- Bowman, John L., Takayuki Kohchi, Katsuyuki T. Yamato, Jerry Jenkins, Shengqiang Shu, Kimitsune Ishizaki, Shohei Yamaoka, et al.** (2017). "Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia Polymorpha* Genome." *Cell* 171 (2): 287-304.e15.
- Cantara, William A., Pamela F. Crain, Jef Rozenski, James A. McCloskey, Kimberly A. Harris, Xiaonong Zhang, Franck A.P. Vendeix, Daniele Fabris, and Paul F. Agris.** (2011). "The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 Update." *Nucleic Acids Research* 39: D195–201.
- Carlile, Thomas M., Maria F. Rojas-Duran, Boris Zinshteyn, Hakyung Shin, Kristen M. Bartoli, and Wendy V. Gilbert .** (2014). "Pseudouridine Profiling Reveals Regulated mRNA Pseudouridylation in Yeast and Human Cells." *Nature* 515 (7525): 143–46.
- Chang, Y., and S. W. Graham.** (2011). "Inferring the Higher-Order Phylogeny of Mosses (Bryophyta) and Relatives Using a Large, Multigene Plastid Data Set." *American Journal of Botany* 98 (5): 839–49.
- Chiyoda, Shota, Kimitsune Ishizaki, Hideo Kataoka, Katsuyuki T. Yamato, and Takayuki Kohchi.** (2008). "Direct Transformation of the Liverwort *Marchantia Polymorpha* L. by Particle Bombardment Using Immature Thalli Developing from Spores." *Plant Cell Reports* 27 (9): 1467–73.
- Cui, Qi, Hailing Shi, Peng Ye, Li Li, Qiu hao Qu, Guoqiang Sun, Guihua Sun, et al.** (2017). "m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells." *Cell Reports* 18 (11): 2622–34.
- Delatte, Benjamin, Fei Wang, Long Vo Ngoc, Evelyne Collignon, Elise Bonvin, Rachel Deplus, Emilie Calonne, et al.** (2016). "Transcriptome-Wide Distribution and Function of RNA Hydroxymethylcytosine." *Science* 351 (6270): 282–85.

- Dominissini, Dan, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Mali Salmon-Divon, Ninette Amariglio, and Gideon Rechavi.** (2013). "Transcriptome-Wide Mapping of N<sup>6</sup>-Methyladenosine by m<sup>6</sup>A-Seq Based on Immunocapturing and Massively Parallel Sequencing." *Nature Protocols* 8 (1): 176–89.
- Dominissini, Dan, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Schraga Schwartz, Mali Salmon-Divon, Lior Ungar, Sivan Osenberg, Karen Cesarkas, et al.** (2012). "Topology of the Human and Mouse M<sup>6</sup>A RNA Methylomes Revealed by M<sup>6</sup>A-Seq." *Nature* 485 (7397): 201–6.
- Dominissini, Dan, Sigrid Nachtergaele, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Eyal Peer, Nitzan Kol, Moshe Shay Ben-Haim, Qing Dai, et al.** (2016). "The Dynamic N<sup>1</sup>-Methyladenosine Methylome in Eukaryotic Messenger RNA." *Nature* 530 (7591): 441–46.
- Du, Hao, Ya Zhao, Jinqiu He, Yao Zhang, Hairui Xi, Mofang Liu, Jinbiao Ma, and Ligang Wu.** (2016). "YTHDF2 Destabilizes M<sup>6</sup>A-Containing RNA through Direct Recruitment of the CCR4-NOT Deadenylation Complex." *Nature Communications* 7 (1): 12626.
- Duan, Hong Chao, Lian Huan Wei, Chi Zhang, Ye Wang, Lin Chen, Zhike Lu, Peng R Chen, Chuan He, and Guifang Jia.** (2017). "ALKBH10B Is an RNA N<sup>6</sup>-Methyladenosine Demethylase Affecting Arabidopsis Floral Transition." *Plant Cell* 29 (12): 2995–3011.
- Edupuganti, Raghu R, Simon Geiger, Rik G H Lindeboom, Hailing Shi, Phillip J Hsu, Zhike Lu, Shuang-Yin Wang, et al.** (2017). "N<sup>6</sup>-Methyladenosine (M<sup>6</sup>A) Recruits and Repels Proteins to Regulate mRNA Homeostasis." *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (10): 870–78.
- Fernández, Israel S., Chyan Leong Ng, Ann C. Kelley, Guowei Wu, Yi-Tao Yu, and V. Ramakrishnan.** (2013). "Unusual Base Pairing during the Decoding of a Stop Codon by the Ribosome." *Nature* 500 (7460): 107–10.
- Flores-Sandoval, Eduardo, Tom Dierschke, Tom J. Fisher, and John L. Bowman.** (2016). "Efficient and Inducible Use of Artificial MicroRNAs in *Marchantia Polymorpha*." *Plant and Cell Physiology* 57 (2): 281–90.
- Flores-Sandoval, Eduardo, D. Magnus Eklund, and John L. Bowman.** (2015). "A Simple Auxin Transcriptional Response System Regulates Multiple Morphogenetic Processes in the Liverwort *Marchantia Polymorpha*." *PLoS Genetics* 11 (5): 1–26.
- Flores-Sandoval, Eduardo, D. Magnus Eklund, Syuan Fei Hong, John P. Alvarez, Tom J. Fisher, Edwin R. Lampugnani, John F. Golz, et al.** (2018). "Class C ARFs Evolved before the Origin of Land Plants and Antagonize Differentiation and Developmental Transitions in *Marchantia Polymorpha*." *New Phytologist* 218 (4): 1612–30.
- Fu, Ye, Dan Dominissini, Gideon Rechavi, and Chuan He.** (2014). "Gene Expression Regulation Mediated through Reversible M<sup>6</sup>A RNA Methylation." *Nature Reviews. Genetics* 15 (5): 293–306.
- Fu, Ye, Guifang Jia, Xueqin Pang, Richard N. Wang, Xiao Wang, Charles J. Li, Scott Smemo, et al.** (2013). "FTO-Mediated Formation of N<sup>6</sup>-Hydroxymethyladenosine and N<sup>6</sup>-Formyladenosine in Mammalian RNA." *Nature Communications* 4 (1): 1798.
- Fujisawa, Masaki, Kiwako Hayashi, Tomohisa Nishio, Tomoyuki Bando, Sachiko Okada, Katsuyuki T. Yamato, Hideya Fukuzawa, and Kanji Ohyania.** (2001). "Isolation of X and Y Chromosome-Specific DNA Markers from a Liverwort, *Marchantia Polymorpha*, by Representational Difference Analysis." *Genetics* 159 (3): 981–85.
- Garcias, David.** (2016) "Identificación y caracterización de Mpo-mir319 un microRNA conservado en el linaje de las plantas terrestres" Tesis Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

- Geula, Shay, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Dan Dominissini, Abed AlFatah Mansour, Nitzan Kol, Mali Salmon-Divon, Vera Hershkovitz, et al.** (2015). "Stem Cells. M6A MRNA Methylation Facilitates Resolution of Naïve Pluripotency toward Differentiation." *Science (New York, N.Y.)* 347 (6225): 1002–6.
- Giancaspro, A., Gadaleta, A. and Blanco, A.,** (2017). "Real-Time PCR for the Detection of Precise Transgene Copy Number in Wheat". In *Wheat Biotechnology*. Humana Press, New York, NY. pp. 251-257
- Guo, Jian, Hong-Wen Tang, Jing Li, Norbert Perrimon, and Dong Yan.** (2018). "Xio Is a Component of the Drosophila Sex Determination Pathway and RNA N6-Methyladenosine Methyltransferase Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (14): 3674–79.
- Hausmann, Irmgard U., Zsuzsanna Bodí, Eugenio Sanchez-Moran, Nigel P. Mongan, Nathan Archer, Rupert G. Fray, and Matthias Soller.** (2016). "M6A Potentiates Sxl Alternative Pre-mRNA Splicing for Robust Drosophila Sex Determination." *Nature* 540 (7632): 301–4.
- He, Chuan.** (2010). "Grand Challenge Commentary: RNA Epigenetics?" *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group.
- Helm, Mark, Richard Giegé, and Catherine Florentz.** (1999). "A Watson-Crick Base-Pair-Disrupting Methyl Group (M1A9) Is Sufficient for Cloverleaf Folding of Human Mitochondrial tRNA(Lys)." *Biochemistry* 38 (40): 13338–46.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T.** (1999) "Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999" *Nucleic Acids Research* 27 (1), 297-300.
- Hongay, Cintia F, and Terry L Orr-Weaver.** (2011). "Drosophila Inducer of MEiosis 4 (IME4) Is Required for Notch Signaling during Oogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (36): 14855–60.
- Horowitz, S, A Horowitz, T W Nilsen, T W Munns, and F M Rottman.** (1984). "Mapping of N6-Methyladenosine Residues in Bovine Prolactin mRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (18): 5667–71.
- Hsu, Phillip J., Yunfei Zhu, Honghui Ma, Yueshuai Guo, Xiaodan Shi, Yuanyuan Liu, Meijie Qi, et al.** (2017). "Ythdc2 Is an N6-Methyladenosine Binding Protein That Regulates Mammalian Spermatogenesis." *Cell Research* 27 (9): 1115–27.
- Hu, Jianzhong, Stefano Manduzio, and Hunseung Kang.** (2019). "Epitranscriptomic RNA Methylation in Plant Development and Abiotic Stress Responses." *Frontiers in Plant Science* 10 (April): 1–11.
- Huang, Huilin, Hengyou Weng, Wenju Sun, Xi Qin, Hailing Shi, Huizhe Wu, Boxuan Simen Zhao, et al.** (2018). "Recognition of RNA N6-Methyladenosine by IGF2BP Proteins Enhances mRNA Stability and Translation (Nature Cell Biology, (2018), 20, 3, (285-295), 10.1038/S41556-018-0045-Z)." *Nature Cell Biology* 20 (9): 1098.
- Huber, Sabrina M., Pieter Van Delft, Lee Mendil, Martin Bachman, Katherine Smollett, Finn Werner, Eric A. Miska, and Shankar Balasubramanian.** (2015). "Formation and Abundance of 5-Hydroxymethylcytosine in RNA." *ChemBioChem* 16 (5): 752–55.
- Hughes, S. J.** (1971). "On Conidia of Fungi, and Gemmae of Algae, Bryophytes, and Pteridophytes." *Canadian Journal of Botany* 49 (8): 1319–39.
- Ishizaki, Kimitsune, Shota Chiyoda, Katsuyuki T. Yamato, and Takayuki Kohchi.** (2008). "Agrobacterium-Mediated Transformation of the Haploid Liverwort *Marchantia polymorpha* L., an Emerging Model for Plant Biology." *Plant and Cell Physiology* 49 (7): 1084–91.

- Ishizaki, Kimitsune, Yasuyo Johzuka-Hisatomi, Sakiko Ishida, Shigeru Iida, and Takayuki Kohchi.** (2013). "Homologous Recombination-Mediated Gene Targeting in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Scientific Reports* 3 (1): 1532.
- Ishizaki, Kimitsune, Ryuichi Nishihama, Minoru Ueda, Keisuke Inoue, Sakiko Ishida, Yoshiki Nishimura, Toshiharu Shikanai, and Takayuki Kohchi.** (2015). "Development of Gateway Binary Vector Series with Four Different Selection Markers for the Liverwort *Marchantia polymorpha*." *PLoS ONE* 10 (9): 1–13.
- Ishizaki, Kimitsune, Ryuichi Nishihama, Katsuyuki T. Yamato, and Takayuki Kohchi.** (2016). "Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research." *Plant and Cell Physiology* 57 (2): 262–70.
- Jia, Guifang, Ye Fu, Xu Zhao, Qing Dai, Guanqun Zheng, Ying Yang, Chengqi Yi, et al.** (2011). "N6-Methyladenosine in Nuclear RNA Is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO." *Nature Chemical Biology* 7 (12): 885–87.
- Jones, Victor A. S., and Liam Dolan.** (2017). "Mp WIP Regulates Air Pore Complex Development in the Liverwort *Marchantia Polymorpha*." *Development* 144 (8): 1472–76.
- Kirchner, Sebastian, and Zoya Ignatova.** (2015). "Emerging Roles of tRNA in Adaptive Translation, Signalling Dynamics and Disease." *Nature Reviews Genetics* 16 (2): 98–112.
- Knuckles, Philip, Tina Lence, Irmgard U. Haussmann, Dominik Jacob, Nastasja Kreim, Sarah H. Carl, Irene Masiello, et al.** (2018). "Zc3h13/Flacc Is Required for Adenosine Methylation by Bridging the mRNA-Binding Factor RbM15/Spenito to the M6a Machinery Component Wtap/FI(2)D." *Genes and Development* 32 (5–6): 415–29.
- Kohli, Rahul M., and Yi Zhang.** (2013). "TET Enzymes, TDG and the Dynamics of DNA Demethylation." *Nature* 502 (7472): 472–79.
- Koi, Satoshi, Tetsuya Hisanaga, Katsutoshi Sato, Masaki Shimamura, Katsuyuki T. Yamato, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, and Keiji Nakajima.** (2016). "An Evolutionarily Conserved Plant RKD Factor Controls Germ Cell Differentiation." *Current Biology* 26 (13): 1775–81.
- Komatsu A., Nishihama R., Kohchi T.** (2019) "Observation of Phototropic Responses in the Liverwort *Marchantia polymorpha*". In: Yamamoto K. (eds) Phototropism. *Methods in Molecular Biology*, vol 1924. Humana Press, New York, NY
- Krug, Robert M., Barbara A. Broni, and Michele Bouloy.** (1979). "Are the 5' Ends of Influenza Viral Mrnas Synthesized in Vivo Donated by Host MRNAs?" *Cell* 18 (2): 329–34.
- Kubota, Akane, Kimitsune Ishizaki, Masashi Hosaka, and Takayuki Kohchi.** (2013). "Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 77 (1): 167–72.
- Leach, F. and Aoyagi, K.,** (1991). "Promoter analysis of the highly expressed rolC and rolD root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated". *Plant Science*, 79(1), pp.69-76.
- Leebens-Mack, J.H., Barker, M.S., Carpenter, E.J. et al.** (2019) "One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants". *Nature* 574, 679–685.
- Lence, Tina, Junaid Akhtar, Marc Bayer, Katharina Schmid, Laura Spindler, Cheuk Hei Ho, Nastasja Kreim, et al.** (2016). "M6A Modulates Neuronal Functions and Sex Determination in *Drosophila*." *Nature* 540 (7632): 242–47.

- Li, Yuli, Xiliang Wang, Cuiping Li, Songnian Hu, Jun Yu, and Shuhui Song.** (2014a). "Transcriptome-Wide N<sup>6</sup>-Methyladenosine Profiling of Rice Callus and Leaf Reveals the Presence of Tissue-Specific Competitors Involved in Selective mRNA Modification." *RNA Biology* 11 (9): 1180-88.
- Lin, Shuibin, Junho Choe, Peng Du, Robinson Triboulet, and Richard I. Gregory.** (2016). "The M6A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells." *Molecular Cell* 62 (3): 335-45.
- Lin, Zhen, Phillip J. Hsu, Xudong Xing, Jianhuo Fang, Zhike Lu, Qin Zou, Ke Jia Zhang, et al.** (2017). "Mettl3-/Mettl14-Mediated mRNA N<sup>6</sup>-Methyladenosine Modulates Murine Spermatogenesis." *Cell Research* 27 (10): 1216-30.
- Liu, Jianzhao, Yanan Yue, Dali Han, Xiao Wang, Y. Fu, Liang Zhang, Guifang Jia, et al.** (2014a). "A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N<sup>6</sup>-Adenosine Methylation." *Nature Chemical Biology* 10 (2): 93-95.
- Liu, Jun, Mark A. Eckert, Bryan T. Harada, Song-Mei Liu, Zhike Lu, Kangkang Yu, Samantha M. Tienda, et al.** (2018). "M6A mRNA Methylation Regulates AKT Activity to Promote the Proliferation and Tumorigenicity of Endometrial Cancer." *Nature Cell Biology* 20 (9): 1074-83.
- Liu, Nian, Qing Dai, Guanqun Zheng, Chuan He, Marc Parisien, and Tao Pan.** (2015). "N<sup>6</sup>-Methyladenosine-Dependent RNA Structural Switches Regulate RNA-Protein Interactions." *Nature* 518 (7540): 560-64.
- Liu, Zhen, and Jianzhi Zhang.** (2018). "Most M6A RNA Modifications in Protein-Coding Regions Are Evolutionarily Unconserved and Likely Nonfunctional." *Molecular Biology and Evolution* 35 (3): 666-75.
- Luo, Guan Zheng, Alice Macqueen, Guanqun Zheng, Hongchao Duan, Louis C. Dore, Zhike Lu, Jun Liu, et al.** (2014). "Unique Features of the M6A Methylome in *Arabidopsis thaliana*." *Nature Communications* 5: 1-8.
- Machnicka, Magdalena A., Kaja Milanowska, Okan Osman Oglou, Elzbieta Purta, Malgorzata Kurkowska, Anna Olchowik, Witold Januszewski, et al.** (2013). "MODOMICS: A Database of RNA Modification Pathways - 2013 Update." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D262-67.
- Maden, B.E.H.** (1990). "The Numerous Modified Nucleotides in Eukaryotic Ribosomal RNA." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 39 (January): 241-303.
- Martínez-Pérez, Mireya, Frederic Aparicio, María Pilar López-Gresa, Jose María Bellés, Jesus A. Sánchez-Navarro, and Vicente Pallás.** (2017). "*Arabidopsis* m<sup>6</sup>A Demethylase Activity Modulates Viral Infection of a Plant Virus and the m<sup>6</sup>A Abundance in Its Genomic RNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (40): 10755-60.
- Mendel, Mateusz, Kuan Ming Chen, David Homolka, Pascal Gos, Radha Raman Pandey, Andrew A. McCarthy, and Ramesh S. Pillai.** (2018). "Methylation of Structured RNA by the m<sup>6</sup>A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development." *Molecular Cell* 71 (6): 986-1000.e11.
- Meyer, Kate D., Yogesh Saletore, Paul Zumbo, Olivier Elemento, Christopher E. Mason, and Samie R. Jaffrey.** (2012). "Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons." *Cell* 149 (7): 1635-46.
- Meyer, Kate D., and Samie R. Jaffrey.** (2014). "The Dynamic Epitranscriptome: N<sup>6</sup>-Methyladenosine and Gene Expression Control." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (5): 313-26.
- Meyer, Kate D., Deepak P. Patil, Jun Zhou, Alexandra Zinoviev, Maxim A. Skabkin, Olivier Elemento, Tatyana V. Pestova, Shu-Bing Qian, and Samie R. Jaffrey.** (2015). "5' UTR M<sup>6</sup>A Promotes Cap-Independent Translation." *Cell* 163 (4): 999-1010.

- Mielecki, Damian, Dorota Ł. Zugaj, Anna Muszewska, Jan Piwowarski, Aleksandra Chojnacka, Marcin Mielecki, Jadwiga Nieminuszczy, Marcin Grynberg, and Elżbieta Grzesiuk. (2012). "Novel AlkB Dioxygenases—Alternative Models for In Silico and In Vivo Studies." Edited by Martin G. Marinus. *PLoS ONE* 7 (1): e30588.
- Monte, Isabel, José M. Franco-Zorrilla, Gloria García-Casado, Angel M. Zamarreño, José M. García-Mina, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, and Roberto Solano. (2019). "A Single JAZ Repressor Controls the Jasmonate Pathway in *Marchantia polymorpha*." *Molecular Plant* 12 (2): 185–98.
- Nagarajan, Arvindhan, Radoslav Janostiak, and Narendra Wajapeyee. (2019). "Dot Blot Analysis for Measuring Global N6-Methyladenosine Modification of RNA." *Methods in Molecular Biology* 1870: 263–71.
- Nakazato, T., A. Kadota, and M. Wada. (1999). "Photoinduction of Spore Germination in *Marchantia polymorpha* L. Is Mediated by Photosynthesis." *Plant and Cell Physiology* 40 (10): 1014–20.
- Narayan, P, and FM Rottman. (1988). "An In Vitro System for Accurate Methylation of Internal Adenosine Residues in Messenger RNA." *Science* 242 (4882): 1159–62.
- Nicastro, Giuseppe, Ian A Taylor, and Andres Ramos. (2015). "KH-RNA Interactions: Back in the Groove." *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Current Trends.
- Ogasawara, Yuka, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, and Yutaka Kodama. (2013). "Cold-Induced Organelle Relocation in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Plant, Cell and Environment* 36 (8): 1520–28.
- Okada, Sachiko, Masaki Fujisawa, Takefumi Sone, Shigeki Nakayama, Rie Nishiyama, Mizuki Takenaka, Shohei Yamaoka, et al. (2000). "Construction of Male and Female PAC Genomic Libraries Suitable for Identification of Y-Chromosome-Specific Clones from the Liverwort, *Marchantia Polymorpha*." *Plant Journal* 24 (3): 421–28.
- Ortega, Angeles, Martina Niksic, Angela Bachi, Matthias Wilm, Lucas Sánchez, Nicholas Hastie, and Juan Valcárcel. (2003). "Biochemical Function of Female-Lethal (2)D/Wilms' Tumor Suppressor-1-Associated Proteins in Alternative Pre-mRNA Splicing." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (5): 3040–47.
- Patil, Deepak P., Chun-Kan Chen, Brian F. Pickering, Amy Chow, Constanza Jackson, Mitchell Guttman, and Samie R. Jaffrey. (2016). "m6A RNA Methylation Promotes XIST-Mediated Transcriptional Repression." *Nature* 537 (7620): 369–73.
- Pendleton, Kathryn E., Beibei Chen, Kuanqing Liu, Olga V. Hunter, Yang Xie, Benjamin P. Tu, and Nicholas K. Conrad. (2017). "The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention." *Cell* 169 (5): 824–835.e14.
- Phizicky, Eric M, and Anita K Hopper. (2015). "tRNA Processing, Modification, and Subcellular Dynamics: Past, Present, and Future." *RNA (New York, N.Y.)* 21 (4): 483–85.
- Piekna-Przybylska, Dorota, Piotr Przybylski, Agnès Baudin-Baillieu, Jean-Pierre Rousset, and Maurille J. Fournier. (2008). "Ribosome Performance Is Enhanced by a Rich Cluster of Pseudouridines in the A-Site Finger Region of the Large Subunit." *Journal of Biological Chemistry* 283 (38): 26026–36.
- Ping, Xiao-Li, Bao-Fa Sun, Lu Wang, Wen Xiao, Xin Yang, Wen-Jia Wang, Samir Adhikari, et al. (2014). "Mammalian WTAP Is a Regulatory Subunit of the RNA N6-Methyladenosine Methyltransferase." *Cell Research* 24 (2): 177–89.
- Qiu, Yin-Long, Libo Li, Bin Wang, Zhiduan Chen, Volker Knoop, Milena Groth-Malonek, Olena Dombrowska, et al. (2006). "The Deepest Divergences in Land Plants Inferred from Phylogenomic Evidence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (42): 15511–16.

- Roundtree, Ian A., Molly E. Evans, Tao Pan, and Chuan He.** (2017). "Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation." *Cell* 169 (7): 1187–1200.
- Roundtree, Ian A, Guan-Zheng Luo, Zijie Zhang, Xiao Wang, Tao Zhou, Yiquang Cui, Jiahao Sha, et al.** (2017). "YTHDC1 Mediates Nuclear Export of N6-Methyladenosine Methylated MRNAs." *ELife* 6 (October).
- Rövekamp, Moritz, John L. Bowman, and Ueli Grossniklaus.** (2016). "Marchantia MpRKD Regulates the Gametophyte-Sporophyte Transition by Keeping Egg Cells Quiescent in the Absence of Fertilization." *Current Biology* 26 (13): 1782–89.
- Růžička, Kamil, Mi Zhang, Ana Campilho, Zsuzsanna Bodi, Muhammad Kashif, Mária Saleh, Dominique Eeckhout, et al.** (2017). "Identification of Factors Required for M6A mRNA Methylation in Arabidopsis Reveals a Role for the Conserved E3 Ubiquitin Ligase HAKAI." *New Phytologist* 215 (1): 157–72.
- Schapira, Matthieu.** (2016). "Structural Chemistry of Human RNA Methyltransferases." *ACS Chemical Biology* 11 (3): 575–82.
- Schwartz, Schraga, Sudeep D. Agarwala, Maxwell R. Mumbach, Marko Jovanovic, Philipp Mertins, Alexander Shishkin, Yuval Tabach, et al.** (2013a). "High-Resolution Mapping Reveals a Conserved, Widespread, Dynamic mRNA Methylation Program in Yeast Meiosis." *Cell* 155 (6): 1409–21.
- Schwartz, Schraga, Sudeep D. Agarwala, Maxwell R. Mumbach, Marko Jovanovic, Philipp Mertins, Alexander Shishkin, Yuval Tabach, et al.** (2013b). "High-Resolution Mapping Reveals a Conserved, Widespread, Dynamic mRNA Methylation Program in Yeast Meiosis." *Cell* 155 (6): 1409–21.
- Schwartz, Schraga, Douglas A. Bernstein, Maxwell R. Mumbach, Marko Jovanovic, Rebecca H. Herbst, Brian X. León-Ricardo, Jesse M. Engreitz, et al.** (2014). "Transcriptome-Wide Mapping Reveals Widespread Dynamic-Regulated Pseudouridylation of ncRNA and mRNA." *Cell* 159 (1): 148–62.
- Schwartz, Schraga, Maxwell R. Mumbach, Marko Jovanovic, Tim Wang, Karolina Maciag, G. Guy Bushkin, Philipp Mertins, et al.** (2014a). "Perturbation of M6A Writers Reveals Two Distinct Classes of mRNA Methylation at Internal and 5' Sites." *Cell Reports* 8 (1): 284–96.
- Scutenaire, Jérémy, Jean Marc Deragon, Viviane Jean, Moussa Benhamed, Cécile Raynaud, Jean Jacques Favory, Rémy Merret, and Cécile Bousquet-Antonelli.** (2018). "The YTH Domain Protein ECT2 Is an M6A Reader Required for Normal Trichome Branching in Arabidopsis." *Plant Cell* 30 (5): 986–1005.
- Sharma, Sunny, Peter Watzinger, Peter Kötter, and Karl-Dieter Entian.** (2013). "Identification of a Novel Methyltransferase, Bmt2, Responsible for the N1-Methyl-Adenosine Base Modification of 25S rRNA in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nucleic Acids Research* 41 (10): 5428–43.
- Shaw, A. Jonathan, Péter Szövényi, and Blanka Shaw.** (2011). "Bryophyte Diversity and Evolution: Windows into the Early Evolution of Land Plants." *American Journal of Botany* 98 (3): 352–69.
- Shen, Lisha, Zhe Liang, Xiaofeng Gu, Ying Chen, Zhi Wei Norman Wei Norman Teo, Xingliang Hou, Weiling Maggie Maggie Cai, Peter C. C. Dedon, Lu Liu, and Hao Yu.** (2016). "N6-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in Arabidopsis." *Developmental Cell* 38 (2): 186–200.
- Shi, Hailing, Xiao Wang, Zhike Lu, Boxuan S. Zhao, Honghui Ma, Phillip J. Hsu, Chang Liu, and Chuan He.** (2017). "YTHDF3 Facilitates Translation and Decay of N 6-Methyladenosine-Modified RNA." *Cell Research* 27 (3): 315–28.
- Shi, Hailing, Jiangbo Wei, and Chuan He.** (2019). "Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers." *Molecular Cell* 74 (4): 640–50.

- Shi, Hailing, Xuliang Zhang, Yi-Lan Weng, Zongyang Lu, Yajing Liu, Zhike Lu, Jianan Li, et al.** (2018). "M6A Facilitates Hippocampus-Dependent Learning and Memory through YTHDF1." *Nature* 563 (7730): 249–53.
- Shima, Hiroki, Mitsuyo Matsumoto, Yuma Ishigami, Masayuki Ebina, Akihiko Muto, Yuho Sato, Sayaka Kumagai, Kyoko Ochiai, Tsutomu Suzuki, and Kazuhiko Igarashi.** (2017). "S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1." *Cell Reports* 21 (12): 3354–63.
- Shimamura, Masaki.** (2016a). "*Marchantia polymorpha*: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System." *Plant and Cell Physiology* 57 (2): 230–56.
- Shimba, Shigeki, Joseph A. Bokar, Fritz Rottman, and Ram Reddy.** (1995). "Accurate and Efficient N<sup>6</sup>-Adenosine Methylation in Spliceosomal U6 Small Nuclear RNA by HeLa Cell Extract *in Vitro*." *Nucleic Acids Research* 23 (13): 2421–26.
- Śledź, Paweł, and Martin Jinek.** (2016). "Structural Insights into the Molecular Mechanism of the M6A Writer Complex." *ELife* 5 (September): 1–16.
- Sugano, Shigeo S., Makoto Shirakawa, Junpei Takagi, Yoriko Matsuda, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura, and Takayuki Kohchi.** (2014). "CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Plant and Cell Physiology* 55 (3): 475–81.
- Takenaka, M., S. Yamaoka, T. Hanajiri, Y. Shimizu-Ueda, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, and K. Ohyama.** (2000). "Direct Transformation and Plant Regeneration of the Haploid Liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Transgenic Research* 9 (3): 179–85.
- Tang, Chong, Rachel Klukovich, Hongying Peng, Zhuqing Wang, Tian Yu, Ying Zhang, Huili Zheng, Arne Klungland, and Wei Yan.** (2018). "ALKBH5-Dependent M6A Demethylation Controls Splicing and Stability of Long 3'-UTR MRNAs in Male Germ Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (2): E325–33.
- Theiler, Dominik, Cyril Dominguez, Markus Blatter, Julien Boudet, and Frédéric H.-T. Allain.** (2014). "Solution Structure of the YTH Domain in Complex with N6-Methyladenosine RNA: A Reader of Methylated RNA." *Nucleic Acids Research* 42 (22): 13911–19.
- Thüring, Kathrin, Katharina Schmid, Patrick Keller, and Mark Helm.** (2017). "LC-MS Analysis of Methylated RNA." In , 3–18. Humana Press, New York, NY.
- Tsuboyama-Tanaka, Shoko, and Yutaka Kodama.** (2015). "AgarTrap-Mediated Genetic Transformation Using Intact Gemmae/Gemmalings of the Liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Journal of Plant Research* 128 (2): 337–44.
- Tsuboyama, Shoko, and Yutaka Kodama.** (2014). "AgarTrap: A Simplified Agrobacterium-Mediated Transformation Method for Sporelings of the Liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Plant and Cell Physiology* 55 (1): 229–36.
- Vandivier, Lee E, and Brian D Gregory.** (2018). "New Insights into the Plant Epitranscriptome." *Journal of Experimental Botany* 69 (20): 4659–65.
- Vandenbussche Filip, Fierro Ana C., Wiedemann Gertrud, Reski Ralf, Van Der Straeten Dominique.** (2007). "Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components". *BMC Plant Biol* 7, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-65>
- Vespa, L.** (2004). "The Immunophilin-Interacting Protein AtFIP37 from Arabidopsis Is Essential for Plant Development and Is Involved in Trichome Endoreduplication." *Plant Physiology* 134 (4): 1283–92.

- Vujičić, Milorad, Tijana Cvetić, Aneta Sabovljević, and Marko Sabovljević.** (2010). "AXENICALLY CULTURING THE BRYOPHYTES: A CASE STUDY OF THE LIVERWORT *Marchantia polymorpha* L. Ssp. *Ruderalis* Bischl. & Boisselier (MARCHANTIOPHYTA, MARCHANTIACEAE)." *Kragujevac J. Sci* 32: 73–81.
- Wan, Yizhen, Kai Tang, Dayong Zhang, Shaojun Xie, Xiaohong Zhu, Zegang Wang, and Zhaobo Lang.** (2015). "Transcriptome-Wide High-Throughput Deep M6A-Seq Reveals Unique Differential M6A Methylation Patterns between Three Organs in *Arabidopsis thaliana*." *Genome Biology* 16 (1): 1–26.
- Wang, Xiang, Jing Feng, Yuan Xue, Zeyuan Guan, Delin Zhang, Zhu Liu, Zhou Gong, et al.** (2016). "Structural Basis of N6-Adenosine Methylation by the METTL3-METTL14 Complex." *Nature* 534 (7608): 575–78.
- Wang, Xiao, Zhike Lu, Adrian Gomez, Gary C. Hon, Yanan Yue, Dali Han, Ye Fu, et al.** (2014). "N6-Methyladenosine-Dependent Regulation of Messenger RNA Stability." *Nature* 505 (7481): 117–20.
- Wang, Xiao, Boxuan Simen Simen Zhao, Ian A. A. Roundtree, Zhike Lu, Dali Han, Honghui Ma, Xiaocheng Weng, Kai Chen, Hailing Shi, and Chuan He.** (2015). "N6-Methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency." *Cell* 161 (6): 1388–99.
- Wang, Yang, Yue Li, Julia I. Toth, Matthew D. Petroski, Zhaolei Zhang, and Jing Crystal Zhao.** (2014). "N6-Methyladenosine Modification Destabilizes Developmental Regulators in Embryonic Stem Cells." *Nature Cell Biology* 16 (2): 191–98.
- Wang, Yang, Yue Li, Minghui Yue, Jun Wang, Sandeep Kumar, Robert J. Wechsler-Reya, Zhaolei Zhang, et al.** (2018). "N6-Methyladenosine RNA Modification Regulates Embryonic Neural Stem Cell Self-Renewal through Histone Modifications." *Nature Neuroscience* 21 (2): 195–206.
- Wei, Fan-Yan, Bo Zhou, Takeo Suzuki, Keishi Miyata, Yoshihiro Ujihara, Haruki Horiguchi, Nozomu Takahashi, et al.** (2015). "Cdk5rap1-Mediated 2-Methylthio Modification of Mitochondrial TRNAs Governs Protein Translation and Contributes to Myopathy in Mice and Humans." *Cell Metabolism* 21 (3): 428–42.
- Wei, Jiangbo, Fange Liu, Zhike Lu, Qili Fei, Yuxi Ai, P. Cody He, Hailing Shi, et al.** (2018). "Differential M6A, M6Am, and M1A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm." *Molecular Cell* 71 (6): 973-985.e5.
- Wei, Lian-Huan, Peizhe Song, Ye Wang, Zhike Lu, Qian Tang, Qiong Yu, Yu Xiao, Xiao Zhang, Hong-Chao Duan, and Guifang Jia.** (2018). "The M6A Reader ECT2 Controls Trichome Morphology by Affecting mRNA Stability in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 16: tpc.00934.2017.
- Wen, Jing, Ruitu Lv, Honghui Ma, Hongjie Shen, Chenxi He, Jiahua Wang, Fangfang Jiao, et al.** (2018). "Zc3h13 Regulates Nuclear RNA M6A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal." *Molecular Cell* 69 (6): 1028-1038.e6.
- Weng, Yi-Lan, Xu Wang, Ran An, Jessica Cassin, Caroline Vissers, Yuanyuan Liu, Yajing Liu, et al.** (2018). "Epitranscriptomic M6A Regulation of Axon Regeneration in the Adult Mammalian Nervous System." *Neuron* 97 (2): 313-325.e6.
- Wickett, Norman J., Siavash Mirarab, Nam Nguyen, Tandy Warnow, Eric Carpenter, Naim Matasci, Saravanaraj Ayyampalayam, et al.** (2014). "Phylotranscriptomic Analysis of the Origin and Early Diversification of Land Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (45): E4859–68.
- Wu, Baixing, Jinhao Xu, Shichen Su, Hehua Liu, Jianhua Gan, and Jinbiao Ma.** (2017). "Structural Insights into the Specific Recognition of DSR by the YTH Domain Containing Protein Mmi1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491 (2): 310–16.

- Xiao, Wen, Samir Adhikari, Ujwal Dahal, Yu-Sheng Chen, Ya-Juan Hao, Bao-Fa Sun, Hui-Ying Sun, et al.** (2016). "Nuclear M6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing." *Molecular Cell* 61 (4): 507–19.
- Xu, Chao, Xiao Wang, Ke Liu, Ian A. Roundtree, Wolfram Tempel, Yanjun Li, Zhike Lu, Chuan He, and Jinrong Min.** (2014). "Structural Basis for Selective Binding of M6A RNA by the YTHDC1 YTH Domain." *Nature Chemical Biology* 10 (11): 927–29.
- Yang, Litao, Jiayu Ding, Chengmei Zhang, Junwei Jia, Haibo Weng, Wenxuan Liu, and Dabing Zhang.** (2005). "Estimating the Copy Number of Transgenes in Transformed Rice by Real-Time Quantitative PCR." *Plant Cell Reports* 23 (10–11): 759–63.
- Yang, Ying, Phillip J. Hsu, Yu Sheng Chen, and Yun Gui Yang.** (2018). "Dynamic Transcriptomic M6A Decoration: Writers, Erasers, Readers and Functions in RNA Metabolism." *Cell Research* 28 (6): 616–24.
- Zhang, Sicong, Boxuan Simen Zhao, Aidong Zhou, Kangyu Lin, Shaoping Zheng, Zhike Lu, Yaohui Chen, et al.** (2017). "M6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program." *Cancer Cell* 31 (4): 591-606.e6.
- Zhao, Boxuan Simen, Xiao Wang, Alana V. Beadell, Zhike Lu, Hailing Shi, Adam Kuuspalu, Robert K. Ho, and Chuan He.** (2017). "M6A-Dependent Maternal mRNA Clearance Facilitates Zebrafish Maternal-to-Zygotic Transition." *Nature* 542 (7642): 475–78.
- Zhao, Xu, Ying Yang, Bao-Fa Sun, Yue Shi, Xin Yang, Wen Xiao, Ya-Juan Hao, et al.** (2014). "FTO-Dependent Demethylation of N6-Methyladenosine Regulates mRNA Splicing and Is Required for Adipogenesis." *Cell Research* 24 (12): 1403–19.
- Zheng, Guanqun, John Arne Dahl, Yamei Niu, Peter Fedorcsak, Chun-Min Huang, Charles J. Li, Cathrine B. Vågbø, et al.** (2013). "ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase That Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility." *Molecular Cell* 49 (1): 18–29.
- Zhong, Silin, Hongying Li, Zsuzsanna Bodi, James Button, Laurent Vespa, Michel Herzog, and Rupert G. Fray.** (2008). "MTA Is an Arabidopsis Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor." *Plant Cell* 20 (5): 1278–88.
- Zhu, Tingting, Ian A. Roundtree, Ping Wang, Xiao Wang, Li Wang, Chang Sun, Yuan Tian, Jie Li, Chuan He, and Yanhui Xu.** (2014). "Crystal Structure of the YTH Domain of YTHDF2 Reveals Mechanism for Recognition of N6-Methyladenosine." *Cell Research*.

## ANEXOS

### ANEXO I

**Tabla suplementaria I. Secuencia de los oligonucleótidos.** Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

<b>Etiqueta</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>
pE-PHOT-F	CACCTAAAGCGAGAAGTTGGTTT
F-MpPHOT1	TTACCAGGTAAGCTTGGCTGC
R-MpPHOT1	AAACCGACATACCATGCAGCG
pE-PHOT-R	TCTACCCGGAATACAACCTAA
amiR-MTB2-R	CCTGTCAAGGTCTCTGAGGAGCTCCTCAGTGTGATCGTAAGCAACGTGCAAAGTGCAGTCTGGCC T
amiR-MTB2*-F	CTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCGTGATCCTAAGCGACGTCCAAGGAGGAAGTCGCTA C
F-qMpECT30	AGGATTTGCGCCCTCCATTTGC
R-qECT30	TCAGCTTGAGCACCTTCTTCG
Hyg-R	TAC TTC TAC ACA GCC ATC GGT CCA G
Hyg-F	CGC AAG GAA TCG GTC AAT ACA CTA C
MpECT72_F	ACGAAAGCCGTCAGAGAGCAA
MpECT39_R	GCTGCCTAAACGCGACATCT
MpECT39_F	GAGACTGCCAGGAGCTGACAT
MpECT72_R	CTGCATAGATTCAGCCGGTGTT
amiR_MTA_R	CCTGTCAAGGTCTCTGAGGAGCTCCTCAGTATGACCGGAGTACCGGGTTTAAGTGCAGTCTGGCC
RvEF1alpha_1	AGAGGTGGGTACTIONCAGCGAA
mir_160_NotI	AGCGGCCGCGCACCTCCTCTCTCCGAC
amiR-MTB-R	CCTGTCAAGGTCTCTGAGGAGCTCCTCAGTAGGACTAATAGAACCTTTGGAAGTGCAGTCTGGCC
AmiR-WTAP-R	CCTGTCAAGGTCTCTGAGGAGCTCCTCAGTAGGACTAATAGAACCTTTGGAAGTGCAGTCTGGCC

	T
amiR-WTAP*-F	CTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCAGGACTTATAGAGCCTTAGGAGGAGGAAGTCGCTA C
amiR-MTB*-F	CTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCAGGACTTATAGAGCCTTAGGAGGAGGAAGTCGCTA CC
mir_160_AscI	CGGCGCGCCTAAGTAAATCTATCAA
FwqEF1A	TCCGAGATCCTGACCAAGGTC
qMpMTA-Fwd	GGCTTAACCACAGCAAGGAG
qMpMTA-Rvs	GCATGCGAGCGAAAAGCTCAA
FpmMpMETLL3	<b>CACCGAATCTCTCCCTAAGCAC</b>
RpmMpWTAP	CGTCTCTCGCGCTGCAATTCTC
FpmMpWTAP	<b>CACCTGGAAGTCGATCATTCTCAT</b>
RvMpMettl3silen	CGTCATTATTAGCCTGCAACC
FwMpMettl3silen	<b>CACCTCAAATCTGCATATCCGGAAG</b>
FwMpWtapsilen	<b>CACCCGGGACACAAGTATGAAGAG</b>
F-MpMTBq-2	AGGCGCAGAAAGTGATGTTAGA
R-MpMTBq-2	ACATCTGACATGAGGAAACGGC
amiR-MTA*-R	CTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCATGACCCGAGTATCGGGATTAGGAGGAAGTCGCTA C
EF1A_peFwd	<b>CACCCAAATGAGTCACACACA</b>
F-pEF1a	TGCTTCTATGGGTGTTGCCTCAAC
qMpWTAP-Rvs	GTGCTTTTGCTGCACTTGTT
qMpWTAP-Fwd	CGGCACAAAGCTTGCAATG
RvT35S	GTGATTTTTGCGGACTCTAG
F-MpMTBq-1	TCCAAAATCTTCGCATCGAGGC
RpmMpMETLL3	GGTGGTTCTCGGTCTGAACTT

3'-Int-iRNA	GCAGGTCAGCTTGACACTGA
R-MpMTBq-1	GGTGTCGGATTCTCTCGGTTGG
FwMprhf73	TGACGACGAAGATGTGGATGAC
RvMprhf73	GAAACTTGCCGTGTGACTGA
FwMprbm27	CCAAGTGCGGGCAGAATCAAGT
RvMprbm27	TTCATGCCCCGCTATCACCTTC

**\*Negritas:** Secuencias CACC agregada para clonar direccionalmente en el vector pENTR/SD.

**Tabla suplementaria I. Códigos de identificación de *Phytozome* de los genes y transcritos identificados y utilizados en *Marchantia*.** \* señala los transcritos que se utilizaron para el estudio.

Gen	Id del gen	Id del transcrito
<i>MpMTA</i>	Mapoly0036s0127	Mapoly0036s0127.1*
		Mapoly0036s0127.2
<i>MpMTB</i>	Mapoly0005s0162	Mapoly0005s0162.1*
<i>MpMTB-like</i>	Mapoly0005s0290	Mapoly0005s0290.1*
<i>MpWTAP</i>	Mapoly0061s0094	Mapoly0061s0094.1*
		Mapoly0061s0094.2
		Mapoly0061s0094.3
		Mapoly0061s0094.4
		Mapoly0061s0094.5
<i>MpECT72</i>	Mapoly0103s0072	Mapoly0103s0072.1*
		Mapoly0103s0072.2
<i>MpECT39</i>	Mapoly0007s0039	Mapoly0007s0039.1*
<i>MpECT30</i>	Mapoly0056s0030	Mapoly0056s0030.1*
<i>MpEF1<math>\alpha</math></i>	Mapoly0024s0116	Mapoly0024s0116.1*
		Mapoly0024s0116.2

## Anexo II

Tabla suplementaria II-A. Códigos de identificación de *Phytozome* para las proteínas que presentaron el dominio MT-A70 en distintas plantas que se usaron para el árbol filogenético.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G19340.1	<i>Oryza sativa</i>	Os01g16180.1	
	AT4G09980.1 (AtMTB)		Os02g45110.1	
	AT4G10760.1 (AtMTA)		Os03g05420.1	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre01.g050600.t1.1		Os03g10220.1	
	Cre06.g288100.t1.2		Os03g10224.1	
	Cre06.g295600.t1.2		Os10g31030.1	
	Cre10.g452300.t1.2		Mapoly0005s0162.1.p (MpMTB)	
<i>Glycine max</i>	Glyma.07G067100.1.p		<i>Marchantia polymorpha</i>	Mapoly0005s0290.1.p (MpMTB-II)
	Glyma.10G232300.1.p			Mapoly0036s0127.1.p (MpMTA)
	Glyma.14G077000.1.p		<i>Medicago truncatula</i>	Medtr1g021985.1
	Glyma.16G033100.1.p	Medtr1g100210.1		
	Glyma.17G248800.1.p	Medtr2g099870.1		
	Glyma.20G161800.1.p	Medtr8g104280.1		
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G005844_P01	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp3c10_21330V3.1.p	
	GRMZM2G116563_P01		Pp3c1_32590V3.1.p	
	GRMZM2G148047_P01		Pp3c5_5900V3.1.p	
<i>Sphagnum fallax</i>	Sphfalx0022s0181.1.p		Pp3c6_26980V3.1.p	
	Sphfalx0030s0034.1.p		<i>Selaginella moellendorffii</i>	SELMODRAFT_123364
	Sphfalx0312s0012.1.p	SELMODRAFT_80323		

**Tabla suplementaria II-B. Códigos de identificación para *Ensemble* de las proteínas que presentan el dominio MT-A70 distintas especies.** La división por clado es de acuerdo al árbol filogenético realizado en el presente trabajo (Figura 14).

<b>Especie</b>	<b>CLADO</b>		
	<b>METTL3</b>	<b>METTL14</b>	<b>METTL4</b>
<i>Danio rerio</i>	ENSDART00000019699.8	ENSDART000000102993.4	ENSDARP000000108647
<i>Drosophila melanogaster</i>	FBtr0084532	FBtr0079599	FBpp0307589
<i>Homo sapiens</i>	ENST00000298717.8	ENST00000388822.9	ENST00000574538.2
<i>Mus musculus</i>	ENSMUST00000022767.15	ENSMUST00000029759.15	ENSMUSP000000157180
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGL192W_mRNA	YCL055W_mRNA (KAR4)	-

### ANEXO III

Categoría	cis-element	pAtMTA	pAtFIP37	pMpMTA	pMpWTAP	Descripción
Relacionadas a ABA	ABRELATERD1	4	1	2	2	Elemento de respuesta a ABA (respuesta temprana a deshidratación) en Arabidopsis.
	ABRERATCAL	5	1	1	0	Elemento de respuesta a ABA (ABRE).
	ACGTABREMOTIFA2OSEM	2	0	0	0	Secuencia determinada experimentalmente requerida en ABRE en gen de arroz.
	DRE1COREZMRAB17	1	0	0	0	Secuencia principal de "DRE1" encontrada en maíz.
Relacionadas a Auxinas	ARFAT	3	1	0	1	Sitio de unión para factores de respuesta a auxinas (ARF) encontrada en los promotores en genes de respuesta a auxinas tempranas en Arabidopsis.
	ASF1MOTIFCAMV	3	0	2	0	Sitio de unión de ASF-1 en promotor CaMV 35S; sitio involucrado en la activación transcripcional de varios genes por auxinas.
	CATATGGMSAUR	2	2	4	6	Involucrado en la respuesta de auxinas.
	SURECOREATSULTR11	6	2	3	2	Núcleo del elemento de respuesta a sulfuro (SURE) encontrado en el promotor de SULTR1; SURE contiene secuencia de unión a ARF.
Relacionadas a Ciclo celular	CELLCYCLESC	1	0	0	0	Sitio de activación específico del ciclo celular.
	TE2F2NTPCNA	0	0	0	1	Involucrado en la activación transcripcional en células con alta actividad de división.
Ritmo circadiano	-10PEHVPSBD	2	2	4	1	"-10 promoter element" encontrada en cebada en el promotor del gen psbD.
	CIACADIANLELHC	2	1	2	5	región necesaria para la expresión circadiana en tomate
Relacionadas a Cu	CURECORECR	6	2	18	10	Elemento de respuesta a cobre encontrado en los genes Cyc y Cpx1 en Chlamydomonas.
Relacionadas a citoquininas	CPBCSPOR	0	1	1	0	Secuencia crítica para proteínas de unión por citocinina in vitro.
Relacionadas a sequía	ACGTATERD1	10	8	16	10	Secuencia ACGT requerida para la expresión inducida por etiolación de erd1 (respuesta temprana a deshidratación) in Arabidopsis.
	MYCATERD1	2	0	0	2	Secuencia de reconocimiento de MYC necesaria para la expresión de erd1 en Arabidopsis.

	MYCATRD22	2	0	0	2	Sitio de reconocimiento de MYC encontrado en los promotores de genes de respuesta a deshidratación en Arabidopsis.
	MYCCONSUSAT	16	12	14	20	Sitio de reconocimiento de MYC encontrado en los promotores de los genes en respuesta a deshidratación en Arabidopsis.
Relacionadas a Fe	IRO2OS	2	0	0	0	Secuencia principal de unión a OsIRO2; el factor transcripcional OsIRO2 es inducido exclusivamente por la deficiencia de Fe.
Relacionadas a giberelinas	GARE2OSREP1	1	1	0	0	Elemento de respuesta a Giberelinas (GARE).
	GAREAT	2	1	2	2	GARE
	MYBGAHV	1	1	1	1	Elemento central del complejo de respuesta a giberelinas (GARC)
	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	1	1	0	2	Caja de pirimidinas encontrada en arroz que participa en la respuesta de giberelinas.
	WRKY71OS	15	12	19	16	Sitio de unión de WRKY71 en arroz, un factor represor de la vía de señalización de giberelinas.
	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	0	0	0	1	"Caja de pirimidinas" encontrada en cebada; requerida para la inducción por giberelinas.
	TATCCACHVAL21	0	0	0	2	"Caja TATCCAC" es parte de los elementos cis de GARC.
	GADOWNAT	2	0	0	0	Secuencia presente en 24 genes en la regulación por baja GA encontrados en la germinación de la semilla de Arabidopsis.
GATABOX	GATABOX	32	18	18	25	"Caja GATA". Requerida para la regulación por luz y expresión en tejidos específicos.
GT1GMSCAM4	GT1GMSCAM4	12	2	4	9	Motivo encontrado en el promotor de la isoforma de sCaM-4 en soya; involucrado en la expresión de ScaM-4 inducido por patógenos y sal.
Relacionadas a proteínas de choque térmico	CCAATBOX1	4	1	4	13	Secuencia común encontrada en las regiones no codificantes 5' en genes eucariontes; encontrada en el promotor de genes en proteínas de choque térmico.
	PRECONSCRHSP70A	5	2	3	2	Involucrado en la inducción del gen HSP70A.
Relacionadas a Luz	GT1CONSENSUS	31	9	20	23	Sitio consenso de unión para GT-1 en varios genes regulados por luz.
	GT1CORE	1	1	0	0	Motivo esencial para la unión de GT-1.
	IBOX	5	2	0	1	Secuencia conservada río arriba de genes regulados por luz.

	IBOXCORE	12	7	3	5	Secuencia conservada rio arriba de genes regulados por luz.
	IBOXCORENT	3	2	0	1	Motivo "I-box" asociado a las regiones promotoras con respuesta a luz.
	INRNTPSADB	5	1	4	3	Elemento "Inr" encontrado en el promotor del gen psaDB en tabaco; Transcripción en respuesta a luz del gen psaDB.
	REALPHALGLHCB21	4	2	1	1	Requerido para la regulación del fitocromo.
	SORLIP1AT	1	0	0	2	Secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por luz en Arabidopsis.
	SORLIP2AT	1	0	1	0	Secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por luz en Arabidopsis.
	TBOXATGAPB	3	0	2	2	"Tbox" encontrada en Arabidopsis thaliana; mutaciones en el "Tbox" resulta en la reducción de la transcripción en genes activados por luz.
	SORLIP3AT	0	1	0	0	Secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por luz en Arabidopsis.
	SORLREP2AT	0	0	1	0	Secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por luz en Arabidopsis.
	SORLIP5AT	0	0	2	1	Secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por luz en Arabidopsis.
	SORLREP3AT	0	0	0	1	Secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por luz en Arabidopsis.
Relacionadas a bajas temperaturas	CBFHV	4	0	2	3	Sitio de unión de CBF1 de cebada; CBFs son también conocidos como proteínas de unión a elementos de respuesta a deshidratación.
	CRTDREHVCBF2	2	0	0	2	Secuencia preferida por el factor transcripcional AP2 en cebada de HvCBF2.
	LTRE1HVBLT49	0	2	0	0	Elemento de respuesta a baja temperatura (LTRE-1) en cebada.
	LTRECOREATCOR15	3	1	2	0	LTRE del gen cor15a en Arabidopsis.
Relacionadas a MYB	MYB1AT	6	4	1	2	Sitio de reconocimiento de MYB encontrado en los promotores de genes en respuesta a deshidratación en Arabidopsis.
	MYB1LEPR	3	0	0	0	Pti4 de tomate regula la expresión génica relacionada a defensa mediante los motivos GCC y no-GCC

	MYB2CONSENSUSAT	3	2	3	2	Sitio de reconocimiento de MYB encontrado en los promotores de genes en respuesta a deshidratación en Arabidopsis.
	MYBCORE	5	4	4	4	Sitio de unión para las proteínas ATMYB1 y ATMYB2; ATMYB2 está involucrada en la regulación de genes que responden a estrés por agua en Arabidopsis.
	MYBCOREATCYCB1	3	4	3	0	Encontrado en el promotor del gene ciclina B1 en Arabidopsis thaliana
	MYBPLANT	1	0	0	0	Sitio de unión de la proteína MYB de planta.
	MYBST1	2	6	3	4	Motivo principal del sitio de unión de MybSt1 (un homólogo de MYB en papa).
	TATCCAOSAMY	0	2	1	3	Sitio de unión de OsMYBS1, OsMYBS2 y OsMYBS3.
	MYB2AT	0	1	1	2	Sitio de unión para ATMYB2, un homólogo de MYB en Arabidopsis; está involucrado en la regulación de genes que responden a estrés hídrico en Arabidopsis.
Relacionadas a fosfatos	P1BS	0	2	0	4	Secuencia de unión de PHR1 encontrada en la región río arriba de los genes en respuesta a la ausencia de fosfato en varias plantas.
Señal de poli-A	POLASIG1	8	9	2	10	Señal de poli-A encontrada en el gen legA en guisantes, alfa-amilasa en arroz.
	POLASIG2	4	2	1	2	Señal de poli-A encontrada en el gen alfa-amilasa de arroz.
	POLASIG3	1	7	6	8	Señal de poli-A
Relacionadas a prolina	PREATPRODH	2	1	2	5	Elemento de respuesta a Prolina encontrado en la región promotora del gene prolina deshidrogenasa en Arabidopsis.
RESPONSE REGULATOR	ARR1AT	25	21	34	39	Elemento de unión de ARR1 encontrado en Arabidopsis; ARR1 es un regulador de respuesta.
Tejido específico	-300CORE	1	1	0	0	Motivo esencial "TGTAAG" en elementos "-300" de los genes alpha-zeina de maíz.
	-300ELEMENT	7	3	2	7	Presente río arriba del promotor del gene B-hordeina de cebada.
	AACACOREOSGLUB1	1	3	0	0	Motivo AACA encontrado en los genes glutelin en arroz, involucrados en el control de la expresión específica en el endospermo.
	AMYBOX1	1	1	1	1	Secuencia conservada encontrada en la región 5' río arriba del gen alfa-amilasa del arroz, trigo y cebada.

CAATBOX1	27	22	31	47	Secuencia conservada encontrada en el promotor del gen legA en chícharo.
CACGTGMOTIF	4	0	0	0	Esencial para la expresión del gen beta-faseolin durante la embriogénesis en frijol, tabaco y Arabidopsis.
CACTFTPPCA1	47	18	35	56	Tetranucleótido (CACT) es un componente clave de Mem1 (módulo de expresión del mesófilo 1) encontrado en los elementos reguladores cis en la región distal del fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppcA1).
CARGATCONSENSUS	2	0	0	0	Secuencia consenso "CarG" encontrada en el promotor de SOC1 de Arabidopsis que es una caja MADS de un gene de control de floración.
DOFCOREZM	48	11	23	36	Sitio requerido para la unión de las proteínas Dof en maíz; las proteínas Dof son proteínas de unión al DNA, con probablemente un solo dedo de zinc, y que son únicas en plantas.
DPBFCOREDCDC3	5	3	3	1	Motivo esencial para la unión de una nueva clase de factores de transcripción bZIP, DPBF-1 y 2 (factor de unión al promotor Dc3); la expresión de Dc3 es normalmente embrión-específica, y puede ser también inducida por ABA.
EBOXBNNAPA	32	24	14	40	Caja E del gen de la proteína de almacenaje de napA de <i>Brassica napus</i> .
ERELEE4	3	2	1	4	Elemento de respuesta a etileno en los genes E4 de tomate y GST1 de clavel; GST1 está relacionada a senescencia.
GTGANTG10	15	8	19	23	Motivo "GTGA" encontrado en el promotor del gene g10 de polen en tabaco.
NAPINMOTIFBN	3	0	1	0	Secuencia encontrada en la región 5' rio arriba del gene napin en <i>Brassica napus</i>
NTBBF1ARROLB	3	1	1	1	Sitio de unión de NtBBF1 en el gen rolB <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ; requerida para la expresión tejido específica e inducción por auxinas.
OSE1ROOTNODULE	4	2	4	4	Una de las secuencias motivo consenso de los elementos órgano específico característicos de los promotores activados en las células infectadas en los nódulos de raíz.
OSE2ROOTNODULE	5	4	4	10	Una de las secuencias motivo consenso de los elementos órgano específico característicos de los promotores activados en las células infectadas en los nódulos de raíz.
POLLEN1LELAT52	38	18	22	40	Uno de los dos elementos regulatorios codependientes responsables para la activación específica en polen del gen lat52 de tomate
QELEMENTZMZM13	1	0	0	0	Elemento Q en el promotor del gene ZM13 en maíz; Zm13 es un gen de maíz específico en

						polen.
	RAV1AAT	10	7	11	6	Secuencia consenso de unión del factor transcripcional RAV1 en Arabidopsis; Los niveles de expresión de RAV1 son relativamente altos en hojas de la roseta y raíz.
	RHERPATEXPA7	3	1	1	2	Parte derecha de RHEs (elementos en cis específico de pelo radicular) conservado en Arabidopsis thaliana
	ROOTMOTIFTAPOX1	34	22	22	40	Motivo encontrado en los promotores de rolD; El promotor rolD es altamente específico en plantas regenerativas y es específico en raíces (Leach,F y Aoyagi K, 1991)
	S1FBOXSORPS1L21	2	0	3	1	Motivo S1F conservado en los genes de espinaca RPS1 y RPL21 que codifican para las proteínas de ribosomales del plástido.
	SEF1MOTIF	7	2	0	3	Motivo de unión de SEF1 (factor del embrión de soya 1)
	SEF4MOTIFGM7S	13	12	6	9	Sitio de unión de SEF4
	TAAAGSTKST1	10	1	2	5	Motivo encontrado en el promotor del gene KST1 en <i>Solanum tuberosum</i> ; el gen KST1 codifica un canal de K+ en las células guarda.
	TATABOX2	5	3	1	2	Caja TATA encontrado en la región 5' río arriba del gen legA de chícharo; la secuencia y espaciado de los elementos TATA son esenciales para una iniciación precisa.
	TATABOX3	2	6	1	4	Caja TATA encontrado en la región 5' río arriba del gen esporamina A en papa.
	TATABOX4	15	3	0	4	Caja TATA encontrado en la región 5' río arriba del gen esporamina A en papa.
	TATABOX5	8	10	6	9	Caja TATA encontrado en la región 5' río arriba del gen glutamina sintetasa en chícharo; un elemento TATA funcional in vivo.
	XYLAT	3	0	0	0	Elemento en cis identificado en los promotores de los genes relacionados al xilema.
	AMYBOX2	0	2	1	1	Secuencia conservada en la región 5' río arriba del gen alfa-amilasa en arroz, trigo y cebada.
	GCN4OSGLUB1	0	1	1	1	Requerido para la expresión específica en endospermo.
	RYREPEATBNNAPA	0	2	2	6	Requerida para la expresión específica en semilla.
	TGACGTVMAMY	0	0	1	0	Requerida para altos niveles de expresión de alfa amilasa en los cotiledones de semillas germinadas.

	TGTCACACMCUCUMISIN	0	0	1	1	Un elemento potenciador necesario para la expresión específica en fruta.
	CCA1ATLHCB1	0	0	0	3	Sitio de unión de CCA1; Relacionada en la regulación del fitocromo
Factores transcripcionales	BIHD1OS	5	4	5	9	Sitio de unión de OsBIHD1, un factor transcripcional BELL de arroz.
	CARGCW8GAT	8	4	7	4	Sitio de unión para AGL15 (AGAMOUS-like 15)
Relacionadas a cajas W	WBOXATNPR1	5	7	8	5	Caja W encontrada en el promotor del gen NPR1 de Arabidopsis thaliana; reconocido específicamente por las proteínas de unión de DNA inducidos por WRKY.
	WBOXHVIS01	3	5	8	6	Elemento W presente en el promotor de iso1 (codifica a la isoamilasa1) en cebada.
	WBOXNTERF3	7	8	12	7	Caja W encontrada en la región promotora del gene represor transcripcional ERF3 en tabaco; Puede estar involucrada en la activación del gen ERF3 por daño.
	WBBOXPCWRKY1	0	2	3	1	Proteínas WRKY de unión específica a la secuencia de DNA con el motivo también denominado caja W.
Relacionadas a daño/heridas	WRECSAA01	0	0	1	0	Elemento de respuesta a daño encontrado en la región promotora del gen ascorbato oxidasa en pepino.

**Tabla suplementaria III. Desglose de las categorías en las que se agruparon los diferentes elementos en cis encontrados en los promotores.**  
 Se señala la cantidad de elementos en cis encontrados en cada promotor. Tamaño de los promotores considerado para el análisis: AtMTA 3000 pb, AtFIP37 1700 pb, MpMTA 2821 y MpWTAP 3000 pb.

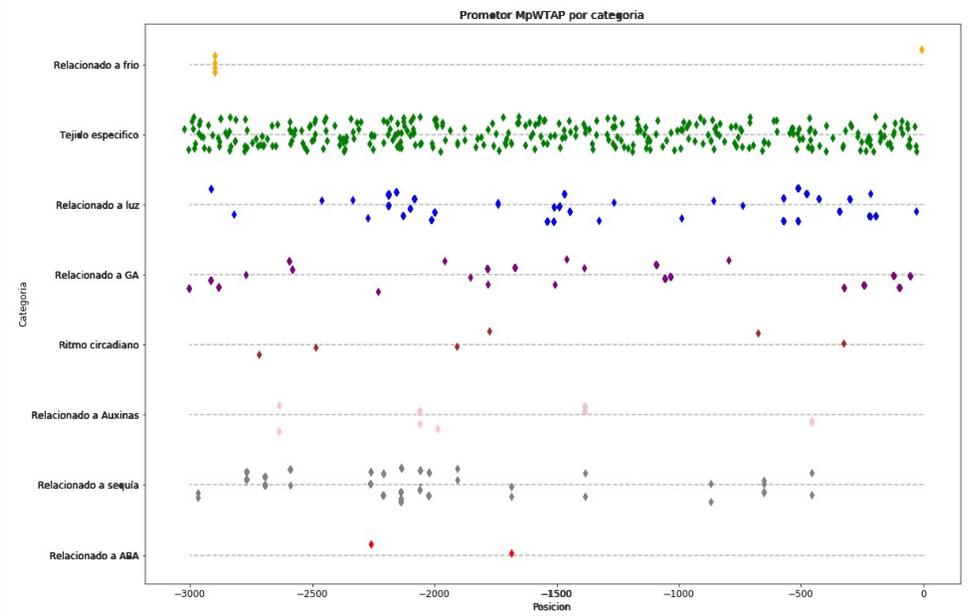
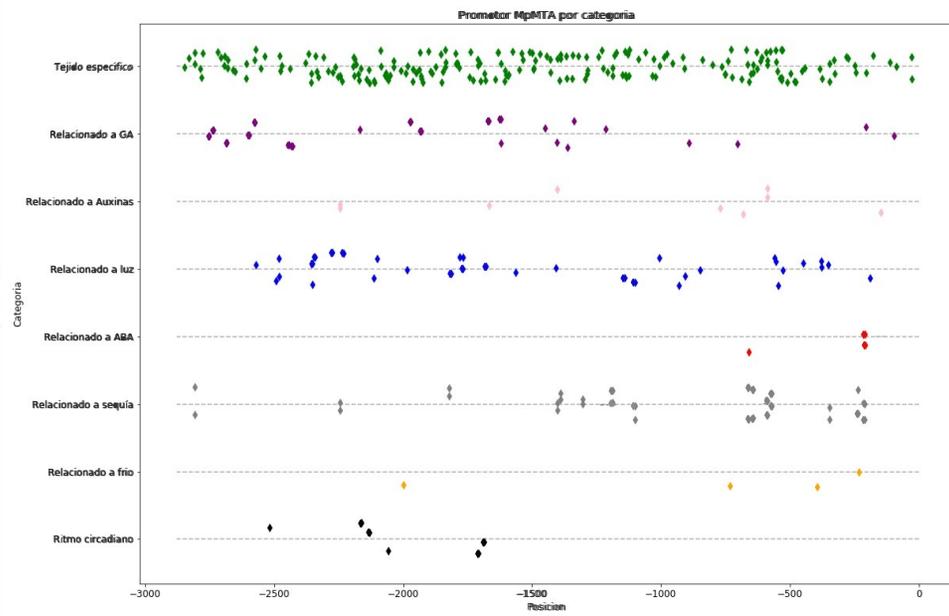
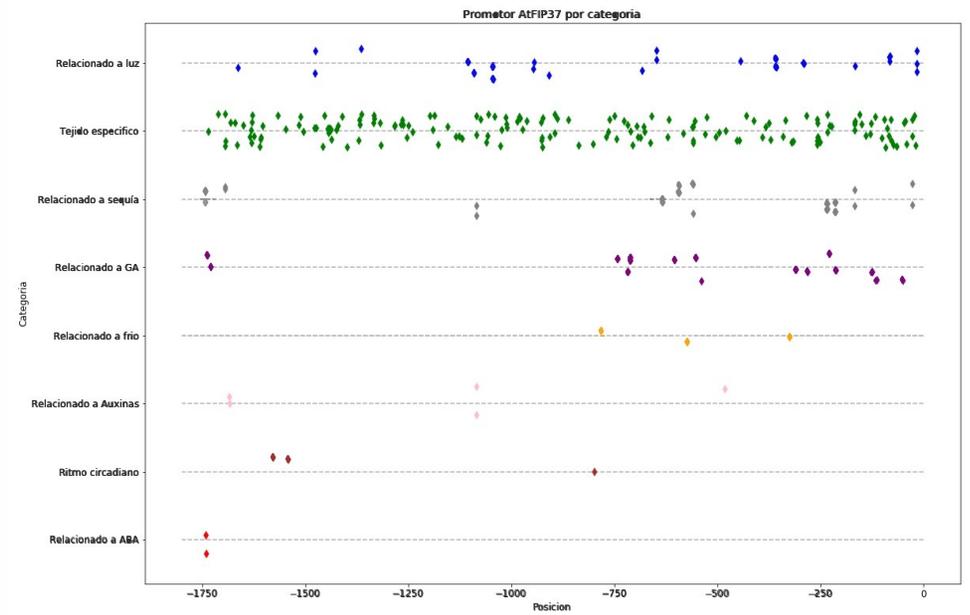
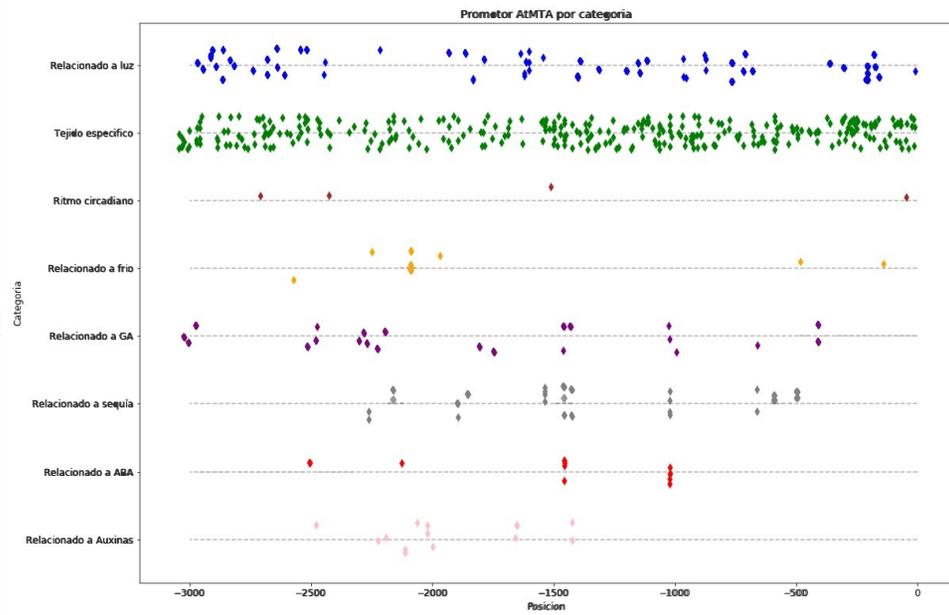
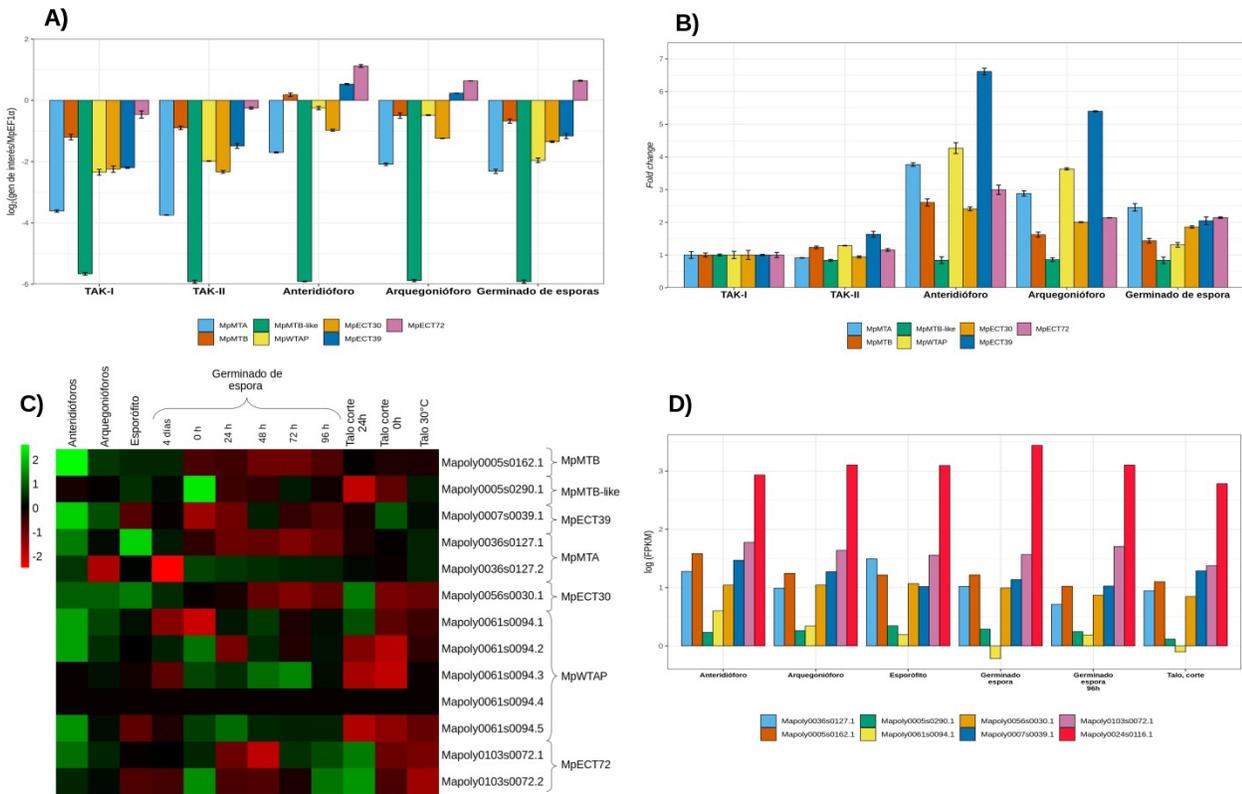
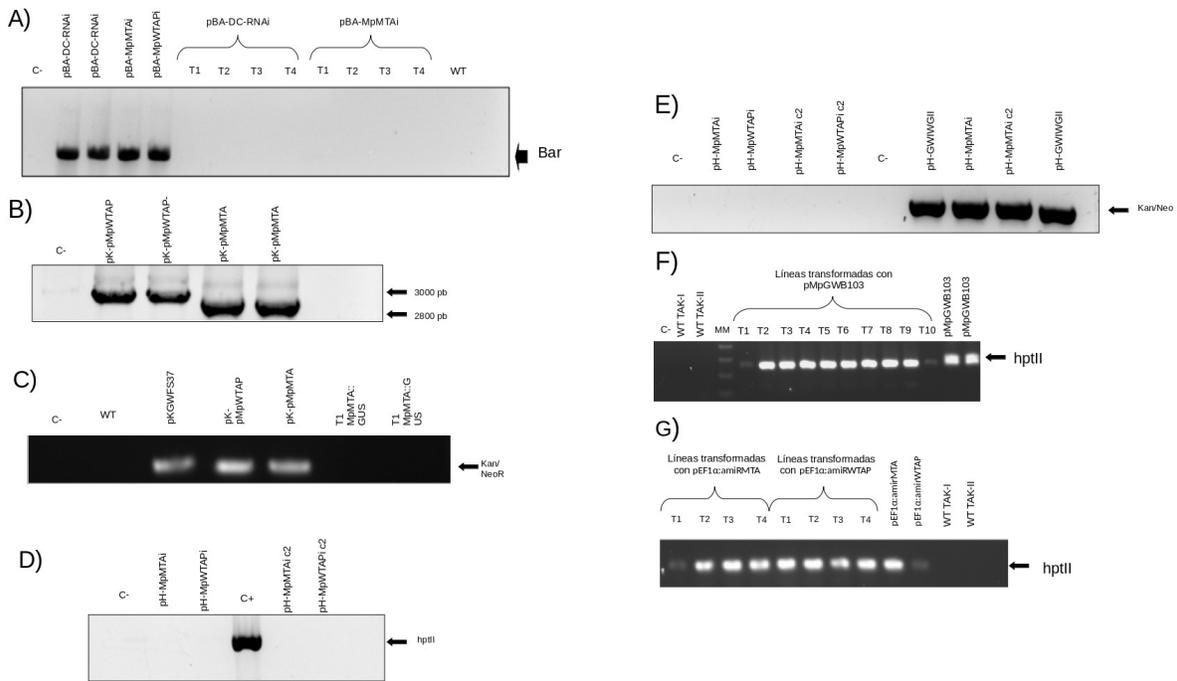


Figura suplementaria I.-

Representación esquemática por categoría, de la ubicación de los elementos regulatorios en *cis* probables en los promotores de los genes *AtMTA*, *AtFIP37*, *MpMTA*, *MpWTAP*. La categoría de "Tejido-específica" incluye a todos los elementos encontrados en la tabla suplementaria II.

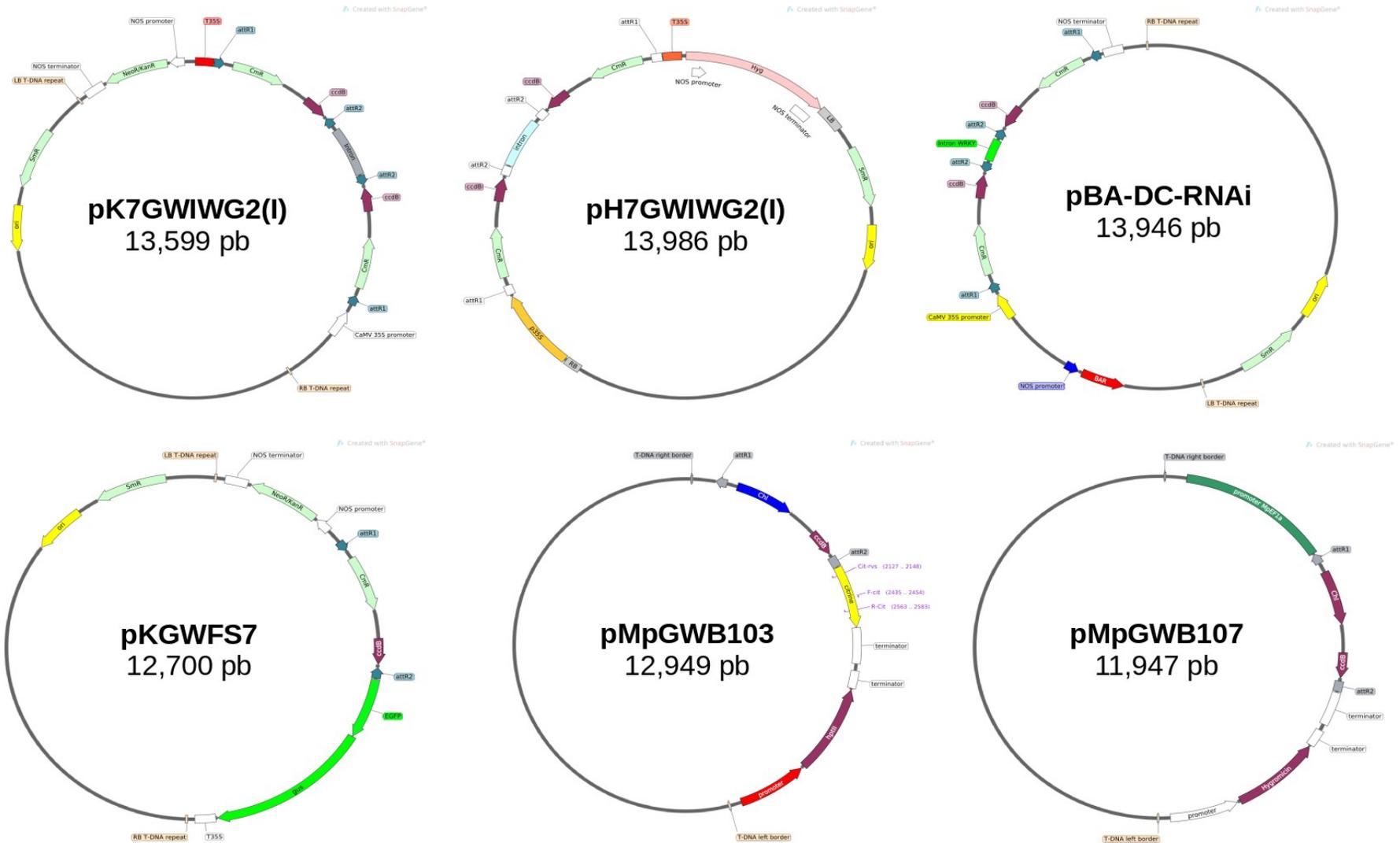


**Figura suplementaria II.** A) Análisis cuantitativo de mRNA de los genes de interés por RT-PCR relativo a *MpEF1a* representados en una escala logarítmica; B) Resultado del análisis  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  para obtener los niveles de acumulación de los genes en las distintas etapas evaluadas con respecto al talo masculino por 14 días (“TAK-I”). Las barras de error representan el error estándar de  $\Delta Cq$  de tres replicas biológicas. C) *Heatmap* de los niveles de expresión de los transcritos relacionados con la metilación en FPKM (*Fragments per Kilobase of transcript per Millon mapped reads*) a partir de los datos publicados por Bowman *et. al.* 2018 representados en el valor estándar z; D) Logaritmo de los valores de FPKM de los transcritos primarios en algunas etapas similares a la evaluadas por qRT-PCR. La etapa de germinado a partir de espورا representa el tejido recolectado a los 5 días y en las primeras 96 horas, mientras que el talo son los fragmentos de cortados en tiempo 0h. No se reportaron replicas para los experimentos de *RNA-seq*.



**Figura Suplementaria III.** A) Gel que muestra el resultado de la amplificación con los oligos Bar para el gen de resistencia al herbicida BASTA en los vectores *pBA-DC-RNAi*, *pBA-MpMTAi*, *pBA-MpWTAPi* junto con DNA genómico de aparentes plantas resistentes a BASTA y de plantas WT; B) Amplificación de los promotores en los vectores para verificar su inserción en *pK-pMpMTA* y *pK-pMpWTAP*; C) Resultado de la PCR con oligos para amplificar una región del gen de resistencia a Kanamicina en los vectores *pKGF37*, *pK-pMpWTAP*, *pK-pMpMTA*, y en los últimos carriles en DNA genómico de plantas que mostraron resistencia en un medio con Kanamicina. D) Resultado de la PCR con oligos para la amplificación de una región del gen de resistencia a higromicina usando los vectores con las construcciones de RNAi a partir del vector donado por Dra. Catalina Huerta, *pHGWIWG*; como control positivo se usó el vector *pER-XVE* que presenta resistencia a higromicina; en E) se muestra el resultado de la amplificación con los oligonucleótidos del gen de resistencia a Kanamicina en estos mismos vectores. Después de la obtención de posibles plantas transgénicas mediante la selección con higromicina, se corroboró la inserción de interés mediante una PCR con oligos para amplificar una región del gen *hptII* en plantas resistentes que se transformaron con la construcción del vector control *pMpGWB103* (F) y en plantas resistentes después de transformar con las construcciones *pMpEF1a:amiRMTA* y *pMpEF1a:amiRWTAP* (G). En ambos casos los vectores purificados se usaron como control positivo en la PCR.

## ANEXO IV



Mapa de los vectores usados en el presente trabajo. Los diagramas fueron realizados en el programa *SnapGene Viewer*.

**Tabla de las construcciones generadas en el presente trabajo para *M. polymorpha*.**

<b>Construcción</b>	<b>Vector Binario usado</b>
pBa-WTAPi	pBA-DC-RNAi
pBA-MTAi	
pKan-MTAi	pK7GWIWG2(I)
pKan-WTAPi	
pHyg-WTAPi	pH7GWIWG2(I)
pHyg-MTAi	
pMpMTA::GUS-GFP	pKGWFS7
pMpWTAP::GUS-GFP	
pMpMTA::citrina	pMpGWB107
pMpWTAP::citrina	
pMpGWB107-PHOT	
pEF1a:: MTAgb2	pMpGWB103
pEF1a:: MTAcas	
pEF1a:: MTA	
pEF1a:: WTAP	
pEF1a:: WTAPcas	
pEF1a:: WTAPgb2	
pEF1a:: MTB	
pEF1a:: MTBcas	
pEF1a:: MTBgb2	
pMpGWB103-PHOT	

## Anexo V

### Secuencias y plegamiento de las construcciones de amiRNAs para *MpMTA*, *MpMTB* y *MpWTAP*

Dentro de la estructura tallo-asa del precursor *miR160*, la secuencia del miRNA se aparea imperfectamente a la secuencia del miRNA\*. En nuestras construcciones, la secuencia blanco de *miR160* fue reemplazada con la secuencia complementaria al gen de interés (amiRNA), y la secuencia *miR160\** fue reemplazada con una secuencia (amiRNA\*) que aparea imperfectamente con el amiRNA para formar la estructura tallo-asa similar al precursor del miRNA. Para diseñar el amiRNA\*, los *mismatches* fueron introducidos en las mismas posiciones al gen endógeno *miR160* (Posiciones: 4,9, 15 del amiRNA) con el fin de mantener exactamente las propiedades físicas del microRNA endógeno. En el apareamiento de *miR160/miR160\**, el *mismatch* en la posición 9 es G/U, el cual forma una interacción tipo *wooble* y no crea una burbuja física en el tallo. Las secuencias de los amiRNAs fueron seleccionadas para mantener estas características del templado endógeno. Adicionalmente, las posiciones 17-19 del amiRNA deben ser ricas en GC y la primera base del amiRNA sea Uracilo tal como se observa en el *mir160*.

A continuación, se muestran las secuencias diseñadas de los amiRNAs. Las secuencias de los amiRNAs están indicadas en rojo, secuencias de amiRNA\* están indicadas en azul, las letras mayúsculas en amiRNA\* indican la localización de los *mismatch* para el apareamiento imperfecto y en color verde se señalan los sitios de restricción para NotI y Ascl. En negro se resaltan las secuencias que fueron sintetizadas por *Integrated DNA Technologies* (IDT) mientras que las otras se realizaron por *overlapping* PCR.

#### >MpmiR160\_MTA\_1

```
aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG
CACTTGACCATTGCGTAAAGAGCCTACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCaggctcAttacgTaatgCtcaGGAGGA
AGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTAGCGCGCCGg
```

#### >MpmiR160\_MTA\_2

```
aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG
CACTTAAACCCGGTACTCCGGTCATACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCatgaccCgagtaTcgggAttaGGAGGA
AGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTAGCGCGCCGg
```

#### >MpmiR160\_MTA\_3

```
aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG
CACTTGTTACGATTCACGTCGGATACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCatccggTcgtgaGtcgtTacaGGAGGA
AGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTAGCGCGCCGg
```

#### >MpmiR160\_MTB\_1

```
aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG
CACTTGCGTAAATCACATTGCATATACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCatatgcTatgtGtttaGgcaGGAGGAA
GTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTAGCGCGCCGg
```

#### >MpmiR160\_MTB\_2

```
aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG
CACTTATACATCGGCGGGTAGCTACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGCgagctaGccccGtgatAataGGAGG
AAGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTAGCGCGCCGg
```

>MpmiR160\_MTB\_3

aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG  
CACTT**TGCAAGTTGCTTACGATCAC**ACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGC**gtgacCtaagcGagctCcaa**GGAGGA  
AGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTA**GCGCGCC**g

>MpmiR160\_WTAP\_1

aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG  
CACT**TATTAAGGTTCTTCCGCTG**ACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGC**cagcggTaggaaTctttTata**GGAGGAA  
GTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTA**GCGCGCC**g

>MpmiR160\_WTAP\_2

aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG  
CACT**TGCCAAACGGCTCTGAACAGC**ACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGC**gctgtGagagcTgtttCgca**GGAGGA  
AGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTA**GCGCGCC**g

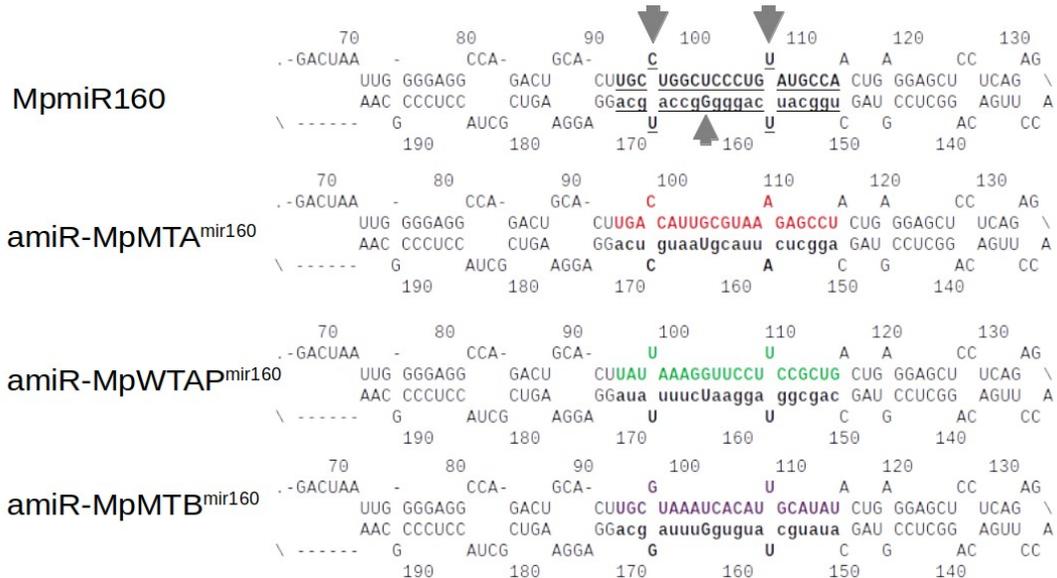
>MpmiR160\_WTAP\_3

aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG  
CACT**TCCAAAGGTTCTATTAGTCT**ACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGC**aggactTatagaGccttAgga**GGAGGA  
AGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTA**GCGCGCC**g

>MpmiR160\_WTAP\_3

aGCGGCCGCGCACCTCCTCTCCGACTGCAGCCCGTTTCGAGATCCGAGGACTTGCTCGACGCGACTAATTGGGGAGGCCAGACTG  
CACT**UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA**ACTGAGGAGCTCCTCAGAGACCTTGACAGGCTCCGTAGC**uggcauUcagggGgccaUgca**GGA  
GGAAGTCGCTACCTCCCGCAAGGTGCGACTAGCTTTCTGTCTTGGGTGCACACCTCACTGATGTTTGATAGATTTACTTA**GCGCGCC**  
g

Para controlar que las secuencias sintetizadas mantengan el patrón de plegamiento del miRNA endógeno, fueron analizadas con el software Mfold. El plegamiento del tallo-asa del *MpmiR160* endógeno y los amiRNAs se muestra debajo; las bases con *mismatch* están elevadas y se indica la posición de las bases.



## ANEXO VI

### PROTOCOLOS

#### REACCIONES DE RECOMBINACIÓN POR GATEWAY

Para recombinar los vectores destino con los vectores pENTR ligados los fragmentos de interés:

Reactivo	Volumen
Vector destino	150 ng
pENTR - fragmento de interés	150 ng
LR Clonase Mix	1 µL
Volumen total	4 µL

- Dejar incubando la reacción 2-3 horas a temperatura ambiente.
- Agregar 1 µL de proteinasa K e incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Transformar *E. coli* DH5α quimiocompetentes con toda la reacción de recombinación.

#### Reacción de ligación por T4 ligasa

Calcular los nanogramos (ng) de inserto a utilizar de acuerdo a la siguiente formula:

$$ng(\text{inserto}) = \frac{5 * kb(\text{inserto}) * ng(\text{vector})}{kb(\text{vector})}$$

Reactivo	Volumen
Buffer para T4 Ligasa	2 µL
Inserto	X µL
Vector digerido	20 ng
ATP (opcional)	1 µL

Enzima T4 Ligasa	1 $\mu$ L
Volumen final	20 $\mu$ L

- Incubar por 20 minutos a 22 °C
- Inactivar por 10 min a 65 °C.

### ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- Pesar 1 gr de agarosa ultrapura en un matraz.
- Disolver completamente en 100 mL de Buffer TBE 0.5X en microondas.

#### Solución TBE 5X

Reactivo	Volumen
Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5 M pH 8	20 mL
H <sub>2</sub> O	Aforar a 1 Litro

- Enfriar hasta ~50 °C.
- Agregar 5  $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg/mL).
- Verter la agarosa en la charola de gelificación y colocar los peines para pozos.
- Dejar gelificar por 30 minutos.
- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel.
- Mezclar 2-3  $\mu$ L de muestra con 0.5  $\mu$ L de buffer de carga.
- Cargar la mezcla en un pozo. Proceder igual para todas las muestras.
- Cargar 0.5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de DNA (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l).
- Conectar la cámara y dejar corriendo a ~90 V por 45 minutos.
- Fotografiar el gel en fotodocumentador.

### **TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* QUIMIOCOMPETENTES**

- Descongelar una alícuota de *E. coli* quimiocompetentes lentamente en hielo por 10 minutos.
- Agregar 5 ng de DNA plasmídico purificado (o el volumen entero de las reacciones de ligación o recombinación) e incubar en hielo 5 minutos.
- Dar un shock térmico a 42 °C durante 1.5 minutos.
- Pasar a hielo durante 1 minuto.
- Repetir los dos pasos anteriores.
- Agregar 1 mL de LB líquido estéril.
- Recuperar durante 1 hora a 37 °C en agitación constante.
- Plaquear 100 µL y 900 µL del cultivo en placas de agar LB adicionado con el antibiótico para seleccionar el plásmido.
- Incubar durante 16 horas a 37°C.

### **TRANSFORMACIÓN DE *A. tumefaciens* QUIMIOCOMPETENTES**

- Descongelar una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetentes lentamente en hielo por 10 minutos.
- Agregar 100-500 ng de DNA plasmídico e incubar en hielo 5 minutos.
- Congelar en N<sub>2</sub> líquido por 1 minuto.
- Descongelar e incubar a 37 °C por 3 minutos.
- Incubar en hielo por 1 minuto.
- Agregar 1 mL de LB líquido estéril.
- Recuperar durante 2 horas a 28 °C en agitación lenta.
- Plaquear 50 µL y 150 µL en placas de agar LB con gentamicina y/o rifampicina, más el antibiótico para seleccionar el plásmido.
- Dejar creciendo durante 48-72 horas.

### **MINIPREP DE PLÁSMIDOS DE *E. coli* MEDIANTE LISIS ALCALINA.**

Para la purificación de plásmidos, se siguió el protocolo de miniprep por lisis alcalina reportado por Bimboim y doly (1979), incorporando modificaciones.

Solución I	Conc. Final	Solución II	Conc. Final	Solución III	Conc. Final
Glucosa	50 mM	NaOH	0.2 N	Acetato de potasio	3.0 M
Tris-HCl	25 mM	SDS	1 %	Ácido acético	11.5 %
EDTA	10 mM				
RNAse	10 µg/mL				

1. Inocular 3 mL de medio LB, adicionado con antibiótico de selección, con la cepa de *E. coli* de donde se extraerá el plásmido. Crecer toda la noche a 37 °C con agitación constante.
2. Transferir 1 mL de cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Centrifugar 1 minuto a velocidad máxima. Desechar el sobrenadante. Repetir hasta centrifugar todo el cultivo.
3. Resuspender el pellet en 100 µL de solución I.
4. Agregar 200 µL de solución II. Mezclar suavemente. No incubar más de 5 minutos.
5. Agregar 150 µL de solución III y mezclar.
6. Centrifugar 7 minutos a máxima velocidad,
7. Recuperar el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
8. Agregar 1/10 de volumen de acetato de amonio 10 M y 1 volumen de etanol al 70 %.
9. Incubar 2 horas a -20 °C.
10. Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
11. Lavar la pastilla con 500 µL de etanol 70 %.
12. Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad, secar el pellet 15 minutos a temperatura ambiente y resuspender en 40 µL de H<sub>2</sub>O.

En caso de requerir plásmido para secuenciar o con mayor pureza, se utilizó el kit *GeneJet Plasmid Miniprep kit* (Cat. K0502 Thermo Scientific™)

#### **Extracción de DNA de *M. polymorpha* por CTAB.**

Buffer CTAB:

Reactivo	Para preparar 100 mL:
CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)	2.0 g
1 M Tris pH 8.0	10.0 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	4.0 mL
5 M NaCl	28.0 mL
H <sub>2</sub> O	40.0 mL
PVP 40 (polivinipirrolidona 40)	1 g

Ajustar todo a pH 5.0 con HCl y llevar a un volumen de 100 mL con H<sub>2</sub>O.

1. Moler 100 mg de tejido de planta en una fina pasta en aproximadamente 500  $\mu$ L de Buffer CTAB.
2. Transferir la mezcla de CTAB/extracto de planta en un microtubo de 1.5 mL e Incubar la mezcla a 65 °C por 30 minutos.
3. Después de la incubación, centrifugar la mezcla a 12000g por 5 minutos para separar el debris celular.
4. Agregar 250  $\mu$ L de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1) y mezclar por inversión. Posteriormente centrifugar los tubos a 12000g por 1 minuto.
5. Transferir la fase superior acuosa a un tubo nuevo y agregar 50  $\mu$ L de 7.5 M Acetato de amonio seguido de 500  $\mu$ L de etanol absoluto frío.
6. Invertir los tubos lentamente varias veces para precipitar el DNA. Los tubos pueden ser puestos por 1-2 horas a -20 °C después de la adición de etanol para precipitar el DNA.
7. El precipitado se aísla centrifugando el tubo a 12000g por 2 minutos para formar el pellet. Remover el sobrenadante y lavar el pellet de DNA agregando dos veces etanol 70 % frío.
8. Después del lavado, remover todo el sobrenadante y dejar que el pellet de DNA se seque (aprox. 15 min a temperatura ambiente)
9. Resuspender el DNA en agua estéril libre de DNAsas (aprox. 100-200  $\mu$ L H<sub>2</sub>O) RNAsa (10  $\mu$ g/mL) puede ser agregada al agua antes de disolver el DNA para remover cualquier RNA en la preparación (10  $\mu$ L RNAsa en 10 mL H<sub>2</sub>O)
10. Después de la resuspensión, el DNA se incuba a 65°C por 20 minutos para destruir cualquier DNAsa presente.

### **Extracción de RNA total para la detección de m<sup>6</sup>A en mRNAs de *M. polymorpha*.**

Para la extracción de RNA total de *Marchantia*, primero se probaron diferentes kits comerciales los cuales resultaron ser adecuados para distintos análisis moleculares como qRT-PCR, sin embargo, estos no nos permitieron obtener las cantidades necesarias para la purificación de los mRNAs por el kit *MagJet* (*MagJET mRNA Enrichment Kit #K2811*) en las distintas etapas debido a las características fisiológicas de la planta. Por esta razón, se trabajó en escalar el método de extracción de RNA por CTAB en el cual utilizamos cantidades mayores de tejido (hasta 5-8 gramos de tejido de cada etapa). Con el protocolo que se muestra a continuación se lograron obtener hasta 200 µg RNA total que se podrían utilizar para la detección de m<sup>6</sup>A en mRNAs de *M. polymorpha* en un futuro. Cabe mencionar que también existen otras alternativas como precipitar varias muestras de RNA total para concentrarlo por kit comerciales.

### **Extracción de RNA total de *M. polymorpha* utilizando CTAB y PVP (Adaptado a partir de lo reportado por Acosta-Maspons, et al. 2019)**

Nota: Si el RNA total será usado para análisis por qPCR se recomienda usar el *Kit RNAesy Plant extraction* de Qiagen.

Buffer CTAB-PVP:

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
CTAB	2.0 % m/v
PVP-40 (polivinilpirrolidona-40)	2.0 % m/v
Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 M

- Agregar β-Mercaptoetanol para una concentración final de 2.0 % antes de su uso.

Buffer SSTE:

Reactivos	Concentración final
NaCl	1 M
SDS (dodecilsulfato sódico)	0.5 % m/v
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM

1. Moler el tejido con nitrógeno hasta obtener un polvo fino.
2. Agregar 3-5 gramos de tejido congelado a 10 mL de buffer de extracción previamente calentado, en un tubo de 50 mL.
3. Agitar en vortex el tubo hasta que el tejido se mezcle con el buffer complemente.
4. Incubar el tubo a 65 °C por 60 minutos. Agitar brevemente (15 segundos) cada 5 minutos durante la incubación.
5. Agregar 10 mL de 24:1 Cloroformo:Alcohol Isoamílico.
6. Agitar vigorosamente hasta que las fases se mezclen, luego incubar a 20-25°C por 5 minutos.
7. Centrifugar a 6000 rpm por 12 minutos a temperatura ambiente.
8. Colectar la fase acuosa.
9. Repetir la extracción con Cloroformo:Alcohol Isoamílico una vez más.
10. Colectar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo.
11. Agregar  $\frac{1}{3}$  volumen de 10 M LiCl al tubo, mezclar y dejar la precipitación de RNA a 4 °C por 8 horas u *overnight*.
12. Centrifugar los tubos a 9000 rpm por 20 minutos a 4° C y decantar el sobrenadante, sin perder el *pellet*.
13. Agregar 3 mL de etanol al pellet.
14. Centrifugar a 9000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante.
15. Repetir los pasos 13 y 14 una vez más.
16. Dejar secar el pellet.

17. Agregar 5 mL de buffer SSTE precalentado a 65 °C. No colocar los tubos en hielo.
18. Agregar 5 mL de Cloroformo:Alcohol Isoamílico, mezclar y centrifugar 9000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
19. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y mantener en hielo.
20. Agregar 1 volumen de 2-propanol (v/v) y acetato de potasio (3 M) para obtener una concentración final de 0.3 M.
21. Mezclar gentilmente y dejar la precipitación *overnight* a -20°C.
22. Centrifugar a 9000 rpm por 30 minutos a 4 °C, posteriormente decantar el sobrenadante.
23. Lavar el pellet con 75 % etanol frío y centrifugar a 9000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
24. Secar el pellet y resuspender en 150 µL de agua estéril precalentada a 65°C (concentración final obtenida aproximadamente 200 µg/150 µL).

### **Estimación del número de copias de las inserciones después de la transformación de *M. polymorpha*.**

La transformación de las plantas mediante *Agrobacterium* usualmente genera la integración de DNA en una sola copia o en múltiples copias. Por lo tanto, la estimación del número de copias representa un paso esencial cuando se van a caracterizar fenotipos de plantas transgénicas (ver discusión). Uno de los métodos para esta estimación es mediante PCR tiempo real la cual resulta ser una herramienta efectiva y menos laboriosa que *Southern blot*, que es otra metodología para esta estimación.

A continuación, describiremos brevemente el protocolo que se usó para establecer esta herramienta por PCR en tiempo real y que se puede utilizar en dado caso que se requiera realizar esta determinación en las líneas transgénicas a evaluar. Para mayor detalle consultar Giancaspro et. al. 2017.

**Preparación del DNA:** 1) Se aisló el DNA genómico de líneas transgénicas y WT. Se evaluó su pureza e integridad mediante la relación de la absorción 260/280 nm y visualizando en gel de 0.8% (m/v) agarosa.

2) Dado que la metodología requiere de curvas de cuantificación absoluta, fue necesario generar templados estándar. Por lo tanto, decidimos generar el estándar a partir de un plásmido ya que se

obtiene una cantidad elevada de DNA. Para llevar a cabo esto, se amplificó un fragmento de 286 pb reportado como unicopia en el genoma de *M. polymorpha* (Ogasawara et al, 2013). Este fragmento, que abarca una parte del gen *PHOT*, se clonó en el vector *pENTR<sup>TM</sup>-SD/D-TOPO<sup>TM</sup>*. Posteriormente, se realizó la reacción de recombinación con el vector pMpGWB103 y se transformó en células competentes *E. coli*. La purificación de los plásmidos se realizó mediante kit *GeneJet Plasmid Miniprep kit*. De esta manera obtenemos un solo estándar que se puede usar de templado para el fragmento unicopia endógeno y el transgen a evaluar (gen *hptII*).

3) La cuantificación de DNA es uno de los aspectos más importantes de esta metodología, por lo cual recomendamos que se realicen medidas fluorométricas (*Qubit*) ya que presentan una mayor exactitud que la determinación por absorción UV en el espectrómetro. Se preparó una concentración de 5 ng/μL de DNA genómico.

**Curvas de Calibración:** A partir del templado estándar (vector), se realizan diluciones seriales a partir de una concentración conocida. Dado que conocemos la longitud exacta del estándar, se puede determinar el número de copias en un volumen determinado. De esta manera, a partir de una concentración de  $10^7$  copias por microlitro se realizaron 6 diluciones seriales 1:10. Para templado, se diseñaron oligonucleótidos adecuados para amplificar fragmentos menores a 150 pb, con una eficiencia de amplificación elevada y especificidad. Las diluciones se ocuparon para realizar las curvas estándar absolutas con reacciones en *SYBR-Green* como se especifica en la sección de Materiales y Métodos. Las curvas se obtienen graficando el logaritmo del número de copias de DNA contra el Cq correspondiente.

**Reacciones de PCR en tiempo real:** Se realizaron las reacciones con *SYBR-Green* como se especificó anteriormente. Se usaron 5 ng de DNA genómico por muestra. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Las condiciones del termociclador fueron iguales a las mencionadas anteriormente.

**Cálculo del número de copias del transgén:** Se determinó la cantidad de copias del transgén (y del endógeno) en las líneas transgénicas comparando el valor de Cq de las muestras contra la curva de calibración generada previamente. Se calculó el número preciso de copias del transgén a partir de la relación entre la cantidad de copias del transgén y el endógeno.

## Medios de crecimiento usados para *M. polymorpha*

### Preparación del stock 10X Gamborg's B5.

Preparar un volumen 0.7X de H<sub>2</sub>O con agitación y agregar los siguientes reactivos en el orden establecido:

Reactivo	Cantidad
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.75 g
KNO <sub>3</sub>	25 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.34 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.5 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.5 g
EDTA NaFe (III)	400 mg
Gamborg's B5 microelementos	10 mL
0.075 % KI	10 mL
Agregar H <sub>2</sub> O para	1000 mL

Realizar alícuotas de 50 mL y almacenar a -20 °C. No se agrega mezcla de vitaminas al medio Gamborg's B5 para *M. polymorpha*.

### Preparación de stock 1000X de Gamborg's B5 microelementos.

Preparar un volumen 0.7X de H<sub>2</sub>O, y con agitación, agregar los siguientes reactivos siguiendo el orden mencionado uno por uno, de otra manera algunos reactivos pueden no disolverse completamente y dejar sedimentos.

Reactivos	Cantidad
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg
25 mg/mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1 mL (2.5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
25 mg/mL de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 mL (2.5 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	300 mg
Agregar $\text{H}_2\text{O}$ para	100 mL

Realizar alícuotas y almacenar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### Preparación del medio Gamborg's B5 0.5X.

Reactivos	Cantidad
10X Gamborg's B5 stock	50 mL
MES	0.5 g
Agregar $\text{H}_2\text{O}$ para	1000 mL

Ajustar pH 5.5 con 1 N KOH.

Para placas, agregar 1% de agar y 1% sacarosa.

Esterilizar en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  por 21 minutos.

#### Preparación del stock 10X M51C.

Preparar un volumen 0.7X de  $\text{H}_2\text{O}$ , y con agitación, agregar los siguientes reactivos en orden:

Reactivo	Cantidad
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.75 g
$\text{KNO}_3$	20 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 g
EDTA-NaFe (III)	400 mg
Gamborg's B5 microelementos	10 mL
Gamborg's B5 <i>mix</i> vitaminas	10 mL
0.075 % KI	10 mL
Agregar $\text{H}_2\text{O}$ para	1000 mL

Realizar alícuotas de 50 mL y almacenar a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### Preparación de Gamborg's B5 *mix* vitaminas.

Preparar un volumen 0.7X de  $\text{H}_2\text{O}$ , y con agitación, agregar los siguientes reactivos en orden.

Reactivos	Cantidad
Mio-inositol	10 g
Ácido nicotínico	100 mg
Piridoxina-HCl	100 mg
Tiamina-HCl	1 g
Agregar $\text{H}_2\text{O}$ para	100 mL

Realizar alícuotas de 10 mL y almacenar a  $-20^\circ\text{C}$ .

**Preparación del medio 0M51C.**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
10X <i>stock</i> M51C	100 mL
Sacarosa	20 g
Casa aminoácidos	1 g
L-glutamina	0.3 g
Agregar H <sub>2</sub> O para	1000 mL

Ajustar pH 5.5 con 1 N KOH.

Para placas, agregar 1.4 % agar

Esterilizar por autoclave a 120 °C por 21 minutos.