



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA SEÑALIZACIÓN
RETRÓGRADA BIOGÉNICA DE ANGIOSPERMAS EN MARCHANTIA
POLYMORPHA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Arihel de Jesús Hernández Muñoz

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Patricia León Mejía,
Instituto de Biotecnología, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Svetlana Shishkova
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**Dr. Mario Alberto Arteaga Vázquez
Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, UV**

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 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.

JURADO

Presidente: Dr. Luis Cárdenas Torres

Secretaria: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Vocal: Dra. Denhi Schnabel Peraza

Vocal: Dra. Patricia Coello Coutiño

Vocal: Dr. Mario Alberto Serrano Ortega

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con financiamiento de DGAPA-PAPIIT/UNAM, proyecto número IN207320.

El alumno recibió beca CONACYT durante sus estudios de posgrado en el Instituto de Biotecnología, UNAM (CVU: 925188).

El alumno recibió apoyo económico de PAEP para atender el XVIII National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress, en la ciudad de Mérida, Yucatán.

A la Dra. Patricia León Mejía por permitirme ejecutar este proyecto en su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial, los Dres. Svetlana Shishkova y Mario Arteaga por sus valiosas aportaciones durante la elaboración de este trabajo.

A los miembros de mi jurado de examen, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la Dra. Kenny Alejandra Agreda Laguna, por su apoyo y colaboración en algunos experimentos necesarios para la conclusión de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Zavala Padilla, por su apoyo técnico en la preparación y posterior procesamiento de las muestras para visualización por microscopía electrónica.

A la M. en C. María Isabel Cruz Lopez por su apoyo técnico durante la realización de los cortes histológicos del talo de *Marchantia polymorpha*.

A todos los miembros del laboratorio de la Dra. Patricia León Mejía, por sus valiosos aportes y consejos.

A la Dra. Nidia Sánchez León por su apoyo técnico.

RESUMEN

La emergencia de los embrioplastos, es decir, plástidos con la capacidad de diferenciarse en otros subtipos además de cloroplastos (v.g. etioplastos, elaioplastos, cromoplastos, amiloplastos etc.) fue un evento crítico en la terrestrialización de las Embriofitas. En este proceso de diferenciación de un tipo de plástido hacia otro es imprescindible la comunicación entre el organelo y el núcleo, con la consecuente modulación de la expresión génica nuclear y del genoma del plástido. A este proceso de señalización se le denomina señalización retrógrada, y el plástido en que esto ha sido estudiado más extensivamente es el cloroplasto. De manera interesante, se ha documentado la presencia de elementos involucrados en la señalización retrógrada desde clados algales, no obstante, en estos organismos existen sólo cloroplastos, y estos se duplican ya diferenciados, sin pasar por un proceso de biogénesis. El organismo más basal en el cual se tiene evidencia de la existencia de plástidos distintos a cloroplastos es *Marchantia polymorpha*, lo cual le hace un modelo interesante para estudiar la evolución de este proceso de señalización. En plantas vasculares, los cloroplastos se desarrollan a partir de organelos indiferenciados denominados proplástidos, mismos que se localizan en la capa L2 del Meristemo Apical de Brote (SAM). A las señales plastídicas que modulan la expresión nuclear durante el desarrollo de los plástidos se les llama señales biogénicas, y éstas pueden ser de variada naturaleza, desde metabólica, partiendo de carotenoides o precursores de la síntesis de clorofilas, hasta proteicas. Es importante recalcar, que esta señalización es necesaria no sólo para la diferenciación hacia cloroplastos a partir de organelos indiferenciados (proplástidos), sino también para la transición entre los distintos subtipos de plástidos.

Con el propósito de ahondar en el estudio de la aparición de estas señales a lo largo de la evolución de las plantas terrestres, se realizaron análisis filogenéticos con un total de 12 proteínas, nueve de éstas involucradas en la comunicación entre el plástido y el núcleo durante su biogénesis, y tres en la señalización plástido-núcleo en plástidos maduros. Del análisis de las proteínas involucradas en señalización biogénica se concluyó que cuatro de éstas (HY5, IJ1, PAPP5, RABD8) existen desde el ancestro en común entre las algas verdes (Chlorophyta) y las plantas terrestres; CIA2, GLK, GUN1 y SG1, emergieron en el ancestro en común de las plantas terrestres con las algas estreptofitas, y que PRIN2 es un elemento de señalización propio únicamente de las Angiospermas. Para las proteínas involucradas en la señalización plastídica que parte de plástidos maduros, a su vez, se concluyó que, de tres analizados, dos (HDS y SAL1) existen desde el ancestro en común entre Chlorophyta y Embryophyta, mientras que WHY1, emerge con el clado de Streptophyta.

Adicionalmente, se caracterizó funcionalmente al ortólogo de GLK en *M. polymorpha* (MpGLK). Los GLK participan en la señalización retrograda biogénica como reguladores positivos del desarrollo del cloroplasto. La sobreexpresión de MpGLK recapitula lo esperable para una GLK *bona fide* de plantas vasculares, con plantas que acumulan significativamente mayor cantidad de pigmentos (carotenoides y clorofilas) y almidón durante distintos estadios de desarrollo; y cuyos cloroplastos presentan un empaquetamiento más denso, derivando en sistemas endomembranales más complejos. Adicionalmente, la sobreexpresión de MpGLK induce la diferenciación hacia cloroplastos en tejidos que no son fotosintéticamente activos en condiciones silvestres, lo cual confirma su papel como regulador positivo del desarrollo del cloroplasto en *M. polymorpha*. Interesantemente, MpGLK posee a su vez un dominio regulador de respuesta adicional a los dominios y motivos asociados a una GLK *bona fide*, lo cual sugiere que esta proteína podría cumplir a su vez una función adicional a la que se describe en este trabajo.

ABSTRACT

Plastids of vascular plants exhibit the capability of transitioning between several subtypes of plastids (*e.g.* chloroplasts, amyloplasts, chromoplasts, etioplasts, elaioplasts, etc.). This capability has been associated with the terrestrialisation of Land Plants, being this so called “embryoplast” pivotal for land adaptation. This differentiation process depends on the communication between the organelle and the nucleus through several signals of varied nature. The term “retrograde signalling” encompasses all those signals that derive from the plastids and modulate the gene expression of plastid—targeted nuclear encoded genes, when this signalling process derives from developing plastids, it is called plastid biogenic retrograde signalling and chloroplasts are the plastids where this has been studied most extensively. Interestingly, recent studies report the presence of plastid signalling-related proteins in some algae clades, even though, plastids in algae do not transit through a development process, but only duplicate already differentiated. *M. polymorpha* represents the most basal Land Plant model where more subtypes of plastids than only chloroplasts have been reported, which makes this an interesting model to study the evolution of retrograde signalling.

In vascular plants, chloroplasts develop from undifferentiated organelles called proplastids, these organelles are in the L2 layer of the SAM. Biogenic retrograde signals can be of varied nature, some deriving from metabolites, such as carotenoids, or from chlorophyll biosynthesis precursors; to some protein related. This signalling process, nevertheless, is not only critical for chloroplast development, but for the transition to the different plastid subtypes.

In order to inquire on the evolution of retrograde signalling, through phylogenetic analyses, we scrutinised the emergence of 12 different proteins involved in plastid retrograde signalling, 9 of these, related to biogenic signalling, and 3 to signalling derived from already developed plastids. From these analyses, we concluded that 4 out of 9 of these biogenic signalling-related proteins (HY5, IJ1, PAPP5, RABD8) evolved already in the common ancestor of Land Plants and Green Algae (Chlorophyta), meanwhile, CIA2, GLK, GUN1 and SG1 did in the common ancestor of Streptophyte algae and Land Plants. Interestingly, PRIN2 evolved in the common ancestor of Angiosperms. With respect to proteins involved in plastid signals derived from already developed organelles, 2 out of 3 (HDS, SAL1) evolved in the common ancestor of Land Plants and Chlorophyte algae, and WHY1 did in the common ancestor of Land Plants and Streptophyte algae.

Additionally, we functionally characterised the *M. polymorpha* orthologue to GLK: MpGLK. GLK is a positive regulator of chloroplast development in vascular plants. Our analyses demonstrate that MpGLK functions as a *bona fide* GLK. The overexpression of this transcriptional factor derives in plants over-accumulating pigments, such as chlorophylls or carotenoids; and starch. Their chloroplasts exhibit a more complex endomembrane system, characterised by a denser packing of the thylakoidal membranes. Also, the overexpression causes the differentiation to chloroplasts in non-photosynthetic tissues, which suggests that, as a *bona fide* GLK, MpGLK positively regulates chloroplast development. Interestingly, MpGLK exhibits an additional protein domain to those associated with a “traditional” GLK: a response regulator domain. This suggests that this protein serves an additional function to that of a GLK.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	12
1.0. INTRODUCCIÓN	15
1.1. El Origen del cloroplasto.....	15
1.2. La biogénesis del cloroplasto en plantas vasculares	16
1.3. La señalización retrógrada	18
1.3.1. La señalización retrógrada biogénica	19
1.3.2. GUN1 coordina la expresión genética nuclear y del cloroplasto	21
1.3.3. PRIN2 participa en la regulación de la expresión génica del cloroplasto y en su biogénesis.....	21
1.3.4. Los factores de transcripción GLK regulan positivamente la expresión de los PhANGs y el desarrollo del cloroplasto	22
1.4. Evolución de la señalización retrógrada biogénica y el desarrollo del cloroplasto en las embriofitas.....	23
1.5. <i>M. polymorpha</i> como modelo para el estudio de las embriofitas ancestrales	24
2.0. Antecedentes.....	26
3.0. JUSTIFICACIÓN.....	28
4.0. HIPÓTESIS.....	28
5.0. OBJETIVOS.....	28
6.0. METODOLOGÍA	29
6.1. Corroboración de los homólogos de elementos que participan en la señalización retrógrada de Angiospermas en <i>M. polymorpha</i>	29
6.2. Análisis filogenético de elementos involucrados en la señalización retrógrada	29
6.3. Crecimiento in vitro de <i>M. polymorpha</i>	30
6.4. Conservación del <i>stock</i> de gemas de <i>M. polymorpha</i>	31
6.5. Transformación por electroporación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	31
6.6. Extracción de DNA de <i>M. polymorpha</i>	31
6.7. Corroboración de la calidad del DNA obtenido	31
6.8. Purificación de DNA a partir de banda de gel de agarosa por kit ZymoClean (ZymoResearch, Irvine, CA., USA).	32
6.9. Generación de construcciones por medio de la tecnología Gateway (Invitrogen).....	32
6.10. Amplificación de <i>pMpGLK::MpGLK</i>	33

6.10. Amplificación de <i>pMpGLK</i>	34
6.11. Generación de construcciones para determinar el patrón de expresión de <i>MpGLK</i>	34
6.12. Diseño y construcción de los RNAs guía para mutagénesis sitio dirigida de <i>MpGLK</i> mediante CRISPR/Cas9.....	35
6.12.1. Alineamiento de los gRNA (<i>sense</i> y <i>antisense</i>).....	36
6.13. Generación de los vectores para la mutagénesis por CRISPR/Cas9 en <i>M. polymorpha</i> ..	36
6.13.1. Digestión del vector <i>pMpGE_En03</i>	36
6.13.2 Purificación del vector <i>pMpGE_En03</i> digerido.....	37
6.13.3. Reacción de ligación para clonación de los sgRNA en el vector <i>pMpGE_En03</i>	37
6.13.4. Reacción LR para clonación de <i>MpGLK sgRNA2</i> en <i>pMpGE011</i>	38
6.14. Generación de construcción para sobreexpresión de <i>MpGLK</i>	38
6.15. Transformación de esporas de <i>M. polymorpha</i>	40
6.16. Extracción y cuantificación de proteínas.....	41
6.17. Ensayos de western blot.....	41
6.18. Extracción y cuantificación de pigmentos.....	41
6.19. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	42
6.20. Histología de talos de <i>M. polymorpha</i>	42
6.21. Tinción de almidón con lugol.....	42
6.22. Protocolo de digestión por T7 endonucleasa (NEB).....	42
6.23. Sexado de plantas transformantes de <i>M. polymorpha</i>	43
7.0. RESULTADOS.....	44
7.1. <i>M. polymorpha</i> posee homólogos para múltiples elementos que participan en la señalización retrógrada (tanto biogénica como operacional).....	44
7.1.1. El homólogo putativo para PRIN2 en <i>M. polymorpha</i> probablemente no corresponde a una PRIN2 bona fide.....	48
7.1.2. <i>MpGUN1</i> agrupa en el mismo clado que las <i>GUN1</i> de Bryophyta (s.s) y está conservada desde el ancestro en común de Streptophyta.....	49
7.1.3. <i>PAPP5</i> está conservada desde el ancestro en común de las algas verdes y las Streptophyta.....	50
7.1.4. <i>SG1</i> emergió en el ancestro en común de las Streptophyta.....	51
7.1.5. <i>CIA2</i> existía ya en el ancestro común de Streptophyta.....	52
7.1.6. <i>IJ1</i> está conservado a lo largo de la evolución de las plantas desde el ancestro en común de éstas con las algas verdes.....	53
7.1.7. <i>HY5</i> existe desde el ancestro en común de Chlorophyta y Streptophyta.....	54
7.1.8. <i>RABD8</i> está presente desde el ancestro en común de Streptophyta y Chlorophyta ...	55

7.1.9. <i>WHY1</i> emergió en el ancestro en común de las <i>Streptophyta</i>	56
7.1.10. <i>SAL1</i> emergió en el ancestro en común de <i>Viridiplantae</i>	57
7.1.11. <i>HDS</i> está conservado a lo largo de la filogenia de las plantas terrestres desde <i>Viridiplantae</i>	58
7.1.12. <i>MpGLK</i> pertenece a un clado que contiene a <i>GLKs</i> algales (<i>KnitGLK</i>), de <i>Bryophyta</i> (s.s.) (<i>SphaGLK 1, 2</i> ; <i>PpatGLK 1 y 2</i>) y de <i>Lycophyta</i> (<i>SmoeGLK</i>) y que es un grupo hermano de las <i>GLKs</i> de <i>Spermatophyta</i> y de las <i>APRR</i>	59
7.2. Numerosos elementos que participan dentro de la señalización retrógrada emergieron en los ancestros de las <i>Streptophyta</i>	60
7.3. La sobreexpresión de <i>MpGLK</i> deriva en un fenotipo <i>GLK bona fide</i>	62
7.4. Mutagénesis de <i>MpGLK</i> por medio de <i>CRISPR/Cas9</i>	75
7.5. El transcrito de <i>MpGLK</i> se expresa mayormente durante el enverdecimiento de la espora y en el talo	83
7.5.1. <i>MpGLK</i> se expresa en talos de 4 días en las zonas circundantes de los meristemos apicales.	83
8.0. DISCUSIÓN	85
8.1. <i>MpGLK</i> es un ortólogo funcional de <i>GLK</i> en <i>M. polymorpha</i>	85
8.2. <i>MpGLK</i> puede tener una función adicional a aquella de una <i>GLK</i>	85
8.3. La sobreexpresión de <i>MpGLK</i> induce defectos en la morfología del talo	86
8.4. La sobreexpresión de <i>MpGLK</i> deriva en un desbalance metabólico que induce la acumulación ectópica de almidón a lo largo del desarrollo de <i>M. polymorpha</i>	87
8.5. La conservación de algunos elementos relacionados con la señalización retrógrada biogénica en <i>M. polymorpha</i> sugiere que algunas vías de señalización retrógrada existían ya en el ancestro en común de las plantas terrestres	87
9.0. CONCLUSIONES	89
10.0. PERSPECTIVAS	90
11.0. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Origen del cloroplasto en el clado Archaeplastida.....	15
Fig. 2. Existe diversidad de plástidos en las embriofitas.....	16
Fig. 3. Las transiciones entre un tipo de plástido y otro están relacionadas con el balance de la transcripción por NEP y PEP y el estado de desarrollo de la planta.....	17
Fig. 4. La señalización retrógrada es un proceso complejo y se compone de numerosas vías de señalización.	19
Fig. 5. GUN1 es un regulador de la expresión de los PhANGs.	21
Fig. 6. La mutante PRIN2 tiene un fenotipo verde pálido y desregulación de la expresión de genes asociados a la fotosíntesis.	22
Fig. 7. Las GLKs regulan la expresión de los PhANGs y el desarrollo del cloroplasto.	23
Fig. 8. Evolución de los plástidos.	24
Fig. 9. Clonación a través del método Gateway.	32
Fig. 10. Vector pDONR Zeo.	33
Fig. 11. Digestión del vector pMpGE_En03 por BsaI.	36
Fig. 12. Dominios de las proteínas MpGLK, AtGLK1 y AtGLK2.	47
Fig. 13. Dominios de MpGUN1 y AtGUN1.....	48
Fig. 14. Filogenia de PRIN2.....	49
Fig. 15. Filogenia de GUN1.	50
Fig. 16. Filogenia de PAPP5..	51
Fig. 17. Filogenia de SG1.....	52
Fig. 18. Filogenia de los factores transcripcionales CIA2.	53
Fig. 19. Filogenia de IJ1.....	54
Fig. 20. Filogenia de HY5.	55
Fig. 21. Filogenia de RABD8.....	56
Fig. 22. Filogenia de WHY1.....	57
Fig. 23. Filogenia de SAL1.....	58
Fig. 24. Filogenia de HDS.	59
Fig. 25. Filogenia de GLK.....	60
Fig. 26. Conservación de elementos que participan en la señalización retrógrada a lo largo de la evolución de las plantas terrestres.	61
Fig. 27. Construcción para sobreexpresión de MpGLK.....	62
Fig. 28. Primera generación de sobreexpresoras putativas de MpGLK.	63
Fig. 29. Genotipificación por sexo de plantas 35S:MpGLKCDS::3XFLAG.	63
Fig. 30. Las plantas putativamente sobreexpresoras de MpGLK en <i>M. polymorpha</i> acumulan mayor cantidad de pigmentos que las plantas silvestres (Tak-1).	64
Fig. 31. La sobreexpresión de MpGLK correlaciona con el fenotipo de las plantas.	65
Fig. 32. Fases del desarrollo del talo de <i>M. polymorpha</i>	66
Fig. 33. El desarrollo en las plantas MpGLK OE está retrasado respecto al de plantas silvestres de <i>M. polymorpha</i>	68
Fig. 34. Histología de un talo de <i>M. polymorpha</i>	69
Fig. 35. La sobreexpresión de MpGLK induce la diferenciación hacia plastidos fotosintéticos en la región de almacenamiento y altera la morfología del talo.....	70

Fig. 36. Los cloroplastos de las plantas sobreexpresoras de MpGLK acumulan almidón y parecen tener un sistema de grana y tilacoides más complejo.	70
Fig. 37. La sobreexpresión de MpGLK deriva en mayor acumulación de almidón que en plantas silvestres.	72
Fig. 38. Las plantas sobreexpresoras de MpGLK continúan teniendo un fenotipo más verde que las silvestres aún en condiciones de baja luz.	73
Fig. 39. La sobreexpresión de MpGLK deriva en un fenotipo de insensibilidad a la percepción de luz baja.....	74
Fig. 40. Diagramas del gen MpGLK ilustrando las secuencias de los distintos mRNAs derivados de éste.....	75
Fig. 41. Secuencias de proteínas de la isoforma 1 y la isoforma 2 de MpGLK y de las mutantes putativas que se obtendrían con los sgRNAs MpGLK sgRNA2 y MpGLK sgRNA3..	76
Fig. 42. Vectores utilizados para la mutagénesis por medio de la tecnología CRISPR/Cas9.....	76
Fig. 43. Genotipificación por sexo de 20 líneas putativamente mutantes en MpGLK. S.....	77
Fig. 44. Secuenciación de las líneas Mpglk-9, 22, 28, 16 y 42.	78
Fig. 45. Fenotipos en plantas pMpGE011+MpGLK sgRNA3.....	79
Fig. 46. Secuenciación de las líneas pMpGE011+MpGLKsgRNA3 (Mpglk-4, 31 y 35).....	80
Fig. 47. Secuencia de los cDNA y proteínas de las mutantes putativas Mpglk-4, 31 y 35 respecto de la silvestre (Tak-1).	81
Fig. 48. Digestión por T7 endonucleasa de líneas Mpglk (pMpGE011 + MpGLK sgRNA3).	82
Fig. 49. La expresión de MpGLK se concentra en las regiones que circundan los meristemas.	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Homólogos en <i>M. polymorpha</i> de elementos de la señalización retrógrada biogénica de <i>A. thaliana</i> .	26
Tabla 2. Clados y especies utilizados para la generación de los árboles filogenéticos de GLK, GUN1 y PRIN2.	30
Tabla 3. Reacción de PCR y protocolo de ciclación utilizado para la amplificación de pMpGLK::MpGLK.	33
Tabla 4. Reacción de PCR y protocolo de ciclación para la amplificación de pMpGLK.	34
Tabla 5. Reacción BP para la clonación de pMpGLK en pDONR Zeo.	35
Tabla 6. Reacción LR para la clonación de pMpGLK en pMpGWB307.	35
Tabla 7. Secuencias de los gRNAs para realizar la mutagénesis en MpGLK.	36
Tabla 8. Protocolo de digestión de pMpGE_En03 con BsaI.	37
Tabla 9. Reacción de ligación entre pMpGE_En03 y MpGLK sgRNA.	37
Tabla 10. Reacción LR para clonación de MpGLK sgRNA2 y su scaffold RNA en pMpGE011.	38
Tabla 11. Protocolo de PCR seguido para amplificar el CDS de MpGLK.	38
Tabla 12. Reacción BP entre MpGLK CDS y pDONR Zeo.	39
Tabla 13. Reacción LR entre pDONR Zeo y MpGLK CDS.	39
Tabla 14. Buffer de extracción de proteínas.	41
Tabla 15. Reacción de hibridación para T7 endonucleasa	42
Tabla 16. Protocolo de hibridación para digestión con endonucleasa T7.	43
Tabla 17. Elementos que participan en la señalización retrógrada del plástido y sus funciones.	44
Tabla 18. Análisis de homología de secuencias por BLASTP de GLK1, GLK2, GUN1 y PRIN2 de <i>A. thaliana</i> contra el proteoma de <i>M. polymorpha</i> (MarpolBase, v3.1; Phytozome, v12.1, <i>Marchantia polymorpha</i> , v3.1).	46
Tabla 19. Análisis de homología de secuencias por HMMER de GLK1, GLK2, GUN1 y PRIN2 de <i>A. thaliana</i> contra el proteoma de <i>M. polymorpha</i> (UniProtDB).	48
Tabla 20. Mapa de calor de la expresión de MpGLK en el ciclo de vida de <i>M. polymorpha</i> .	83

ABREVIATURAS

% m/V: porcentaje masa por volumen.

% V/V: porcentaje volumen por volumen.

%: porcentaje.

°C: grados centígrados.

Aa: aminoácidos.

accD: del inglés, “*acetyl-coa carboxylase carboxyl transferase subunit B*”.

ACRE122: del inglés, “*Avr9/Cf-9 RAPIDLY ELICITED PROTEIN 132*”.

ACS1: del inglés, “*Apocarotenoid Signal 1*”.

ACS2: del inglés, “*Apocarotenoid Signal 2*”.

APRR: del inglés, “*ARABIDOPSIS PSEUDORESPONSE REGULATOR*”.

ARR-B: del inglés, “*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR B*”.

Cas9: del inglés, “*CRISPR-associated nuclease 9*”.

CCDs: del inglés, “*CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASES*”.

cDNA: del inglés, “*complementary DNA*”.

CDS: del inglés, “*Coding Sequence*”.

ChIP seq: secuenciación de la precipitación de la cromatina.

CHLH: del inglés, “*Mg-CHELATASE SUBUNIT H*”.

CIA2: del inglés, “*CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS 2*”.

cla1: *cloroplastos alterados 1*.

clb: del inglés, “*chloroplast biogenesis*”.

CRISPR: del inglés, “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”.

DMAPP: dimetilalil pirofosfato.

DNA: del inglés, “*Desoxiribonucleic Acid*”.

DPS: Días Post-Siembra.

DXS: del inglés, “*1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE SYNTHASE*”.

Et-OH: etanol.

FAE: formaldehído, ácido acético, etanol.

fmol: femtomoles.

FW: del inglés, “*forward*”.

g: gramo.

GARP: del inglés, “*GOLDEN2-like, ARR-B and Psr1*”.

GBF: del inglés, “*G-BOX BINDING FACTOR*”.

GCT-box: del inglés, “*GOLDEN2-LIKE C-TERMINAL box*”.

GLK: del inglés, “*GOLDEN2-like*”.

gRNA: del inglés, “*guide RNA*”.

gun: del inglés, *genomes uncoupled*.

GUS: β-glucoronidasa.

h: horas.

HDS: del inglés, “*4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE*”.

HSP90: del inglés, “*HEATSHOCK PROTEIN 90*”.

HY5: del inglés, “*HYPOCOTYL ELONGATED 5*”.

IJ1: del inglés, “*IOJAP stripping 1*”.

IPP: isopentenil pirofosfato.

Kb: kilobases.

LHCB: del inglés, “*LIGHT HARVESTING COMPLEX BINDING PROTEIN*”.

M: molar.

MEcPP: 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato.

MES: del inglés, "2-morpholinoethanesulfonic acid".

mg: miligramo.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

min: minutos.

mL: mililitro.

mM: milimolar.

mRNA: del inglés, "messenger RNA".

mRNA: del inglés, messenger RNA.

NaOH: hidróxido de sodio.

NCED: del inglés, "NINE-CIS-EPOXY-CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE".

NEP: del inglés, "Nuclear-Encoded Polymerase".

ng: nanogramos.

OE: del inglés, "overexpressor".

ORE1: ORESARA1.

PAM: del inglés, "Protospacer Adjacent Motif".

PAP: del inglés, "3'-phosphoadenosine 5'-phosphate".

PAPP5: del inglés, "PHYTOCHROME-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE 5".

pb: pares de bases.

PBS: del inglés, "Phosphate Buffered Saline".

PDS: del inglés, "PHYTOENE DESATURASE".

PEP: del inglés, "Plastid-Encoded Polymerase".

pH: potencial de hidrógeno.

PhANGs: del inglés, "Photosynthesis Associated Nuclear Genes".

PPR: del inglés, "PENTATRICOPEPTIDE REPEAT".

PRANGs: del inglés, "Plastid-Redox Associated Nuclear Genes".

PRIN2: del inglés, "PLASTID REDOX INSENSITIVE 2".

PRSP1: del inglés, "PLASTID RIBOSOMAL PROTEIN S1".

PSY: del inglés, "PHYTOENE SYNTHASE".

pTAC: del inglés, "Plastid Transcriptionally Activated Chromosome".

PVP: polivinilpirrolidona.

RABD8: del inglés, "RAB GTPASE HOMOLOG E1B".

RAM: del inglés, "Root Apical Meristem".

RBCS: del inglés, "RIBULOSE BISPHTOPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1a".

RNA seq: secuenciación del RNA.

RNA: del inglés, "Ribonucleic Acid".

rpoB: del inglés, "RNA polymerase subunit β".

rpoC: del inglés, "RNA polymerase beta' subunit-1".

rRNA: del inglés, "Ribosomal RNA".

RV: del inglés, "reverse".

s: segundos.

Sac: sacarosa.

SAL1: del inglés, "SAL1 PHOSPHATASE-LIKE PROTEIN".

SAM: del inglés, "Shoot Apical Meristem".

SG1: del inglés, "SLOW GREENING 1".

sgRNA: del inglés, “single guide RNA”.

SMR: del inglés, “Small MutS-related domain”.

SORGs: del inglés, “Singlet Oxygen Responsive Genes”.

ssDNA: del inglés, “single strand DNA”.

T1: primera generación de transformantes.

TAE: Tris, acetato, EDTA.

Tak-1: Takaragaike.

TEM: del inglés, “Transmission Electron Microscopy”

TIC: del inglés, “Translocon on the Inner Chloroplast membrane”.

TPR: del inglés, “TETRATRICOPEPTIDE REPEAT”.

TRX Z: del inglés, “THIOREDOXIN Z”.

V: volumen.

WHY1: del inglés, “WHIRLY 1”.

WRKY22: del inglés, “WRKY TRANSCRIPTION FACTOR 22”.

x g: del inglés, “for times gravity”.

µg: microgramos.

µL: microlitro.

µM: micromolar.

µmol/m²s: micromol por metro cuadrado sobre segundo.

σ: Factor Sigma.

1.0. INTRODUCCIÓN

1.1. El Origen del cloroplasto

El cloroplasto es un organelo propio de los organismos fotosintéticos cuya entrada en el linaje eucariota se originó a través de un evento de endosimbiosis, en el cual, una cianobacteria fue retenida por una célula eucariota ancestral a todo el clado Archaeplastida (Fig. 1). Como evidencia, el cloroplasto exhibe un comportamiento semiautónomo caracterizado por la presencia de un genoma propio reducido (el plastoma; codificante para ~120 genes en *Arabidopsis thaliana*) que se transcribe y traduce a partir de una maquinaria de expresión propio (Börner et al., 2015; Jarvis & López-Juez, 2013; Reyes-Prieto et al., 2007). Durante este proceso la mayoría de los genes necesarios para el funcionamiento de este organelo fueron transferidos al genoma nuclear y necesitan ser importados post-traduccionalmente. El establecimiento exitoso de la relación endosimbiótica entre la cianobacteria retenida y el ancestro de Archaeplastida, asume la emergencia de un mecanismo eficiente para el intercambio de metabolitos, así como para la coordinación de la expresión génica entre el hospedero y el simbiote. Estos mecanismos emergieron potencialmente a consecuencia de la cooptación de los sistemas de importe/exporte del simbiote, así como, de eventos de transferencia horizontal de genes desde el plástido ancestral hacia el núcleo; lo cual derivó finalmente en la reducción del plastoma (Keeling, 2013; Moustafa et al., 2008; Reyes-Prieto et al., 2007).

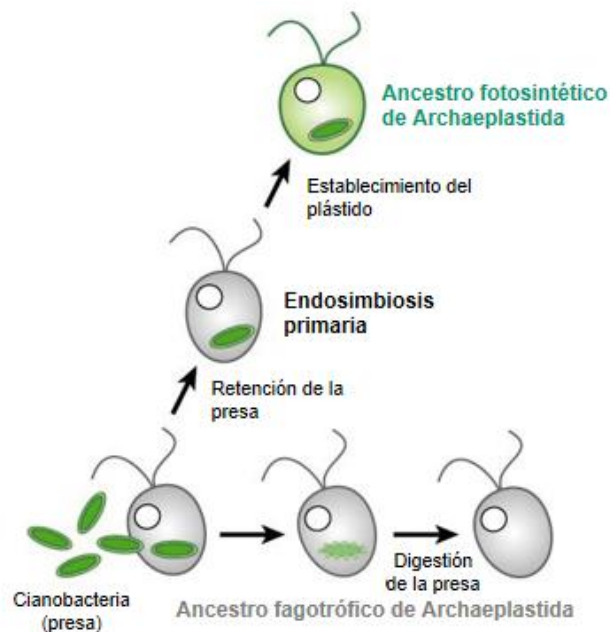


Fig. 1. Origen del cloroplasto en el clado Archaeplastida. El cloroplasto se originó con la retención de una cianobacteria por parte de una célula eucariota fagotrófica. La no digestión de la presa sentó el establecimiento del metabolismo fotosintético en el clado Archaeplastida. Modificado de Reyes-Prieto et al., 2007.

El cloroplasto cumple numerosas funciones dentro de las células vegetales, aunadas a su participación en la síntesis de carbohidratos. Este organelo funge como un nodo metabólico muy importante para la síntesis de compuestos diversos, entre los que pueden citarse a los aminoácidos, metabolitos secundarios como los terpenoides, pigmentos, ácidos grasos y hormonas vegetales, las

cuales actúan en procesos tan variados como la respuesta a estrés o dirigiendo el desarrollo (Jarvis & López-Juez, 2013; Vranová *et al.*, 2013).

1.2. La biogénesis del cloroplasto en plantas vasculares

El cloroplasto puede considerarse como el miembro más basal de los plástidos; pues en las algas, que son el grupo del que derivan las embriofitas, es el único tipo de plástido que existe, y éste no sufre un proceso de biogénesis, como ocurre en las embriofitas, sino que se multiplica por división. La familia de los plástidos está compuesta por plástidos especializados con distintas funciones; además de los cloroplastos, están los proteinoplastos, que se encargan de almacenar proteínas; los cromoplastos, que almacenan pigmentos; los amiloplastos, que almacenan almidón, los elaioplastos, que almacenan lípidos, entre otros (Fig. 2). La transición entre estos distintos tipos de plástidos se ha asociado a la coordinación de la expresión entre el núcleo y los plástidos, cuyos desencadenantes son señales que viajan desde el núcleo hacia el plástido (señales anterógradas), así como señales que parten en sentido inverso (señales retrógradas) (Chan *et al.*, 2016; de Vries *et al.*, 2016; Liebers *et al.*, 2017; Pogson *et al.*, 2015).

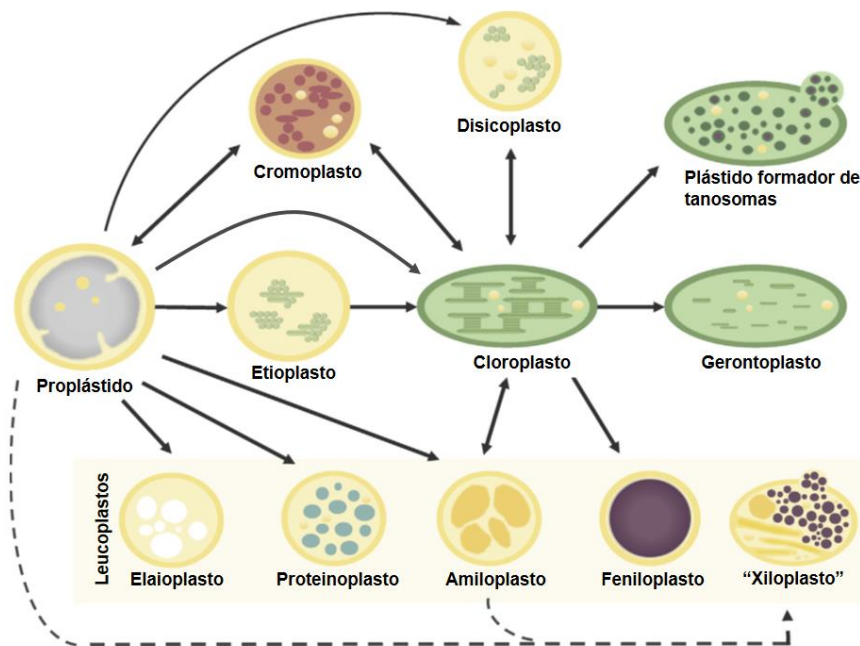


Fig. 2. Existe diversidad de plástidos en las embriofitas. En las embriofitas se ha documentado la presencia de otros tipos de plástidos (además del cloroplasto) asociados a distintos procesos. Entre estos puede mencionarse a los elaioplastos, que almacenan lípidos, los amiloplastos, que acumulan almidón; los cromoplastos, que funcionan como almacén de pigmentos, particularmente de carotenoides, los proteinoplastos, que acumulan proteínas, o los etioplastos, que son plástidos que se desarrollan en condiciones de oscuridad. Modificado de Pinard & Mizrahi, 2018.

El desarrollo del cloroplasto sólo se ha caracterizado para plantas vasculares y, en éstas; su diferenciación parte de un proplástido, que es un plástido indiferenciado que presenta vesículas y un sistema de doble membrana (envoltura del plástido), pero que carece de estructuras tales como grana y tilacoides (Fig. 2). Como previamente se mencionó, la transición de un tipo de plástido a otro requiere de la coordinación de la expresión génica entre el organelo y el núcleo celular a través de señales anterógradas y retrógradas. En *A. thaliana*, que es la planta en la que se ha estudiado más este proceso (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Börner *et al.*, 2015; Courtois *et al.*, 2007; Gutiérrez-

Nava *et al.*, 2004; Hricová *et al.*, 2006; Larkin, 2014; Liebers *et al.*, 2017; Pfanschmidt *et al.*, 2015; Pogson *et al.*, 2015), el desarrollo del cloroplasto y el desarrollo de la propia planta están ligados. Durante la embriogénesis, los proplástidos se diferencian en cloroplastos a partir del estadio globular, posteriormente, durante la desecación de la semilla, se desdiferencian nuevamente, dando origen a los eoplastos. Prosiguiendo en la germinación y bajo condiciones de oscuridad, la planta sigue un programa de desarrollo escotomorfogénico (en oscuridad), en el cual, el plástido transita hacia un estadio intermedio en que se forma un etioplasto, que se define a partir de la presencia de cuerpos prolamelares (que darán origen a los tilacoides) y que, al iluminarse, y acoplado al programa de desarrollo en luz (fotomorfogénesis); procede a diferenciarse en un cloroplasto maduro. Durante el desarrollo de la hoja, los cloroplastos parten de proplástidos que se localizan en el meristemo apical de brote (o SAM; del inglés *Shoot Apical Meristem*); posteriormente, estos cloroplastos ya diferenciados, se replican a través de división (Liebers *et al.*, 2017; Pogson *et al.*, 2015); como lo que ocurre en algas verdes (Fig. 3). La biogénesis del cloroplasto se articula a partir de tres procesos generales: la coordinación de la expresión nuclear y del plástido a nivel transcripcional como traduccional; el importe de proteínas de localización cloroplástica desde el citosol hacia el organelo y su ensamblaje; y la síntesis o importe de numerosos metabolitos como las clorofilas, los carotenos u otros lípidos; algunos de los cuales son necesarios para la formación de los tilacoides (Pogson *et al.*, 2015).

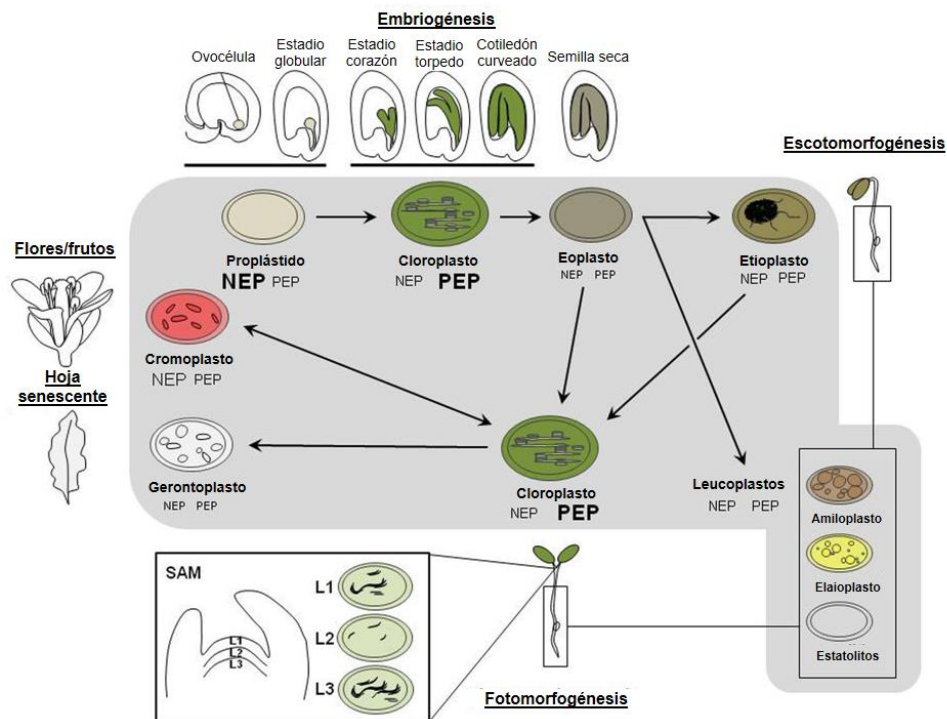


Fig. 3. Las transiciones entre un tipo de plástido y otro están relacionadas con el balance de la transcripción por NEP y PEP y el estado de desarrollo de la planta. Los cloroplastos se desarrollan a partir de organelos indiferenciados llamados proplástidos, en los cuales predomina la actividad transcripcional de la NEP sobre la de PEP. Los proplástidos se localizan en tejidos meristemáticos (como el SAM) y, durante la embriogénesis, desde la ovocélula hasta el estadio globular. En los cloroplastos predomina la actividad transcripcional de PEP; estos organelos comienzan a diferenciarse a partir del estadio globular y, posteriormente, durante la desecación, se desdiferencian y dan lugar a eoplastos. Durante la germinación, se sigue un programa de desarrollo en escotomorfogénesis, el cual coincide con la formación del etioplasto, que es un intermediario de la transición de proplástido a cloroplasto; (en el cual, PEP está inactiva), que presenta cuerpos

prolamelares que darán origen a los tilacoides del cloroplasto. En hojas verdaderas, durante la fotomorfogénesis, los proplástidos de la capa 2 del SAM se diferencian hacia cloroplastos. La capa 2 da origen al mesófilo de la hoja, que es el tejido fotosintéticamente activo de ésta. Modificado de Liebers *et al.*, 2017.

La señalización anterógrada y retrógrada son críticas para la coordinación de la expresión de los genomas del organelo y el núcleo. Dentro del plástido, la transcripción de genes requiere de dos RNA polimerasas, una codificada por el genoma nuclear y otra por el plastoma: la NEP (del inglés, *Nuclear-Encoded Polymerase*) y la PEP (del inglés, *Plastid-Encoded Polymerase*), respectivamente. La NEP se transloca del citosol hacia el plastido y permite la transcripción de la PEP y otros genes de expresión temprana del plástido codificados en el plastoma, como los rRNAs y algunas proteínas ribosomales del aparato traduccional plástidico (Börner *et al.*, 2015; Courtois *et al.*, 2007; Hricová *et al.*, 2006; Liebers *et al.*, 2017; Yagi & Shiina, 2014). Además de la NEP, otras proteínas nucleares se requieren para la expresión de genes en el plástido, como los factores sigma (σ ; mismos que permiten el reconocimiento de los promotores del plástido por la PEP), o las proteínas que conforman, junto con la PEP y σ , el pTAC (del inglés, *Plastid Transcriptionally Activated Chromosome*); que es la forma transcripcionalmente activa de la PEP; así como algunas proteínas que conforman el ribosoma plástidico (o clororribosoma) (Börner *et al.*, 2015; Pfannschmidt *et al.*, 2015; Tiller & Bock, 2014; Yagi & Shiina, 2014). La translocación de estas proteínas funge como señal anterógrada, y favorece la transición hacia cloroplasto. Durante el desarrollo del cloroplasto, la PEP transita de un estadio inactivo en los etioplastos (sRNAP; del inglés *Soluble RNA Polymerase*) a uno activo en los plástidos en maduración. El balance en la actividad de ambas polimerasas es un indicador del estadio de desarrollo del cloroplasto (Fig. 3), pues en plástidos indiferenciados, la actividad predominante es la de la NEP sobre la PEP, mientras que en cloroplastos maduros, predomina PEP sobre NEP (Liebers *et al.*, 2017; Yagi & Shiina, 2014).

1.3. La señalización retrógrada

Por señalización retrógrada se entiende aquél proceso que deriva de la percepción de un estímulo (ambiental, bioquímico o de desarrollo) por el plástido y que da origen a una o más señales que inciden en la expresión génica nuclear (Chan *et al.*, 2016). Tradicionalmente, se ha dividido a la señalización retrógrada en señalización biogénica, cuando corresponde a aquellas señales que son producidas en el plástido durante la transición de proplástido a cloroplasto maduro; y señalización operacional, cuando estas señales parten de cloroplastos funcionales (Chan *et al.*, 2016; Jarvis & López-Juez, 2013).

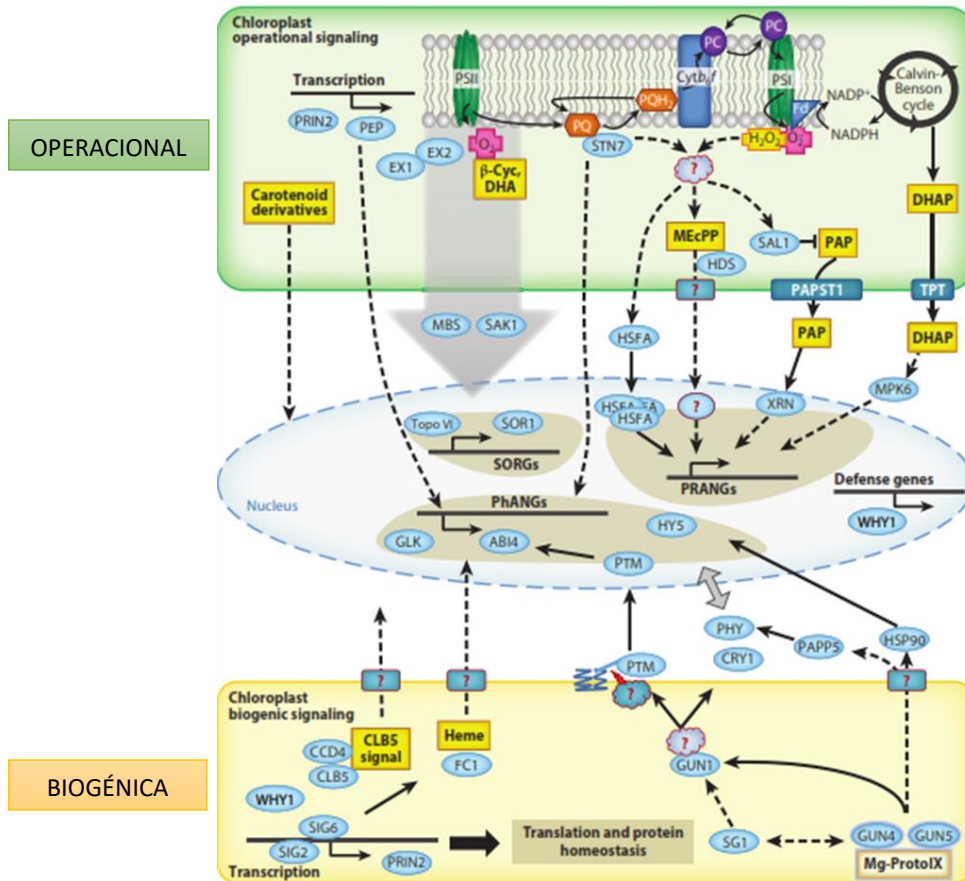


Fig. 4. La señalización retrógrada es un proceso complejo y se compone de numerosas vías de señalización. La señalización retrógrada se suele subdividir para su estudio en señalización retrógrada biogénica y señalización retrógrada operacional. La señalización retrógrada biogénica refiere a aquellas señales que se ha identificado que provienen de plástidos en formación o arrestados en su desarrollo. La señalización retrógrada operacional hace referencia a las señales que se han descrito como provenientes de cloroplastos maduros. Los cuadros amarillos corresponden a señales propuestas. PhANGs (genes nucleares asociados a la fotosíntesis), SORGs (genes de respuesta a singletes de oxígeno) y PRANGs (genes nucleares asociados al estado redox del plástido) son conjuntos de genes cuya expresión es regulada a través de señales retrógradas. Recuperado de Chan et al., 2016.

La señalización retrógrada es un proceso esencial para el desarrollo de la planta desde etapas tempranas hasta tardías, y, comprende una red compleja, donde la mayoría de sus componentes aún son desconocidos (Chan *et al.*, 2016).

1.3.1. La señalización retrógrada biogénica

El estudio de la modulación de la expresión nuclear por la señalización retrógrada biogénica se ha valido de la inhibición de procesos que se desarrollan en el cloroplasto y cuya disrupción genera el arresto en el desarrollo del cloroplasto: la síntesis de carotenoides y la actividad de la maquinaria de expresión del plástido (Chan *et al.*, 2016). Numerosos estudios han demostrado que la presencia de cloroplastos disfuncionales afectados en estadios tempranos de su desarrollo tiene efectos en la expresión de diversos genes nucleares; muchos de los cuales están relacionados con la funcionalidad del plástido y el desarrollo normal de la planta. Esto ha permitido caracterizar algunas vías de señalización retrógrada y sus genes blanco. En la mayoría de los casos, mutantes con defectos en el desarrollo del plástido presentan defectos en la expresión de genes nucleares con función en el

cloroplasto tales como los genes asociados a la fotosíntesis (o PhANGs; del inglés, *Photosynthesis-Associated Nuclear Genes*). Adicionalmente a los defectos en la expresión de los PhANGs, muchas de estas mutantes también presentan diversos defectos en su desarrollo, incluyendo la reducción de la dominancia apical, afectación en la formación de los órganos aéreos, defectos en la pigmentación, cambios en la expresión de genes ligados a la polaridad de la hoja; defectos foliares, tales como presencia de peciolos cortos y/o hojas con formas anormales (redondas, onduladas, con defectos en la vasculatura y en el mesófilo) (Avenidaño-Vazquez *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2007; Larkin *et al.*, 2014; Lundquist *et al.*, 2014).

Dentro de los procesos que afectan el desarrollo del cloroplasto y, en consecuencia, alteran la expresión de genes nucleares identificados por estas mutantes, se encuentran la transcripción y la traducción en el plástido (NEP, PEP, σ , proteínas ribosomales del plástido); la síntesis de isoprenoides y sus derivados, o el transporte de proteínas hacia el cloroplasto (Barajas-López *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2016; Díaz *et al.*, 2018; Jarvis & López-Juez, 2013; Larkin, 2016; Pogson *et al.*, 2015). Para el primer caso, en *A. thaliana*, las mutantes en *RpoTp* y *RpoTmp* (codificantes para la NEP), registran defectos en la transcripción de los PhANGs, presentan defectos en la pigmentación, así como en la expresión de genes de desarrollo temprano del plástido. De igual forma plantas mutantes para genes codificantes para PEP, como *rpoB* y *rpoC*; *accD*, o para enzimas de la síntesis de isoprenoides, como *DXS* presentan defectos morfológicos (hojas aserradas y con poco mesófilo) y, las dobles mutantes para *RpoTp* y *RpoTmp*, arrestan su desarrollo en el estadio de plántula (Courtois *et al.*, 2007; Hricová *et al.*, 2006). Mutantes para PEP igualmente tienen defectos en la pigmentación (son albinas), sus plástidos están alterados en el desarrollo y no inducen la expresión de genes asociados a la fotosíntesis (como *LHCB*); ya que la transcripción por PEP genera una señal retrógrada que regula positivamente la expresión de dichos genes (Allison *et al.*, 1996; Börner *et al.*, 2015).

Los isoprenoides sintetizados en los plastidos son una fuente importante de señales retrógradas. Estos compuestos cumplen numerosas funciones dentro de la célula vegetal, pues son componentes esenciales de membranas y precursores de pigmentos que participan en la fotosíntesis, como los tetrapirroles y los carotenoides, así como de hormonas y otras moléculas señalizadoras (Llorente *et al.*, 2017; Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012; Vranová *et al.*, 2013). En el cloroplasto, los isoprenoides se sintetizan a través de la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato, o vía MEP, a partir de la condensación de dos bloques estructurales de IPP (Isopentenil pirofosfato) / DMAPP (dimetilalil pirofosfato) (Stange, 2016). Mutantes albinas de genes de la vía MEP (v.g. *cla1*, *clb4* y *clb6*), comparten defectos en la expresión de los PhANGs, así como en la expresión de los demás genes de la vía MEP; y sus plástidos están arrestados en estadios tempranos careciendo de granas y tilacoides.

Los tetrapirroles, compuestos sintetizados también dentro de los plastidos y precursores de la de clorofila y hemo, también participan en la regulación de la expresión nuclear. Mutantes en los genes que codifican para enzimas de su biosíntesis, como CHLH (GUN5) o GUN4 expresan a los PhANGs en niveles mayores en condiciones en que en plantas silvestres éstos están reprimidos, como al aplicar herbicidas que afectan la síntesis de carotenoides, al inhibir la traducción plastídica o al crecer en medio con glucosa a las plantas. De este hecho deriva que a éstas mutantes se les haya denominado mutantes *gun* (del inglés, *GENOMES UNCOUPLED*) (Chan *et al.*, 2016; Larkin, 2014). No obstante, existe otra mutante *gun*, el gen *GUN1*, que no está directamente relacionada con la síntesis de

tetrapirroles, sino que, al parecer es una integradora de diversas señales retrógradas provenientes del plástido y en su ausencia, dichas señales no se transducen, afectando la expresión nuclear.

1.3.2. GUN1 coordina la expresión genética nuclear y del cloroplasto

GUN1 es una proteína tipo PPR (del inglés PENTATRICOPEPTIDE REPEAT). Las PPR son proteínas de repetición de motivos de pentatricopéptidos, capaces de unirse a RNA y que pueden incidir en el procesamiento de los transcritos, su estabilización, traducción, así como en la edición de los mismos (cambio de algunos de sus nucleótidos), en su mayoría estas proteínas tienen una función en los organelos (pueden tener localización tanto cloroplástica como mitocondrial). La proteína GUN1 presenta en su C-terminal un dominio pequeño relacionado con MutS (SMR, del inglés *Small MutS related domain*) y un péptido señal de localización plástidica en su N-terminal. El dominio SMR se encuentra en proteínas que median procesos de reparación y recombinación de DNA (Colombo *et al.*, 2016; Tadini *et al.*, 2016). De manera interesante, análisis hechos *in vitro* revelan que GUN1 no se une a ácidos nucleicos, sino que, por el contrario, interactúa con proteínas, entre las cuales se encuentran algunas proteínas del ribosoma plástidico, como PRPS1 (PLASTID RIBOSOMAL PROTEIN S1) (Tadini *et al.*, 2016), del translocon TIC, y HSP90. Consecuentemente, se ha propuesto que GUN1 participa en la integración de señales retrógradas derivadas de la transcripción/traducción del plástido o en el importe de proteínas al cloroplasto. Asimismo, también se ha reportado que GUN1 participa en la transducción de señales derivadas de la acumulación de metabolitos provenientes de la biosíntesis de tetrapirroles, (Chan *et al.*, 2016; Larkin, 2016; Larkin, 2014). Sin embargo, su función real es aún no totalmente clara.

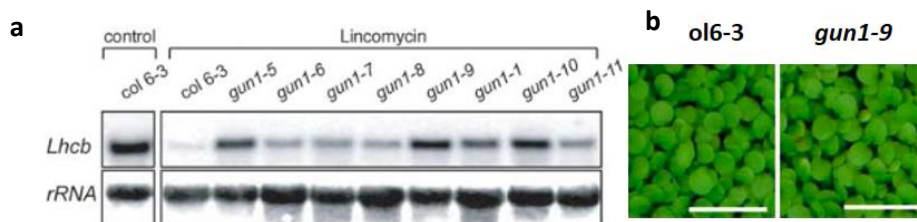


Fig. 5. GUN1 es un regulador de la expresión de los PhANGs. Mutantes portadoras de diversos alelos de la mutante *gun1* expresan *Lhcb* en presencia de lincomicina, un inhibidor de la traducción plástidica, mientras que en la silvestre se reprimen (a). La mutante *gun1-9* no tiene un fenotipo morfológico, a simple vista es idéntica a una silvestre (b). Koussevitzky *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2018.

La mutante *gun1*, al igual que otras mutantes *gun*, presenta desregulación de la expresión génica de los PhANGs en condiciones que en una silvestre reprime su expresión, es decir, presenta un desacoplamiento entre la expresión plástidica y la nuclear (Fig. 5). Es interesante que mutantes de este gen morfológicamente no tienen un fenotipo, salvo algunos alelos como *gun1-101*, que presenta un enverdecimiento retardado (y aun así, dicho fenotipo no es predominante en la población mutante) (Wu *et al.*, 2018).

1.3.3. PRIN2 participa en la regulación de la expresión génica del cloroplasto y en su biogénesis

Otra proteína que se ha relacionado con la vía de señalización retrógrada derivada de la expresión de genes del plástido es PRIN2 (del inglés, PLASTID REDOX INSENSITIVE 2). Esta proteína está

codificada en el núcleo y se transloca al plástido, donde oscila entre una forma monomérica o dimérica, donde la forma activa es la dimérica. La oscilación entre ambas formas es dependiente de la tiorredoxina plastídica TRX Z, que es parte integrante del pTAC. Una vez activa, PRIN2 es capaz de interactuar con el pTAC, y así activar la transcripción por PEP. La transcripción por PEP envía una señal retrógrada de naturaleza desconocida que regula positivamente la expresión de los PhANGs; de modo que se puede decir que PRIN2 es un regulador positivo de su expresión. La función de PRIN2 se induce durante la fotomorfogénesis, con lo cual se favorece la transición desde etioplasto a cloroplasto (Díaz *et al.*, 2018).

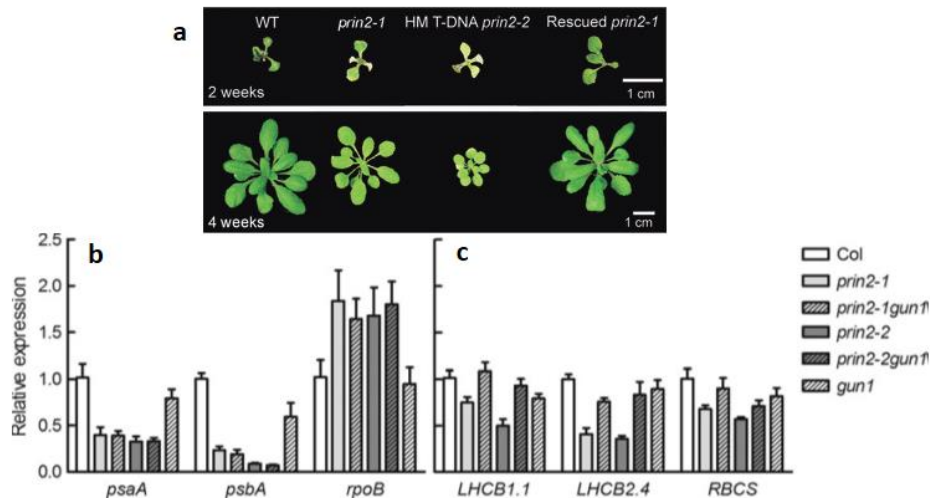


Fig. 6. La mutante PRIN2 tiene un fenotipo verde pálido y desregulación de la expresión de genes asociados a la fotosíntesis. (a) Las mutantes nulas *prin2-1* y *prin2-2* tienen un fenotipo verde pálido y presentan un crecimiento retardado. La complementación con PRIN2 rescata ambos fenotipos en las mutantes **(b)**. Las mutantes *prin2-1* y *prin2-2* tienen defectos en la expresión de los genes transcritos por PEP, como *psaA* y *psbA* e inducen mayores niveles de expresión de PEP (*rpoB*) **(c)**. La expresión de los PhANGs se regula hacia abajo en las mutantes *prin2-1* y *prin2-2*, fenotipo el cual es revertido por las dobles mutantes *prin2-1 gun1-1* y *prin2-2 gun1*. Kindgren *et al.*, 2012.

Las mutantes nulas *prin2-1* y *prin2-2* presentan un fenotipo verde pálido, con crecimiento retardado, tienen menores niveles de clorofila, están alteradas en la expresión de los genes codificados en el plástido que son transcritos por PEP; así como niveles menores de expresión de los PhANGs, como *LHCB* o *RBCS* (Fig. 6). Este último fenotipo molecular es revertido en las dobles mutantes *prin2 gun1*, vinculando así a ambos elementos en la señalización retrógrada biogénica y poniendo a GUN1 río debajo de vía de señalización que parte de la expresión de genes en el plástido. (Díaz *et al.*, 2018; Kindgren *et al.*, 2012).

1.3.4. Los factores de transcripción GLK regulan positivamente la expresión de los PhANGs y el desarrollo del cloroplasto

La modulación de la expresión nuclear por medio de la señalización retrógrada biogénica requiere de factores de transcripción, tales como los GLK (del inglés, *GOLDEN-2 LIKE*). Los GLKs son proteínas con dos dominios altamente conservados: el dominio GCT-box; y un dominio de unión a DNA. Son parte de la familia GARP y, su presencia se ha reportado desde plantas no vasculares, como *Physcomitrella patens* hasta Angiospermas, como *Oryza sativa*, *Zea mays* o *Arabidopsis thaliana*. Estas proteínas se han catalogado como activadores transcripcionales, particularmente de los genes cloroplásticos codificados en el genoma nuclear, en cuyos promotores reconocen motivos

específicos como las cajas G (GCACGTG) y el motivo GLK-T (CCAATC) (Chen *et al.*, 2016; Waters *et al.*, 2009; Yasumura *et al.*, 2005).

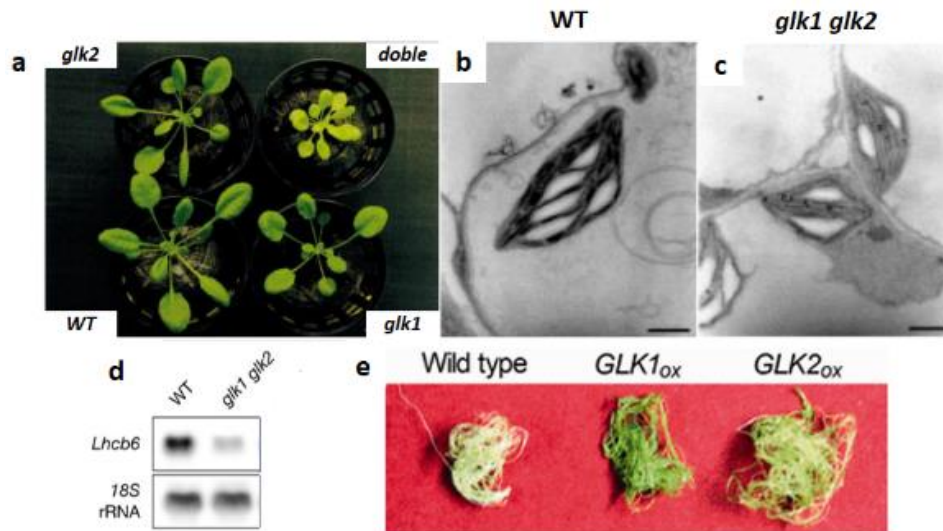


Fig. 7. Las GLKs regulan la expresión de los PhANGs y el desarrollo del cloroplasto. Las GLK1 y GLK2 tienen funciones parcialmente redundantes entre sí y mutantes sencillas para cada factor de transcripción tienen un fenotipo muy semejante al silvestre (WT); si bien, las dobles mutantes presentan un fenotipo verde pálido (*glk1 glk2*) (a). Las mutantes *glk1 glk2* tienen defectos en el desarrollo del cloroplasto, lo cual se evidencia en la carencia de grana en éstos (b y c). Las GLKs regulan positivamente la expresión de los PhANGs; en la doble mutante *glk1 glk2* esto puede observarse claramente por la no inducción de *LHCB6* (d). Las GLKs son reguladores positivos del desarrollo del cloroplasto, su sobreexpresión favorece la transición de otros tipos de plástidos hacia cloroplastos en tejidos no fotosintéticos como las raíces (e). Fitter *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2009; Yasumura *et al.*, 2005.

En la mayoría de las plantas como en *A. thaliana* se encuentran como dos parálogos (GLK1 y GLK2), y se han descrito desde una hasta cuatro GLKs por genoma. En *A. thaliana* GLK1 y GLK2 tienen funciones parcialmente redundantes, basado en el fenotipo de las mutantes sencillas *glk1* y *glk2* (Fitter *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2008). Contrariamente a lo que ocurre en las mutantes sencillas, las dobles mutantes *glk1 glk2* presentan cloroplastos defectivos que carecen de grana, tienen desregulación en la expresión de los PhANGs (como *LHCB6*), así como menor cantidad de clorofilas y un fenotipo verde pálido y son plantas con floración temprana (Fig. 7) (Waters *et al.*, 2009). No sólo las mutaciones de pérdida de función de estos factores inducen alteración en el desarrollo del plástido y de la planta, sino también su sobreexpresión. Las raíces y otros órganos no fotosintéticos no poseen cloroplastos; no obstante, de manera interesante, la alteración de la expresión de las GLKs induce la formación de cloroplastos en estos tejidos, favoreciendo la transición a cloroplasto a partir de otros tipos de plástidos (Kobayashi *et al.*, 2013). Esto posiciona a las GLKs como elementos de suma importancia para la regulación positiva del desarrollo del cloroplasto, así como en la modulación de la expresión nuclear.

1.4. Evolución de la señalización retrógrada biogénica y el desarrollo del cloroplasto en las embriofitas

Como previamente se mencionó, en los ancestros inmediatos de las plantas terrestres no existe más que un tipo de plástido: el cloroplasto; mientras que en las embriofitas se tiene diversidad de estos organelos. La transición entre los diferentes tipos de plástidos es mediada por la modulación de la

expresión nuclear (de Vries *et al.*, 2016), en la cual, la señalización retrógrada biogénica tiene un papel crítico; como puede observarse con elementos como las GLKs, que son capaces de promover la transición de otros plástidos a cloroplastos (Kobayashi *et al.*, 2013). Sin embargo, reportes recientes en algas estreptofitas mencionan la presencia de elementos que participan en la señalización retrógrada biogénica ya codificados en sus genomas (de Vries, Curtis, Gould, & Archibald, 2018; Nishiyama *et al.*, 2018), a pesar de que en estos organismos no existe un proceso de biogénesis del cloroplasto, sino que este organelo se propaga por división (y, en muchos casos, se coordina con la división celular en estos organismos) (de Vries & Gould, 2017).

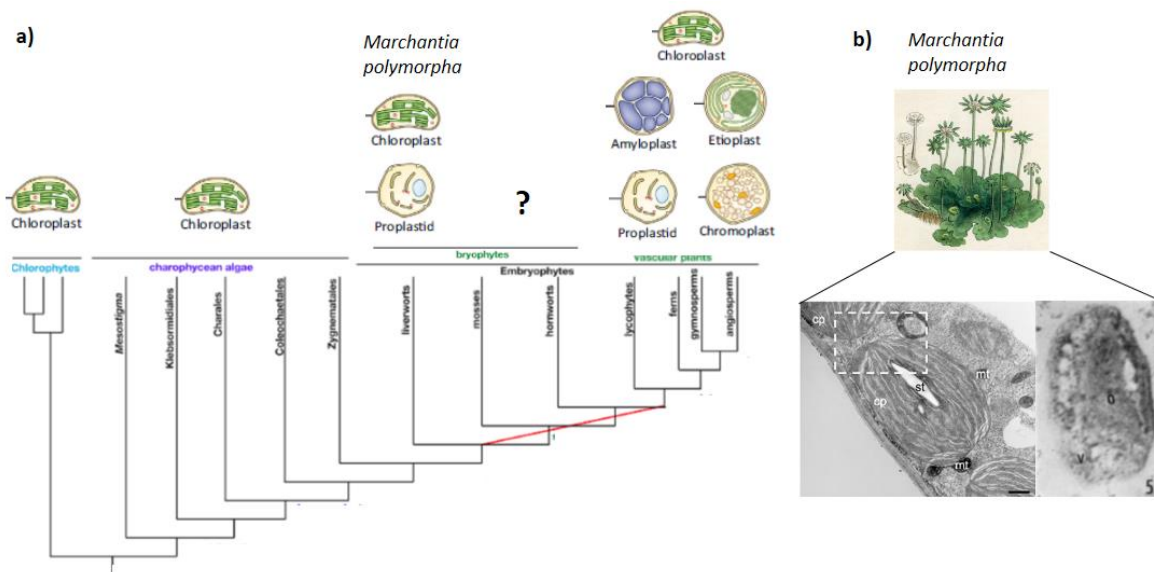


Fig. 8. Evolución de los plástidos. En los ancestros de las plantas terrestres únicamente existen cloroplastos, mientras que, al avanzar hacia las embriofitas, desde sus linajes más basales comienza a detectarse más de un tipo de plástido. La mayor diversidad de plástidos se encuentra en las plantas vasculares (a). *Marchantia polymorpha* posee al menos dos tipos de plástidos: cloroplastos y organelos indiferenciados parecidos a proplástidos (b). Bowman *et al.*, 2017; de Vries *et al.*, 2016; Sun, 1963; Tanaka *et al.*, 2017.

De manera interesante, en algunas plantas no vasculares (los miembros más basales de las embriofitas), como *Marchantia polymorpha*, se han documentado ya diferentes tipos de plástidos además de cloroplastos y, como se mencionó en párrafos anteriores, algunos elementos como las GLKs están presentes (Suire *et al.*, 2000; Sun, 1963; Yasumura *et al.*, 2005). Esto lleva a pensar que el proceso de señalización retrógrada, al menos en las plantas no vasculares, podría estar conservado y algunos de sus elementos están presentes desde clados algales.

1.5. *M. polymorpha* como modelo para el estudio de las embriofitas ancestrales

M. polymorpha es una planta no vascular perteneciente a la División Marchantiophyta que, de acuerdo con diversos estudios filogenéticos, morfológicos y fósiles, se encuentra en la rama más basal de las plantas terrestres, justo después de la transición a tierra de las embriofitas. Es una planta de hábito taloso, con un ciclo de vida corto, cuya fase predominante es la gametofítica (haploide); y que puede reproducirse de manera vegetativa a través de gemas y fragmentos del talo. Es una planta dioica y presenta ya estructuras diferenciadas, como los rizoides y los gametóforos (donde se encuentran sus órganos para reproducción sexual: los arquegonios y los anteridios) (Shimamura, 2016).

M. polymorpha ofrece numerosas ventajas, entre las cuales está que en este organismo modelo no ocurrieron eventos de duplicación exclusivos de su clado y, por el contrario, familias génicas que en angiospermas (o incluso en musgos como *P. patens*) pueden estar compuestas por muchos miembros, en *M. polymorpha* están reducidas (Bowman et al., 2017). El genoma de *Marchantia* está secuenciado, y se han estandarizado técnicas de transformación y mutagénesis previamente; lo que posibilita la realización de estudios de genética tradicional y genética reversa (Bowman et al., 2017; Ishizaki et al., 2015; Ishizaki et al., 2016; Tsuboyama & Kodama, 2015; Tsuboyama & Kodama, 2014).

2.0. Antecedentes

Previo al desarrollo de este proyecto, se realizó un análisis inicial mediante BLASTP contra el genoma de *M. polymorpha*, tomando algunos elementos que se han reportado que participan en la señalización retrógrada. En este análisis exploratorio se incluyó a las CCDs (del inglés CAROTENE CLEAVAGE DIOXYGENASES), debido a la participación de algunas de estas en la generación de señales retrógradas de tipo apocarotenoide que impactan en el desarrollo de la planta, como ACS1 (del inglés *Apocarotenoid Signal 1*) o ACS2 (Avendaño-Vazquez *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2016); a factores como SG1 (del inglés SLOW GREENING 1), una proteína de repetidos de tetratricopéptidos relacionada con el desarrollo del cloroplasto o PAPP5 (del inglés PHYTOCHROME-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE 5), las cuales participan en la vía de señalización retrógrada derivada de tetrapirroles (Barajas-López *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014); a las dos proteínas que codifican para la NEP en *A. thaliana*: RpoTp y RpoTmp (Courtois *et al.*, 2007; Hricová *et al.*, 2006). También se buscó también a GUN1, PRIN2 y los GLKs. Los resultados de esta búsqueda exploratoria se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Homólogos en *M. polymorpha* de elementos de la señalización retrógrada biogénica de *A. thaliana*. De 17 elementos analizados, se obtuvieron sólo nueve homólogos para éstos *M. polymorpha*.

	Gen en <i>A. thaliana</i>)	Homólogo en <i>Marchantia polymorpha</i>	Score	E-value	Identidad (%) Respecto de <i>A. thaliana</i>
GLKs	<i>AtGLK1</i> (AT2G20570.2)	<i>MpGLK1-like</i> (Mapoly0156s0007.1)	214.93	6.96×10^{-63}	37.05
	<i>AtGLK2</i> (AT5G44190.1)	-	-	-	-
GUN1	<i>AtGUN1</i> (AT2G31400.1)	<i>MpGUN1-like</i> (Mapoly0036s0086.1)	830.48	0	53.75
PAPP5	<i>AtPAPP5</i> (AT2G42810.2)	<i>MpPAPP5-like</i> (Mapoly0014s0155.1)	674.86	0	62.71
PRIN2	<i>AtPRIN2</i> (AT1G10522.1)	<i>MpPRIN2-like</i> (Mapoly0021s0016.1)	62	1.11×10^{-12}	33.68
NEP	<i>AtRpoTmp</i> (AT5G15700.2)	<i>MpRpoTmp-like</i> (Mapoly0007s0198.1)	1044.26	0	58.98
	<i>AtRpoTp</i> (AT2G24120.1)	-	-	-	-
SG1	<i>AtSG1</i> (AT3G18420.1)	<i>MpSG1-like</i> (Mapoly0157s0006.1)	152.53	1.01×10^{-42}	37.62
	<i>AtCCD1</i> (AT3G63520.1)	<i>MpCCD1-like</i> (Mapoly0003s0307.1)	644.81	0	58.65
CCDs	<i>AtCCD4</i> (AT4G19170.1)	-	-	-	-
	<i>AtCCD7</i> (AT2G44990.1)	<i>MpCCD7-like</i> (Mapoly0075s0089.1)	486.11	2.38×10^{-164}	44.61
	<i>AtCCD8</i> (AT4G32810.1)	-	-	-	-
	<i>AtNCED2</i> (AT4G18350.1)	-	-	-	-
	<i>AtNCED3</i> (AT3G14440.1)	<i>MpNCED-like</i> (Mapoly0015s0066.1)	657.14	0	60.3
	<i>AtNCED5</i> (AT1G30100.1)	-	-	-	-
	<i>AtNCED6</i> (AT3G24220.1)	-	-	-	-
	<i>AtNCED9</i> (AT1G78390.1)	-	-	-	-

Del total de 17 elementos que se analizaron, se encontraron nueve de ellos, incluyendo a homólogos para GUN1, PRIN2 y GLK (aunque éstas sólo se encontró solo una proteína homóloga para los dos factores de transcripción, no dos como en *A. thaliana* o *P. patens*). Debido al papel tan importante que tienen las GLKs y a que presentan un fenotipo evidente (al contrario de lo que ocurre con GUN1), así como que, por reportes no publicados del laboratorio en los que hemos encontrado que participan en dos vías de señalización que estamos estudiando; resultó de particular interés continuar la evaluación experimental de este homólogo de GLK en *M. polymorpha*; si bien, se decidió también proseguir con los análisis *in silico* de MpPRIN2 y MpGUN1.

3.0. JUSTIFICACIÓN

Dada la posición filogenética de *M. polymorpha* como planta basal en la cual ya existe diferenciación hacia otros tipos de plástidos, resulta ser un modelo interesante para caracterizar funcionalmente elementos que participan en la señalización retrógrada biogénica. En particular, el factor de transcripción GLK que juega un papel central en dicho proceso de señalización en plantas vasculares.

4.0. HIPÓTESIS

La función del factor de transcripción GLK, involucrado en la señalización retrógrada biogénica de *A. thaliana*, está conservada en *M. polymorpha*.

5.0. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar en *M. polymorpha* elementos que participan en la señalización retrógrada biogénica de *A. thaliana* y caracterizar funcionalmente uno de éstos (GLK).

Objetivos particulares

- Identificar homólogos de CIA2, GLK, GUN1, HY5, IJ1, PAPP5, PRIN2, RABD8, SG1, HDS, SAL1 y WHY1, elementos que participan en la señalización retrógrada en *M. polymorpha*.
- Realizar un análisis filogenético de los elementos previamente encontrados.
- Obtener líneas sobreexpresoras de *MpGLK* en *M. polymorpha* y caracterizar sus fenotipos.
- Obtener mutantes de *MpGLK* en *M. polymorpha* y caracterizar sus fenotipos.
- Caracterizar el patrón de expresión de *MpGLK* en plantas silvestres de *M. polymorpha*.

6.0. METODOLOGÍA

6.1. Corroboración de los homólogos de elementos que participan en la señalización retrógrada de Angiospermas en *M. polymorpha*

Usando las secuencias de aminoácidos de las proteínas CIA2, GLK, GUN1, HY5, PAPP5, PRIN2, RABD8, SG1, HDS, SAL1 y WHY1, presentes en la base de datos de TAIR (v11), e IJ1, presente en la base de datos *MaizeGDB*; se analizó el proteoma de *M. polymorpha* para corroborar la presencia de homólogos utilizando dos estrategias: usando como cebador a las secuencias aminoacídicas completas o usando sólo a los dominios distintivos de cada proteína (para cuya identificación se emplearon softwares como InterPro o Prosite). La secuencia cebadora fue usada contra el proteoma de *M. polymorpha* utilizando BLASTP (en las bases de datos de MarpolBase (v3.1), Phytozome (genoma de *M. polymorpha* v3.1)) y HMMER.

6.2. Análisis filogenético de elementos involucrados en la señalización retrógrada

Tomando como cebadores a CIA2, GLK, GUN1, HY5, PAPP5, PRIN2, RABD8, SG1, HDS, SAL1 y WHY1 de *A. thaliana*, y a IJ1 de *Z. mays* (proteína completa o usando sólo sus dominios característicos), se realizó una búsqueda mediante BLASTP de homólogos en las bases de datos de MarpolBase (v3.1), Phytozome (v12.0), TAIR (v11) FernBase, Congenie.org, Miyakogusa.jp (v3.0), Sol Genomics Network y Rosaceae.org para distintos taxa representativos de los diferentes clados que componen la filogenia de las embriofitas (plantas no vasculares: Marchantiophyta, Bryophyta; plantas vasculares: Lycophyta, Pteridophyta, Gimnospermae, Angiospermae). Aunado a esto, se realizó la búsqueda mediante HMMER en la base de datos de UniProtKB para los taxa cuyas secuencias estuviesen disponibles.

Asimismo, debido a que las plantas terrestres derivan de las algas, se decidió incorporar a tres taxa algales pertenecientes a los clados Charophyceae, Klebsormidiophyceae (algas estreptofitas, el grupo más cercano a las plantas terrestres) y Chlorophyceae. Los proteomas para dichos taxa están disponibles en las bases de datos de Phytozome (v12) (*Chlamydomonas reinhardtii*), ORCAE (*Chara braunii*) y plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp (*Klebsormidium nitens*).

La lista de taxa utilizados y la base de datos correspondiente en que se hizo la búsqueda se indican en la tabla siguiente (Tabla 2).

Tabla 2. Clados y especies utilizados para la generación de los árboles filogenéticos de GLK, GUN1 y PRIN2. Se indica la base de datos empleada para la búsqueda por BLASTP. *Algas estreptofitas, †angiospermas basales, **monocotiledóneas.

Clado	Especie	Base de datos usada
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Phytozome
Klebsormidiophyceae	<i>Klebsormidium nitens</i> *	plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp
Charophyceae	<i>Chara braunii</i> *	ORCAE
Marchantiophyta	<i>Marchantia polymorpha</i>	MarpolBase, Phytozome
Bryophyta	<i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome
	<i>Sphagnum phallax</i>	Phytozome
Lycophyta	<i>Selaginella moellendorffi</i>	Phytozome
Pteridophyta/Monilophyta	<i>Azolla filiculoides</i>	FernBase
	<i>Salvinia cucullata</i>	FernBase
Gymnospermae	<i>Pinus taeda</i>	Congenie.org
	<i>Picea abies</i>	Congenie.org
Angiospermae	<i>Amborella trichopoda</i> †	Phytozome
	<i>Brachypodium distachyon</i> **	Phytozome
	<i>Spirodela polyrhiza</i> **	Phytozome
	<i>Ananas comosus</i> **	Phytozome
	<i>Zostera marina</i> **	Phytozome
	<i>Oryza sativa</i> **	Phytozome
	<i>Vitis vinifera</i>	Phytozome
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TAIR
	<i>Brassica oleracea</i>	Phytozome
	<i>Lotus japonicus</i>	Miyakogusa.jp
	<i>Medicago truncatula</i>	Phytozome
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phytozome
	<i>Prunus pérsica</i>	Phytozome, Rosaceae.org
	<i>Fragaria vesca</i>	Phytozome, Rosaceae.org
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sol Genomics Network, Phytozome
<i>Petunia axillaris</i>	Sol Genomics Network	

6.3. Crecimiento in vitro de *M. polymorpha*

Para el crecimiento de *M. polymorpha* se sembraron gemas de Tak-1 silvestres (plantas masculinas) proporcionadas por el laboratorio del Dr. Mario Arteaga Vásquez, en medio Gamborg B5 sin vitaminas (0.5X) (PhytoTechnologies, Shawnee Mission, KS., USA) adicionado con sacarosa al 0.5% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO., USA) y agar para micropropagación al 1% (Caisson Laboratories, Smithfield, UT., USA) bajo un fotoperiodo de día largo (16:8 luz/oscuridad) en una cámara de crecimiento *in vitro* de tipo Percival (CU41L4) a 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La recolección de gemas de las plantas de *M. polymorpha* se realizó entre 20 y 30 días post-siembra (DPS).

6.4. Conservación del stock de gemas de *M. polymorpha*

Las gemas colectadas a los 20 DPS de talos maduros de *M. polymorpha* se conservaron en agua destilada estéril (para uso frecuente) o, alternativamente, en medio B5 0.5 X + 1.0% sacarosa (para conservar por periodos más largos de tiempo) en microtubos de centrifuga de 1.5 mL. En ambos casos, las gemas se mantuvieron a 4°C en oscuridad.

6.5. Transformación por electroporación de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformar las células de *E. coli* (cepas DH5 α o DB3.1 [resistente a la toxina CcdB]) se emplearon celdas para electroporación, en las cuales se colocó un paquete celular en el que previamente se adicionaron 2 μ L de plásmido purificado. Se hizo un choque eléctrico por medio de un electroporador y se resuspendieron las células en 1 mL de medio LB líquido y se incubaron por 1 h a 37°C en agitación. Posteriormente, se plaquearon en medio LB sólido adicionado con el antibiótico ante el que dota de resistencia el vector y se incubaron a 37°C en *overnight*. Para el caso de *A. tumefaciens* (cepa C58), a diferencia de lo que se hizo con *E. coli*, la incubación post-choque eléctrico se realizó por 3 h y, su crecimiento en placa, por 3 días y; adicionalmente a la resistencia del vector, la bacteria se cultiva en medio LB adicionado con 50 μ g/mL de rifampicina y 100 μ g/mL de carbenicilina.

6.6. Extracción de DNA de *M. polymorpha*

Por cada muestra, se colectaron 150 mg de tejido de *M. polymorpha* en microtubos de centrifuga de 1.5 mL, mismos que se congelaron y maceraron con nitrógeno líquido hasta que quedase un polvo fino, posteriormente, se agregaron 500 μ l de Buffer CTAB (2%) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO., USA) + PVP (1%) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO., USA) y se incubaron las muestras a 60°C por 30 min. Una vez pasado el tiempo de incubación, se dejaron las muestras a temperatura ambiente hasta que éstas se atemperasen; enseguida, se colocaron 250 μ L de cloroformo en cada una y se mezcló por vórtex. Una vez las muestras estuviesen correctamente mezcladas, se procedió a centrifugar por 5 min a 12000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4°C. Una vez terminado éste paso, se trasvasaron los sobrenadantes de las muestras a nuevos microtubos de centrifuga, a los que, posteriormente se adicionaron 50 μ L de acetato de Na 3 M (J.T. Baker, Center Valley, PA., USA), pH 5.2 y 500 μ L de etanol absoluto frío (J.T. Baker, Center Valley, PA., USA) y se mezclaron por inversión. Después, se dejaron precipitar durante 1 h a -20°C. Pasado dicho tiempo, se centrifugó por 10 min a 12000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4°C. Enseguida, se desecharon los sobrenadantes de las muestras y se hicieron dos lavados de las pastillas generadas por la centrifugación, con 500 μ L de una solución de etanol al 70% frío por 4 min a 11000 rpm a temperatura ambiente y se desecharon los sobrenadantes en cada ocasión. Las pastillas resultantes se dejaron secar a 45°C por 10 min para eliminar los remanentes de etanol. Una vez eliminado el etanol, se procedió a resuspender las muestras de DNA purificado en 30 μ L de agua ultrapura estéril.

6.7. Corroboración de la calidad del DNA obtenido

Para corroborar la calidad del DNA purificado, se realizó PCR con cebadores para amplificar actina de *M. polymorpha* (MpACT, ID: Mapoly0016s0139.1). La secuencia de los cebadores *forward* y *reverse* son los siguientes: MpACT F, 5' GCTGTGCTGTCTTTGTACGC 3'; MpACT R, 5' ACATGGTCGTTCCCTCCAGAC 3'.

6.8. Purificación de DNA a partir de banda de gel de agarosa por kit ZymoClean (ZymoResearch, Irvine, CA., USA).

Se colocó la banda escindida correspondiente al DNA de interés en un tubo de microcentrífuga de 1.5 μ L (previamente pesado) y se cuantificó su masa. Se agregaron tres volúmenes de buffer de disolución de agarosa (o ADB) por cada volumen de la muestra con agarosa (relación 3:1, respecto del peso en mg de la muestra de DNA con agarosa) y se incubó por 5 a 10 min a 55°C hasta que el gel se disolviese totalmente. Posteriormente, se transfirió la solución de agarosa disuelta a una columna con filtro dentro de un tubo de recolección y se centrifugó por 60 s a 13 000 x g; se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μ L de solución de lavado para DNA; se centrifugó por 30 s adicionales y se volvió a descartar el sobrenadante. Este paso se repitió una segunda vez y, posteriormente, se colocó la columna con filtro en un tubo para microcentrífuga estéril nuevo de 1.5 mL; se adicionaron 15 μ L de H₂O ultrapura estéril, y se centrifugó por 3 min para coleccionar el DNA.

6.9. Generación de construcciones por medio de la tecnología Gateway (Invitrogen)

Las construcciones para caracterizar el patrón de expresión de *MpGLK*, así como para la caracterización funcional de este gen, se realizaron a través del método de clonación Gateway (Fig. 9); mismo que se basa en dos reacciones de recombinación: una reacción BP entre los sitios attB y attP; y una reacción LR, entre sitios attL y attR. En la reacción BP participan un amplicón, al cual se adicionan los sitios attB1 y attB2; y un vector donador que posee sitios attP1 y attP2. En la reacción LR, participan el vector donador en el cual se ha clonado el amplicón (ahora con sitios attL1 y attL2, producidos como resultado de la recombinación homóloga entre los sitios attB y attP), y un vector destino que contiene el reportero de interés (*CITRINE*), para las construcciones para caracterizar el patrón de expresión), una etiqueta o *tag* (caso de la construcción para la sobreexpresión de *MpGLK*) o a Cas9 (construcciones para la generación de mutantes nulas para *MpGLK*); y sitios attR1 y attR2. El resultado es un vector destino que ahora contiene el amplicón, nuevamente con sitios attB (por la recombinación entre los sitios attL y attR); fusionado al reportero (reacción LR) (Invitrogen, 2012).

Recombinación BP



Recombinación LR

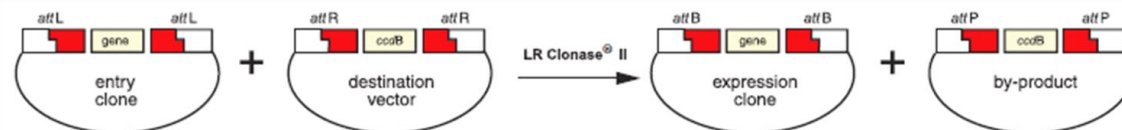


Fig. 9. Clonación a través del método Gateway. El método Gateway se basa en dos reacciones de recombinación homóloga en las cuales, la clonación depende de sitios attB (inserto o amplicón), attP (vector donador), attL (vector de entrada; es decir, vector donador + amplicón) y attR (vector destino). En la primera reacción (BP), recombinan los sitios attB y attP, lo cual produce un vector de entrada que ahora contiene el gen de interés, flanqueado por sitios attL. En la segunda reacción (LR), recombinan los sitios attL del vector de entrada con los sitios attR del vector destino, resultando en un vector de expresión que contiene el gen de interés, flanqueado por sitios attB.

pMpGLK FW 10 µM	1.50	0.3 µM	Extensión	72°C	8 min	
MpGLK RV 10 µM	1.50	0.3 µM	Extensión final	72°C	8 min	1
DMSO	1.25	5%				
DNA polimerasa KAPA HiFi HotStart	0.50	0.5 U				
DNA genómico	2.00	-				

6.10. Amplificación de *pMpGLK*

La amplificación de *pMpGLK* se realizó a través de PCR con cebadores con los sitios attB1 (cebador *forward*, pMpGLK 2 FW) y attB2 (cebador *reverse* pMpGLK 3 RV). Para la reacción de PCR, se utilizó la enzima KAPA HiFi HotStart, las condiciones para la reacción se indican en la Tabla 4. Este amplicón se clonó primero en el *pDONR Zeo* y, posteriormente, en el pMpGWB307 (vector destino), para la transformación primero en *A. tumefaciens* y, después de las esporas de planta silvestres de *M. polymorpha*.

Tabla 4. Reacción de PCR y protocolo de ciclación para la amplificación de pMpGLK. Se utilizó la enzima KAPA HiFi HotStart (KAPA Biosystems), se indican volúmenes y concentración final de los reactivos para una reacción de 50 µL y el protocolo de ciclación utilizado en la amplificación

Reacción de PCR (en 50 µL)			Protocolo de ciclación			
Reactivos	Vol. (µL)	Concentración final	Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
H ₂ O ultrapura estéril	25.50	N/A	Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Buffer KAPA HiFi 5X	10.00	1 X	Desnaturalización	98°C	20 s	
dNTPs 2.5 mM	6.00	0.3 mM	Alineamiento	65°C	15 s	35
pMpGLK FW 2 10 µM	1.50	0.3 µM	Extensión	72°C	3 min	
pMpGLK RV 3 10 µM	1.50	0.3 µM	Extensión final	72°C	3 min	1
DMSO	1.25	5%				
DNA polimerasa KAPA HiFi HotStart	0.50	0.5 U				
DNA genómico	2.00	-				

6.11. Generación de construcciones para determinar el patrón de expresión de *MpGLK*

Se generó una fusión transcripcional que contiene 3 Kb de la región intergénica junto con el 5'UTR hasta el codón de inicio de *MpGLK*, el amplicón se clonó en el vector pDONR Zeo (reacción BP, Tabla 5), mismo que se recombinó con el vector *pMpGWB307* (reacción LR, Tabla 6) a través de la tecnología Gateway, originando un vector que contiene así, al reportero *CITRINE* bajo la región

regulatoria de *MpGLK* (vector *pMpGLK:CITRINE*). Para la purificación del amplicón de *pMpGLK* se empleó el kit de purificación de DNA de ZymoClean™ (ZymoResearch, Irvine, CA., USA).

Tabla 5. Reacción BP para la clonación de *pMpGLK* en *pDONR Zeo*. La reacción se realizó en 10 μ L. Se indican concentraciones y volúmenes utilizados de cada reactivo.

Reactivos	Vol. (μ L)
Producto de PCR con sitios attB (50 fmol)	0.62
Vector <i>pDONR Zeo</i> (115 ng/ μ L)	1.30
H ₂ O ultrapura estéril	6.08
BP clonasa	2.00

Tabla 6. Reacción LR para la clonación de *pMpGLK* en *pMpGWB307*. La reacción se realizó en 10 μ L. Se indican concentraciones originales de los reactivos, volúmenes y concentración finales de DNA usada por cada vector.

Reactivos	Vol. (μ L)	Concentración de DNA
<i>pDONR Zeo + pMpGLK</i> (295 ng/ μ L)	0.51	150 ng
<i>pMpGWB307</i> (203.6 ng/ μ L)	0.74	150 ng
H ₂ O ultrapura estéril	3.80	-
LR clonasa	2.00	-

Para tener una idea de en qué tejidos o en qué partes del ciclo de vida de este organismo se expresa este factor de transcripción, se analizaron los datos publicados del transcriptoma de *M. polymorpha* (Bowman *et al.*, 2017) a través de un *script* del paquete estadístico *R suite*.

6.12. Diseño y construcción de los RNAs guía para mutagénesis sitio dirigida de *MpGLK* mediante CRISPR/Cas9

Se utilizó un software disponible en la plataforma de Benchling que permite identificar los sitios PAM (necesarios para que Cas9 pueda reconocer su blanco) y señala los 20 nucleótidos adyacentes a éstos, mismos que corresponden a la región del RNA guía monocadena (sgRNA) que tiene homología con el blanco (gRNA) y que otorga especificidad a la actividad de nucleasa de Cas9 para realizar el corte de doble cadena sólo en esa región del genoma. El software evalúa los distintos gRNA candidatos y los clasifica de acuerdo con la posibilidad de que generen cortes inespecíficos de Cas9. Como uno de los objetivos de este trabajo fue obtener mutantes nulas, se eligieron dos candidatos, uno con blanco en el inicio del sexto exón de *MpGLK* (*MpGLK* sgRNA2), y otro en el segundo exón de *MpGLK* (*MpGLK* sgRNA3). Para la construcción del gRNA, se mandaron a sintetizar tanto la secuencia del gRNA como su antisentido para, posteriormente alinearlos a 95°C. Cabe notar que a las secuencias del gRNA se agregaron los nucleótidos CTCG (para el gRNA sentido) y AAAC (para el gRNA antisentido) en sus extremos 5' para que puedan ser clonados por medio de ligación en el vector para ensamble de sgRNAs (*pMpGE_En03*), como se ejemplifica en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de los gRNAs para realizar la mutagénesis en MpGLK. En gris se resalta la secuencia que se agregó en

sgRNA	Nombre del cebador	Secuencia
MpGLK sgRNA2	MpGLK sgRNA2 sense	5' CTCGAGCTGCTTTAACAGGTACGA 3'
	MpGLK sgRNA2 antisense	5' AAACCTCGTACCTGTTAAAGCAGCT 3'
MpGLK sgRNA3	MpGLK sgRNA3 sense	5' CTCGTCAGCAGAACATTTTTTCACG 3'
	MpGLK sgRNA3 antisense	5' AAACCGTGAAAAATGTTCTGCTGA 5'

6.12.1. Alineamiento de los gRNA (*sense* y *antisense*)

Para el alineamiento, se colocó una solución compuesta por 1 µL del gRNA sentido (100 µM) y 1 µL del gRNA antisentido, y aforada con 28 µL de H₂O ultrapura estéril. Dicha solución se colocó en un termociclador por 5 min a 95°C y, posteriormente, se enfrió allí mismo hasta que alcanzase 25°C.

6.13. Generación de los vectores para la mutagénesis por CRISPR/Cas9 en *M. polymorpha*

Con el objetivo de obtener mutantes nulas para *MpGLK* se utilizó la técnica de CRISPR/Cas9. Para la transformación (y posterior mutagénesis) es necesario, primero clonar la secuencia guía (gRNA) en un vector de ensamblaje para el sgRNA que posee sitios de recombinación attB1 y attB2 (equivalente a un vector donador) y, posteriormente, a través de la técnica de Gateway, realizar una reacción de recombinación LR con un vector donador que contiene a Cas9 (la nucleasa que efectúa los cortes de doble cadena en el DNA genómico blanco) (Sugano *et al.*, 2014).

6.13.1. Digestión del vector *pMpGE_En03*

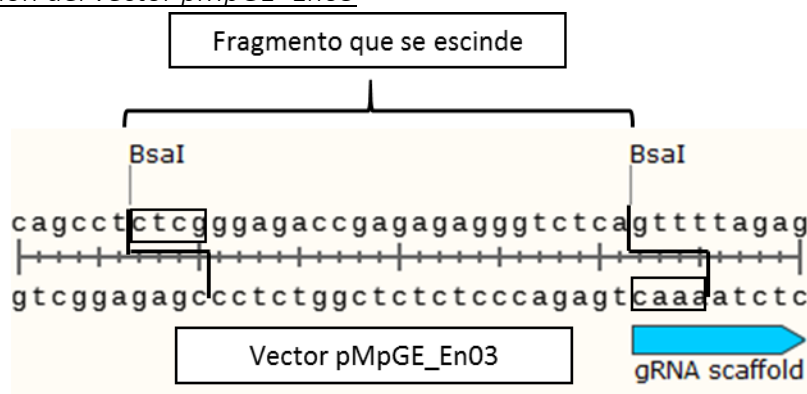


Fig. 11. Digestión del vector *pMpGE_En03* por *BsaI*. El corte por *BsaI* escinde un fragmento de 25 nucleótidos y deja extremos cohesivos que no son complementarios entre sí, lo cual evita la recircularización del vector.

La clonación en el vector para el ensamblaje (*pMpGE_En03*) se efectuó mediante la digestión de dicho vector por medio de la enzima de restricción *BsaI* (*Eco31I*) (Thermo Scientific) durante 16 h a 37°C. El protocolo que se siguió para realizar la reacción se explica a continuación en la Tabla 8. El corte por *BsaI* escinde un fragmento de 25 nucleótidos y genera extremos cohesivos, pero no compatibles entre sí, lo que evita la recircularización del vector en ausencia de un fragmento de DNA con extremos compatibles a ambos extremos (Fig. 11)

Tabla 8. Protocolo de digestión de pMpGE_En03 con Bsal. Se indica la concentración final a la que quedan los reactivos y su volumen equivalente en μL para una reacción de 25 μL .

Reactivos	Concentración final	Vol. (μL)
pMpGE_En03 (0.257 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.5 μg	9.73
CutSmart Buffer 10X	1 X	2.50
Bsal (10 U/ μL)	20 U	2.00
H ₂ O ultrapura estéril	-	10.77

6.13.2 Purificación del vector *pMpGE_En03* digerido

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE 1 X como buffer de corrida en la cual se corrieron 2 μL de la digestión y, a manera de control, se corrieron también 2 μL del vector circularizado para observar su patrón de bandeo. Una vez finalizada la electroforesis, se cortó la banda correspondiente al vector linearizado (3.2 Kb) en un transiluminador. Posteriormente, se procedió a correr una electroforesis con los 23 μL restantes de la reacción. El producto restante se cortó nuevamente después de observarse en el transiluminador y se purificó mediante kit (ZymoClean™; ZymoResearch, Irvine, CA. USA).

6.13.3. Reacción de ligación para clonación de los sgRNA en el vector *pMpGE_En03*

Se realizó una reacción de ligación entre el vector digerido y los cebadores alineados; a manera de control, se hizo una reacción adicional en la que no se incluyeron los cebadores alineados, sino únicamente el vector digerido. Dichas reacciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo explicado a continuación en la Tabla 9. Se procedió a incubar control y muestra por 2 h a 25°C y, posteriormente, a 4°C en *overnight*. Después se prosiguió a realizar la transformación de *E. coli* (DH5 α) por medio de electroporación con 2 μL del producto de la ligación o del control; se plaqueó en medio LB sólido adicionado con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37°C por 12 h. Después se revisó que hubiese crecimiento bacteriano en las placas con medio sólido y, en éstas, se seleccionaron 10 colonias que presumiblemente contenían el inserto y de ellas se hizo PCR utilizando los cebadores M13 FW (propio del vector) y MpGLK sgRNA antisense RV para confirmar su presencia. Posteriormente se realizó un inóculo para purificar por kit el plásmido de una de estas colonias (el cual se secuenció) para llevar a cabo la última reacción para finalizar la construcción de los vectores para CRISPR/Cas9: una reacción LR entre el vector de entrada que porta el sgRNA y el vector destino que porta a Cas9.

Tabla 9. Reacción de ligación entre *pMpGE_En03* y *MpGLK sgRNA*. La reacción se hizo en 10 μL ; se indican los volúmenes de los reactivos y la concentración inicial de los mismos. Para el control de ligación no se agregó DNA de los cebadores alineados, sino otros 2 μL de H₂O ultrapura estéril.

Reactivos	Vol. (μL)
H ₂ O ultrapura estéril	3.00
pMpGE_En03 (46 ng/ μL)	1.00
DNA de cebadores alineados (10 pmol)	2.00
Buffer 10 X ligasa T4	1.00
ATP 10 mM	2.00
Ligasa T4	1.00

6.13.4. Reacción LR para clonación de *MpGLK sgRNA2* en *pMpGE011*

Se generó un vector de expresión en el cual se clonó *MpGLK sgRNA2* y el *scaffold RNA* para la mutagénesis de *MpGLK* por CRISPR/Cas9. Para dicha reacción se emplearon los vectores *pMpGE011* (vector destino) y *pMpGE_En03+MpGLKsgRNA2* (Tabla 10).

Tabla 10. Reacción LR para clonación de *MpGLK sgRNA2* y su *scaffold RNA* en *pMpGE011*. La reacción se realizó en 10 μ L como volumen final. Se indican reactivos en su concentración original, volúmenes finales por reactivo utilizados en la reacción y concentración de los vectores utilizada.

Reactivos	Vol. (μ L)	Concentración de DNA
<i>pMpGE_En03+MpGLK sgRNA2</i> (230 ng/ μ L)	0.65	150 ng
<i>pMpGE011</i> (376 ng/ μ L)	0.40	150 ng
H ₂ O ultrapura estéril	6.95	-
LR clonasa	2.00	-

6.14. Generación de construcción para sobreexpresión de *MpGLK*

Con el objetivo de completar la caracterización funcional de *MpGLK* se realizó una construcción sobreexpresora de *MpGLK* utilizando el método de clonación de Gateway. A diferencia de lo realizado con la construcción para *pMpGLK*, se partió de cDNA en vez de DNA genómico, y se empleó la enzima Phusion HF (ThermoScientific) para la amplificación del fragmento. El DNA sin intrones de *MpGLK* (*MpGLK CDS*) corresponde a un fragmento de 2.1 Kb y fue amplificado mediante el protocolo que se ilustra en la Tabla 11.

Tabla 11. Protocolo de PCR seguido para amplificar el CDS de *MpGLK*. Se indican volúmenes y concentración final de los reactivos para una reacción de 50 μ L, así como el protocolo de ciclación utilizado para esta misma.

Reacción de PCR (en 50 μ L)			Protocolo de ciclación			
Reactivos	Vol. (μ L)	Concentración final	Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
H ₂ O ultrapura estéril	29.50	N/A	Desnaturalización inicial	98°C	2 min	1
Buffer GC rich 5X	10.00	1 X	Desnaturalización	98°C	20 s	
dNTPs 2.5 mM	4.00	0.2 mM	Alineamiento	60°C	30 s	40
<i>MpGLK CDS FW</i> 10 μ M	2.00	0.4 μ M	Extensión	72°C	1:30 min	
<i>MpGLK RV</i> 10 μ M	2.00	0.4 μ M	Extensión final	72°C	10 min	1
cDNA	2.00	-				
DNA pol. Phusion HF	0.50	0.2 U/ μ L				

Una vez amplificado, se purificó por el kit de ZymoClean™, de la misma manera que se indicó en la sección 6.9, obteniéndose 24.6 ng/μL. Para saber cuánto volumen de DNA se necesitaba para alcanzar 50 fmol, se realizó la siguiente relación:

$$ng \text{ requeridos: } 50 \text{ fmol}(2101 \text{ pb}) \left(\frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} \right) \left(\frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}} \right) = 69.333 \text{ ng}$$

Por lo tanto, para saber cuánto volumen del DNA purificado se necesitaba se realizó la operación siguiente:

$$\frac{69.333 \text{ ng}}{24.6 \text{ ng}} (1 \mu\text{L}) = 2.82 \mu\text{L}$$

Una vez conocidos estos datos, se procedió a realizar la reacción BP, para la cual se preparó el *mix* siguiente (Tabla 12):

Tabla 12. Reacción BP entre *MpGLK CDS* y *pDONR Zeo*. La reacción se realizó en 10 μL por un tiempo de 18 h. Se indica la concentración de los DNAs y el volumen necesario por cada reactivo para la realización de la reacción.

Reactivos	Vol. (μL)
Producto de PCR con sitios attB (50 fmol)	2.90
Vector <i>pDONR Zeo</i> (115 ng/μL)	1.30
H ₂ O ultrapura estéril	3.80
BP clonasa	2.00

La reacción BP se dejó durante 18 h a 22°C y para detenerla, se agregó 1 μL de proteinasa K y se incubó por 10 min a 37°C (temperatura indicada por el manual de Gateway). El producto de la reacción BP se utilizó para transformar a *E. coli* (DH5α) por electroporación. Después de transformar, se procedió a plaquear a las bacterias en medio LB + zeocina 50 μg/mL, antibiótico de resistencia del vector *pDONR Zeo*.

Posteriormente se prosiguió con la reacción LR, entre el vector de entrada (*pDONR Zeo + MpGLK CDS*) y el vector destino *pMpGWB311*, mismo que contiene un promotor para expresión constitutiva (CaMV 35S) y *3XFLAG* como etiqueta para seguir a la proteína. La reacción LR se realizó de la manera que se enuncia en la Tabla 13:

Tabla 13. Reacción LR entre *pDONR Zeo* y *MpGLK CDS*. Se indica la concentración de los reactivos, los volúmenes necesarios para una reacción de 10 μL, y la concentración de DNA requerida por vector para la reacción.

Reactivos	Vol. (μL)	Concentración de DNA
<i>pDONR Zeo + MpGLK CDS</i> (240.5 ng/μL)	2.90	150 ng
<i>pMpGWB311</i> (66 ng/μL)	1.30	150 ng
H ₂ O ultrapura estéril	3.80	-

Con esta construcción se transformó a *E. coli* (para purificar y obtener más pDNA) y, una vez se confirmó que poseía el inserto de *MpGLK CDS* (y que éste no presentaba mutaciones), se transformó en *A. tumefaciens*, para agroinfiltrar a *M. polymorpha*. La transformación de *M. polymorpha* se realizó como se indica en la sección siguiente.

6.15. Transformación de esporas de *M. polymorpha*

La transformación de *M. polymorpha* requiere de tres pasos: desinfección y siembra de esporas, cultivo de *A. tumefaciens* y transformación de esporas de *M. polymorpha* y, finalmente el lavado de *A. tumefaciens* y selección de las plantas transformantes. La desinfección de las esporas se hizo resuspendiendo el esporangio de la planta en 400 µL de agua ultrapura estéril por pipeteo o usando vórtex en un tubo de microcentrífuga de 1.5 µL el; una vez resuspendido, se tomó la suspensión con las esporas y se trasvasó a un tubo de microcentrífuga nuevo y estéril, donde se adicionaron 400 µL de la solución de desinfección 2 X (cloro 0.8% + tween 20 al 0.4%), se mezcló y se dejó incubar por 1 min. A continuación, se precipitaron las esporas a través de centrifugación por 1 min. Posterior a esto, se decantó el sobrenadante y se añadieron 400 µL de H₂O ultrapura estéril, se lavaron las esporas por pipeteo o vórtex y se centrifugó por 1 min, después del cual, se eliminó nuevamente el sobrenadante. Este proceso de lavado se repitió dos veces más y, finalmente, se resuspendió el sedimento de las esporas en 600 µL de H₂O ultrapura estéril. Posteriormente, se sembraron 100 µL de la solución con las esporas en placas de 60 mm de diámetro con 10 mL medio B5 0.5 X + 1% sacarosa, 1% agar, pH 5.7 (6 cajas en total), procurando distribuir uniformemente el líquido por la caja; se dejó secar y se selló con cinta micropore, y se dejó crecer *in vitro* por 3 días.

Para el cultivo con *A. tumefaciens* para la transformación de esporas de *M. polymorpha*, se creció una cepa que contuviese el vector destino de interés en medio LB sólido con su respectivo antibiótico de selección (espectinomycin 50 µg/mL) a 28°C por 2 días (comenzando un día después de la desinfección y cultivo de esporas de *M. polymorpha*). Pasado dicho tiempo, se tomó de la superficie de la caja una asada de *A. tumefaciens* y se resuspendió en un buffer de transformación (MgCl₂ 10 mM, MES-NaOH 10 mM, pH 5.2, acetosiringona 150 µM), se cuantificó la cantidad de bacteria en el buffer (OD₆₀₀) y, se utilizó a 0.5 O.D₆₀₀. Se tomó 1 mL de buffer de transformación para transformar cada placa donde previamente se había crecido a las esporas por tres 3 días y se dejó incubar por 1 min y 20 min; posteriormente se retiró el exceso y se sellaron las placas con parafilm para incrementar la humedad en el medio y se co-cultivó a la bacteria y las esporas por 3 días *in vitro* a 22°C.

El lavado de *A. tumefaciens* se hizo 3 días después del co-cultivo. Se realizaron tres lavados con 4 mL de H₂O ultrapura estéril, removiendo el H₂O ultrapura estéril después de cada lavado. Después se adicionó 1 mL del buffer de selección (cefotaxima 100 µg/mL, clorsulfurón 0.5 µM, aforado a 1 mL pero preparado en concentración para 10 mL) en cada caja para eliminar a *A. tumefaciens* y seleccionar a las plantas transformantes, se sellaron las cajas con cinta micropore y se incubaron *in vitro* a 22°C por 3 semanas; a continuación, se transfirieron los talos resistentes al clorsulfurón a medio B5 0.5 X + Sac 1% + Agar 1% nuevo con el antibiótico de selección y se incubaron a 22°C hasta que produjeran gemas (T1).

6.16. Extracción y cuantificación de proteínas.

Se partió de aproximadamente 300 µg de tejido fresco de *M. polymorpha* colocado en tubos de 1.5 mL para microcentrífuga y se maceró finamente en nitrógeno líquido. Después, se le adicionaron 100 µL de buffer de extracción de proteínas (Tabla 14). Dicho tejido se centrifugó por 16 minutos a 16 000 x g y, posteriormente, se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo de centrífuga. Finalmente, se cuantificó a través del método de Bradford por espectrofotómetro a 595 nm, partiendo de una curva estándar de BSA.

Tabla 14. Buffer de extracción de proteínas. Se indica en la columna derecha los reactivos y en la izquierda, su concentración. Volumen final del buffer: 50 mL.

Reactivo	Concentración
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
EDTA	2 mM
NaCl	100 mM
DTT	2 mM
Inhibidor de proteasas	1:100

6.17. Ensayos de western blot

Para la corroboración de la sobreexpresión de *MpGLK* en las líneas portadoras de la construcción *35S:MpGLKCDS::3XFLAG* se procedió a realizar ensayos de western blot con α -FLAG (Sigma-Aldrich) como anticuerpo primario y α -Mouse HRP (Invitrogen), como anticuerpo secundario. Se corrieron geles de acrilamida en los cuales se cargaron 20 µg de proteína por cada línea analizada. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante hora y media a 4°C bajo amperaje constante y, posteriormente, se bloquearon con una solución de PBS 1x + Tritón 0.5% (V/V) + leche descremada 5% (m/V) (*overnight*). Después del bloqueo, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con PBS 1x + Tritón 0.5% y después se incubaron en anticuerpo primario por 2 horas. Enseguida, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con PBS 1x + Tritón 0.5% y se incubaron en anticuerpo secundario por una hora. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos en PBS 1x Tritón 0.5% y un lavado breve final en agua destilada. Finalmente, se revelaron las membranas utilizando el kit de Clarity Max ECL (BioRad) (alta sensibilidad).

6.18. Extracción y cuantificación de pigmentos

Se extrajeron pigmentos de plantas de un mes de edad o de 14 días (9 por réplica, para un total de 3 réplicas) para lo cual se tomaron entre 20 y 40 mg de tejido por planta. Se maceró finamente el tejido en nitrógeno líquido y se dejó extrayendo en acetona al 100% a temperatura ambiente por 4 horas en oscuridad. Posterior a este tiempo, se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, tras de lo cual, se realizaron diluciones 1:10 de los extractos.

La cuantificación se realizó mediante la medición de absorbancias de cada extracto diluido 1:10 (662 nm para clorofila a, 645 para clorofila b y 470 nm para carotenoides) y su normalización de acuerdo con el peso original de la muestra, conforme a lo indicado en el protocolo de (Lichtenthaler & Buschmann, 2001b, 2001a).

6.19. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con el objetivo de realizar cortes transversales ultrafinos para observar la ultraestructura de los plástidos de plantas de *M. polymorpha* se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm, para lo cual, previamente se prepararon las muestras con el protocolo siguiente en plantas de 30 días colectadas al mediodía (modificado de Suire *et al.*, 2000): se prefijó el tejido en glutaraldehído al 3% en buffer de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M (pH 7.2) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA., USA) con sacarosa al 5% por una noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las muestras en este mismo buffer sin sacarosa y se fijaron con tetróxido de osmio en buffer de glutaraldehído al 3% $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M (pH 7.2). Las muestras se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se embebieron en resina Epon (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA., USA). Los cortes se realizaron con un microtomo Leica ULTRACUT y se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss LIBRA 120.

6.20. Histología de talos de *M. polymorpha*

Para la realización de los cortes transversales para la descripción de la histología de plantas de *M. polymorpha* se partió de plantas de 10 y 30 días, en ambos casos se cortaron transversalmente los talos con hojas para afeitar Gillette™ ultrafinas. Los cortes se resuspendieron en agua para su visualización en microscopio.

6.21. Tinción de almidón con lugol

Con el objetivo de determinar el patrón de acumulación de almidón en plantas de *M. polymorpha* se analizaron muestras de 1, 2 y 7 días *post-siembra*. Previo a la tinción, se fijaron las muestras en una solución de formaldehído, ácido acético y Et-OH (FAE 10:5:50) por una noche, tras lo cual, se colocaron en una solución para despigmentación con Et-OH al 70% por 3 días. Posterior a la despigmentación, se hicieron dos lavados de las muestras con agua ultrapura y, finalizados éstos, se sumergieron las muestras en solución de tinción con lugol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO., USA) por 1 min, tras el cual, se lavaron las muestras nuevamente con agua ultrapura y se montaron para observación.

6.22. Protocolo de digestión por T7 endonucleasa (NEB)

Se aisló gDNA de *M. polymorpha* de 10 líneas transgénicas transformadas con el vector *pMpGE011 + MpGLK sgRNA3*, así como de plantas Tak-1, a partir del cual se amplificó una región de 641 pb, flanqueando el sitio de reconocimiento del guía. Dicho amplicón fue purificado a través del kit Zymo ZymoClean™ con el objeto de obtener 150 ng de las muestras de las mutantes putativas para, posteriormente realizar una reacción de hibridación entre éstas (por separado), con 150 ng del amplicón silvestre. La reacción de hibridación se realizó como se indica en la Tabla 15.

Tabla 15. Reacción de hibridación para T7 endonucleasa. Se indica en la columna izquierda el reactivo y en la derecha la concentración final a la que debe estar el mismo. Calcular concentraciones para un volumen final de 20 µL aunque se afore a 19 µL.

Reactivo	Concentración
10X NEB Buffer 2	1X
PCR purificado de <i>M. polymorpha</i> silvestre	150 ng
PCR purificado de <i>M. polymorpha</i> mutante	150 ng

Una vez adicionados los reactivos, se hibridó con el protocolo de la Tabla 16, como se indica.

Tabla 16. Protocolo de hibridación para digestión con endonucleasa T7. Se indica paso del protocolo de hibridación, tiempo o velocidad del *ramp down* y temperatura a la cuál este debe ser realizado.

Paso	Tiempo o velocidad	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95°C
<i>Ramp down</i>	-2°C/s	85°C
<i>Ramp down</i>	-0.1°C/s	25°C
Hold	∞	4°C

Al finalizar el protocolo de hibridación y, para realizar la digestión enzimática, se agregó inmediatamente 1 µL (10 unidades) de T7 endonucleasa (NEB) para obtener un volumen final de 20 µL. Se dejó incubar durante 40 min a una temperatura de 37°C, posterior a lo cual, se adicionaron 2 µL de EDTA 0.25 M con el propósito de detener la reacción de digestión y se cargó en un gel de agarosa (1.2%) para cotejar la presencia o no de corte enzimático.

6.23. Sexado de plantas transformantes de *M. polymorpha*

Dado que *M. polymorpha* es un organismo dioico, en cada evento de transformación de esporas, se obtienen tanto individuos hembra como macho. El sexado de las líneas se hizo mediante PCR de marcadores *rhf73* (exclusivo del cromosoma sexual femenino; 406 pb) y *rbm27* (exclusivo del cromosoma sexual masculino, 663 pb), de acuerdo a lo publicado por Fujisawa et al., (2001), utilizando cebadores específicos para dichos marcadores. Las líneas en las cuales había amplificación del fragmento de 406 pb se denotaron como femeninas, mientras que las que amplificaron el de más de 600 pb, como masculinas.

7.0. RESULTADOS

7.1. *M. polymorpha* posee homólogos para múltiples elementos que participan en la señalización retrógrada (tanto biogénica como operacional)

Se realizó la búsqueda tanto por medio de BLASTP como HMMER de distintos elementos involucrados en la señalización retrógrada plastídica contra el proteoma de *M. polymorpha*, así como de otros organismos como se indicó en la tabla 2 utilizando como cebadores a las secuencias de proteínas de Angiospermas del modelo de estudio en el cual se ha caracterizado más a profundidad la función de dichas proteínas (en la mayoría de los casos, siendo éstas, proteínas de *A. thaliana* y, sólo en el caso de IJ1, *Z. mays*). La elección de estas proteínas se basó en la información disponible sobre su papel en la señalización retrógrada o su participación en vías de señalización retrógrada conocidas (Chan et al., 2016; Jarvis & López-Juez, 2013; Koussevitzky et al., 2007; Strand & Hernandez-Verdeja, 2017; Xiao et al., 2012). El objetivo principal de este análisis fue analizar su aparición a lo largo de la evolución de las plantas terrestres.

Las distintas proteínas que se utilizaron para los sucesivos análisis se indican en la siguiente tabla (Tabla 17), donde se describe brevemente su función y si existe un fenotipo asociado a su pérdida de función reportado; en rojo, se resaltan los tres elementos de señalización con los cuales se trabajó inicialmente debido a su relevancia en la biogénesis de los cloroplastos, razón por la cual se ahondo en su descripción en la introducción de este trabajo: los GLK, factores transcripcionales que se sitúan río abajo de las cascadas de señalización derivadas de la señalización retrógrada biogénica y que, se regulan funcionalmente por medio de señales provenientes de los plástidos en desarrollo (Fitter et al., 2002; Gang et al., 2019; Rossini et al., 2001; Tokumaru et al., 2017); GUN1, quien integra señales de diversa naturaleza y provenientes de distintos procesos (como de la expresión génica del plástido o de la síntesis de tetrapirroles) dentro del plástido y, posteriormente, las transduce hacia el núcleo (Colombo et al., 2016; Ichihashi & Tsukaya, 2015; Koussevitzky et al., 2007; Strand & Hernandez-Verdeja, 2017; Tadini et al., 2016; Tameshige et al., 2013; Wu et al., 2018); y, por último, PRIN2, cuya actividad favorece la diferenciación de etioplasto a cloroplasto (Díaz et al., 2018; Kindgren et al., 2012).

Tabla 17. Elementos que participan en la señalización retrógrada del plástido y sus funciones. Dentro de la señalización retrógrada se reconocen dos subdivisiones principales: la señalización retrógrada biogénica y la operacional. En la biogénica, las señales parten de plástidos en desarrollo; mientras que, en la operacional, las señales parten de organelos maduros, y, en el caso del cloroplasto, de un organelo fotosintéticamente activo.

Tipo de Señal	Gen de referencia	Función	Fenotipo mutante	Referencias
GLKs	<i>AtGLK1 (AT2G20570.2)</i>	Participan en la vía de señalización que coordina el importe de proteínas al plástido y la transcripción de los PhANGs.	Dobles mutantes: coloración verde pálido, floración temprana.	Waters et al., (2009)
				Kakizaki et al., (2009)
	<i>AtGLK2 (AT5G44190.1)</i>	Función redundante entre GLK1 y GLK2.		Chan et al., (2016)
		Interacciona con elementos del aparato traduccional del plástido; participa en la		Llamas et al., (2017)

GUN1	Biogénica	<i>AtGUN1 (AT2G31400.1)</i>	respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) dentro del plástido. Coordina la expresión de los PhANGs.	Expresión de los PhANGs en condiciones que inhiben la fotosíntesis.	Colombo et al., (2016) Tadini et al., (2016); Wu et al., (2018)
PAPP5	Biogénica	<i>AtPAPP5 (AT2G42810.2)</i>	Involucrada en la señalización cloroplasto-núcleo a través del metabolismo de tetrapirroles y GUN1. Parte del complejo que se une a Proto-Mg IX en el citosol.	Mutante simple no tiene fenotipo, recupera el fenotipo de mutantes <i>crd</i> (que son verde pálido y acumulan Proto-Mg IX).	Chan et al., (2016) Barajas-López et al., (2013)
PRIN2	Biogénica	<i>AtPRIN2 (AT1G10522.1)</i>	Participa en la transición de etioplasto a cloroplasto maduro en fotomorfogénesis, activa la transcripción de genes fotosintéticos en el plástido. Necesario para la transcripción por PEP.	Plantas con coloración pálida, regulación hacia abajo en la expresión de los PhANGs.	Díaz et al., (2018) Hernandez-Verdeja & Strand (2017)
SG1	Biogénica	<i>AtSG1 (AT3G18420.1)</i>	Es requerida en los estadios tempranos del desarrollo de proplástido hacia cloroplasto. Rol putativo en la síntesis o degradación de proteínas del plástido. Putativamente involucrado en la señalización por GUN1 (dobles mutantes <i>sg1 gun1</i> , rescatan el fenotipo de <i>sg1</i>).	Alteración en la expresión de los PhANGs y PhAPGs, retraso en la diferenciación hacia cloroplastos. Hojas con enverdecimiento tardío. Plantas más pequeñas que las silvestres.	Hu et al., (2014) Chan et al., (2016)
CMF7/CIA2	Biogénica	<i>AtCIA2 (AT5G57180.2)</i>	Factor transcripcional de tipo CCT. Regula positivamente la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales del plástido localizados en el núcleo (PRPs); así como, la de genes involucrados en la formación del translocón TOC (Arabidopsis). Participa en el desarrollo del cloroplasto y en la determinación de la arquitectura del tilacoide (cebada; <i>HvCMF3</i> , <i>HvCMF7</i>).	En Arabidopsis, la mutante <i>cia2</i> presenta deficiencias en el importe de proteínas hacia el plástido, así como <i>downregulation</i> en la expresión de PRPs y las plantas son verde pálido.	Sun et al., (2001) Sun et al., (2009) Li et al., (2019)
IOJAP stripping 1	Biogénica	<i>Zea mays:</i> <i>(GRMZM2G004583)</i>	Putativamente codifica para un factor de silenciamiento ribosomal.	Los plástidos de la mutante variegada <i>iojap</i> carecen de ribosomas (maíz)	Walbot & Coe, (1979) Han et al., (1992) Häuser et al., (2012)
HY5	Biogénica	<i>AtHY5 (AT5G11260.1)</i>	Factor transcripcional tipo bZIP. Inhibe el crecimiento del hipocótilo y el desarrollo de raíces laterales. Promueve la fotomorfogénesis. Regula la transcripción de genes involucrados en la síntesis de pigmentos fotosintéticos. Participa en el desarrollo del cloroplasto mediante la	Las mutantes <i>hy5</i> exhiben mayor crecimiento del hipocótilo que en plantas silvestres ante crecimiento bajo luz	Gangappa & Botto (2016) Oyama et al., (1997)

			regulación de la expresión de DGD1 para la biogénesis de los tilacoides.	roja, azul, roja lejana y UV-B.	
Rab8D	Biogénica	<i>AtRABD8 (AT4G20360.1)</i>	Participa en el control del tamaño del meristemo apical de la raíz (RAM), la longevidad de las células troncales y la actividad del centro quiescente. Señal mediada por GUN1, ATM y ERF115.	Mutantes nulas en homocigosis son letales. Embriones albinos, se arrestan en estadio globular. Mutantes <i>knock down</i> son verde pálido y presentan raíces pequeñas con división celular en el centro quiescente y muerte celular en el nicho de células troncales.	Li et al., (2020)
WHY1	Operacional	<i>AtWHY1 (AT1G14410.1)</i>	Factor transcripcional con localización dual en plástido y núcleo. Participa como regulador positivo de la expresión de genes involucrados en la respuesta ante patógenos (nuclear), así como en el mantenimiento de la estabilidad del plastoma y la respuesta a ABA (plástido).	Las mutantes <i>why1</i> son insensibles a JA y ABA.	Isemer et al., (2012) Chan et al., (2016)
SAL1-PAP	Operacional	<i>AtSAL1 (AT5G63980.1)</i>	Participa en la respuesta a estrés hídrico, mediando la respuesta a ABA, así como la respuesta ante estrés lumínico por alta intensidad de luz. Función conservada desde Streptophyta.	Las mutantes <i>alx8</i> presentan retardo en el desarrollo y en la floración y son resistentes a sequía. Presentan hojas anormales.	Wilson et al., (2009) Zhao et al., (2019)
MEcPP	Operacional	<i>AtHDS (AT5G60600.1)</i>	La acumulación de MEcPP induce la expresión de genes de respuesta a estrés biótico o abiótico.	La mutante <i>ceh1</i> contiene niveles mayores de SA que plantas silvestres, así como <i>upregulation</i> de la expresión de genes involucrados en su biosíntesis.	Xiao et al., (2012) Chan et al., (2016)

Se confirmó la presencia de un único homólogo para GLK en *M. polymorpha*, tanto por BLASTP como por HMMER utilizando a manera de cebador tanto, a la proteína completa como dominios característicos de la misma (dominio de unión a DNA HTH-Myb, identificado por medio de InterPro y corroborado con Prosite). En lo que respecta a GLK, se encontró un homólogo único (a diferencia de lo que ocurre en *A. thaliana* o *P. patens*, donde estas proteínas están presentes como dos parálogos), correspondiente al locus Mapoly0156s0007.1 (de aquí en adelante denominado MpGLK); ya fuese utilizando como cebador a AtGLK1 o a AtGLK2; interesantemente, con quien guarda mayor similitud MpGLK es con AtGLK1, como se puede constatar en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de homología de secuencias por BLASTP de GLK1, GLK2, GUN1 y PRIN2 de *A. thaliana* contra el proteoma de *M. polymorpha* (MarpolBase, v3.1; Phytozome, v12.1, *Marchantia polymorpha*, v3.1). El análisis de las

secuencias corrobora que en *M. polymorpha* sólo existe un homólogo para las dos GLKs de *A. thaliana* y corrobora los resultados de la Tabla 1 para GUN1 y PRIN2 (ver Antecedentes). PRIN2 no tiene dominios reportados, de modo que sólo pudo hacerse el análisis de esta proteína por medio de la secuencia aminoacídica completa.

	BLASTP							
	Locus por secuencia completa			Locus por dominios característicos				
	ID	Score	E-value	Identidad	ID	Score	E-value	Identidad
GLK1	Mapoly0156s0007.1	214.93	6.96E-63	37.05%	Mapoly0156s0007.1	110.92	7.40E-31	88.89%
GLK2	Mapoly0156s0007.1	207.99	4.93E-61	35.71%	Mapoly0156s0007.1	106.69	2.91E-29	79.66%
GUN1	Mapoly0036s0086.1	830.48	0	53.75%	Mapoly0036s0086.1	551.58	5.47E-163	61.62%
PRIN2	Mapoly0021s0016.1	62	1.11E-12	33.68%	-	-	-	-

MpGLK, a diferencia de las GLKs de *A. thaliana* presenta un dominio adicional regulador de respuesta (Fig. 12, color verde. Si bien, en los tres casos se conserva el dominio de unión a DNA (dominio HTH tipo MyB, Fig. 12, color amarillo). Igualmente, cabe resaltar que la proteína de *M. polymorpha* es mucho más grande que las de *A. thaliana*, siendo la primera una proteína de 700 aminoácidos (aa), en contraste con las otras dos, que constan de 436 aa y 386 aa (Fig. 12). La función de este dominio regulador de respuesta se conoce para otras proteínas de la familia GARP, como las proteínas ARR-B, en las cuáles, se asocia a regulación de su actividad por medio de fosforilación por parte de cinasas que forman parte de la vía de señalización por citocininas. Sin embargo, a diferencia de la fosforilación canónica, en estas proteínas la fosforilación es en un residuo de aspártico (Hwang & Sheen, 2001; Safi et al., 2017). Si bien, este dominio está presente también en otras proteínas de la familia GARP, como las APRR2 o PRR2 (Cheval et al., 2017; Perez et al., 2019; Perochon et al., 2010), su función es aún poco clara. A semejanza de AtGLK1 y AtGLK2, MpGLK presenta un motivo GCT (del inglés, *GOLDEN2-like C-terminal motif*) en su extremo C-terminal (Fig. 12, en color azul).

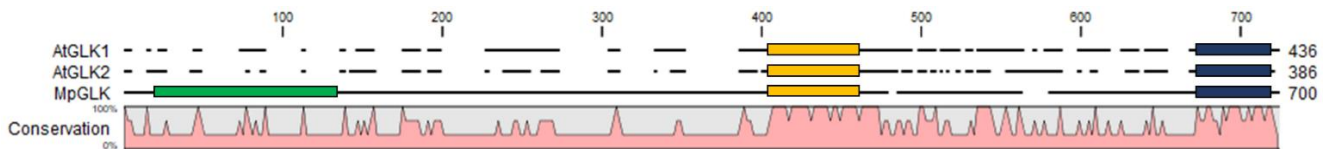


Fig. 12. Dominios de las proteínas MpGLK, AtGLK1 y AtGLK2. MpGLK, aparte de los dominios característicos de una GLK, posee un dominio regulador de respuesta en su N-terminal (color verde) a diferencia de lo que ocurre en AtGLK1 y AtGLK2, quienes sólo presentan el dominio de unión a DNA tipo HTH-Myb (amarillo), y el motivo GCT (azul). Adicionalmente, la proteína de *M. polymorpha* es más larga que aquella de *A. thaliana*.

En lo que respecta a GUN1, tanto el análisis por HMMER como el análisis por BLASTP arrojan el mismo locus como resultado, ya sea que se use como cebador a la proteína completa o sólo a las secuencias de sus dominios característicos: Mapoly0036s00086.1 (de aquí en adelante referido como MpGUN1). MpGUN1, al igual que su homólogo en *A. thaliana* presenta repetidos de pentatricopéptidos y un dominio SMR, lo que refuerza la idea de que pueda cumplir en *M. polymorpha* una función semejante a la de GUN1 en *A. thaliana* (Fig. 13).



Fig. 13. Dominios de MpGUN1 y AtGUN1. Tanto MpGUN1 como AtGUN1 son proteínas de más de 900 aa, en ambos casos, las dos proteínas poseen repetidos de pentatricopéptidos y un dominio SMR en su C-terminal, adicionalmente, MpGUN1 posee un dominio TAT, que marca la proteína para translocación hacia el lumen del tilacoide.

Respecto a PRIN2, el análisis por BLASTP y HMMER corroboran también que el locus encontrado a través de los análisis preliminares por BLASTP usando la secuencia completa de la proteína de *A. thaliana* (Mapoly0021s0016.1 (referido a partir de aquí como MpPRIN2)), es homólogo de AtPRIN2. Con esta proteína no fue posible realizar los análisis de homología por las secuencias de sus dominios, debido a que no hay dominios reportados para ésta, de acuerdo con PROSITE e InterPro.

Tabla 19. Análisis de homología de secuencias por HMMER de GLK1, GLK2, GUN1 y PRIN2 de *A. thaliana* contra el proteoma de *M. polymorpha* (UniProtDB). El análisis por HMMER corrobora que existe sólo un homólogo en *M. polymorpha* para GLK1 y GLK2 de *A. thaliana*; así como los homólogos predichos por el trabajo preliminar reseñado en la Tabla 1 (ver Antecedentes). PRIN2 no tiene dominios reportados, de modo que sólo pudo realizarse el análisis por medio de su secuencia aminoacídica completa.

		HMMER						
		<u>Locus por secuencia completa</u>			<u>Locus por dominios característicos</u>			
	ID	Score	E-value	Identidad	ID	Score	E-value	Identidad
GLK1	Mapoly0156s0007.1	151.3	4.10E-56	46.10%	Mapoly0156s0007.1	100.2	1.30E-26	88.90%
GLK2	Mapoly0156s0007.1	114.9	2.20E-46	52.60%	Mapoly0156s0007.1	97.6	3.20E-25	79.70%
GUN1	Mapoly0036s0086.1	883.3	3.70E-262	55.10%	Mapoly0036s0086.1	511.3	5.10E-195	61.50%
PRIN2	Mapoly0021s0016.1	49.5	8.20E-10	32.10%	-	-	-	-

Para las proteínas restantes se hizo un tratamiento similar para obtener sus homólogos putativos en *M. polymorpha* y los demás organismos bajo análisis, como se describió previamente, si bien, no se incluyen dentro del concentrado presentado en las dos tablas previas, sino sólo sus respectivos árboles filogenéticos.

7.1.1. El homólogo putativo para PRIN2 en *M. polymorpha* probablemente no corresponde a una PRIN2 bona fide

Con el objetivo de determinar la filogenia de las distintas proteínas que han sido reportadas como elementos importantes de la señalización retrógrada, se realizaron 12 árboles filogenéticos con 27 especies representativas de los distintos clados de algas y plantas. El primer árbol filogenético que se presenta en este trabajo es el de PRIN2. Como se mencionó, PRIN2 carece de dominios reconocibles a través de los softwares InterPro o PROSITE. Se obtuvieron homólogos putativos en 19 de 27 especies analizadas a lo largo de la escala filogenética y con éstos, se realizó su árbol filogenético. Interesantemente, no se recuperaron homólogos para Bryophyta (s.s), Lycophyta, Monilophyta/Pteridophyta, ni Gymnospermae, sino sólo en Angiospermas, además del homólogo identificado en *M. polymorpha* descrito en la sección anterior (Fig. 14).

De hecho, el homólogo putativo de *M. polymorpha* no se agrupa junto con las PRIN2 de Angiospermas ni con las proteínas PRIN2-like identificadas en el análisis (clado resaltado en color amarillo fuerte) que se agrupan entre sí. Este resultado junto con el hecho de que no existen

homólogos putativos en ningún otro clado de plantas no vasculares ni vasculares, fuera de Angiospermas, reduce la posibilidad de que la proteína inicialmente identificada sea un ortólogo *bona fide* de AtPRIN2. Es interesante la ausencia de este factor en el resto de los clados de plantas, debido a su papel en la diferenciación hacia cloroplasto, si bien, puede estar relacionado a que parece participar específicamente en la transición desde etioplasto y, en estos otros organismos, pudiese no existir este subtipo de plástido.

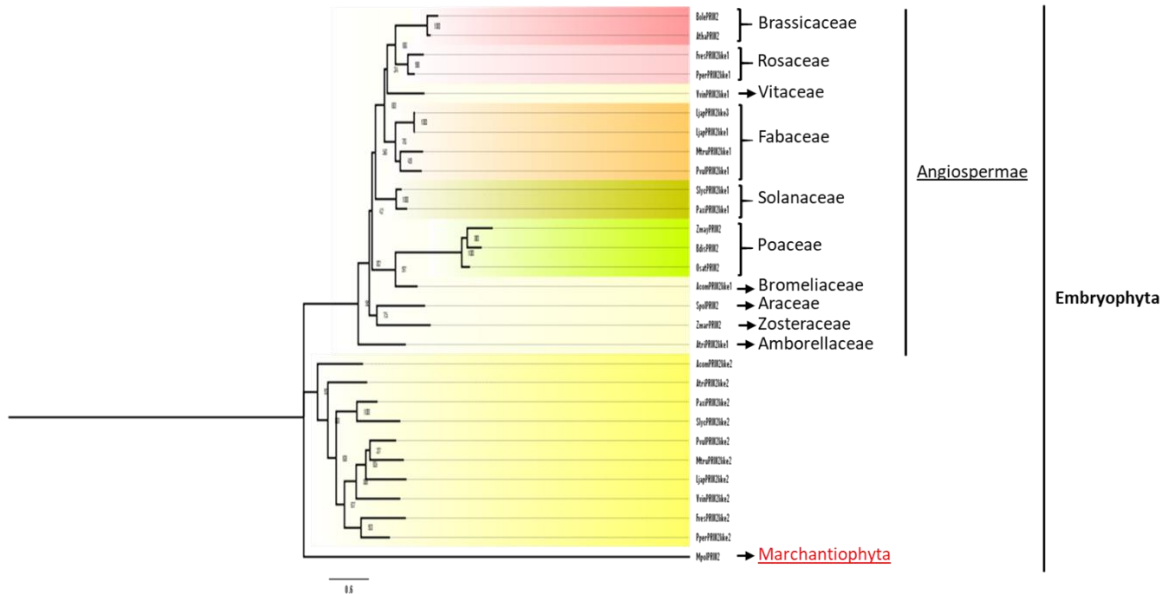


Fig. 14. Filogenia de PRIN2. PRIN2 es un elemento exclusivo de la señalización en Angiospermas, no existen homólogos para este en organismos fuera de dicho clado de las Embryophyta. El homólogo putativo de *M. polymorpha* se localiza en una politomía como grupo externo de las PRIN2 *bona fide* de Angiospermas y de un clado de proteínas PRIN2-like, igual exclusivo de Angiospermas, por lo cual es poco probable que sea un ortólogo de AtPRIN2.

7.1.2. MpGUN1 agrupa en el mismo clado que las GUN1 de Bryophyta (s.s) y está conservada desde el ancestro en común de Streptophyta

De manera similar se realizó la filogenia de GUN1, y de acuerdo con los datos derivados de este análisis, MpGUN1 agrupa claramente con las proteínas GUN1 de *P. patens* y *S. phallax* (15b). Interesantemente, en estas plantas a diferencia de *M. polymorpha*, hay dos y tres ortólogos putativos respectivamente. En el resto de los taxa analizados de plantas (con la sola excepción de *M. truncatula* que tiene dos), existe un único ortólogo. Cabe destacar que no se encontró ortólogo alguno en Gymnospermae ni en Chlorophyta (Fig. 15a). GUN1 es un factor importante en la señalización retrógrada como transductor de las señales que derivan del plástido, por lo cual, resulta sorprendente que no exista un ortólogo en gimnospermas, ya que se sabe que en este tipo de plantas existen diferentes tipos de plástidos y que, por ende, hay un proceso de biogénesis de éstos, orquestado a través de señales retrógradas y anterógradas. La ausencia de un ortólogo de ésta proteína en estos clados podría deberse también a problemas con el curado de las bases de datos, puesto que las secuencias disponibles corresponden a una versión preliminar de sus genomas que no ha sido actualizada recientemente (Nystedt et al., 2013).

En su mayoría, la distribución encontrada de los clados refleja los datos publicados respecto a la filogenia de las plantas terrestres, con la sola excepción de SmoeGUN1 (Lycophyta), cuyo

representante agrupa como grupo hermano del resto de las GUN1 de plantas, si bien, se encontraron ortólogos putativos para GUN1 en *C. braunii* y *K. nitens*, quienes forman una politomía con las demás GUN1 de plantas terrestres (Fig. 15a).

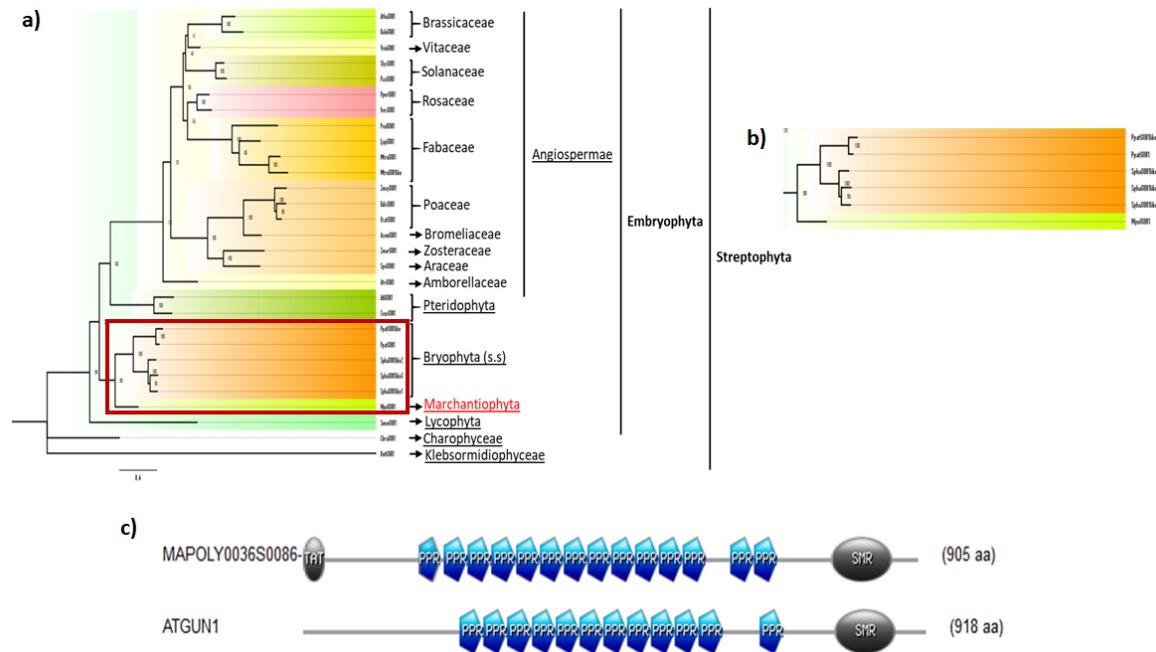


Fig. 15. Filogenia de GUN1. (a) GUN1 parece haber surgido en el ancestro en común de las plantas terrestres, puesto que está presente en todos los taxa de Embryophyta analizados. Las GUN1 de Streptophyta agrupan como grupo externo de las GUN1 de Embryophyta. La mayoría de los taxa posee un solo ortólogo de GUN1, salvo *P. patens*, *S. phallax* y *M. truncatula*, con dos o más representantes cada uno. (b) MpGUN1 agrupa en el mismo clado que los homólogos para esta proteína en Bryophyta (*S. fallax* y *P. patens*) y, (c) a semejanza de lo que ocurre con AtGUN1, MpGUN1 posee repetidos de PPR y un dominio SMR.

7.1.3. PAPP5 está conservada desde el ancestro en común de las algas verdes y las Streptophyta

La fosfatasa con motivos repetidos de TPR, PAPP5 (Fig. 16c), participa dentro de la vía de señalización retrógrada biogénica derivada de tetrapirroles, en la cual es crítico su papel en la transducción de esta señal para la regulación (negativa) de la expresión de los PhANGs ante la acumulación de precursores de la síntesis de clorofila (Barajas-López, et al., 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos en la filogenia para esta proteína, se puede especular que este gen existe desde el ancestro en común de las algas verdes, puesto que se encontró un homólogo en el representante de dicho clado (*C. reinhardtii*), tanto como en Streptophyta (grado que abarca tanto a las algas estreptofitas como a las plantas terrestres). Se observó que, en la mayoría de los 27 organismos representativos incluidos, existe un único ortólogo putativo para PAPP5, si bien, en tres organismos existen de dos a tres parálogos por proteoma (*S. fallax* y *P. patens*, y *M. truncatula*, respectivamente) (Fig. 16a).

MpPAPP5 se localiza en el mismo clado que las PAPP5 de algas estreptofitas (*K. nitens* y *C. braunii*), Bryophyta (s.s.) (*S. fallax* y *P. patens*) y Monilophyta (*A. filiculoides* y *S. cucullata*). El ortólogo de Lycophyta (SmoePAPP5), por otro lado, forma una politomía en la base del árbol junto con la proteína de *C. reinhardtii* y el clado en el que agrupan las demás PAPP5 de Streptophyta (Fig. 16b).

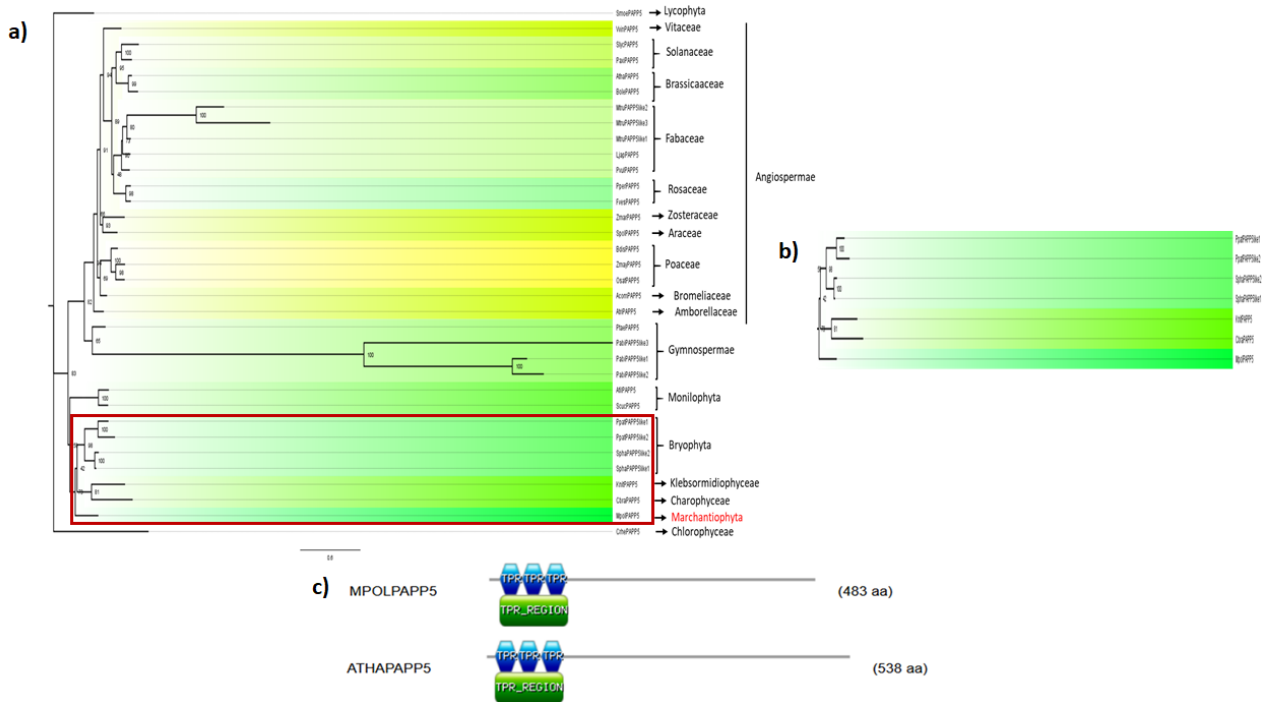


Fig. 16. Filogenia de PAPP5. (a) PAPP5 está conservado desde el ancestro en común de las algas verdes probablemente dada la existencia de un ortólogo putativo a esta proteína en *C. reinhardtii*. (b) Interesantemente, MpPAPP5 agrupa en el mismo clado que aquellas de algas estreptofitas (*C. braunii* y *K. nitens*), Bryophyta (s.s) (*S. fallax* y *P. patens*) y Monilophyta/Pteridophyta (*A. filiculoides* y *S. cucullata*). Este clado es a su vez, hermano de las demás PAPP5 de plantas terrestres a excepción de *S. moellendorffi*, cuyo ortólogo putativo se encuentra en una politomía en la base del árbol. La mayoría de los organismos poseen un único ortólogo putativo, si bien en *M. truncatula* (Fabaceae, Angiospermae) existen tres parálogos, caso similar al de Bryophyta (s.s), con *S. fallax* y *P. patens* teniendo ambos dos parálogos. (c) De acuerdo con PROSITE, en esta proteína se reconoce una región TPR con tres motivos TPR tanto en AtPAPP5 como en MpPAPP5.

7.1.4. SG1 emergió en el ancestro en común de las Streptophyta

SG1 putativamente participa en la degradación o síntesis de proteínas del plástido (regula la acumulación de *RbcL*) y se le ha relacionado con la transición de proplástido hacia cloroplasto ya que las plantas mutantes por pérdida de función para esta proteína tipo TPR, presentan retraso en el enverdecimiento y alteración en el desarrollo del cloroplasto en distintos grados (Hu et al., 2014).

La distribución en la filogenia de las plantas terrestres para esta proteína revela que ésta emergió en el ancestro en común del clado de Streptophyta, estando presente en *K. nitens* y *C. braunii*, así como en el resto de las plantas terrestres. El ortólogo de esta proteína en *M. polymorpha* agrupa en su propio clado como hermano de las demás de plantas vasculares (Fig. 17a) y, a diferencia del ortólogo de SG1 en *A. thaliana*, presenta 5 motivos TPR en vez de 4 (Fig. 17b). Interesantemente, las de Bryophyta (s.s.) fungen como grupo externo de todas de plantas terrestres, con las cuales forman un clado en politomía con las de *K. nitens* y *C. braunii*. Es a su vez importante resaltar que salvo en *B. oleracea* (Brassicaceae, Angiospermae) y *L. japonicus* (Fabaceae, Angiospermae), donde existen dos parálogos de esta proteína, en las demás especies sólo hay un gen codificante para esta proteína (Fig. 17).

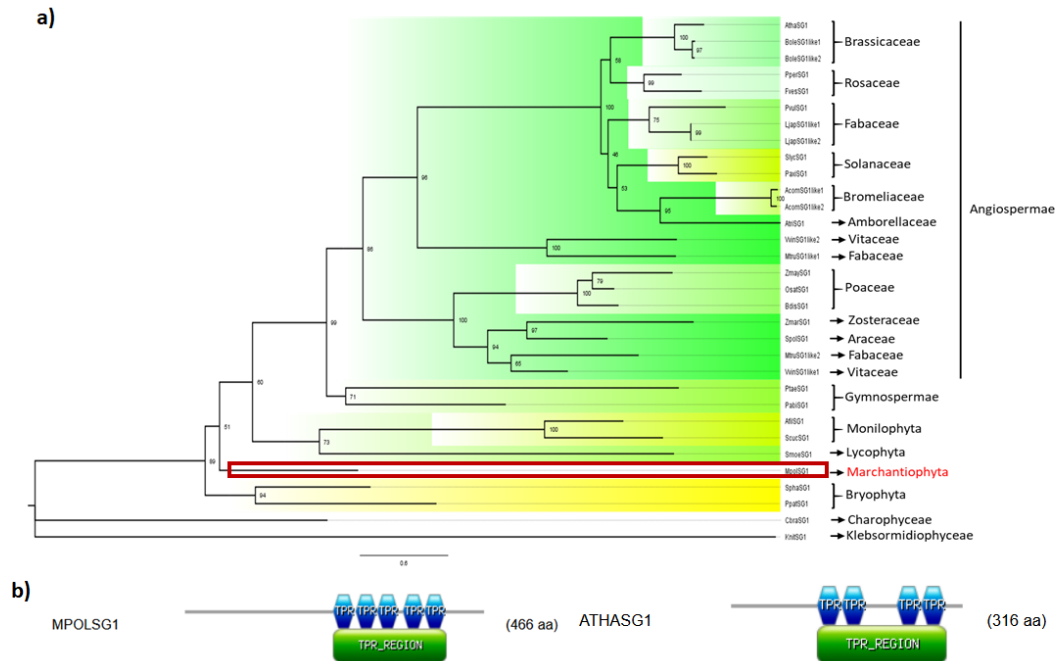


Fig. 17. Filogenia de SG1. (a) SG1 está presente desde el ancestro en común de las Streptophyta y, el estado basal de carácter es posible asumir que es tener un único gen codificante para esta proteína. MpSG1 agrupa cercanamente con las de plantas vasculares, y las de Bryophyta funcionan como grupo externo de este clado al que pertenece la de *M. polymorpha*. (b) MpSG1 tiene 5 motivos de repetidos tipo TPR en vez de 4, como AtSG1.

7.1.5. CIA2 existía ya en el ancestro común de Streptophyta

CIA2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia CCT, que participa en la regulación de la expresión de los genes codificantes para algunas de las proteínas del clororribosoma, así como de la maquinaria de importe del plástido (Sun et al., 2001; Sun et al., 2009). A su vez, su expresión es regulada transcripcionalmente por los GLKs, por lo que se le ha relacionado a la señalización plástidica mediada por GUN1 durante la biogénesis del cloroplasto (Waters et al., 2009).

En este árbol filogenético se distinguen grupos o especies en los cuales hay particular abundancia de parálogos, como es el caso de las Bryophyta (s.s.), contándose con nueve parálogos en *P. patens* y ocho en *S. fallax*; mientras que en Monilophyta y Gymnospermae, se documentó la presencia de tres parálogos en el proteoma de *A. filiculoides*, y tres y dos parálogos en el proteoma de *P. abies* y *P. taeda*, respectivamente (Fig. 18a). Interesantemente, en *M. polymorpha* hay también dos ortólogos putativos y éstos agrupan en el mismo clado que aquellos de Bryophyta (s.s.), Lycophyta y dos de los homólogos de Monilophyta; los ortólogos putativos de *M. polymorpha* presentan adicionalmente al dominio CCT típico de las proteínas CIA2, un dominio tipo *Zinc finger* (Fig. 18b y c). Este clado es hermano de aquél que agrupa a las CIA2 de Angiospermas, algunas de Gymnospermae (de cuatro, dos se encuentran en este clado, las otras dos (provenientes del proteoma de *P. abies*), agrupan como grupo externo del clado de las CIA2 de las demás Streptophyta), algas estreptofitas, y de dos homólogos en Monilophyta. Dentro de este último clado se distingue un grupo conformado por otras proteínas pertenecientes a la familia CCT de factores de transcripción (ver clado *CIA2-like sister group*) cercanamente relacionadas con las CIA2, cuyos miembros casi exclusivamente son taxa de Angiospermas, a excepción de una proteína de *C. reinhardtii* (CrheCIA2-like1) (Fig. 18a).

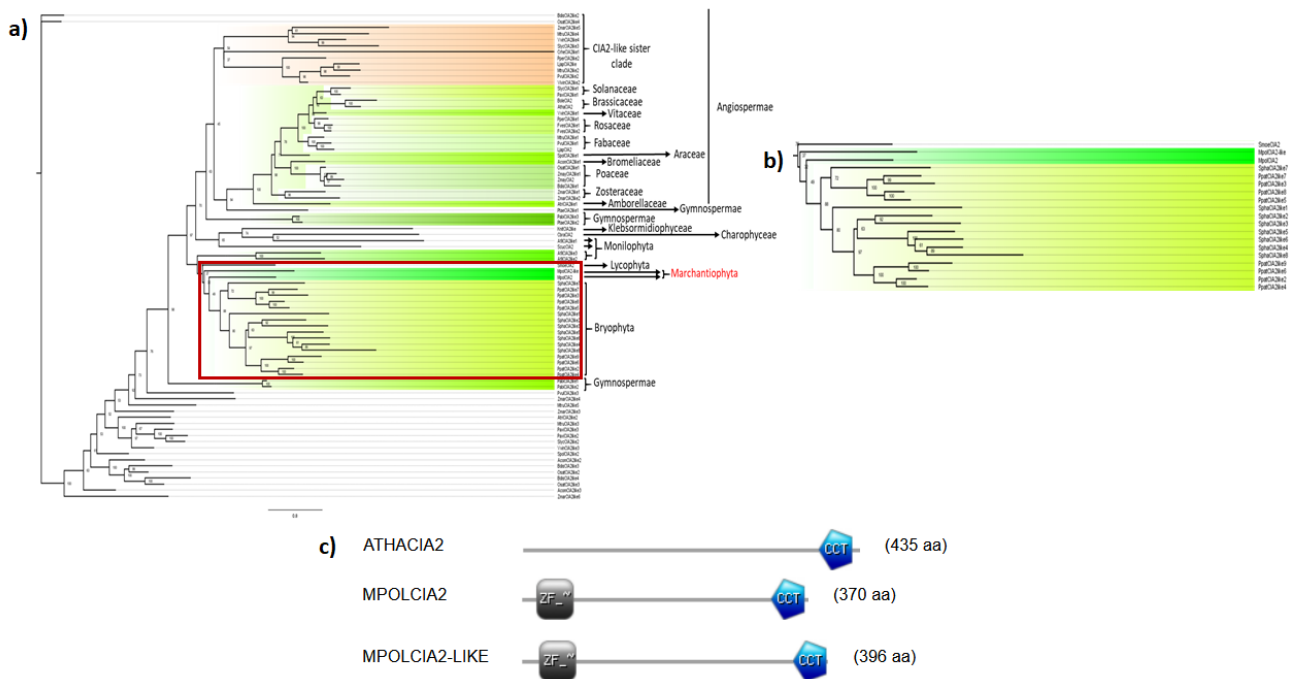


Fig. 18. Filogenia de los factores transcripcionales CIA2. (a) La distribución de los taxa pertenecientes a algunos grupos como Gymnospermae o Monilophyta es atípica, con taxa de un mismo grupo en clados diferentes. (b) Algunos de los taxa bajo análisis presentan abundancia en parálogos, como las dos especies de Bryophyta e, incluso, en *M. polymorpha* existen dos putativos ortólogos. (c) Los ortólogos putativos de *M. polymorpha* presentan adicionalmente al dominio CCT típico de esta proteína en *A. thaliana* (recuadro azul), un dominio tipo Zinc finger (recuadro gris).

7.1.6. IJ1 está conservado a lo largo de la evolución de las plantas desde el ancestro en común de éstas con las algas verdes

El fenotipo de la mutante de la proteína IJ1 fue descrito en *Z. mays* generando plantas variegadas cuyos plástidos carecen de ribosomas (Han et al., 1992; Häuser et al., 2012; Walbot & Coe, 1979). De acuerdo con la estructura de su proteína, se ha identificado que putativamente podría funcionar como un factor de silenciamiento ribosomal (Fig. 19c).

La filogenia obtenida para esta proteína sugiere que este factor de silenciamiento existe desde el ancestro en común del clado Viridiplantae. Salvo lo que ocurre en tres organismos (*L. japonicus*, *P. patens* y *B. oleracea*, en los cuales hay dos parálogos), cada especie tiene un único ortólogo putativo por genoma. Interesantemente, no existen proteínas homólogas en una de las especies de Gymnospermae analizadas (*P. taeda*) ni en la monocotiledónea *B. distachyon* (Poaceae) (Fig. 19a). MpIJ1 se encuentra en el mismo clado que las IJ1 de Bryophyta (s.s.), Monilophyta y Lycopphyta, que, a su vez, es el grupo hermano de las IJ1 de algas estreptofitas y, en conjunto con éste clado, son el grupo hermano de las demás IJ1 de plantas, a excepción de aquella de Gymnospermae (*P. abies*), que se encuentra en una politomía en la base del árbol (Fig. 19b).

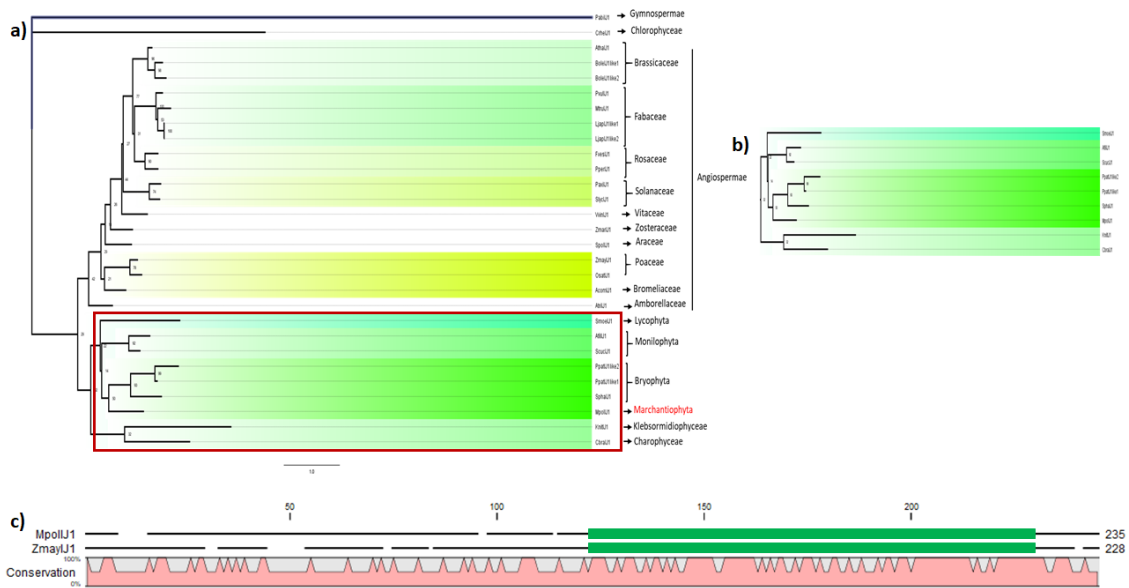


Fig. 19. Filogenia de IJ1. (a) IJ1 tiene homólogos en *C. reinhardtii* (Chlorophyceae, Chlorophyta), así como en los organismos del clado Streptophyta, a excepción de *B. distachyon* (Poaceae, Angiospermae) y *P. taeda* (Gymnospermae). (b) MplJ1 agrupa cercanamente con aquellas IJ1 de Bryophyta (s.s.) y, ambas, junto con las de Monilophyta, Lycophyta y algas estreptofitas, fungen como grupo hermano de las demás de plantas terrestres a excepción de aquella de Gymnospermae. (c) La estructura de las IJ1 de *M. polymorpha* y *Z. mays* revela la presencia de un dominio tipo RSFs, asociado al silenciamiento ribosomal.

7.1.7. HY5 existe desde el ancestro en común de Chlorophyta y Streptophyta

HY5 es un factor transcripcional caracterizado por la presencia de un dominio de tipo bZIP (Fig. 20c), éste está involucrado en la regulación de la fotomorfogénesis, así como en la regulación del desarrollo del cloroplasto, particularmente en la formación de los tilacoides (Gangappa & Botto, 2016; Oyama et al., 1997).

En nuestro análisis esta proteína se encontró desde *C. reinhardtii* hasta las demás especies de estreptofitas. En *C. reinhardtii* (Chlorophyceae, Chlorophyta), Bryophyta (s.s.), *S. moellendorffi* (Lycophyta), *A. filiculoides* (Monilophyta) *P. taeda* (Gymnospermae), *S. polyrhiza* (Araceae, Angiospermae), *A. comosus* (Bromeliaceae, Angiospermae), *Z. mays*, *B. distachyon*, *O. sativa* (Poaceae, Angiospermae), *L. japonicus*, *M. truncatula* (Fabaceae, Angiospermae) y *B. oleracea* (Brassicaceae, Angiospermae) se encontraron al menos dos parálogos por organismo, mientras que en los demás clados sólo existe un putativo ortólogo (Fig. 20a). MplHY5 agrupa en el mismo clado que aquellas de Bryophyta, como grupo hermano de uno de los homólogos de HY5 en *S. fallax* y, este clado junto con aquellos de algas estreptofitas, plantas vasculares basales y Gimnospermas, son el grupo hermano de aquellas HY5 de Angiospermas. Las de *C. reinhardtii* agrupan una, dentro del clado de las Bryophyta (s.l., incluyendo *M. polymorpha*) y la otra, en una politimía en la base del árbol (Fig. 20b).

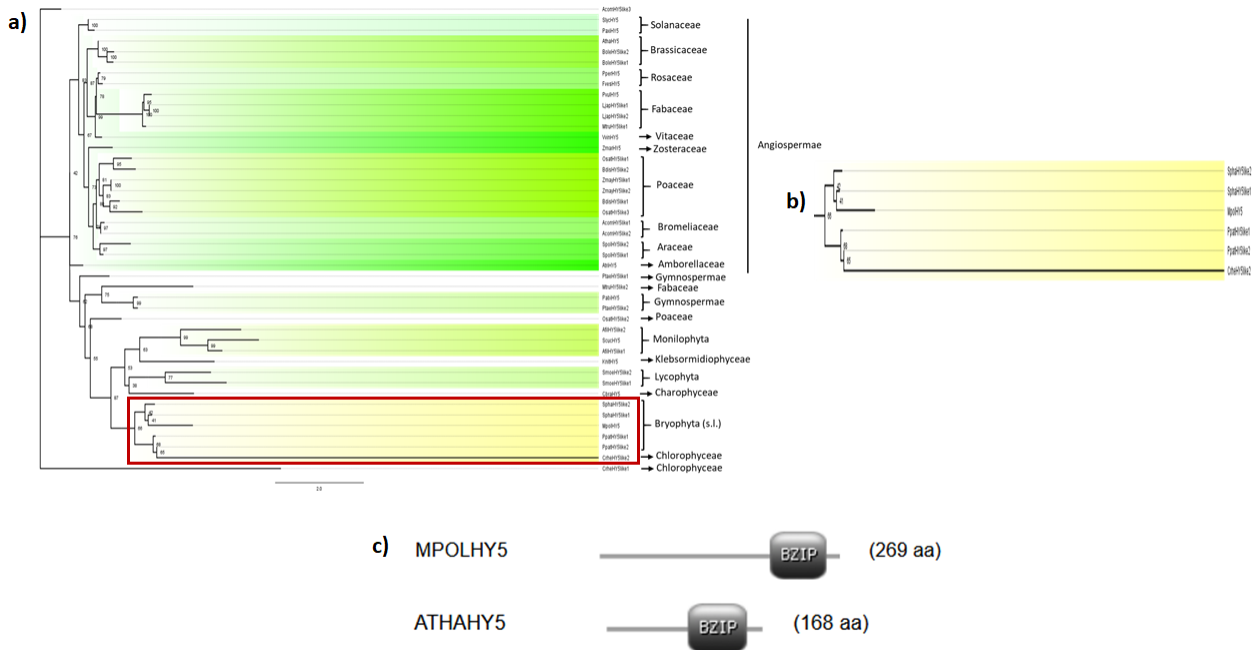


Fig. 20. Filogenia de HY5. (a) HY5 está presente desde *C. reinhardtii*, con dos parálogos. Numerosos clados presentan estos factores de transcripción en forma de parálogos, como Poaceae, Monilophyta, Bryophyta (s.s.) o Gymnospermae, entre otros. (b) MpHY5 se encuentra en el mismo clado que aquellas de Bryophyta (clado Bryophyta s.l.) y una de *C. reinhardtii*. (c) MpHY5 posee un dominio bZIP (recuadro gris), a semejanza de otras HY5 *bona fide*, como AtHY5.

7.1.8. RABD8 está presente desde el ancestro en común de Streptophyta y Chlorophyta

RABD8 es una GTPasa que ha sido recientemente caracterizado como un factor de elongación que participa dentro del proceso de la traducción en el plástido, que, no obstante, se codifica en el genoma nuclear. Mutantes *knock down* para este factor de elongación en *A. thaliana* presentan alteraciones en el desarrollo de la raíz, particularmente en la arquitectura del meristemo apical de la raíz (RAM), y en la actividad del centro quiescente (Li et al., 2020).

En la base del árbol filogenético, interesantemente se agrupan dos de las RABD8 de Monilophyta a manera de grupo externo de las demás RABD8 de plantas y algas, MpRABD8 se encuentra en el mismo clado que las RABD8 de Bryophyta (s.s.) y este clado, a su vez, es el grupo hermano de las demás RABD8 de algas (Chlorophyta y Streptophyta) y plantas vasculares. Este ortólogo en *M. polymorpha*, presenta, al igual que su homólogo de *A. thaliana*, un dominio traduccional de unión a GTP (Fig. 21c). En el clado en el que se localizan las RABD8 de algas, curiosamente agrupan también una RABD8 de Monilophyta y dos de Angiospermas (*P. axillaris* y *V. vinifera*). El grupo hermano de este clado es el conformado por plantas vasculares, del cual, su grupo externo es Lycophyta, con SmoeRABD8 (*S. moellendorffi*). El clado interno que prosigue contiene a Gimnospermas y Angiospermas, si bien, es importante hacer notar que las RABD8 de Solanaceae acá son el grupo externo de dicho clado, mientras que las de Gimnospermas agrupan cercanamente con las demás de Angiospermas. Asimismo, las RABD8 de Rosaceae no se recuperan como un único clado, sino que miembros de estas (tanto de *F. vesca* como *P. persica*) agrupan entre sí, pero en dos clados distintos. Fabaceae, por otro lado, se recupera como grupo parafilético, no monofilético, dado que en el clado que contiene a los RABD8 de esta familia, se localiza también uno de los dos clados de Rosaceae (Fig. 21).

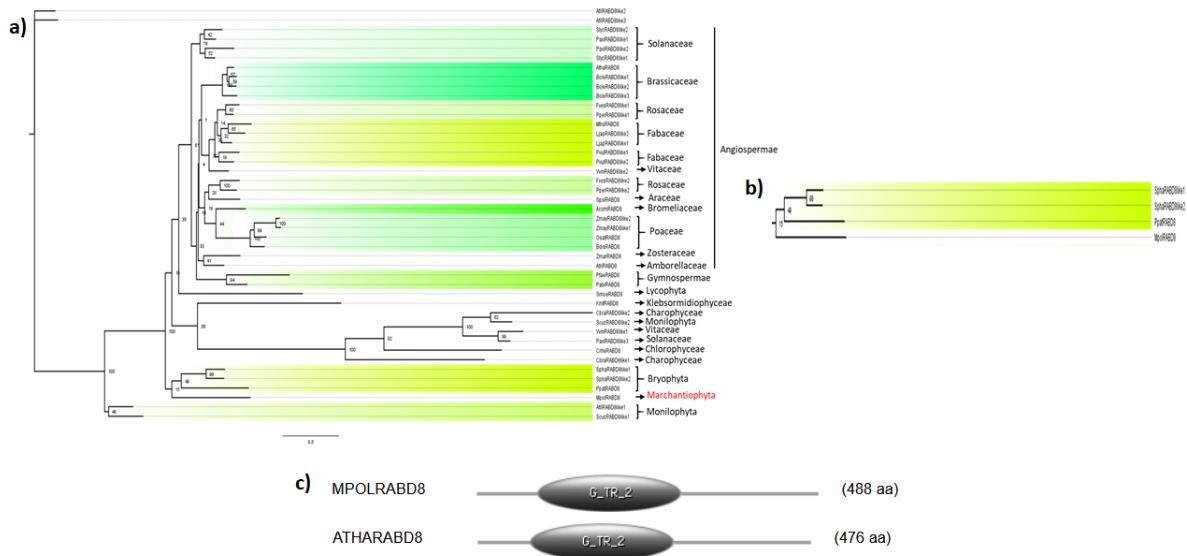


Fig. 21. Filogenia de RABD8. (a) RABD8 está conservado desde el ancestro en común de Viridiplantae. Las RABD8 de algas (tanto estreptofitas como Chlorophyta) se encuentran en un clado que contiene, a su vez, dos RABD8 de Angiospermas (*V. vinifera* y *P. axillaris*) y que no se encuentra en la base del árbol (en la base se recupera un clado formado por RABD8 de Monilophyta). (b) MpRABD8 agrupa junto con las RABD8 de Bryophyta (s.s.), siendo su grupo hermano. Este clado es, a su vez, el grupo externo de aquél que contiene a las demás RABD8 de Viridiplantae. MpRABD8, al igual que AtRABD8, posee un dominio traduccional de unión a GTP (recuadro gris).

7.1.9. WHY1 emergió en el ancestro en común de las Streptophyta

WHY1 es un factor transcripcional de localización dual, el cual se ha demostrado que participa dentro de la señalización retrógrada operacional en *A. Thaliana*, regulando positivamente la transcripción de genes de respuesta a estrés ante estímulos provenientes del plástido (Chan et al., 2016; Isemer et al., 2012). Estas proteínas están caracterizadas por la presencia de un dominio de unión a DNA monocadena (*ssDNA binding*) (Fig. 22c)

El árbol filogenético de esta proteína indica que los organismos más basales en los cuales existe son *K. nitens* y *C. braunii*, lo cual sugiere que este elemento surgió en el ancestro en común de las Streptophyta. CbraWHY1 se encuentra en una politomía en la base del árbol junto con AcomWHY1 y el clado en el que se encuentran las demás WHY1 de Streptophyta, en el cual, KnitWHY1 funge como su grupo externo (Fig 22a). MpWHY1 se encuentra en el mismo clado que aquellas de Bryophyta, Lycophyta y Monilophyta (Fig. 22b); a su vez, este clado es el grupo hermano del conformado por las WHY de Gymnospermae y, ambos, son el grupo hermano del clado donde se agrupan las WHY1 de Angiospermas (con la salvedad del caso mencionado previamente de AcomWHY1). En la mayoría de los 27 taxa analizados existe un único homólogo para esta proteína, con excepción de las plantas de la familia Fabaceae, con dos parálogos cada una; y *S. polyrhiza* (Araceae, Angiospermae), igual con dos parálogos. Interesantemente, *P. patens* y *F. vesca* carecen de homólogos para estos factores transcripcionales, empero, otras plantas que pertenecen a los mismos grupos taxonómicos como *S. fallax* y *P. persica*, sí presentan ortólogos putativos para éstos (Fig. 22a).

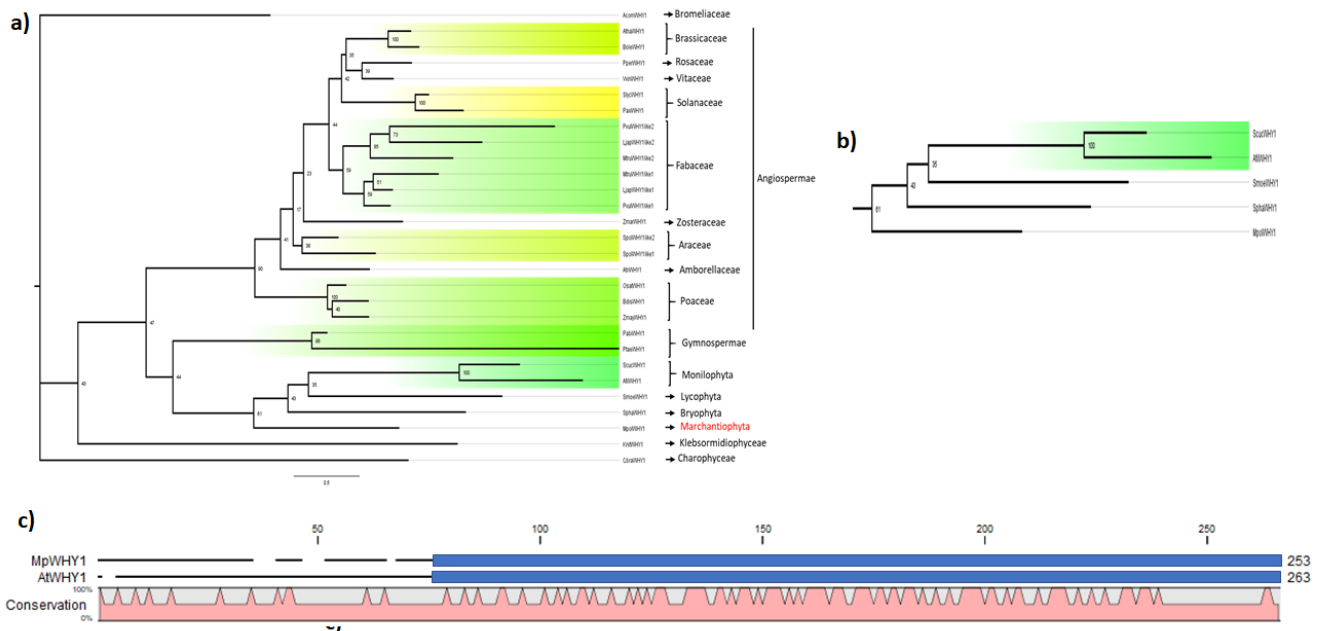


Fig. 22. Filogenia de WHY1. (a) Los factores de transcripción WHY1 surgieron en el ancestro en común de las Streptophyta, como puede observarse por la presencia de homólogos para estas proteínas en *C. braunii* y *K. nitens*. (b) MpWHY1 se localiza en un clado donde se agrupan a su vez, homólogos de WHY de Bryophyta, Lycophyta y Monilophyta. En la mayoría de los taxa bajo análisis existe un único ortólogo putativo para WHY1, salvo el caso de las plantas de la familia Fabaceae y *S. polyrhiza*. MpWHY1 posee un dominio tipo *ssDNA binding* (recuadro azul) tal y como otras WHY1 *bona fide*, como AtWHY1.

7.1.10. SAL1 emergió en el ancestro en común de Viridiplantae

SAL1-PAP pertenece a la familia de fosfatasa de inositol fosfato y participa en la señalización retrógrada operacional en plantas vasculares dentro de la cual, está involucrada en la respuesta ante estreses abióticos, particularmente hídrico (mediado por ABA) y lumínico. Su función ha sido estudiada en *A. thaliana* y *P. patens* (Wilson et al., 2009; Zhao et al., 2019).

De acuerdo con lo que puede observarse en esta filogenia, SAL1 habría emergido en el ancestro en común de Viridiplantae, puesto que existe un homólogo para esta proteína en *C. reinhardtii* (Fig. 23a). En la base del árbol, se localiza una proteína de *Z. marina* que fungiría como grupo externo para todas las demás de plantas y algas. Dentro de dicho clado, una SAL1 de *P. taeda* agrupa como grupo externo. El grupo hermano de este clado se ramifica a su vez en uno que agrupa sola a la SAL1 de *C. reinhardtii* y otro que está compuesto por una politomía entre un clado que agrupa a las proteínas de Angiospermas y Gimnospermas, Lycophyta, y otro que contiene a las de Monilophyta, Bryophyta, Marchantiophyta y algas estreptofitas. MpSAL1 se ubica en el mismo clado que las SAL1 de Bryophyta, de las cuales es su grupo hermano y, en conjunto con éstas, su clado es hermano de aquél de las SAL1 de algas estreptofitas (Fig. 22b). A diferencia de AtSAL1, MpSAL1 presenta dos motivos inositol fosfato (y de dos tipos diferentes, tipo 1 y tipo 2) (Fig. 23c). Estos dos clados, tienen como grupo externo a Monilophyta. Interesantemente, los homólogos putativos que habían sido encontrados en *B. oleracea* son agrupados fuera del árbol, soportado con un valor de *Bootstrap* de 100, lo cual podría indicar que dichas proteínas no son realmente homólogos para esta proteína, si bien, ésta existe en otro miembro de su familia: *A. thaliana* (Fig. 23a). El estado de carácter basal

parece ser la presencia de un único homólogo para SAL1 en los proteomas, puesto que sólo en dos especies existe más de un ortólogo putativo: *Z. mays* y *Z. marina*.

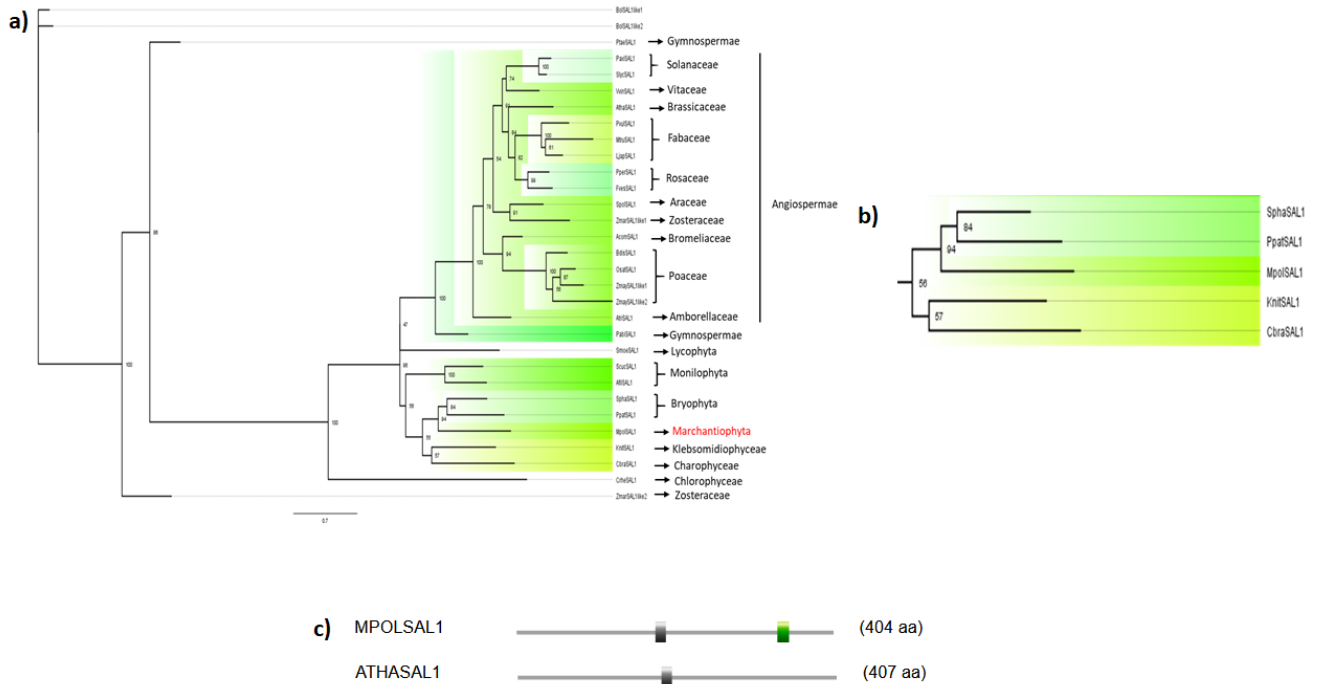


Fig. 23. Filogenia de SAL1. (a) SAL1 surgió en el ancestro en común de plantas y algas verdes de acuerdo con los datos de esta filogenia, puesto que existe un homólogo para esta proteína en el proteoma de *C. reinhardtii*. (b) MpSAL1 agrupa junto con los homólogos para esta proteína en Bryophyta (s.s.) y, en conjunto con éstas, son el grupo hermano de aquél donde se agrupan las de algas estreptofitas. Una politomía entre este clado, Lycophyta y Spermatophyta (Angiospermae+Gymnospermae) impide resolver correctamente las relaciones entre las SAL1 de plantas no vasculares/Monilophyta/algas estreptofitas y los clados de plantas vasculares basales (Lycophyta) y plantas con semilla. La mayoría de las especies cuentan con un único homólogo, salvo *Z. mays* y *Z. marina*. (c) MpSAL1, a diferencia de AtSAL1, presenta dos motivos inositol fosfato (tipo 1, recuadro gris; y tipo 2, recuadro verde), la cual sólo presenta un motivo inositol fosfato (tipo 1, recuadro gris).

7.1.11. HDS está conservado a lo largo de la filogenia de las plantas terrestres desde Viridiplantae

HDS es una enzima que participa dentro de la vía de síntesis de isoprenoides plastídicos. En condiciones en las cuales se acumula su sustrato (MecPP), del plástido se genera una señal de tipo metabólica que impacta en la transcripción de genes nucleares relacionados con estrés biótico o abiótico (Chan et al., 2016; Xiao et al., 2012). Debido a su papel dentro de la vía MEP, era esperable que esta proteína se conservara a lo largo de la evolución en organismos que poseen plástidos, como todos los taxa analizados en este trabajo.

En la base del árbol existe una politomía entre los clados algales y el clado que agrupa a todos los HDS de plantas, tanto vasculares como no vasculares. Como grupo externo dentro de este clado, están las HDS de Monilophyta (una de *A. filiculoides* y dos de *S. cucullata*) y, en el grupo hermano del clado que agrupa a las Spermatophyta (Angiospermae+Gymnospermae), se encuentran MpHDS, las HDS de Bryophyta (s.s.) y la de Lycophyta (Fig. 24a y b). Interesantemente, en Bryophyta existen tres HDS en el proteoma de *P. patens* y dos en el de *S. fallax*. Dentro del clado de Spermatophyta,

las HDS de Gymnospermae funcionan como grupo externo de las Angiospermas, en concordancia con la filogenia de las plantas terrestres (Fig. 24a).

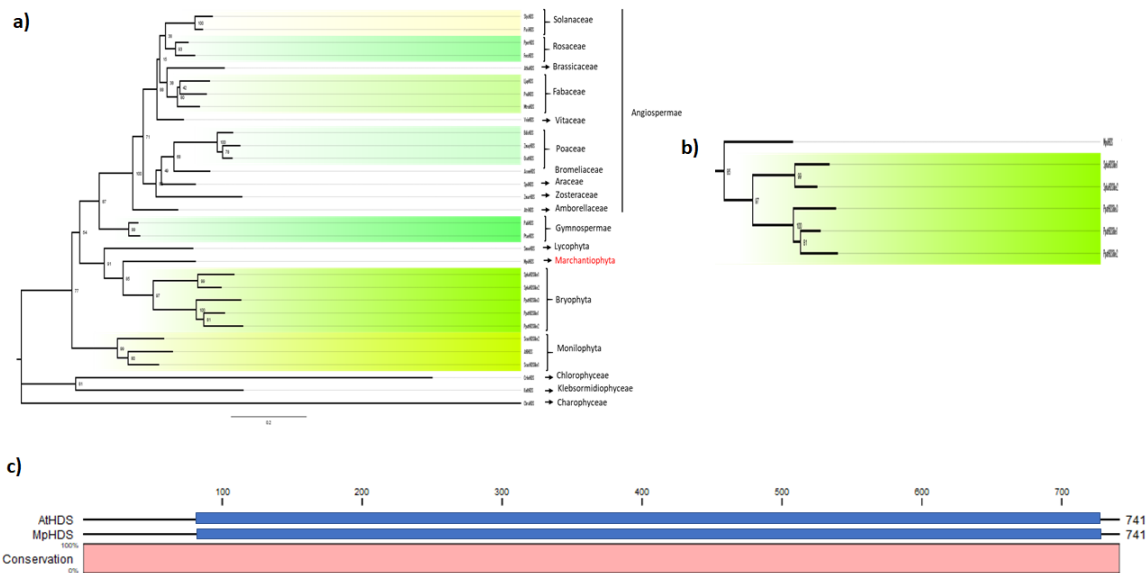


Fig. 24. Filogenia de HDS. HDS es una enzima que participa en la síntesis de isoprenoides dentro del plástido. Su conservación a lo largo de la filogenia de las plantas terrestres era esperable, debido a la función crítica de esta vía de biosíntesis en la homeostasis de las plantas y su desarrollo. MpHDS agrupa cercanamente a las HDS de Bryophyta (s.s.) y, junto con este clado y el formado por Lycophyta, son el grupo hermano de las HDS de Spermatophyta. (c) Tanto MpHDS como AtHDS poseen una firma de tipo IspG (recuadro azul) altamente conservada.

7.1.12. MpGLK pertenece a un clado que contiene a GLKs algales (KnitGLK), de Bryophyta (s.s.) (SphaGLK 1, 2; PpatGLK 1 y 2) y de Lycophyta (SmoeGLK) y que es un grupo hermano de las GLKs de Spermatophyta y de las APRR

MpGLK agrupa con otras GLKs de plantas no vasculares y una vascular (Lycophyta), así como con una de algas. De acuerdo con lo obtenido en esta filogenia, es posible hipotetizar que GLK surgió en el ancestro en común de las plantas terrestres (un alga Streptophyta), puesto que existe un ortólogo putativo de esta proteína en *K. nitens* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta), mas no en *C. reinhardtii* (Chlorophyta) (Fig. 25b). Asimismo, que el probable estado basal de carácter era poseer una única GLK, si bien, debido a los sucesivos eventos de duplicación total de genoma (WGD) en los distintos clados de las plantas terrestres, existen plantas con más de una (sirva de ejemplo el clado de las Bryophyta s.s., donde existen dos GLKs en sus dos representantes y donde se han reportado previamente eventos de WGD (Bowman *et al.*, 2017)). Esto es relevante, puesto que la duplicación del gen que codifica para esta proteína tiene un patrón iterativo, y no existe división entre un clado ancestral de GLKs tipo AthGLK1 y otro tipo AthGLK2, sino que la duplicación del gen ha ocurrido dentro de los clados de manera recurrente (Fig. 25a).

Es interesante a su vez, que MpGLK, KnitGLK y SmoeGLK poseen, de manera adicional a los dominios característicos de una GLK (dominio HTH MYB y motivo GCT), un dominio regulador de respuesta (Waters *et al.*, 2008), puesto que éste está presente justamente en otros grupos de proteínas de la

familia GARP: las ARR y las APRR (Fig. 25c). Cabe resaltar que, de acuerdo con lo obtenido en esta filogenia, las APRR agrupan como grupo hermano del clado al que pertenece MpGLK.

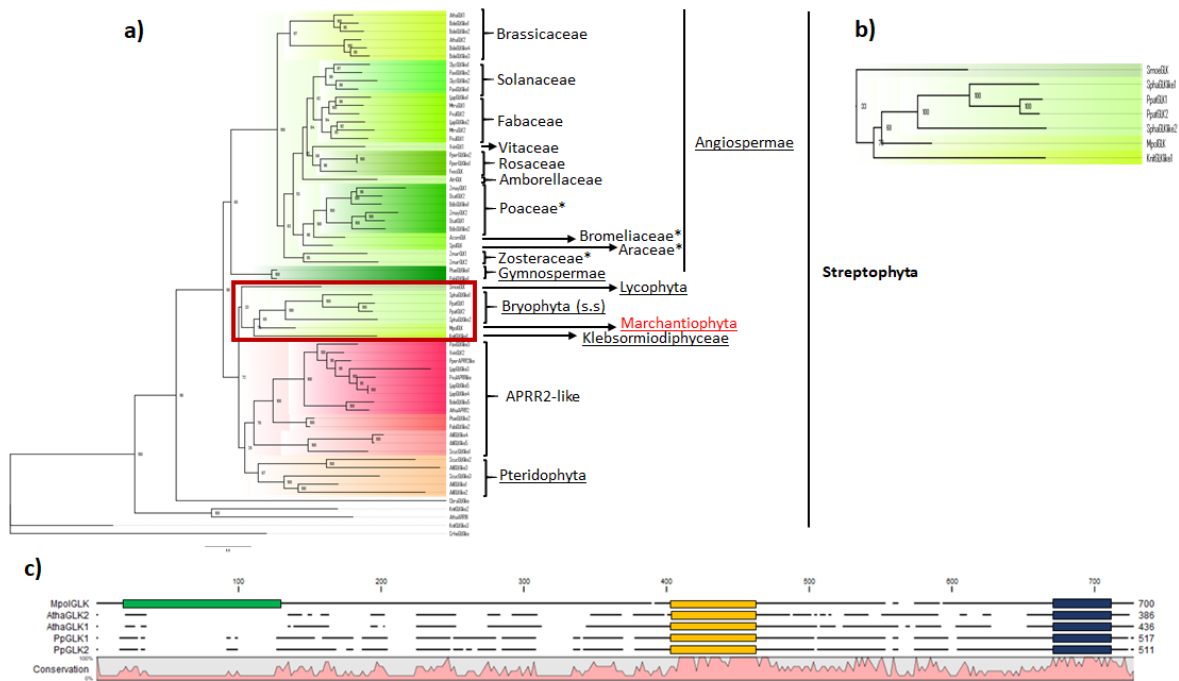


Fig. 25. Filogenia de GLK. El ortólogo de GLK en *M. polymorpha* agrupa con GLKs de algas, Bryophyta (s.s.) y Lycophyta (b). Este clado, a su vez es hermano de los GLKs de espermatofitas y de los APRR (a), otro grupo de factores transcripcionales de la familia GARP. MpGLK, a diferencia de las GLK de Bryophyta y Angiospermas, posee un dominio regulador de respuesta (c) (verde) adicional a aquellos de una GLK estándar, que son el dominio de unión a DNA de tipo HTH Myb (amarillo) y el motivo GCT (azul). GLK parece haber surgido en el ancestro en común de las plantas terrestres, en el grado Streptophyta, pues existe un ortólogo putativo en *K. nitens*.

7.2. Numerosos elementos que participan dentro de la señalización retrógrada emergieron en los ancestros de las Streptophyta

Como se constata en los análisis filogenéticos realizados, cuatro de los factores analizados que están involucrados en la señalización retrógrada biogénica (HY5, IJ1, PAPP5 y RABD8) surgieron desde el ancestro de Viridiplantae. De éstos, IJ1 y RABD8 participan en las vías de señalización derivadas de la expresión del plástido, uno como factor putativo de silenciamiento ribosomal y el otro, directamente estando involucrado en la traducción plástidica, en la elongación del péptido. CIA2 los GLK, GUN1 y SG1, a su vez, emergen en el ancestro en común de Streptophyta ya que ninguno de estos elementos tiene según nuestro análisis un homólogo en *C. reinhardtii*. El número de copias para estos genes es variable, habiendo taxa como Bryophyta (ver *S. fallax* y *P. patens*), en los cuales para algunos de estos genes existen hasta nueve u ocho ortólogos (caso de CIA2) (Fig. 26), lo cual creemos responde directamente a la historia evolutiva de los distintos taxa. En Bryophyta, Brassicaceae, Solanaceae, Poaceae y Fabaceae se han documentado eventos de duplicación total del genoma (WGD, del inglés, *Whole Genome Duplication*), lo cual explica la abundancia de parálogos en las especies pertenecientes a estos taxa (Cannon et al., 2015; Clark & Donoghue, 2018). Por otro lado, existen especies en las cuales estos eventos han sido escasos o nulos, como *M.*

polymorpha (Bowman et al., 2017), razón por la cual, tienen una batería génica más reducida, y que representa una oportunidad de estudio interesante en una red con menor redundancia génica sobre eventos críticos en la evolución de las plantas terrestres, como justamente lo es la emergencia del embrioplasto y su plasticidad para diferenciarse en distintos subtipos de plástidos.

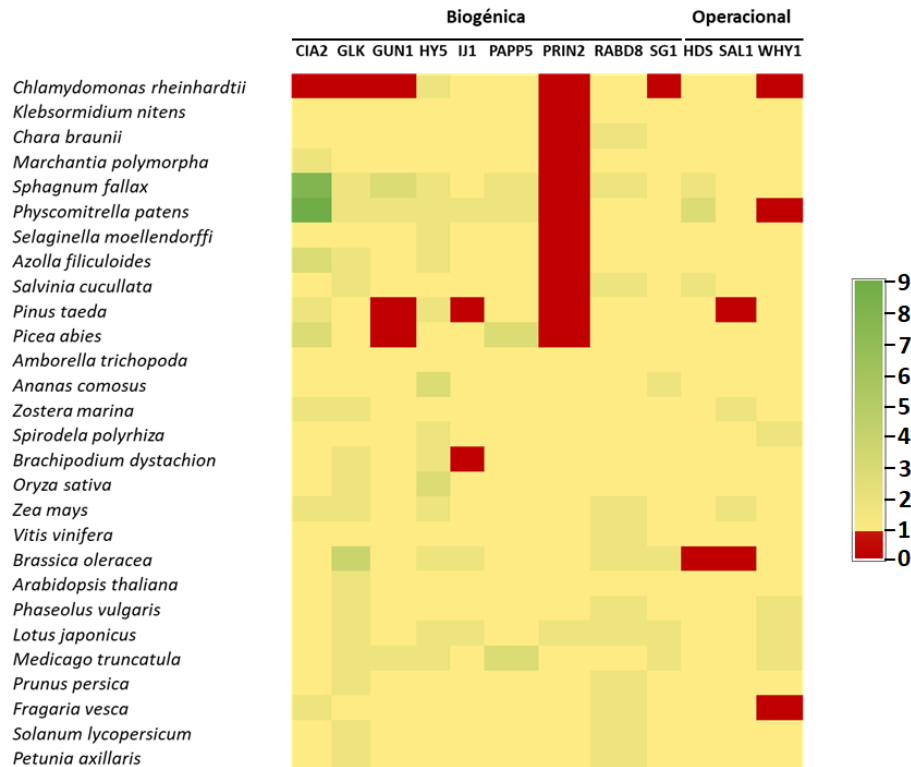


Fig. 26. Conservación de elementos que participan en la señalización retrógrada a lo largo de la evolución de las plantas terrestres. De los 12 elementos que se analizaron, cinco emergieron en el ancestro en común de Streptophyta (CIA2, GLK, GUN1, SG1 y WHY1) y seis son comunes a Chlorophyta y Streptophyta (HY5, IJ1, PAPP5, RABD8, HDS, SAL1). PRIN2 es exclusivo de Angiospermas, como puede observarse, dado que sólo está presente de *A. trichopoda* en adelante.

Con respecto al número de copias por genoma de los elementos analizados, podemos resumir primero que, CIA2, en Bryophyta presenta hasta nueve parálogos, si bien, no se trata del único clado con presencia de más de un homólogo para este factor transcripcional, correspondiendo a nueve de los 26 taxa evaluados este caso. Para los GLKs, se incrementa a 16 de los 26 taxa, mientras que para GUN1, sólo en tres de 24. Para SG1, sólo hay presencia de más de un homólogo en cuatro de 26 taxa (Fig. 26).

En HY5, 14 de los 27 taxa en que se documentó la presencia de esta proteína tienen más de un homólogo putativo para este factor transcripcional, si esto se contrasta inmediatamente con IJ1, PAPP5 y RABD8, se tiene que, sólo en tres de los 25 taxa analizados en que existe IJ1 hay más de un homólogo, en cuatro de los 27 taxa para el caso de PAPP5 y 12 para RABD8 (Fig. 26). PRIN2 es el único de los factores analizados que emerge con el surgimiento de las Angiospermas y, aún en las especies de Angiospermas, sólo existe un homólogo putativo en la mayoría de estas (a pesar de lo previamente mencionado sobre eventos de WGD en algunos clados de Angiospermas) con la sola excepción de *L. japonicus* (Fig. 26).

Con respecto a los factores relacionados con la señalización retrógrada operacional que se analizaron es interesante que de los tres evaluados, dos surgen en el ancestro en común con Chlorophyta (HDS y SAL1), mientras que WHY1 lo hace con el ancestro en común de Streptophyta. Para el caso de HDS, en solo tres de los 27 organismos analizados se presenta más de un gen homólogo, y notoriamente, en Bryophyta y Monilophyta es en dónde se documentan estos eventos de aparición de parálogos. SAL1, por su parte, sólo en *Z. mays* y *Z. marina* presenta dos parálogos, mientras que en el resto de los organismos está presente como un gen único. Finalmente, WHY1 sólo se encuentra en forma de parálogos en plantas de la familia Fabaceae y en *S. polyrhiza* de los 26 genomas nalizados (Fig. 26).

7.3. La sobreexpresión de MpGLK deriva en un fenotipo GLK bona fide

Con el objetivo de ahondar en la función de uno de los genes descritos y su relación con la señalización retrógrada, se generaron líneas sobreexpresoras de MpGLK, usando una construcción que porta el CDS de MpGLK (2.1 Kb) fusionado al epítotope 3xFLAG bajo el promotor de expresión constitutiva *CamV 35S* (Fig. 27) empleando la tecnología *Gateway* (vector *pMpGWB311 + MpGLK CDS*, tal y como se explica en la sección de metodología.



Fig. 27. Construcción para sobreexpresión de MpGLK. El vector contiene un inserto de 2.1 Kb (MpGLK CDS), indicado en color verde; 3xFLAG (color rosa), un promotor de expresión constitutiva (CaMV 35S) y tiene un cassette de resistencia a espectinomomicina (SmR). El vector otorga resistencia a clorsurforón en planta.

La inclusión del epítotope 3xFLAG tuvo como objetivo poder corroborar la sobreexpresión de la proteína por medio de ensayos de *western blot* en las plantas generadas después del evento de

transformación. Para lo cual se agroinfectaron esporas de *M. polymorpha* mediante una cepa de *A. tumefaciens* con el vector. Se obtuvieron un total de 35 líneas independientes sobreexpresoras de MpGLK que eran resistentes a clorsulfurón, en una concentración de 0.5 μ M (resistencia proveída por el vector pMpGWB311, de acuerdo a lo reportado por Ishizaki et al., (2015)). Como puede observarse en la Fig. 28, algunas de las plantas presentaron una tonalidad verde más intensa que las plantas silvestres, lo cual sugeriría que la sobreexpresión de MpGLK incrementa la cantidad de pigmentos (particularmente de clorofilas). Todas las líneas obtenidas se genotipificaron con el objetivo de determinar si eran líneas masculinas o femeninas, ya que como se mencionó *M. polymorpha* es dioica (descripción en la sección de Metodología). De este análisis, se identificaron 13 líneas masculinas ya que éstas amplificaban un fragmento de alrededor de 600 pb correspondiente a un fragmento sólo encontrado en el cromosoma sexual masculino, en contraste al de las líneas femeninas que amplifican un fragmento de aproximadamente 400 pb (igualmente, correspondiente a una región exclusiva del cromosoma sexual femenino) como está reportado en Fujisawa et al., (2001). Se prosiguió trabajando con las líneas macho en los experimentos sucesivos (Fig. 29).

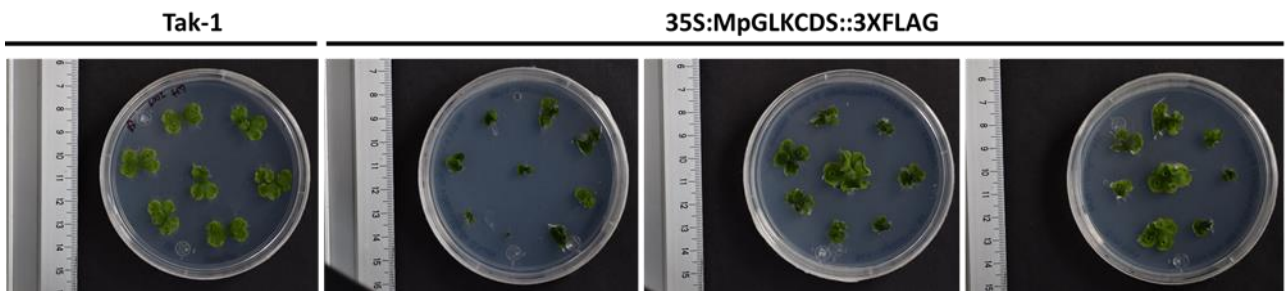


Fig. 28. Primera generación de sobreexpresoras putativas de MpGLK. Se obtuvo un total de 34 líneas putativamente sobreexpresoras (se muestran 25). Varias de éstas presentaban un fenotipo distintivo respecto de aquél de las plantas silvestres: las plantas eran de una tonalidad más intensa de verde.

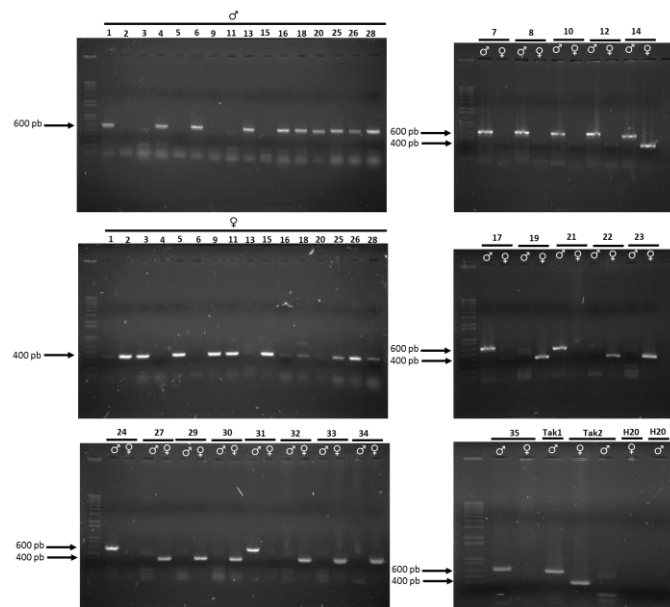


Fig. 29. Genotipificación por sexo de plantas 35S:MpGLKDS::3XFLAG. Se genotipificaron un total de 35 líneas independientes, de las cuales se obtuvieron 13 líneas macho (4, 6, 7, 8, 10, 13, 12, 17, 20, 21, 24, 31 y 35), con las cuales

se prosiguió trabajando. Se indica línea sobreexpresora bajo análisis (por número), si el PCR fue con oligonucleótidos para amplificar un fragmento exclusivo del cromosoma masculino (σ) o del femenino (φ). Controles positivos: gDNA de Tak-1 (silvestre macho) y Tak-2 (silvestre hembra). Controles negativos: gDNA de Tak-2 con oligonucleótidos para amplificar fragmento del cromosoma masculino y reacciones sin gDNA (H_2O).

Derivado de la observación de que varias de las líneas putativamente sobreexpresoras de *MpGLK* (*MpGLK* OE) tenían una coloración de un verde más intenso que la silvestre, se procedió a extraer pigmentos y cuantificar los niveles de clorofilas y carotenos en las 13 líneas macho aisladas, de acuerdo con el protocolo de (Lichtenthaler & Buschmann, 2001a, 2001b).

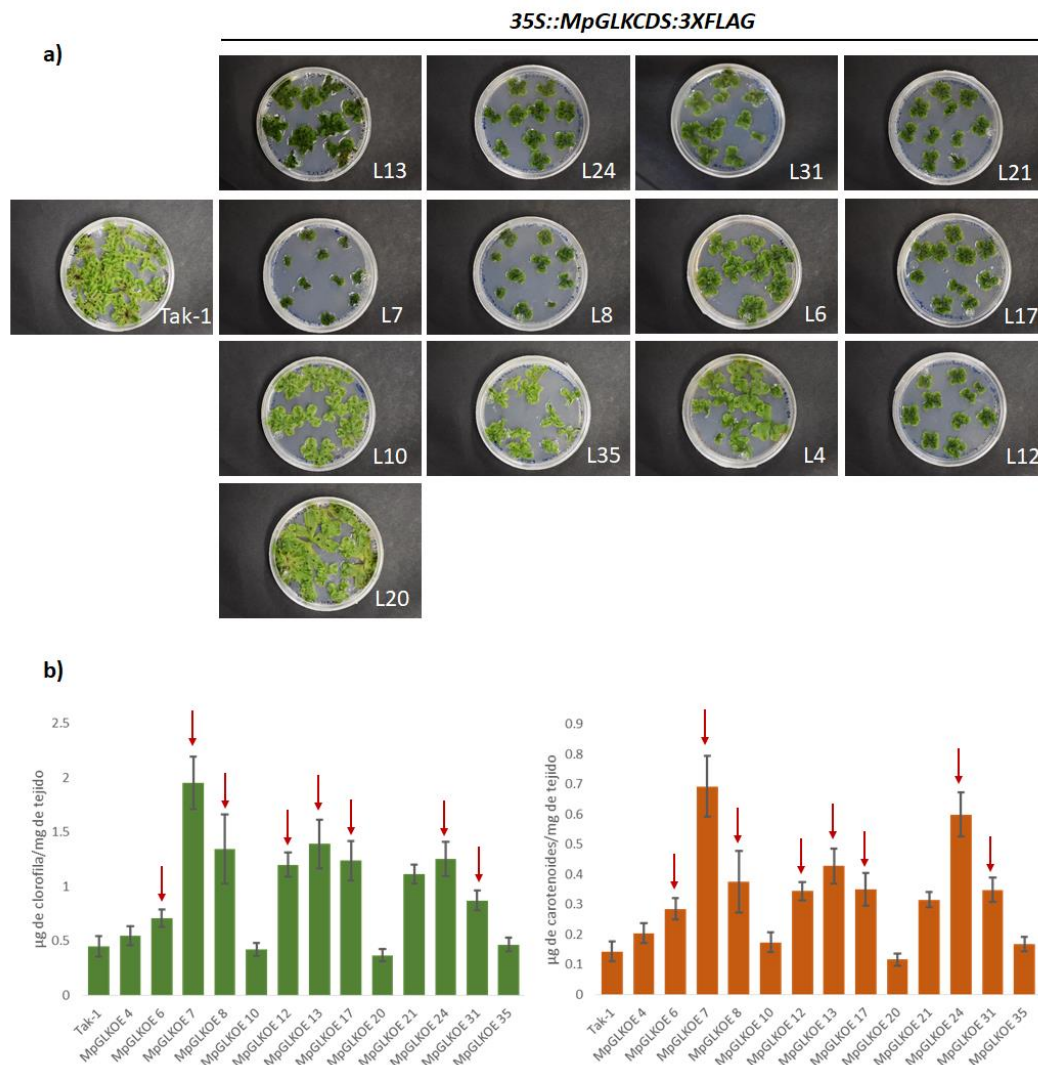


Fig. 30. Las plantas putativamente sobreexpresoras de *MpGLK* en *M. polymorpha* acumulan mayor cantidad de pigmentos que las plantas silvestres (Tak-1). La sobreexpresión de *MpGLK* en *M. polymorpha* deriva en un fenotipo más verde que el de plantas silvestres (a). El fenotipo está directamente relacionado con el incremento en la acumulación de pigmentos, sean éstos clorofilas (b) o carotenoides (c). Sólo tres líneas acumulan pigmentos de una manera semejante a la silvestre (6, 10 y 35), una poco más que ésta (4) y las demás, acumulan de dos hasta cuatro veces más pigmentos (b y c). Las flechas rojas indican las líneas en las cuales hay mayor acumulación de pigmentos que en las plantas silvestres.

Como puede apreciarse en la Fig. 30, la acumulación de pigmentos en las líneas sobreexpresoras putativas es significativamente superior a aquella de la silvestre, alcanzando en algunas líneas

valores hasta cuatro veces (línea 7), o tres veces (líneas 8, 12, 13, 17, 21 ó 24) más. El incremento en la cantidad de pigmentos se dió en la misma proporción para clorofilas como para carotenos, siendo las líneas que acumulan más clorofilas también las que acumulan mayor cantidad de carotenoides.

Con el propósito de corroborar que existía una correlación entre el incremento de la acumulación de pigmentos y la acumulación de MpGLK, se realizó un ensayo de proteína:proteína tipo *western blot*, en el cual se incluyeron cinco de las líneas sobreexpresoras (6, 7, 12, 13 y 24) y la planta silvestre, como control negativo. El ensayo reveló que, en efecto, estas plantas están acumulando MpGLK fusionado al epítotope *3XFLAG* (Fig. 31a). El nivel de acumulación de la proteína es variable entre las distintas líneas sobreexpresoras, como era de esperarse debido al sitio de inserción, aunque, existe una correlación entre aquellas que acumulan más proteína con la acumulación de más pigmentos (Fig 31a, c y d).

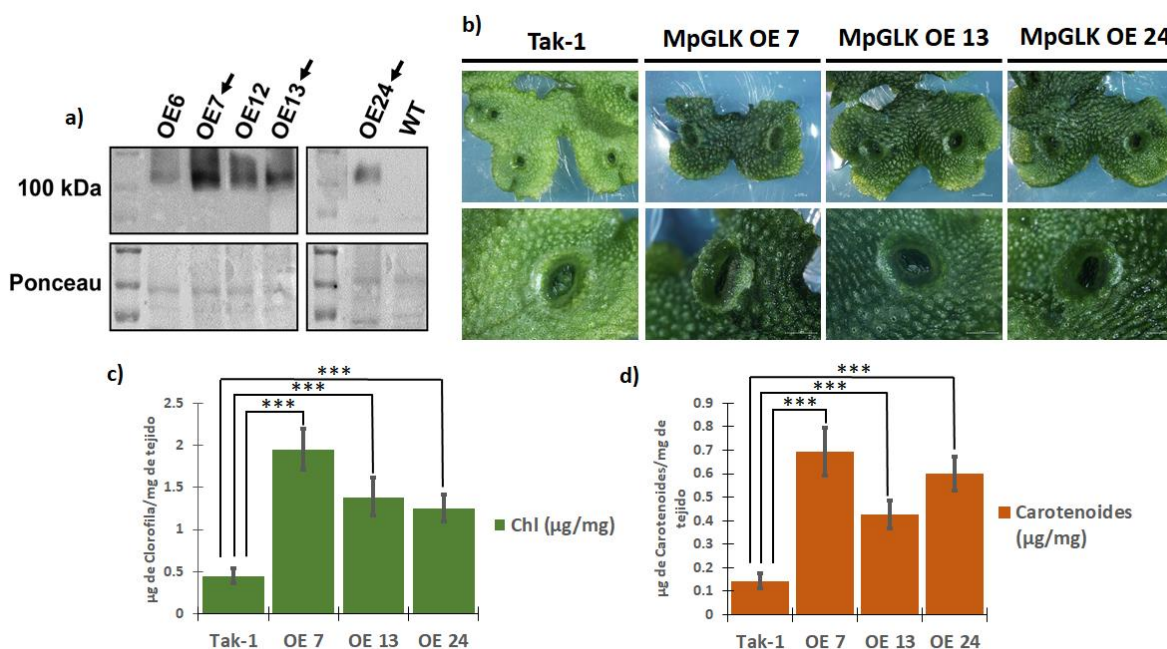


Fig. 31. La sobreexpresión de MpGLK correlaciona con el fenotipo de las plantas. La acumulación de MpGLK en las líneas sobreexpresoras 7, 13 y 24 (a) correlaciona con un fenotipo de coloración verde más intensa (b) y con la acumulación en mayor o menor cantidad de pigmentos respecto a lo que ocurre en las plantas silvestres (Tak-1) ($p < 0.001$). Ponceau usado como control de carga, de cada muestra se cargó un total de 20 µg de proteína (a). Se utilizó un extracto proteico de las plantas silvestres (WT) como control negativo.

De estas cinco líneas, se prosiguieron analizando tres para caracterizar más a profundidad su fenotipo: MpGLK OE7, MpGLK OE13 y MpGLK OE24. Las tres líneas acumulan MpGLK y acumulan significativamente mayor cantidad de pigmentos que las plantas silvestres (Fig. 31b, c y d) con un valor de $p < 0.001$ (MpGLK OE7, $p = 8.79 \times 10^{-16}$; MpGLK OE13, $p = 2.71 \times 10^{-9}$; MpGLK OE24, $p = 2.74 \times 10^{-13}$).

Posteriormente, se decidió analizar si existían defectos en el desarrollo de *M. polymorpha* por la sobreexpresión de MpGLK, para lo cual se realizó un seguimiento del desarrollo de talos de las plantas sobreexpresoras y silvestres durante un periodo de 25 días, documentando con imágenes

cada 5 días. El desarrollo de *M. polymorpha* se define mediante el número de divisiones que registra el talo conforme pasa el tiempo (plastocrones). Cada nueva bifurcación, determina la entrada a un nuevo plastocrón y, cada bifurcación, está asociada a la emergencia de nuevos nodos o muescas apicales, correspondientes a nuevos meristemas. Durante el primer plastocrón (días 0 a 6 post-siembra o DPS), la gema primero se expande lateralmente y, después, sus cuatro lóbulos comienzan a expandirse de manera divergente. En la entrada al segundo plastocrón (7 DPS) ocurre la primera bifurcación, asociada a la emergencia dos nodos apicales en cada extremo del talo y la formación del lóbulo central, posterior a lo cual, el lóbulo central se expande, dando lugar al alejamiento de los nodos apicales (divergencia apical), al cesar la expansión del lóbulo central, éste transiciona de una forma convexa a una cóncava, lo cual determina la formación de un nuevo punto de bifurcación o ramificación (Fig. 32). La transición del plastocrón 1 al plastocrón 2 determina la entrada a un tipo de crecimiento adulto de la gema y, en los plastocrones 3 en adelante, se repiten los procesos asociados con la transición al plastocrón 2, con la nueva generación de nodos o muescas apicales, proseguida por la expansión del lóbulo que se forma entre ellos hasta la formación de un nuevo punto de ramificación (Solly et al., 2017).

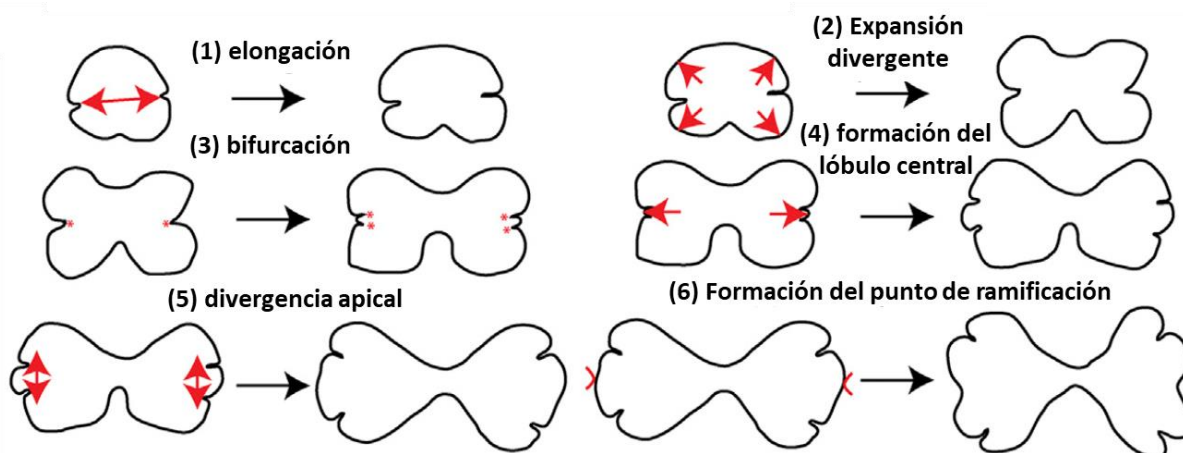


Fig. 32. Fases del desarrollo del talo de *M. polymorpha*. El primer plastocrón representa un tipo de crecimiento juvenil de la gema y está caracterizado por los pasos de elongación (1) y expansión divergente de los lóbulos (2), hasta la bifurcación (3). Este último paso determina la transición hacia el plastocrón 2, con lo cual se transiciona a un tipo de crecimiento adulto, caracterizado por la formación del lóbulo central (4) posterior a la bifurcación (3) de los nodos apicales, con la consecuente divergencia de los nodos apicales (5) y concluyendo con la formación de nuevos puntos de ramificación una vez cesa el crecimiento del lóbulo central. Modificado de Solly et al., (2017).

La evaluación del desarrollo de las plantas sobreexpresoras de MpGLK respecto a sus contrapartes silvestres, reflejó que hay un retraso en el desarrollo. Durante los primeros 15 días del desarrollo de los talos, las plantas silvestres se encuentran en los plastocrones 1 y 2 (Solly et al., 2017), estos días caben dentro de la cinética de crecimiento que se realizó en los puntos 0 DPS, 5 DPS, 10 DPS y 15 DPS. Durante los primeros dos puntos de la cinética (0 y 5 DPS), no se observó diferencia alguna en el crecimiento, y las diferencias comenzaron a manifestarse en los estadios del segundo plastocrón en adelante, lo cual fue notorio en la formación de los nodos o muescas apicales que está retrasada en las sobreexpresoras, teniendo éstas menos nodos apicales que sus contrapartes silvestres en los días 10 y 15 (Fig. 33a, flechas). Al día 10, todas las plantas silvestres se encuentran ya dentro del

plastocrón 2, mientras que, algunas de las plantas sobreexpresoras aún están en el plastocrón 1 (44% de los individuos de la línea 7, 16.67% de los de la línea 13 y 11.11% de los de la línea 24) (Fig. 33b). Es claramente notable que en el estadio de 15 DPS, las plantas silvestres presentan entre 7 y 8 muscas apicales separadas ya por un lóbulo central, mientras que, en las sobreexpresoras, oscila entre 3 y 5, a semejanza del estadio de 10 días en plantas silvestres (Fig. 33a). Este retraso se acentúa en la transición hacia los plastocrones siguientes; hacia el día 20, casi todas las plantas silvestres han ya pasado al plastocrón 3 (88.89%), mientras que, los individuos evaluados de las líneas MpGLKOE aún se encuentran en el plastocrón 2. Para el día 25, todas las plantas silvestres están en el plastocrón 3, en cambio, en las plantas MpGLK OE hay variación entre las tres líneas, con dos en las cuales la mayoría de los individuos se encuentran aún en el plastocrón 2 (OE7 con 100% y OE13 con 88.89%), y una en la que 77.78% de sus individuos están el plastocrón 3 (Fig. 33b). Este retraso en el desarrollo podría estar relacionado con el estrés metabólico que implica exacerbar la producción de fotosintatos, asociado a la sobreexpresión de una GLK.

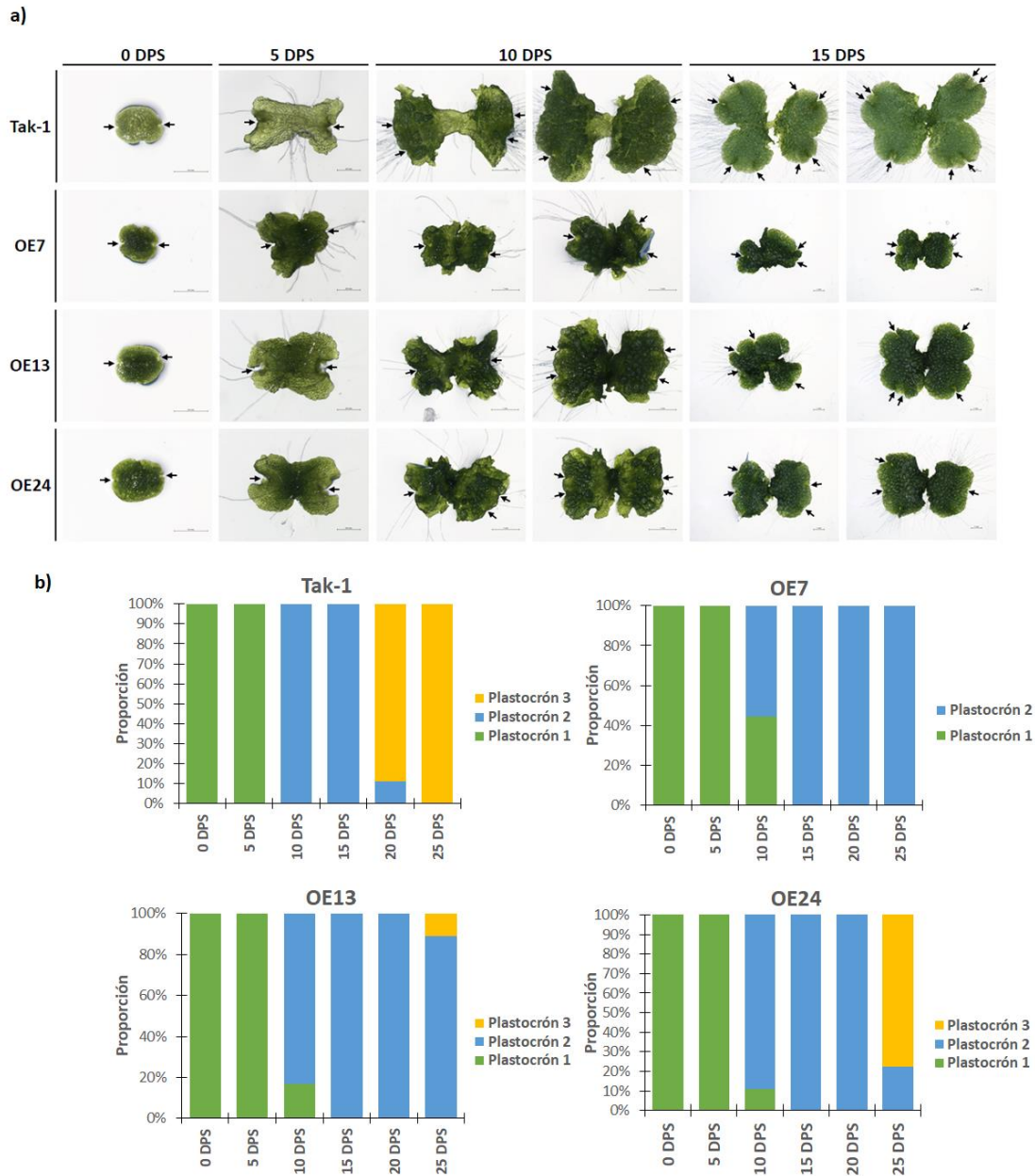


Fig. 33. El desarrollo en las plantas MpGLK OE está retrasado respecto al de plantas silvestres de *M. polymorpha*. (a) De los días 0 a 5, las plantas tanto silvestres como sobreexpresoras cuentan con sólo dos muescas o nodos apicales a cada extremo del talo (flechas), hacia el día 10, las silvestres tienen 4, mientras este número es de entre 2 y 4. Hacia el día 15, las silvestres tienen 7 u 8 muescas apicales, mientras que las sobreexpresoras tienen 3 ó 4. (b). El desarrollo en plantas MpGLK OE está ralentizado respecto a lo que ocurre en las plantas silvestres. De los días 0 a 15, las plantas se encuentran dentro de los estadios de los plastocrones 1 y 2, hacia el día 10, las plantas silvestres están ya en el plastocron 1 aún (OE7=44.44%, OE13=16.67%, OE24=11.11%), para el día 20, 88.89% de las silvestres están en el plastocron 3, mientras que todas las sobreexpresoras están aún en el plastocron 2; para el día 25 todas las silvestres están en el plastocron 3, en cambio, en la mayoría de las líneas sobreexpresoras, casi todos los organismos evaluados siguen en el plastocron 2.

Continuando los análisis de la caracterización fenotípica de las plantas que sobreexpresan MpGLK, se procedió a realizar cortes histológicos frescos transversales en plantas silvestres y

sobreexpresoras de las mismas líneas que fueron previamente evaluadas (MpGLK OE 7, 13 y 24). Los cortes se realizaron con navajas en plantas de 30 DPS y se analizaron al microscopio tanto en campo claro como con lámpara UV, para evidenciar la fluorescencia de la clorofila y definir el estado de los plástidos en las distintas capas celulares del talo de *M. polymorpha*, así como, si existían o no alteraciones morfológicas en estas plantas.

De manera transversal, se pueden distinguir en un talo de *M. polymorpha* varios tejidos (Fig. 34), desde su dominio adaxial hacia el abaxial. Primero, los poros aéreos, análogos en función a los estomas; inmediatamente debajo de éstos, una región asimilatoria (activa fotosintéticamente), correspondiente al mesófilo, una región de almacenamiento (no fotosintética), compuesta por varias capas celulares y, finalmente, una epidermis ventral, en la cual se localizan las escalas ventrales y de la cual derivan dos tipos de rizoides: los lisos que son prolongaciones de una sola célula y los rugosos compuestos por varias células (Shimamura, 2016).

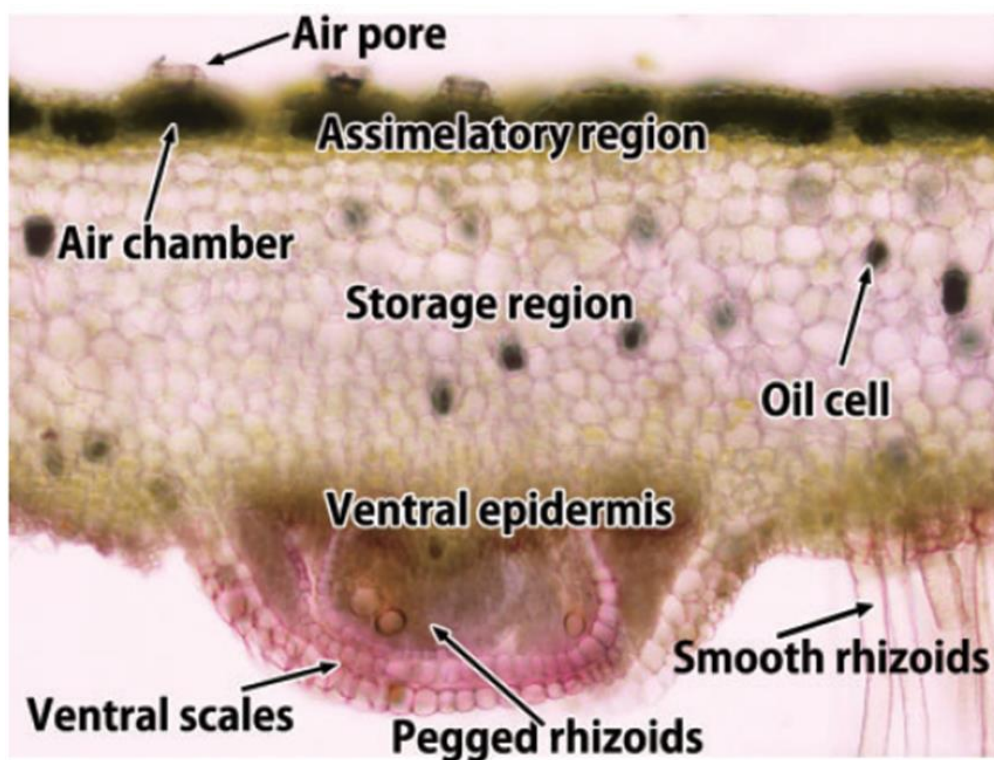


Fig. 34. Histología de un talo de *M. polimorpha*. El talo de *M. polymorpha* presenta una morfología simple en la cual es posible distinguir tejidos y regiones. Los poros aéreos y la región asimilatoria (mesófilo), cumplen con la función fotosintética. Inmediatamente debajo de ésta, se localiza la región de almacenamiento (no activa fotosintéticamente), después de esta, se encuentra la epidermis ventral, las escalas y los rizoides. De estos últimos existen dos tipos: lisos, conformados por prolongaciones de una sola célula, y rugosos, que son multicelulares. Tomado de Shimamura, (2016).

En las plantas silvestres de 30 DPS, se observó una morfología semejante a la descrita arriba. Es posible distinguir en las plantas la región asimilatoria con sus poros aéreos, la región de almacenamiento (con poca presencia de plástidos fotosintéticos), la epidermis ventral y los rizoides. Y, si se observan las imágenes de fluorescencia, prácticamente no hay fluorescencia de clorofila en torno a la región de almacenamiento. No obstante, al comparar con lo que sucede en las líneas sobreexpresoras, es notorio que tanto la región asimilatoria como la de almacenamiento parecen ser más gruesas y, en ésta última, las células aparentemente son más grandes. A su vez, en torno a

la región de almacenamiento, se observa abundante fluorescencia de la clorofila, lo sugiere que, en estas células hay plástidos fotosintéticos. Estos resultados refuerzan la idea de que MpGLK sea un ortólogo funcional de GLK, puesto que está induciendo la diferenciación hacia cloroplastos en tejidos que normalmente no son fotosintéticos. Asimismo, relacionado con lo observado en cuanto al tamaño de las regiones asimilatoria y de almacenamiento, si se mide el grosor total del talo de estas plantas, éste es significativamente más ancho en las MpGLK OE que en las Tak-1 ($p < 0.001$). Las Tak-1 en promedio miden $5509 \mu\text{m}$ de ancho, mientras que las líneas OE miden $9567.15 \mu\text{m}$ (OE7, $p = 3.1 \times 10^{-7}$), $8431.19 \mu\text{m}$ (OE13, $p = 3.21 \times 10^{-4}$) y $8585.34 \mu\text{m}$ (OE24, $p = 1.45 \times 10^{-4}$) (Fig. 35).

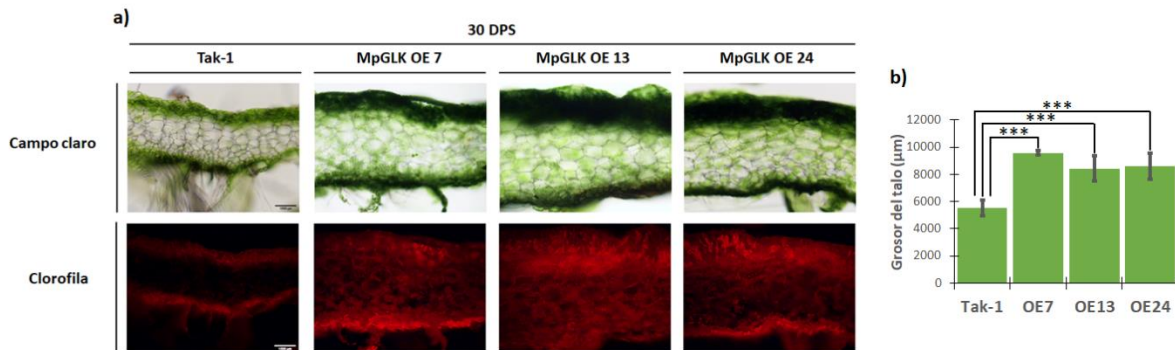


Fig. 35. La sobreexpresión de MpGLK induce la diferenciación hacia plastidos fotosintéticos en la región de almacenamiento y altera la morfología del talo. En plantas silvestres (Tak-1), la fluorescencia de la clorofila se limita a la epidermis adaxial y a la abaxial o ventral, mientras que, en las sobreexpresoras, hay fluorescencia también en la región de almacenamiento (a); a su vez, las células de la región de almacenamiento son más grandes que en plantas silvestres, así como sus talos son significativamente más gruesos ($p < 0.001$) (b).

GLK en angiospermas está reportado como un regulador positivo del desarrollo del cloroplasto, y con base en la evidencia presentada en las figuras 31 y 35, que correlaciona la acumulación de MpGLK con un incremento en la acumulación de pigmentos en estas plantas y que al parecer esta sobreexpresión está induciendo aparentemente también la diferenciación hacia cloroplastos en regiones que en plantas silvestres no son fotosintéticamente activas, resultaba importante estudiar la ultraestructura de los plástidos de estas plantas, respecto a lo que ocurre en plantas silvestres.

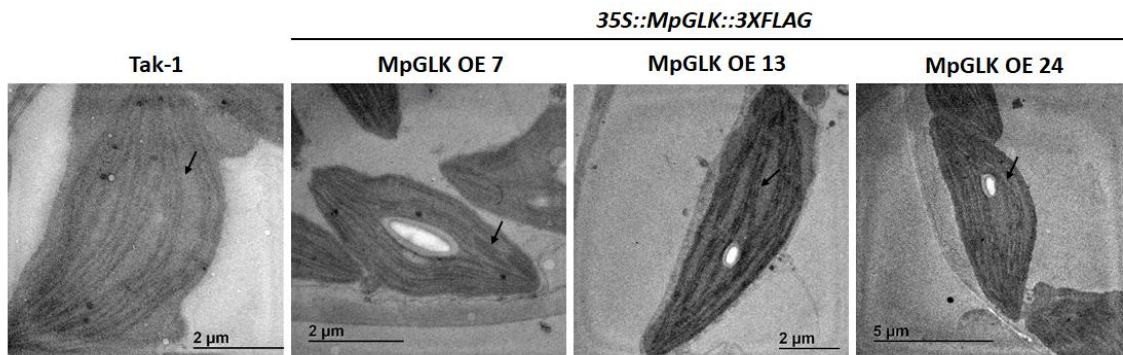


Fig. 36. Los cloroplastos de las plantas sobreexpresoras de MpGLK acumulan almidón y parecen tener un sistema de grana y tilacoides más complejo. Los cloroplastos de las plantas MpGLK son de un tamaño similar a los de las plantas silvestres, si bien, presentan un arreglo diferente a nivel de la ultraestructura de los tilacoides. Éstos se encuentran en un estado menos laxo que en plantas silvestres; asimismo, contrario a lo que ocurre en las silvestres, acumulan grandes

cantidades de almidón, al menos en dos de las líneas analizadas. Las flechas señalan los tilacoides, más densamente empaquetados en las sobreexpresoras que en la silvestre.

Al analizar la ultraestructura de los cloroplastos de las plantas MpGLK OE, se observó que éstos son muy parecidos a aquellos de las plantas silvestres (Fig. 36), con la salvedad de que los primeros, acumulan grandes cantidades de almidón, y que sus sistemas de endomembranas, tanto tilacoides como grana son más densos (se observan más electrodensos que en sus contrapartes silvestres). La mayor acumulación de almidón podría sugerir que en estas plantas existe un exceso en la producción de fotosintatos por lo que éste se deriva a su almacenamiento en forma de almidón. Este hecho también correlaciona con la mayor acumulación de clorofilas y carotenoides en estas plantas, los cuales se acoplan a los complejos antena, anclados en los tilacoides. Esto apoya que podría haber cambios en la ultraestructura de los cloroplastos de estas plantas en respuesta a la sobreexpresión de MpGLK como las modificaciones en el sistema de endomembranas o en el tamaño de los cloroplastos, dado que GLK induce la expresión de los PhANGs, pensando en que la función de este factor transcripcional está conservada; o a que hubiese mayor cantidad de cloroplastos. El análisis de la ultraestructura (figura 36), donde se observa que los cloroplastos de las OE presentan un empaquetamiento más denso de sus tilacoides, apoya la primera hipótesis, más que el hecho de que sus cloroplastos pudieran ser más grandes.

Con el propósito de confirmar que hay mayor acumulación de almidón en las plantas sobreexpresoras de MpGLK respecto a las silvestres, se procedió a analizar la acumulación de almidón a diferentes tiempos durante el desarrollo de *M. polymorpha*, por medio de tinción por lugol en tres estadios de desarrollo: 1 día post-siembra (DPS), 3 DPS y 7 DPS. Con este objetivo primero se fijó el tejido de las plantas a evaluar con una solución de FAE (10:5:50) por 16 h, después se removió la clorofila de las plantas con una solución de Et-OH (70%) por 3 días y, posteriormente, se tiñó con lugol (100%) por 1 min. Las muestras se montaron en placas con medio B5 para su análisis por microscopía.

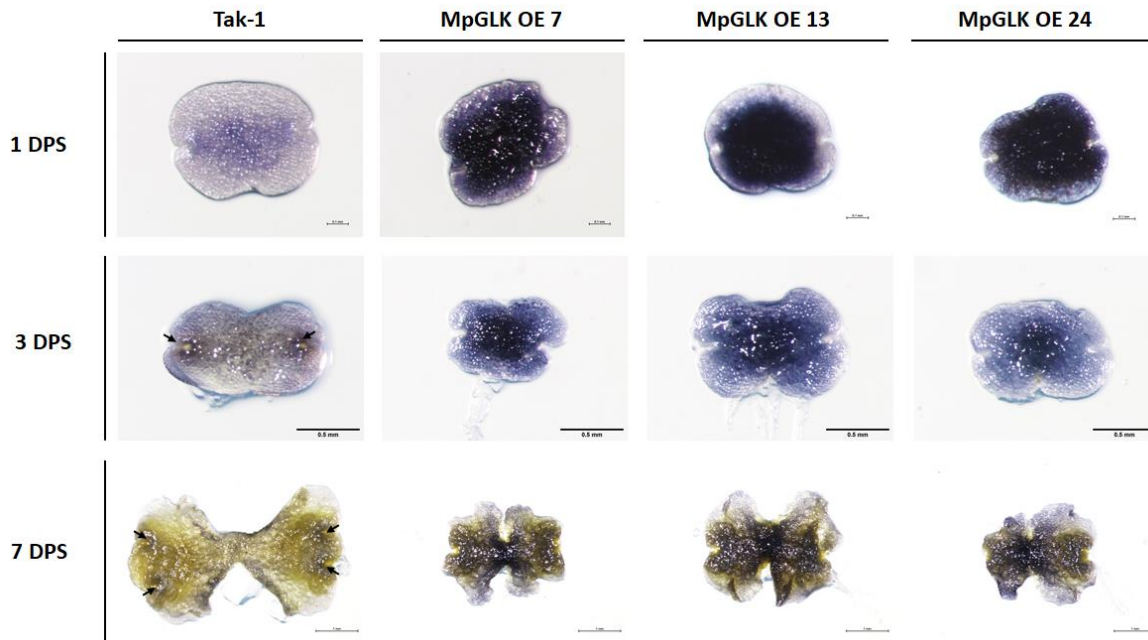


Fig. 37. La sobreexpresión de MpGLK deriva en mayor acumulación de almidón que en plantas silvestres. En el estadio de 1 DPS, en las plantas silvestres (Tak-1) la tinción se observa en torno al centro de las gemas en desarrollo, mientras que, en las sobreexpresoras, está en la totalidad de la gema. El patrón de acumulación de almidón para las plantas silvestres de 3 y 7 DPS es en torno a los meristemos, mientras que en las líneas sobreexpresoras, se observa en la práctica totalidad del talo. Plantas crecidas por uno, tres y siete días, respectivamente en medio B5 0.5 x + 0.5% Sac, fijadas y teñidas con lugol.

En las plantas silvestres 1 DPS, existe acumulación de almidón en torno al centro de la gema en desarrollo, pero en las plantas sobreexpresoras, la acumulación es global y, la tinción es mucho más intensa (Fig. 37). En las plantas a los 3 DPS la acumulación de almidón en las silvestres se limita únicamente a las regiones meristemáticas, mientras que, en las tres líneas sobreexpresoras, hay acumulación clara de éste prácticamente en todo el talo. Este fenómeno es más patente en la línea OE 7 (Fig. 37). Como ya se describió las plantas sobreexpresoras parecen tener un retraso en el crecimiento respecto de las plantas silvestres. A los 7 DPS, la presencia de cantidades importantes de almidón persiste en casi todo el tejido en las líneas sobreexpresoras, mientras que, en las plantas silvestres es detectable únicamente en torno a los meristemos, semejante al patrón observado a los 3 DPS (Fig. 37). La coloración amarillenta que se observa en las plantas silvestres y algunas de las sobreexpresoras deriva de la acumulación de algunos pigmentos que no se pudieron eliminar de las plantas a pesar de que se sometieron a un proceso de desteñido.

La acumulación ectópica de almidón en las líneas sobreexpresoras también podría ser resultado de un desbalance en su síntesis, su degradación, o su transporte. Sin embargo, basados en los reportes sobre la función de GLK en otros organismos modelo, como *A. thaliana* o *P. patens*, en los cuales, esta proteína es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la actividad fotosintética (Yasumura et al., 2005 Waters et al., 2008; Waters et al., 2009), hipotetizamos que en estas plantas hay mayor síntesis de fotosintatos; que esto es también congruente con la mayor cantidad de clorofilas y carotenoides que presentan estas plantas. Por lo tanto, hipotetizamos que el desbalance

en el metabolismo del almidón quizá deriva de la mayor síntesis de éste, en respuesta a la cantidad de fotosintatos generados por los cloroplastos de estas plantas.

Prosiguiendo con la caracterización de la función de MpGLK se decidió crecer a las plantas en distintas condiciones de luz y analizar su respuesta fotomorfológica. Se utilizaron dos condiciones experimentales: luz baja ($6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) y oscuridad absoluta ($0 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), en adición a las condiciones control de luz a la cual siempre se crece a *M. polymorpha* ($75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Las plantas se crecieron en medio B5 0.5 x + 0.5 % Sac por 14 días, después de los cuales, se observaron y se colectó tejido para la cuantificación de pigmentos. Cabe mencionar que no se extrajeron pigmentos de las plantas crecidas en oscuridad absoluta por la poca cantidad de tejido recuperado.

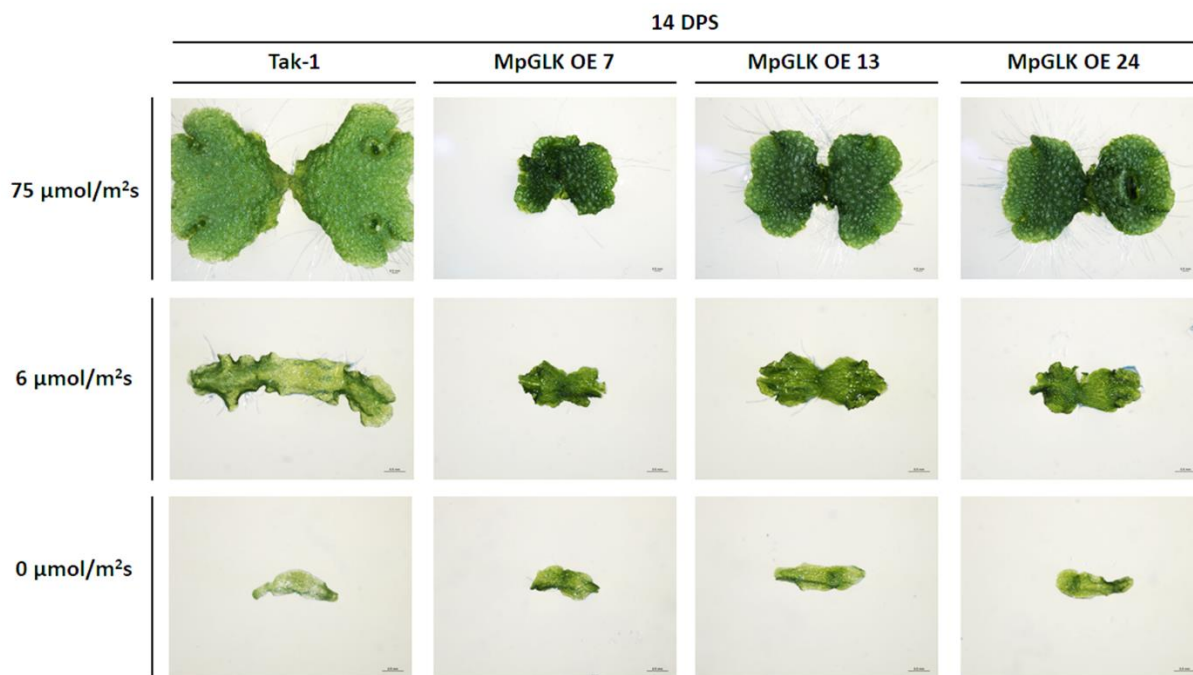


Fig. 38. Las plantas sobreexpresoras de MpGLK continúan teniendo un fenotipo más verde que las silvestres aún en condiciones de baja luz. Se crecieron plantas de *M. polymorpha*, tanto silvestres como sobreexpresoras por 14 días en medio B5 0.5 x + Sac 0.5% en tres condiciones de luz: $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, $6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y $0 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. En las tres condiciones se observa que en las líneas sobreexpresoras se conserva pigmentación mayor que en las plantas silvestres y a baja luz, en condiciones en las cuales *M. polymorpha* (Tak-1) se etiola, las sobreexpresoras no lo hacen.

Como resultado de este análisis se observó que, las líneas sobreexpresoras de MpGLK conservan una coloración más verde que plantas silvestres en las dos condiciones de luz y que a diferencia de lo que ocurre en plantas silvestres, éstas no se encuentran etioladas a una condición baja de luz (Fig. 38). Con el objetivo de obtener un dato cuantitativo de estas diferencias, se midieron los pigmentos de las plantas crecidos bajo condiciones control ($75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) y a baja luz ($6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

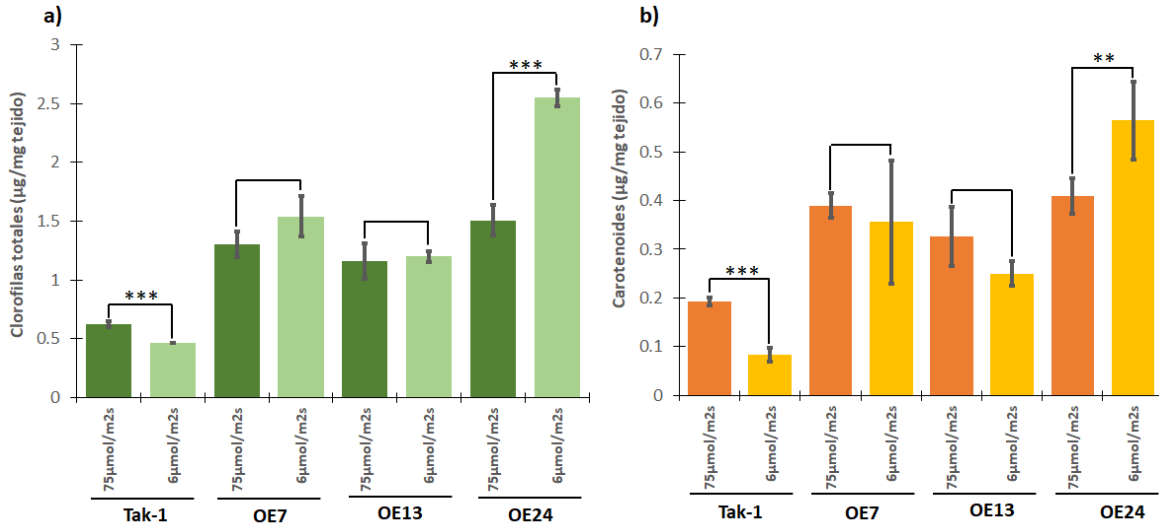


Fig. 39. La sobreexpresión de MpGLK deriva en un fenotipo de insensibilidad a la percepción de luz baja. El crecimiento en luz baja (barras verde claro y amarillo), en plantas silvestres induce que disminuya la síntesis de clorofilas y carotenoides (Tak-1), no obstante, en las líneas sobreexpresoras la síntesis de pigmentos permanece igual (o incluso aumenta) que en condiciones de luz normal (barras verde oscuro y naranja). Las plantas se crecieron a 75 μmol/m²s (control) o a 6 μmol/m²s (experimental) en medio B5 0.5 x + Sac 0.5%.

La cuantificación de pigmentos mostró que en las sobreexpresoras de MpGLK, a diferencia de lo que ocurre con las líneas silvestres, no hay disminución en la cantidad de pigmentos cuando son crecidas en condiciones de baja luz (Fig. 39). Basados en lo que se ha reportado en *A. thaliana*, el hecho de que no haya regulación negativa de la síntesis de pigmentos en estas líneas puede ser explicado porque a diferencia de lo que ocurriría en plantas silvestres donde en una baja intensidad de luz la expresión de los genes PhANGs relacionados con la fotosíntesis estaría reprimida, en estas líneas sobreexpresoras debido a que hay una cantidad constante de MpGLK, éste regularía positivamente a estos genes que participan en la síntesis de tetrapirroles (precursores de la síntesis de clorofilas), y de la vía de síntesis de carotenoides como *PSY* (primera enzima de la vía), así como genes codificantes para los complejos antena de los fotosistemas; por lo cual se siguen sintetizando estos pigmentos, como si la planta estuviese creciendo en condiciones de luz normal (Waters *et al.*, 2009), por lo que existe un desacoplamiento de la regulación por luz.

7.4. Mutagénesis de *MpGLK* por medio de CRISPR/Cas9

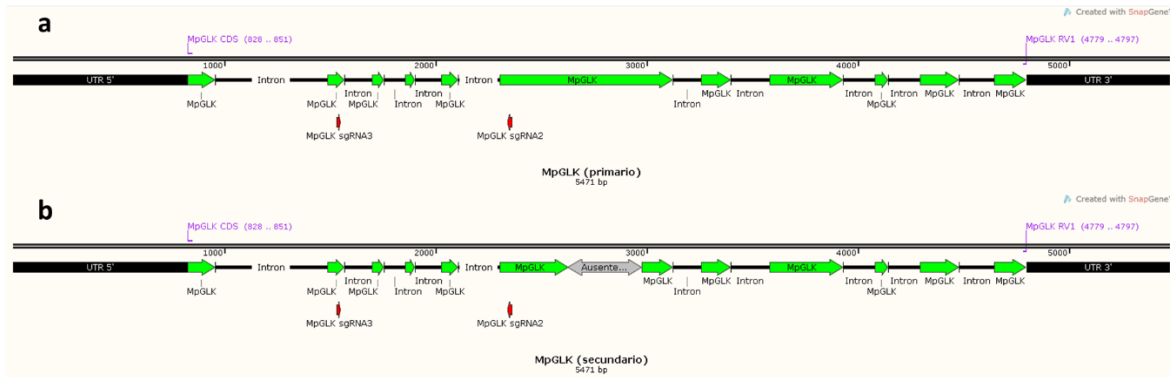


Fig. 40. Diagramas del gen *MpGLK* ilustrando las secuencias de los distintos mRNAs derivados de éste. Del gen de *MpGLK* se derivan dos mRNAs, uno de 2103 pb (a) y uno de 1758 pb (b). En recuadros negros se ilustran los UTR (5' y 3'), en recuadros verdes los exones y, en líneas continuas negras, los intrones. El recuadro gris en (b) refiere a la región ausente en el mRNA más pequeño, respecto de lo que ocurre en el de mayor tamaño, dentro del sexto exón del gen. En recuadros rojos se indican los sgRNAs utilizados para la mutagénesis con CRISPR/Cas9.

Para continuar con la caracterización funcional del factor de transcripción *MpGLK* se siguió como estrategia generar líneas mutantes utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Para este propósito se diseñaron dos sgRNAs, que se esquematizan en la Fig 40. El gen *MpGLK* en *M. polymorpha* está compuesto por 11 exones y 10 intrones, con un UTR 5' de 827 pb y un UTR 3' de 671 pb. De este gen, existen dos mRNAs maduros documentados, uno de 2103 pb, y otro de 1758 pb, los cuales se diferencian por *splicing* alternativo (por retención de intrón) en el sexto exón, lo que deriva en que, en el mRNA maduro más pequeño, estén ausentes 345 pb de dicho exón (Fig. 40). Estos 345 pb corresponden a 115 aa justo después del dominio regulador de respuesta de *MpGLK*

Se generó un vector de entrada para cada sgRNA (*pMpGE_En03 + MpGLK sgRNA2* y *pMpGE_En03 + MpGLK sgRNA3*) y dos vectores de expresión que contienen el gen que codifica para Cas9, así como a *MpGLK sgRNA2* o *MpGLK sgRNA3* (según sea el caso) y su *scaffold RNA* (*pMpGE011 + MpGLK sgRNA2* o *pMpGE011 + MpGLK sgRNA3*). El guía *MpGLK sgRNA 2* tiene como blanco el sexto exón de *MpGLK*, mientras que el del guía *MpGLK sgRNA3* es su segundo exón (Fig, 40). Para el vector de entrada se empleó el vector *pMpGE_En03* digerido por la enzima *BsaI* y, después se realizó una reacción de ligación para clonar *MpGLK sgRNA2* o *MpGLK sgRNA3*. Posteriormente se generó el vector de expresión para lo cual el vector de entrada se recombinó con el vector *pMpGE011* (mismo que porta a Cas9 y un *cassette* de resistencia a clorsulfurón) para clonar el sgRNA por medio de la tecnología *Gateway* (Fig. 42). La construcción del *MpGLK sgRNA3* fue generada por la Dra. Kenny Alejandra Agreda Laguna, quien es colaboradora en el proyecto y quien también realizó la transformación de esporas de *M. polymorpha* con dicho vector.

al., 2018)). Se genotipificaron 20 de estas líneas para verificar si eran hembras o machos a partir de DNA por PCR con oligonucleótidos específicos que amplificaban fragmentos del cromosoma sexual masculino (fragmento de alrededor de 600 pb) o del femenino (alrededor de 400 pb) (Fig. 43). De este análisis se eligieron 4 líneas macho (9, 16, 22 y 42) y una línea hembra (28) y de estas se amplificó una región de 418 pb alrededor de la región que reconoce el guía MpGLK sgRNA2 donde se obtendría las mutaciones.

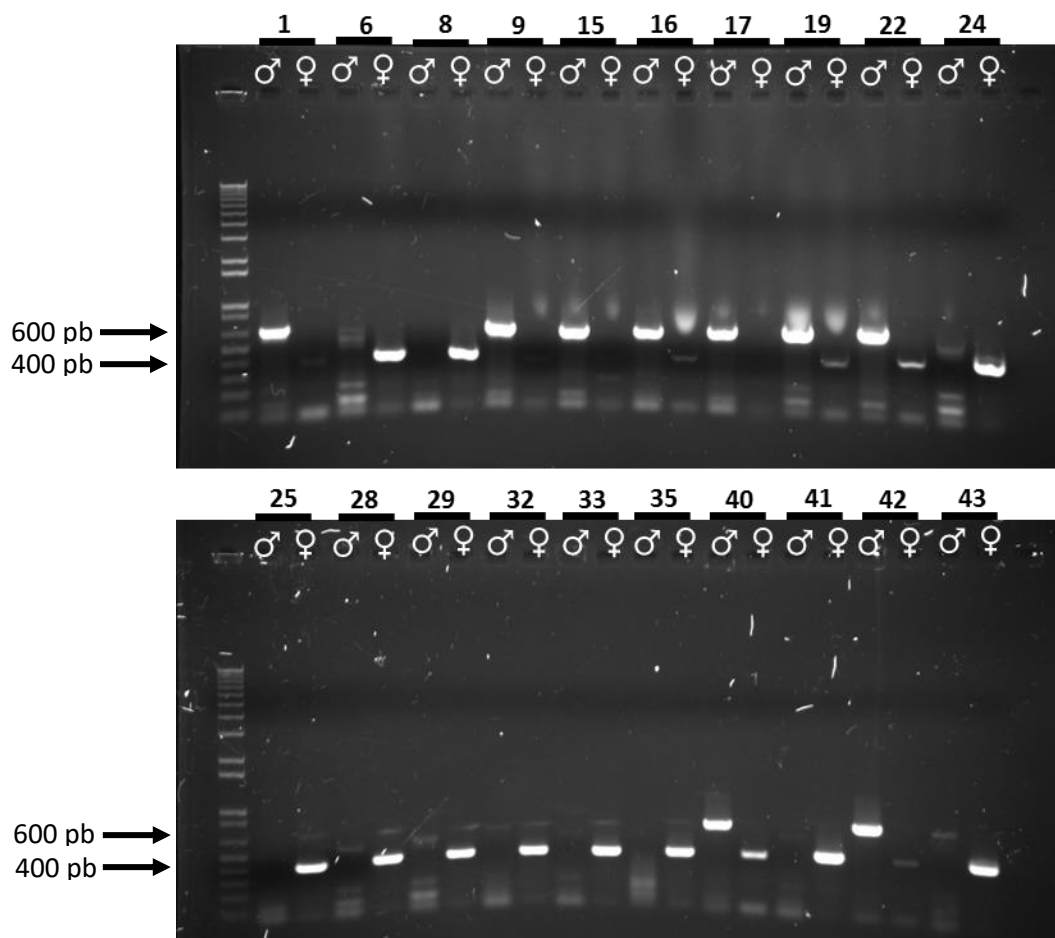


Fig. 43. Genotipificación por sexo de 20 líneas putativamente mutantes en *MpGLK*. Se genotipificaron por medio de PCR 20 líneas *MpGLK* para determinar si se trataba de líneas masculinas (amplicón de 600 pb) o femeninas (amplicón de 400 pb). A partir de esta genotipificación se eligieron 4 líneas macho con las cuales seguir trabajando (9, 16, 22 y 42), y una hembra (28).

La amplificación de los 418 pb en las 5 líneas se realizó con los oligonucleótidos MpGLK mut 1 Fw y MpGLK mut 1 Rv (Figura 44) con la enzima Phusion HF y el fragmento de DNA de cada amplificación se purificó usando el kit de ZymoClean™ y se envió a secuenciar. Como puede observarse en la figura 44, en ninguna de las 5 líneas se encontró algún cambio en la región circundante al sitio PAM y la secuencia que reconoce el guía MpGLK sgRNA2 con respecto de la silvestre (recuadro naranja y recuadro rojo, respectivamente, Fig. 44), lo que muestra que no son mutantes para *MpGLK*.

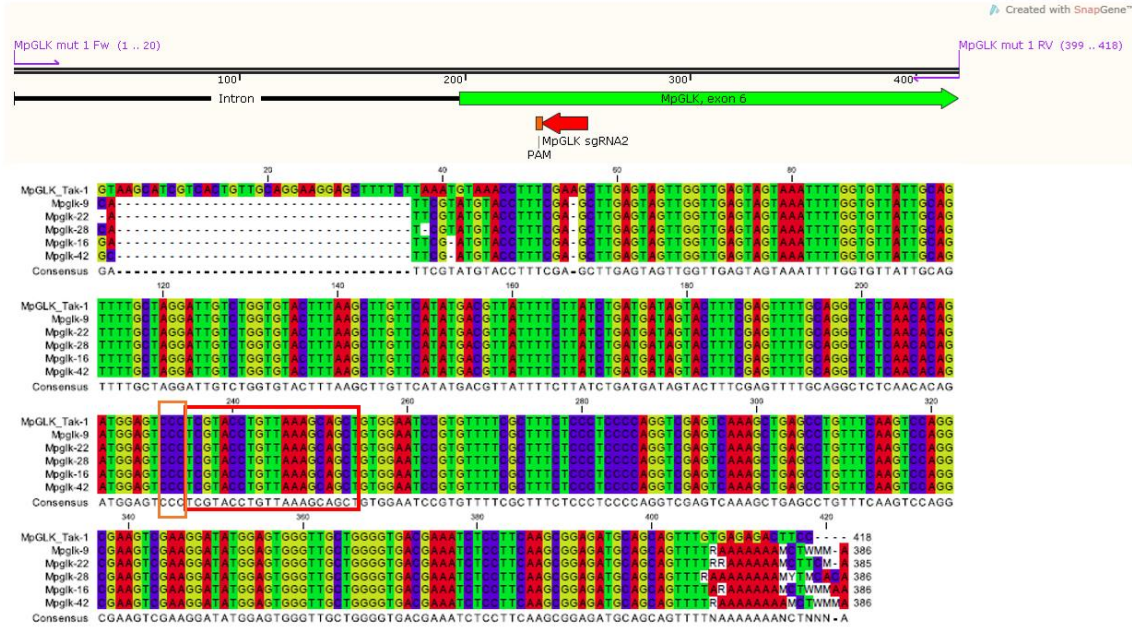


Fig. 44. Secuenciación de las líneas *Mpglk-9*, *22*, *28*, *16* y *42*. Se amplificó previamente a través de PCR un fragmento de 418 pb circundantes al sitio donde habría ocurrido la mutación con el guía MpGLK sgRNA2 por medio de los oligos MpGLK mut 1 Fw y MpGLK mut 1 Rv. En el recuadro rojo se ilustra la secuencia que reconoce el guía, en el recuadro naranja, el sitio PAM. La mutación debería encontrarse en las zonas circundantes al sitio PAM y la región que reconoce el guía y se reflejaría a través de *mismatches* entre las secuencias mutantes y la secuencia silvestre.

Por lo tanto, se decidió evaluar las líneas generadas con el vector *pMpGE011 + MpGLK sgRNA3*, el blanco de cuyo sgRNA es el segundo exón de MpGLK. De la transformación con este vector se obtuvieron un total de 54 líneas, de las cuales, 25 presentaban un fenotipo diferente al silvestre (Fig. 45). Estas 25 líneas se llevaron hasta la tercera generación *post-transformación* (T3) para asegurar que se estuviese trabajando con líneas independientes isogénicas y que, los fenotipos no se debiesen a quimerismo genético entre las distintas células que componen los talos de estas plantas (Ishizaki et al., 2016). De las 25 líneas *pMpGE011+MpGLK sgRNA3* se eligieron tres (4, 31 y 35) para, enviar a secuenciar y corroborar la presencia de mutaciones en *MpGLK* ya que presentaban parches cloróticos en diferentes zonas de sus talos, lo cual podría indicar defectos en el desarrollo del mesófilo en estas plantas, mismo que coincidiría con un fenotipo esperado para plantas mutantes en las cuales está perturbado el desarrollo del cloroplasto (Hricová et al., 2006; Lundquist et al., 2014).

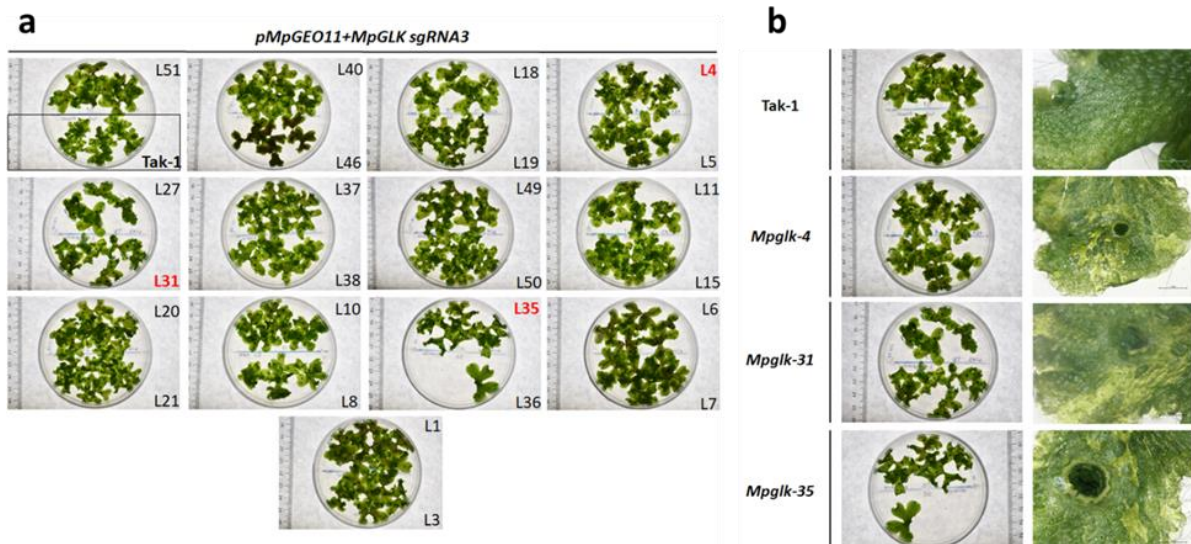


Fig. 45. Fenotipos en plantas pMpGE011+MpGLK sgRNA3. Se generaron un total de 54 líneas putativamente mutantes para MpGLK por medio de CRISPR/Cas9, de las cuales, 25 presentaban un fenotipo distinto al silvestre. En el panel (a) se ilustran los distintos fenotipos de estas 25 líneas. La silvestre (Tak-1) está resaltada con un recuadro negro. En rojo se destacan las líneas que se seleccionaron para secuenciar y evidenciar la presencia o ausencia de mutaciones en MpGLK. En el panel (b) se ilustran los acercamientos de tres líneas (4, 31 y 35), en los cuales se demuestra la presencia de parches cloróticos en estas plantas.

Para la corroboración de la mutación en las tres líneas seleccionadas se amplificó una región de 641 pb flanqueando la secuencia a la cual es complementario el *MpGLK sgRNA3* por medio de PCR, utilizando los oligonucleótidos MpGLK mut gRNA3 F y R con la enzima KAPA HiFi tras de lo cual se purificó el DNA amplificado de cada una de ellas y se envió a secuenciar utilizando el cebador MpGLK mut gRNA3 F. El resultado de la secuenciación se esquematiza en la Fig. 45, observando que en la región amplificada que corresponde a una secuencia codificante contenida en el mRNA de tanto el transcrito primario como el alternativo de *MpGLK* y dentro de la cual se localiza la secuencia complementaria al MpGLK sgRNA3 (el exón 2, representado por un recuadro color amarillo), se detectaron solo dos cambios (R=A/G y W=A/T, resaltados con círculos amarillos) pero no se observaron inserciones o deleciones, que es lo que normalmente se esperaría al realizar mutagénesis por CRISPR/Cas9. La presencia de estos cambios en las secuencias puede deberse a errores de lectura durante la secuenciación, o, realmente, podrían corresponder a cambios por sustitución de la secuencia silvestre (en los casos en que R=G en la silvestre, sería A en la mutante putativa, mientras que, para W, cuando ésta corresponde a A en la secuencia silvestre, sería T en la mutante).

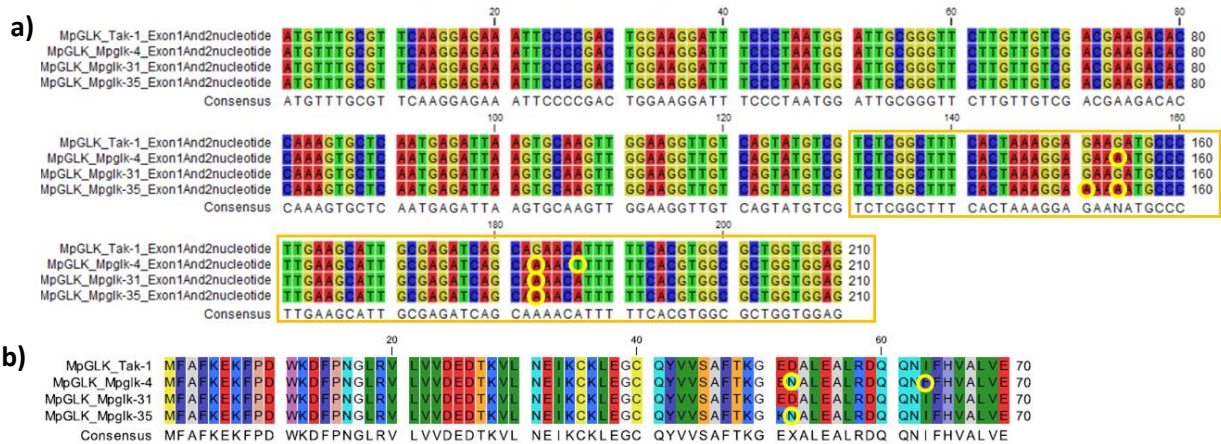


Fig. 47. Secuencia de los cDNA y proteínas de las mutantes putativas *Mpglk-4*, *31* y *35* respecto de la silvestre (*Tak-1*). Se ilustra el alineamiento múltiple entre las secuencias de nucleótidos (a) y de proteínas putativas (b), el recuadro amarillo resalta el exón 2, blanco de MpGLK sgRNA3. Asumiendo que los nucleótidos degenerados R y W corresponden a A y T en las mutantes putativas (círculos amarillos) y a G y A en la silvestre (*Tak-1*), los cambios derivan en proteínas hipotéticas con cambios en su secuencia aminoacídica para las líneas *Mpglk-4* y *Mpglk-35* (b, círculos amarillos), pero en una proteína silvestre para *Mpglk-31*.

Los nucleótidos R y W se sustituyeron por A y T (en la silvestre, G y A, respectivamente). Para el caso de la mutante putativa *Mpglk-4*, las sustituciones en el cDNA en las posiciones 163 (A) y 187 (T) derivan en una proteína con dos cambios a nivel de aminoácidos respecto de la silvestre de D52 a N52, y de I63 a F63. La proteína hipotética de *Mpglk-31* no presenta ningún cambio a nivel de secuencia de aminoácidos ya que la mutación en la posición 183, de una G por una A codifica para el mismo aminoácido y, finalmente, la proteína hipotética de la línea *Mpglk-35* tiene un cambio de un D52 a N52, atribuido al cambio de una G por una A en la posición 163 del cDNA.

Posteriormente se decidió evaluar otras líneas posibles mutantes a través de un protocolo que permite identificar la presencia de malos apareamientos (*mismatches*) entre una secuencia silvestre y una mutante utilizando la endonucleasa T7 que corta cuando no hay apareamiento entre bases. Este análisis se realizó con las líneas *Mpglk-11*, *15*, *19*, *20*, *49*, *7*, *8* y *51* e incluyendo a las *Mpglk-4* y *Mpglk-35*. Para lo cual se amplificó y purificó la región de 641 pb descrita anteriormente, y se hibridó cada amplicón de las líneas mutantes con el amplicón silvestre (150 ng).

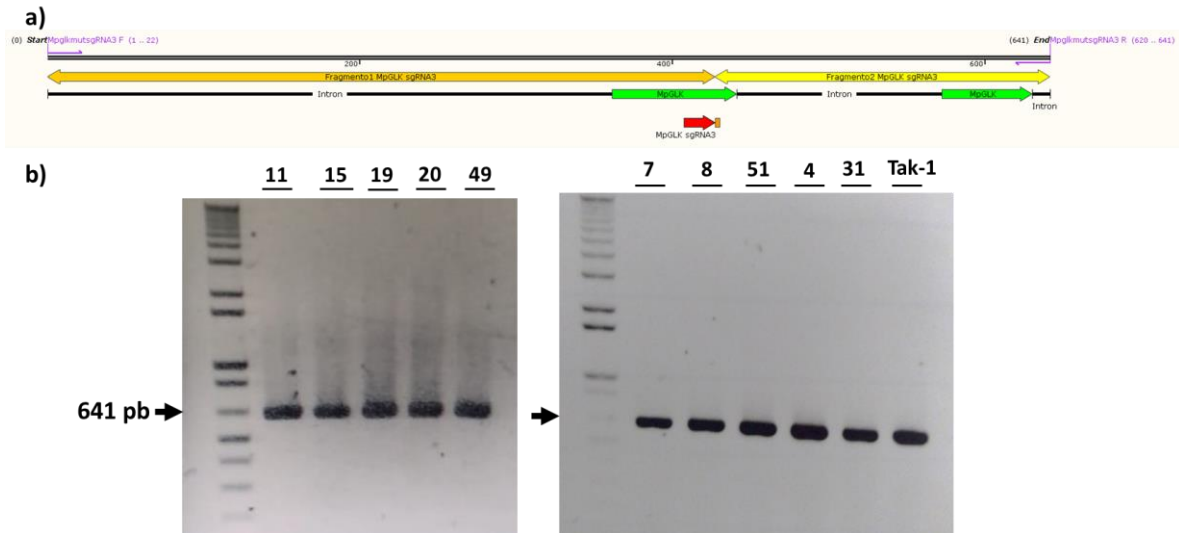


Fig. 48. Digestión por T7 endonucleasa de líneas *MpGLK* (*pMpGE011 + MpGLK sgRNA3*). (a) Diagrama de la región de 641 pb amplificada y purificada en plantas putativamente mutantes y silvestres para ser posteriormente hibridada y digerida por medio de T7 endonucleasa. En caso de encontrar errores de apareamiento entre la secuencia putativamente mutante y la silvestre, deberían producirse dos fragmentos, uno de 427 pb y otro de 214 pb. (b) Ninguna de las líneas *MpGLK* (*pMpGE011 + MpGLK sgRNA3*) es mutante para *MpGLK*, en todas sólo se detecta un fragmento completo de 641 pb.

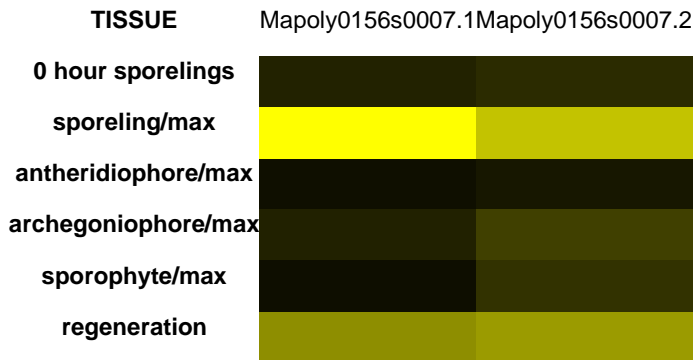
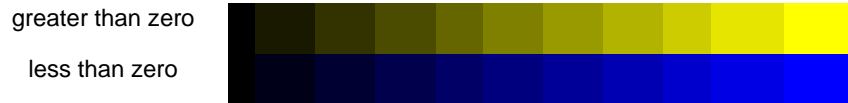
En el caso de existir una mutación, a consecuencia de la digestión debían obtenerse dos fragmentos: uno pequeño de 214 pb, y uno grande de 427 pb, dada la posición del sgRNA en el amplicón. Si no existen cambios con respecto a la secuencia silvestre, no debe haber corte y se observaría un fragmento de 641 pb (Fig 48a). Al digerir las posibles mutantes no se observó digestión, por lo que se puede concluir que ninguna de estas líneas es mutante en *MpGLK*. Por lo tanto, hasta el momento ya se han evaluado un total de 16 líneas, contando las líneas evaluadas por secuenciación generadas con el guía *MpGLK sgRNA2* y ninguna identifica un evento exitoso de mutagénesis. Una de las razones que permitiría explicar por qué no se recuperaron mutantes podría ser que la pérdida de función en este factor de transcripción sea letal en *M. polymorpha*, a diferencia de lo que ocurre en *A. thaliana* o *P. patens* (Waters et al., 2009; Yasumura et al., 2005). Sin embargo, esta posibilidad requiere de ser demostrada en el futuro.

7.5. El transcrito de MpGLK se expresa mayormente durante el enverdecimiento de la espora y en el talo

Con la idea de conocer cuando se expresa MpGLK se analizó el transcriptoma publicado con la secuenciación del genoma de *M. polymorpha* (Bowman *et al.*, 2017) a través de un *script* del paquete estadístico *R. suite*, mismo que permitió conocer los niveles de expresión de *MpGLK* a lo largo del ciclo de vida de *M. polymorpha*. De acuerdo con los datos obtenidos, MpGLK se expresa mayormente durante un proceso análogo al enverdecimiento, que es la germinación de la espora; y en el talo (*ver sporeling y regeneration*, respectivamente, en Tabla 20). Sin embargo, los niveles de expresión del transcrito de *MpGLK* es baja en los tejidos reproductivos y en la etapa esporofítica de la planta, lo cual va en sintonía con el hecho de que el estadio esporofítico es efímero y dependiente del gametofito (el estadio taloso y haploide de *M. polymorpha*) para su nutrición, y que en los anterozoides y las ovocélulas, no hay plástidos fotosintéticamente activos (al menos en angiospermas) (Shimamura, 2015; Hu *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009); ya que la función hipotética de MpGLK está involucrada en la transición hacia cloroplastos y en la regulación positiva de la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis (Waters *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2013).

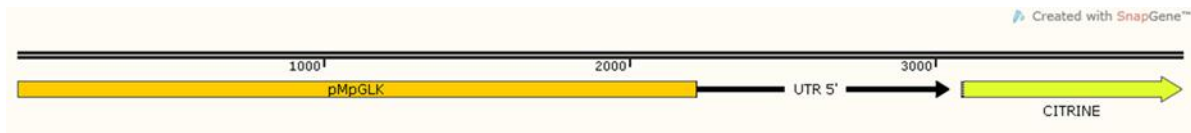
Tabla 20. Mapa de calor de la expresión de MpGLK en el ciclo de vida de *M. polymorpha*. La escala toma en cuenta incremento o decremento en la expresión a través de los distintos estadios del ciclo de vida y en tejidos específicos, como los órganos reproductivos (anteridíforo y arquegonióforo) o durante la regeneración del talo. Se incluyeron las dos variantes de *splicing* en que se expresa el transcrito de MpGLK (Mapoly0156s0007.1 y Mapoly0156s0007.2).

Magnitude of change 0 0.22 0.45 0.67 0.9 1.13 1.35 1.58 1.8 >2.03 >2.26



7.5.1. MpGLK se expresa en talos de 4 días en las zonas circundantes de los meristemos apicales.

Con el objetivo de determinar con un mayor detalle el patrón de expresión de *MpGLK* en plantas silvestres de *M. polymorpha*, se procedió a realizar un primer ensayo en el cual se crecieron talos plantas T2 que portan la construcción de *pMpGLK:CITRINE*.



pMpGLK:CITRINE

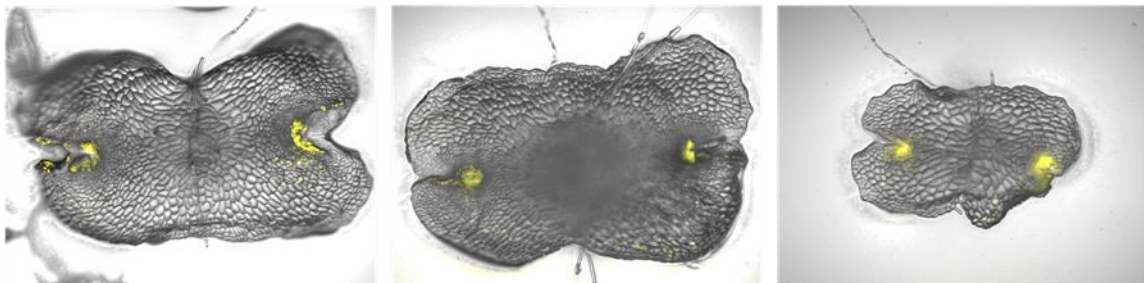


Fig. 49. La expresión de *MpGLK* se concentra en las regiones que circundan los meristemas. La localización de la fluorescencia del reportero no es ubicua en los talos de *M. polymorpha*.

Interesantemente, se observó que la expresión de la construcción estaba limitada a las regiones que circundan los meristemas de *M. polymorpha* (Fig. 49), lo cual podría estar relacionado con los sitios en los cuales hipotéticamente ocurriría la diferenciación de proplástidos hacia cloroplastos (si es extrapolable a lo que ocurre en Angiospermas). En *Arabidopsis*, se ha reportado que la diferenciación de los cloroplastos en el tejido aéreo ocurre a partir de los proplástidos contenidos en la capa L2 del meristemo apical de brote, por lo que la expresión de *MpGLK* en esta región podría coincidir con su papel como regulador positivo de la biogénesis del cloroplasto (Charuvi *et al.*, 2012).

Desgraciadamente al momento de intentar replicar este experimento con las gemas correspondientes a la tercera generación de plantas transgénicas *pMpGLK:CITRINE* de 16 líneas independientes distintas en las que inicialmente (T1) se había detectado fue imposible volver a observar la fluorescencia previa (Figura 49), por lo cual es indispensable re-revisar la construcción a través de una expresión transitoria del vector en protoplastos de *M. polymorpha* o bien realizar una construcción que contenga un fragmento más amplio de la región intergénica 5' por si faltasen elementos necesarios para la transcripción. También como alternativa se propone la generación de una nueva construcción con el reportero sea β -glucoronidasa (GUS) en vez de CITRINE.

8.0. DISCUSIÓN

8.1. MpGLK es un ortólogo funcional de GLK en *M. polymorpha*

Los factores de transcripción GLK han sido caracterizados como reguladores positivos de la diferenciación del cloroplasto, así como, de la transcripción de genes relacionados con la fotosíntesis (PhANGS), la síntesis de tetrapirroles, de otros pigmentos, como los carotenoides (*PSY*), y de otros factores transcripcionales que participan en la regulación de la expresión de genes involucrados en el importe de proteínas al plástido (como CIA2) (Kakizaki et al., 2009; Leister & Kleine, 2016; Waters et al., 2009; Waters et al., 2008; Yasumura, 2005). Estas proteínas cumplen la función como reguladores transcripcionales formando homo u heterodímeros entre sí (Fitter *et al.*, 2002; Rossini *et al.*, 2001), o con otros factores de transcripción como ORE1 (en cuyo caso, la interacción entre GLK y ORE1 deviene en la inducción de senescencia en las hojas), GBF1 y GBF3 (interacción demostrada *in vitro*, no *in vivo*) (Rauf *et al.*, 2013; Tamai *et al.*, 2002).

Para determinar la función de este factor transcripcional en *M. polymorpha*, se generaron líneas mutantes y sobreexpresoras. Las líneas sobreexpresoras presentan un claro fenotipo con mayor pigmentación, con talos son más gruesos y, en éstos, se induce la acumulación de clorofila en regiones que en las plantas silvestres no son fotosintéticamente activas, lo que apoya que en estos tejidos existe una diferenciación ectópica a plástidos fotosintéticos. Todo esto, apuntala que MpGLK está participando en la regulación del desarrollo de los cloroplastos, induciéndolo, lo cual, recapitula la función descrita para estos factores transcripcionales en otros modelos, como *A. thaliana* o *P. patens* (Kobayashi et al., 2013; Yasumura et al., 2005).

Existen reportes en la literatura que demuestran que plantas sobreexpresoras de GLK en *A. thaliana* presentan un fenotipo *gun* cuando se perturba la homeostasis del cloroplasto, como ante la inhibición de la síntesis de carotenoides o de la traducción plastídica (Leister & Kleine, 2016). El fenotipo GUN se refiere a que la regulación de genes nucleares relacionados con la fotosíntesis no se reprimen como respuesta de la afectación del cloroplasto (Koussevitzky et al., 2007; Larkin, 2016; Strand & Hernandez-Verdeja, 2017). Para corroborar si para MpGLK ocurre este mismo fenómeno, sería interesante analizar si la expresión de algunos homólogos de los PhANGs de *A. thaliana* en *M. polymorpha* está desregulada en estas sobreexpresoras en respuesta a inhibición de la síntesis de carotenoides o de la traducción plastídica. También sería interesante realizar un RNAseq y un ChIPseq de estas plantas sobreexpresoras crecidas en condiciones en las cuales el desarrollo de los plástidos está comprometido, para conocer los blancos de MpGLK durante el desarrollo del cloroplasto en *M. polymorpha*.

8.2. MpGLK puede tener una función adicional a aquella de una GLK

Como se describió en este trabajo, MpGLK pertenece a un clado hermano de las demás GLKs y, pero también de los factores de transcripción APRR2, que son miembros de la misma familia GARP. A diferencia de los GLKs de plantas vasculares MpGLK tiene la presencia de un dominio regulador de respuesta que es común con los APRR2 y los ARR2. De manera semejante a lo que ocurre en los APRR2, el dominio regulador de respuesta de MpGLK carece de un ácido aspártico que, es importante para su regulación por fosforilación en las ARR-B (Cheval *et al.*, 2017; Perez *et al.*, 2019; Perochon *et al.*, 2010). Esto, aunado a que las GLK agrupan en análisis filogenéticos más cercano con las APRR2 que con las ARR-B, tanto en el análisis realizado en este trabajo como en otros reportados (Gang *et al.*, 2019; Yasumura *et al.*, 2005), sugeriría que la MpGLK podría compartir

algunas de las funciones de las APRR2 en adición a las de los GLKs. En *A. thaliana* se ha demostrado que APRR2 es un factor de transcripción que regula positivamente genes de defensa durante la respuesta a patógenos (*Pseudomonas syringae*) y de la síntesis o señalización de ácido salicílico (como *CBP60g* o *WRKY6*) (Cheval et al., 2017). Para analizar si MpGLK tiene una función adicional semejante a APRR2, sería interesante exponer tanto a plantas silvestres como las sobreexpresoras de MpGLK de *M. polymorpha* a estrés biótico (patógenos) y medir los niveles de expresión de algunos genes de esta respuesta. En *M. polymorpha* se ha reportado ya previamente que es posible inducir una respuesta ante patógenos por medio del uso de *P. syringae* (Gimenez-Ibanez et al., 2019), y corroboran que existen aspectos conservados, tales como el incremento de la síntesis de ácido salicílico, así como la inducción de la expresión de genes de defensa como *WRKY22* o *ACRE132*, lo cual permite tener un punto de partida para estudiar esta respuesta con el propósito de determinar si MpGLK pudiese participar en ella.

En este trabajo no fue posible identificar líneas mutantes con inserciones o deleciones detectables para MpGLK a través de la técnica de CRISPR/Cas9 a pesar de haber usado dos sgRNAs que tenían como blanco exones diferentes. Esta técnica hipotéticamente resulta en la generación de mutantes nulas por inserciones o deleciones aleatorias, que causarían codones de paro o que correrían el marco de lectura, dando como resultado proteínas truncas y no funcionales. A pesar de que no hemos terminado de analizar todas las posibles mutantes aisladas aún, es importante considerar que, si MpGLK tuviera funciones adicionales, como aquella de las APRR2, podría explicar la posible letalidad de las mutantes nulas en MpGLK. Resulta interesante que en la literatura no existen reportes de mutantes nulas para *AthaAPRR2*, solo hipomorfias (Cheval et al., 2017). En caso de que ninguna de las líneas generadas resultase ser mutante, se realizaría una nueva construcción siguiendo el protocolo de Flores-Sandoval *et al.*, (2016), para la generación de líneas *knock down* para MpGLK a través del uso de microRNAs artificiales.

8.3. La sobreexpresión de MpGLK induce defectos en la morfología del talo

Nuestro análisis de los talos de las plantas sobreexpresoras de MpGLK mostró que éstos son más gruesos, con su mesófilo y región de almacenamiento más amplios y las células de sus talos parecen ser más grandes que en las plantas silvestres. En plantas vasculares se sabe que el desarrollo de los cloroplastos y el del mesófilo están íntimamente relacionados, como ha sido demostrado en diversas mutaciones que afectan el desarrollo del cloroplasto y que, también perturban el desarrollo de este tejido (Avendano-Vazquez *et al.*, 2014; Hricová *et al.*, 2006; Lundquist *et al.*, 2014). En *Arabidopsis* se ha encontrado que la sobreexpresión de GLK deriva en la diferenciación de otros plástidos hacia cloroplastos (Kobayashi *et al.*, 2013), una función que también parece estar conservada en *M. polymorpha* basado en los datos obtenidos en este trabajo. En plantas vasculares el tamaño celular está regulado por diversos factores, entre ellos fitohormonas. En *M. polymorpha* se han reportado homólogos para las distintas enzimas encargadas de la biosíntesis y señalización por fitohormonas (Bowman *et al.*, 2017; Flores-Sandoval *et al.*, 2018; Kato *et al.*, 2015). También se ha demostrado que el desbalance en citocininas y auxinas está involucrado en la alteración de procesos de desarrollo en el talo, desde la filotaxia dicotómica, hasta el hábito de crecimiento de las plantas; derivando en hábitos de crecimiento hiponásticos o epinásticos (Aki *et al.*, 2019). Resultaría importante analizar si los fenotipos asociados a la sobreexpresión de MpGLK podrían ser causados por defectos en los niveles de expresión de genes que participen en las vías de síntesis o de señalización por auxinas y citocininas y también crecer a estas plantas en presencia de auxinas o

citocininas exógenas. Esto permitiría adentrarnos en funciones adicionales de MpGLK aunadas a las asociadas a una GLK en plantas vasculares y del propio desarrollo de cloroplastos a partir de plástidos no fotosintéticos en zonas que normalmente no presentan cloroplastos.

8.4. La sobreexpresión de MpGLK deriva en un desbalance metabólico que induce la acumulación de almidón a lo largo del desarrollo de *M. polymorpha*

Desde etapas tempranas y a lo largo de los estadios de desarrollo analizados, se observa que la sobreexpresión de MpGLK induce la acumulación de almidón todo el talo, contrariamente a lo que ocurre en plantas silvestres, donde está limitada a zonas específicas. La acumulación de almidón es un fenotipo interesante que pudiera estar relacionada con una síntesis exacerbada de fotosintatos, derivada de la activación constitutiva de los genes nucleares asociados a la fotosíntesis por la sobreexpresión de MpGLK. La sobreexpresión de los GLK en otros modelos vegetales como arroz o *Betulla platyphylla* deriva en un incremento en la eficiencia fotosintética, lo cual, produce plantas con mayor biomasa (Gang et al., 2019; X. Li et al., 2020). Es probable que en la sobreexpresión de MpGLK esté igualmente pasando esto y que, debido a que la tasa de consumo de estos fotosintatos y su síntesis no están coordinadas, se favorece la acumulación de estos en forma de almidón. No obstante, con el objetivo de ahondar en este aspecto sería de interés analizar el estado metabólico de estas plantas, así como de la regulación del metabolismo del almidón, para lo cual una alternativa sería realizar un RNA seq para identificar si la expresión de genes relacionados con la síntesis o degradación del almidón se encuentran alterados.

8.5. La conservación de algunos elementos relacionados con la señalización retrógrada biogénica en *M. polymorpha* sugiere que algunas vías de señalización retrógrada existían ya en el ancestro en común de las plantas terrestres

La conservación de elementos centrales para la señalización retrógrada como son GUN1 o GLK desde el clado de algas estreptofitas; sugiere que las vías de señalización dependientes de estos elementos existen desde el ancestro en común de las plantas terrestres. En este trabajo se caracterizó funcionalmente a uno de dichos elementos: el factor de transcripción MpGLK. Toda la evidencia recopilada a través de los resultados de este trabajo apoya que esta proteína cumple una función similar que en plantas vasculares en lo que respecta a la regulación del desarrollo del cloroplasto y, a su papel como regulador positivo de la fotosíntesis (medido indirectamente a través de la acumulación de pigmentos). En *A. thaliana* GLKs tienen como blancos varios genes relacionados con la síntesis de tetrapirroles y otros involucrados en la fotosíntesis, pero también regula a otros elementos que participan en la señalización retrógrada, como son los factores de transcripción CIA2 (Waters et al., 2009). De manera exploratoria se realizó un análisis filogenético con varios de elementos que se han reportado como importantes para la señalización derivada de los plástidos y, en *M. polymorpha*, se identificaron ortólogos potenciales para 11 de los 12 factores analizados (Fig. 26). El único factor que parece estar ausente en varios clados de plantas no vasculares es PRIN2. La ausencia de PRIN2 puede estar relacionada a que en *M. polymorpha* al menos, no existe algo tal como germinación hipogea, que sería la condición natural en la cual, en una planta, se pasaría por un estadio de escotomorfogénesis, con la consecuente diferenciación de proplástidos hacia etioplastos (Díaz et al., 2018; Strand & Hernandez-Verdeja, 2017).

La determinación del momento exacto de la evolución en que surgen estos elementos es importante para comprender, como el evento de la terrestrialización impactó en la coordinación entre el

plástido y el núcleo durante la adaptación de las plantas al medio terrestre. Algunos, como SAL1-PAP, perteneciente a la señalización retrógrada operacional, se ha demostrado en artículos recientes que existe desde algas Streptophyta y, funcionalmente se ha caracterizado ya en *P. patens* (Zhao *et al.*, 2019). Es necesario resaltar que, la coordinación de la expresión entre el núcleo y el plástido es importante no sólo para el desarrollo de este organelo, sino, para montar diversas respuestas ante distintas condiciones ambientales o estreses (de Vries *et al.*, 2016, 2018). En un ambiente agreste como lo fue el terrestre cuando las primeras plantas lo colonizaron, con falta de humedad y alta insolación, seguramente requirieron remodelar el sistema de señalización entre el núcleo y el cloroplasto que ya existía en algas, y probablemente llevo aparejada la adquisición o neofuncionalización de nuevos elementos en algunos clados que estuvieron expuestos a estímulos de desarrollo o ambientales específicos, resultando en la complejas vías de señalización que existen en Angiospermas, y que, incluso pueden diferir entre los distintos tipos de plástidos. A pesar de que claramente aún queda mucho por aprender a este respecto, el uso de modelos como *M. polymorpha* serán de gran utilidad para dar luz a la compleja red de intercomunicación entre el núcleo y los plastidos.

9.0. CONCLUSIONES

El análisis de la función de GLK en *M. polymorpha* sugiere la conservación de ésta desde el ancestro en común de las plantas terrestres. Esto fue corroborado por la sobreexpresión de MpGLK, el ortólogo putativo de GLK en esta planta. Esta proteína es más grande que aquella de *A. thaliana* y presenta un dominio adicional que, a su vez, abre la posibilidad de que esta proteína tenga funciones adicionales y novedosas. Sin embargo, a pesar de las diferencias en la estructura de la proteína, MpGLK induce la acumulación de pigmentos, aún en condiciones de baja intensidad lumínica, así como la diferenciación hacia cloroplastos en regiones donde, en condiciones silvestres, no hay fotosíntesis; lo que supone una recapitulación de la función reportada para este factor de transcripción en plantas vasculares.

GUN1 está conservada desde el clado de Streptophyta, si bien, su función no se evaluó en este trabajo, es posible pensar que también podría estar conservada, debido a que GLK es un factor regulado por señales plastídicas mediadas por esta proteína.

PRIN2 es un elemento sólo presente en angiospermas, debido a que su función requiere de la presencia de etioplastos y, por ende, de un estadio de desarrollo bajo escotomorfogénesis, mismo que no se da en un organismo con germinación epigea, como es *M. polymorpha*.

Cinco de nueve elementos analizados que están involucrados en la señalización retrógrada están conservados desde el ancestro en común de Streptophyta y cuatro de nueve, lo están desde el ancestro en común de las plantas vasculares con las algas clorofitas, a pesar de que en las algas (tanto clorofitas como estreptofitas) no haya un proceso de diferenciación hacia tipos diferentes de plástidos, lo cual sugiere que ha habido eventos de neofuncionalización de estos factores en los clados más divergentes y que originaron a las plantas terrestres.

10.0. PERSPECTIVAS

Realizar un análisis global de la expresión génica de plantas sobreexpresoras y mutantes de MpGLK (nulas o hipomórficas) por medio de RNA seq para encontrar genes que pudieran estar siendo regulados por GLK durante el desarrollo del cloroplasto.

Realizar un ensayo de secuenciación de la precipitación de la cromatina (ChIP seq) para determinar los blancos de MpGLK.

Obtener líneas mutantes *knock down*, en caso de que se confirme que las mutantes nulas en MpGLK sean letales y caracterizar sus fenotipos a nivel morfológico, fisiológico, histológico y de ultraestructura de sus plástidos.

Analizar la posible función adicional que podría tener MpGLK en *M. polymorpha* dada la presencia del dominio regulador de respuesta a través de complementación de mutantes en MpGLK con una construcción que posea la región codificante de MpGLK, pero carente de este dominio, así como, crecer a plantas mutantes y sobreexpresoras en MpGLK, así como silvestres en presencia de *P. syringae* para determinar si tiene un papel en la respuesta a estrés biótico como las proteínas APRR2.

11.0. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aki, S. S., Mikami, T., Naramoto, S., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Kyoizuka, J., Kohchi, T., & Umeda, M. (2019). Cytokinin Signaling Is Essential for Organ Formation in *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology*, *60*(8), 1842–1854. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz100>
- Allison, L. A., Simon, L. D., & Maliga, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The EMBO Journal*, *15*(11), 2802–2809. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00640.x>
- Avendano-Vazquez, A.-O., Cordoba, E., Llamas, E., San Roman, C., Nisar, N., De la Torre, S., Ramos-Vega, M., Gutierrez-Nava, M. d. I. L., Cazzonelli, C. I., Pogson, B. J., & Leon, P. (2014). An Uncharacterized Apocarotenoid-Derived Signal Generated in β -Carotene Desaturase Mutants Regulates Leaf Development and the Expression of Chloroplast and Nuclear Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *26*(6), 2524–2537. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123349>
- Barajas-López, J. de D., Blanco, N. E., & Strand, Å. (2013). Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(2), 425–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.020>
- Barajas-López, J. de D., Kremnev, D., Shaikhali, J., Piñas-Fernández, A., & Strand, Å. (2013a). PAPP5 Is Involved in the Tetrapyrrole Mediated Plastid Signalling during Chloroplast Development. *PLoS ONE*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060305>
- Barajas-López, J. de D., Kremnev, D., Shaikhali, J., Piñas-Fernández, A., & Strand, Å. (2013b). PAPP5 Is Involved in the Tetrapyrrole Mediated Plastid Signalling during Chloroplast Development. *PLoS ONE*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060305>
- Bonet, M. L., Canas, J. A., Ribot, J., & Palou, A. (2016). Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation, and function. In C. Stange (Ed.), *Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation, and function* (Vol. 79). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7>
- Börner, T., Aleynikova, A. Y. u, Zubo, Y. O., & Kusnetsov, V. V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1847*(9), 761–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.004>
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S. S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M. A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C. R., ... Schmutz, J. (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*, *171*(2), 287–304.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>
- Cannon, S. B., McKain, M. R., Harkess, A., Nelson, M. N., Dash, S., Deyholos, M. K., Peng, Y., Joyce, B., Stewart, C. N., Rolf, M., Kutchan, T., Tan, X., Chen, C., Zhang, Y., Carpenter, E., Wong, G. K. S., Doyle, J. J., & Leebens-Mack, J. (2015). Multiple polyploidy events in the early radiation of nodulating and nonnodulating legumes. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 193–210. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu296>
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., McQuinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annual Review of Plant Biology*, *67*(1), 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>

- Charuvi, Dana Kiss, Vladimir, Nevo, Reinat, Shimoni, Eyal, Adam, Zach, & Reich, Z. (2012). Gain and Loss of Photosynthetic Membranes during Plastid Differentiation in the Shoot Apex of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(March), 1143–1157. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094458>
- Chen, M., Ji, M., Wen, B., Liu, L., Li, S., Chen, X., Gao, D., & Li, L. (2016). GOLDEN 2-LIKE Transcription Factors of Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(October), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01509>
- Cheval, C., Perez, M., Leba, L. J., Ranty, B., Perochon, A., Reichelt, M., Mithöfer, A., Robe, E., Mazars, C., Galaud, J. P., & Aldon, D. (2017). PRR2, a pseudo-response regulator, promotes salicylic acid and camalexin accumulation during plant immunity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07535-8>
- Clark, J. W., & Donoghue, P. C. J. (2018). Whole-Genome Duplication and Plant Macroevolution. *Trends in Plant Science*, 23(10), 933–945. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.07.006>
- Colombo, M., Tadini, L., Peracchio, C., Ferrari, R., & Pesaresi, P. (2016). GUN1, a Jack-Of-All-Trades in Chloroplast Protein Homeostasis and Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01427>
- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R., & Lerbs-Mache, S. (2007). Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the rrn Operon from the PC Promoter at Early Developmental Stages in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 145(3), 712–721. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103846>
- de Vries, J., Curtis, B. A., Gould, S. B., & Archibald, J. M. (2018). Embryophyte stress signaling evolved in the algal progenitors of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), 201719230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719230115>
- de Vries, J., & Gould, S. B. (2017). The monoplastidic bottleneck in algae and plant evolution. *Journal of Cell Science*, September, jcs.203414. <https://doi.org/10.1242/jcs.203414>
- de Vries, J., Stanton, A., Archibald, J. M., & Gould, S. B. (2016). Streptophyte Terrestrialization in Light of Plastid Evolution. *Trends in Plant Science*, 21(6), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.021>
- Díaz, M. G., Hernández-Verdeja, T., Kremnev, D., Crawford, T., Dubreuil, C., & Strand, Å. (2018). Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02468-2>
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C., & Zuo, J. (2007). The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a ζ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research*, 17(5), 458–470. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.37>
- Fitter, D. W., Martin, D. J., Copley, M. J., Scotland, R. W., & Langdale, J. A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant Journal*, 31(6), 713–727. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01390.x>
- Flores-Sandoval, E., Dierschke, T., Fisher, T. J., & Bowman, J. L. (2016). Efficient and inducible use of artificial MicroRNAs in Marchantia polymorpha. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 281–290. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv068>

- Flores-Sandoval, E., Eklund, D. M., Hong, S. F., Alvarez, J. P., Fisher, T. J., Lampugnani, E. R., Golz, J. F., Vázquez-Lobo, A., Dierschke, T., Lin, S. S., & Bowman, J. L. (2018). Class C ARFs evolved before the origin of land plants and antagonize differentiation and developmental transitions in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist*, *218*(4), 1612–1630. <https://doi.org/10.1111/nph.15090>
- Fujisawa, M., Hayashi, K., Nishio, T., Bando, T., Okada, S., Yamato, K. T., Fukuzawa, H., & Ohyania, K. (2001). Isolation of X and Y chromosome-specific DNA markers from a liverwort, *Marchantia polymorpha*, by representational difference analysis. *Genetics*, *159*(3), 981–985.
- Gang, H., Li, R., Zhao, Y., Liu, G., Chen, S., & Jiang, J. (2019). Loss of GLK1 transcription factor function reveals new insights in chlorophyll biosynthesis and chloroplast development. *Journal of Experimental Botany*, *70*(12), 3125–3138. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz128>
- Gangappa, S. N., & Botto, J. F. (2016). The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Molecular Plant*, *9*(10), 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>
- Gutiérrez-Nava, M. D. L. L., Gillmor, C. S., Jiménez, L. F., Guevara-García, A., & León, P. (2004). CHLOROPLAST BIOGENESIS genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiology*, *135*(1), 471–482. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036996>
- Han, C. D., Coe, E. H., & Martienssen, R. A. (1992). Molecular cloning and characterization of iojap (ij), a pattern striping gene of maize. *The EMBO Journal*, *11*(11), 4037–4046. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05497.x>
- Häuser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., Naeve, F., Tovchigrechko, A., Yamamoto, K., Szaflarski, W., Takeuchi, N., Stellberger, T., Diefenbacher, M. E., Nierhaus, K. H., & Uetz, P. (2012). RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. *PLoS Genetics*, *8*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002815>
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., & Pogson, B. J. (2016). Synthesis and Function of Apocarotenoid Signals in Plants. *Trends in Plant Science*, *21*(9), 792–803. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
- Hricová, A., Quesada, V., & Micol, J. L. (2006). The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *141*(3), 942–956. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080069>
- Hu, Y., Zhang, Q., & Sodmergen. (2005). Potential cytoplasmic inheritance in *Wisteria sinensis* and *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). *Plant and Cell Physiology*, *46*(7), 1029–1035. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci110>
- Hu, Z., Xu, F., Guan, L., Qian, P., Liu, Y., Zhang, H., Huang, Y., & Hou, S. (2014). The tetratricopeptide repeat-containing protein slow green1 is required for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1111–1123. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert463>
- Hwang, I., & Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, *413*(6854), 383–389. <https://doi.org/10.1038/35096500>
- Ichihashi, Y., & Tsukaya, H. (2015). Behavior of Leaf Meristems and Their Modification. *Frontiers in*

- Plant Science*, 6(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01060>
- Isemer, R., Krause, K., Grabe, N., Kitahata, N., Asami, T., & Krupinska, K. (2012). Plastid located WHIRLY1 enhances the responsiveness of Arabidopsis seedlings toward abscisic acid. *Frontiers in Plant Science*, 3(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00283>
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., & Kohchi, T. (2015). Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE*, 10(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138876>
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., & Kohchi, T. (2016). Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 262–270. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv097>
- Jarvis, P., & López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 787–802. <https://doi.org/10.1038/nrm3702>
- Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.-S., Terauchi, R., & Inaba, T. (2009). Coordination of Plastid Protein Import and Nuclear Gene Expression by Plastid-to-Nucleus Retrograde Signaling. *Plant Physiology*, 151(3), 1339–1353. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145987>
- Kato, H., Ishizaki, K., Kouno, M., Shirakawa, M., Bowman, J. L., Nishihama, R., & Kohchi, T. (2015). Auxin-Mediated Transcriptional System with a Minimal Set of Components Is Critical for Morphogenesis through the Life Cycle in *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genetics*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005084>
- Keeling, P. J. (2013). The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 583–607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120144>
- Kindgren, P., Kremnev, D., Blanco, N. E., De Dios Barajas López, J., Fernández, A. P., Tellgren-Roth, C., Small, I., & Strand, Å. (2012). The plastid redox insensitive 2 mutant of Arabidopsis is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *Plant Journal*, 70(2), 279–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04865.x>
- Kobayashi, K., Sasaki, D., Noguchi, K., Fujinuma, D., Komatsu, H., Kobayashi, M., Sato, M., Toyooka, K., Sugimoto, K., Niyogi, K. K., Wada, H., & Masuda, T. (2013). Photosynthesis of root chloroplasts developed in Arabidopsis lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant and Cell Physiology*, 54(8), 1365–1377. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct086>
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., & Chory, J. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science*, 316(5923), 715–719. <https://doi.org/10.1126/science>
- Larkin, R. M. (2016). Tetrapyrrole Signaling in Plants. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01586>
- Larkin, R. M., Larkin, R., Ruckle, M., Mullineaux, P., Baker, N., Chi, W., Sun, X., Zhang, L., Mochizuki, N., Susek, R., Chory, J., Ruckle, M., DeMarco, S., Larkin, R., Foudree, A., Aluru, M., Rodermel, S., Hassidim, M., Yakir, E., ... Wilson, P. (2014). Influence of plastids on light signalling and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1640), 20130232. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0232>

- Leister, D., & Kleine, T. (2016). Definition of a core module for the nuclear retrograde response to altered organellar gene expression identifies GLK overexpressors as gun mutants. *Physiologia Plantarum*, 157(3), 297–309. <https://doi.org/10.1111/ppl.12431>
- Li, M., Hensel, G., Melzer, M., Junker, A., Tschiersch, H., Arend, D., Kumlehn, J., Boerner, T., & Stein, N. (2019). Mutation of the ALBOSTRIANS Ohnologous Gene HvCMF3 Impairs Chloroplast Development and Thylakoid Architecture in Barley due to Reduced Plastid Translation. *BioRxiv Genetics*. <https://doi.org/10.1101/756833>
- Li, P., Ma, J., Sun, X., Zhao, C., Changle, M., & Wang, X. (2020). Plastid EF-Tu Regulates Root Development through Both the ATM Pathway and GUN1. *BioRxiv Plant Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.03.932574>
- Li, X., Wang, P., Li, J., Wei, S., Yan, Y., Yang, J., Zhao, M., Langdale, J. A., & Zhou, W. (2020). Maize GOLDEN2-LIKE genes enhance biomass and grain yields in rice by improving photosynthesis and reducing photoinhibition. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0887-3>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001a). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001b). Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4.2.1-F4.2.6. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0402s01>
- Liebers, M., Grübler, B., Chevalier, F., Lerbs-Mache, S., Merendino, L., Blanvillain, R., & Pfanschmidt, T. (2017). Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 8(January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00023>
- Llamas, E., Pulido, P., & Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in Arabidopsis triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLoS Genetics*, 13(9), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007022>
- Llorente, B., Martinez-Garcia, J. F., Stange, C., & Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Current Opinion in Plant Biology*, 37, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.011>
- Lundquist, P. K., Rosar, C., Bräutigam, A., & Weber, A. P. M. (2014). Plastid signals and the bundle sheath: Mesophyll development in reticulate mutants. *Molecular Plant*, 7(1), 14–29. <https://doi.org/10.1093/mp/sst133>
- May, C., & Page, S. E. E. L. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science*, 316(May), 715–718. <https://doi.org/10.1126/science>
- Moustafa, A., Reyes-Prieto, A., & Bhattacharya, D. (2008). Chlamydiae has contributed at least 55 genes to plantae with predominantly plastid functions. *PLoS ONE*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002205>
- Nystedt, B., Street, N. R., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y. C., Scofield, D. G., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S., Alexeyenko, A., Vicedomini, R., Sahlin, K., Sherwood, E.,

- Elfstrand, M., Gramzow, L., Holmberg, K., Hällman, J., Keech, O., Klasson, L., ... Jansson, S. (2013). The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 497(7451), 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
- Oyama, T., Shimura, Y., & Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus- induced development of root and hypocotyl. *Genes and Development*, 11(22), 2983–2995. <https://doi.org/10.1101/gad.11.22.2983>
- Perez, M., Guerringue, Y., Ranty, B., Pouzet, C., Jauneau, A., Robe, E., Mazars, C., Galaud, J. P., & Aldon, D. (2019). Specific TCP transcription factors interact with and stabilize PRR2 within different nuclear sub-domains. *Plant Science*, 287(April), 110197. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110197>
- Perochon, A., Dieterle, S., Pouzet, C., Aldon, D., Galaud, J. P., & Ranty, B. (2010). Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(4), 747–751. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.016>
- Pfannschmidt, T., Blanvillain, R., Merendino, L., Courtois, F., Chevallier, F., Liebers, M., Grübler, B., Hommel, E., & Lerbs-Mache, S. (2015). Plastid RNA polymerases: Orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle. *Journal of Experimental Botany*, 66(22). <https://doi.org/10.1093/jxb/erv415>
- Pinard, D., & Mizrachi, E. (2018). Unsung and understudied: plastids involved in secondary growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 42, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.011>
- Pogson, B. J., Ganguly, D., & Albrecht-Borth, V. (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(9), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.003>
- Rauf, M., Arif, M., Dortay, H., Matallana-Ramírez, L. P., Waters, M. T., Gil Nam, H., Lim, P. O., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S. (2013). ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Reports*, 14(4), 382–388. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.24>
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M., & Bhattacharya, D. (2007). The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 147–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Rossini, L., Cribb, L., Martin, D. J., & Langdale, J. A. (2001). The maize Golden2 gene defines a novel class of transcriptional regulators in plants. *Plant Cell*, 13(5), 1231–1244. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.1231>
- Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book*, 10, e0158. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>
- Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Ruffel, S., Lacombe, B., & Krouk, G. (2017). The world according to GARP transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.07.006>
- Shimamura, M. (2016). Marchantia polymorpha: Taxonomy, phylogeny and morphology of a model system. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 230–256. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv192>

- Solly, J. E., Cunniffe, N. J., & Harrison, C. J. (2017). Regional Growth Rate Differences Specified by Apical Notch Activities Regulate Liverwort Thallus Shape. *Current Biology*, 27(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.056>
- Strand, A., & Hernandez-Verdeja, T. (2017). Retrograde signals navigate the path to chloroplast development. *Plant Physiology*, pp.01299.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01299>
- Sugano, S. S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., & Kohchi, T. (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE*, 13(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205117>
- Suire, C., Bouvier, F., Backhaus, R. A., Bégu, D., Bonneu, M., & Camara, B. (2000). Cellular Localization of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a New Role of Oil Bodies. *Plant Physiology*, 124(3), 971–978. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.971>
- Sun, C. N. (1963). Submicroscopic Structure and Development of Chloroplasts of *Marchantia polymorpha*. *Journal of Electronmicroscopy*, 12(4), 254–259.
- Sun, C. W., Chen, L. J., Lin, L. C., & Li, H. M. (2001). Leaf-specific upregulation of chloroplast translocon genes by a CCT motif-containing protein, CIA2. *Plant Cell*, 13(9), 2053–2061. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.9.2053>
- Sun, Chih Wen, Huang, Y. C., & Chang, H. Y. (2009). CIA2 coordinately up-regulates protein import and synthesis in leaf chloroplasts1[w]OA. *Plant Physiology*, 150(2), 879–888. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137240>
- Tadini, L., Pesaresi, P., Kleine, T., Rossi, F., Guljamow, A., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., Masiero, S., Pribil, M., Rothbart, M., Hedtke, B., Grimm, B., & Leister, D. (2016). GUN1 Controls Accumulation of the Plastid Ribosomal Protein S1 at the Protein Level and Interacts with Proteins Involved in Plastid Protein Homeostasis. *Plant Physiology*, 170(3). <https://doi.org/10.1104/pp.15.02033>
- Tamai, H., Iwabuchi, M., & Meshi, T. (2002). Arabidopsis GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-box-binding bZIP factors. *Plant and Cell Physiology*, 43(1), 99–107. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf011>
- Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Kawaguchi, M., Nishimura, M., & Okada, K. (2013). Pattern Dynamics in Adaxial-Abaxial Specific Gene Expression Are Modulated by a Plastid Retrograde Signal during Arabidopsis thaliana Leaf Development. *PLoS Genetics*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003655>
- Tanaka, H., Sato, M., Ogasawara, Y., Hamashima, N., Buchner, O., Holzinger, A., Toyooka, K., & Kodama, Y. (2017). Chloroplast aggregation during the cold-positioning response in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Journal of Plant Research*, 130(6), 1061–1070. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0958-9>
- Tang, L. Y., Nagata, N., Matsushima, R., Chen, Y., Yoshioka, Y., & Sakamoto, W. (2009). Visualization of plastids in pollen grains: Involvement of FtsZ1 in pollen plastid division. *Plant and Cell Physiology*, 50(4), 904–908. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp042>

- Tiller, N., & Bock, R. (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Molecular Plant*, 7(7), 1105–1120. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu022>
- Tokumar, M., Adachi, F., Toda, M., Ito-Inaba, Y., Yazu, F., Hirose, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Kakizaki, T., & Inaba, T. (2017). Ubiquitin-proteasome dependent regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 transcription factor in response to plastid signals. *Plant Physiology*, 173(1), 524–535. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01546>
- Tomoaki Nishiyama, Hidetoshi Sakayama, Jan de Vries, ..., Dominique Van Der Straeten, Sven B. Gould, S. A. R. (2018). The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell*, 174(2), 448–464. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.033>
- Tsuboyama-Tanaka, S., & Kodama, Y. (2015). AgarTrap-mediated genetic transformation using intact gemmae/gemmalings of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Journal of Plant Research*, 128(2), 337–344. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0695-2>
- Tsuboyama, S., & Kodama, Y. (2014). AgarTrap: A simplified agrobacterium-mediated transformation method for sporelings of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant and Cell Physiology*, 55(1), 229–236. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct168>
- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 665–700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Walbot, V., & Coe, E. H. (1979). Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(6), 2760–2764. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.6.2760>
- Waters, M. T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R. G., Saunders, N. J., & Langdale, J. A. (2009). GLK Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 21(4), 1109–1128. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065250>
- Waters, Mark T., Moylan, E. C., & Langdale, J. A. (2008). GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant Journal*, 56(3), 432–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03616.x>
- Wilson, P. B., Estavillo, G. M., Field, K. J., Pornsiriwong, W., Carroll, A. J., Howell, K. A., Woo, N. S., Lake, J. A., Smith, S. M., Harvey Millar, A., Von Caemmerer, S., & Pogson, B. J. (2009). The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal*, 58(2), 299–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03780.x>
- Wu, G.-Z., Chalvin, C., Hoelscher, M. P., Meyer, E. H., Wu, X. N., & Bock, R. (2018). Control of Retrograde Signaling by Rapid Turnover of GENOMES UNCOUPLED 1. *Plant Physiology*, pp.00009.2018. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00009>
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, E. E. K., Chehab, W. E., Hayden, D. M., Tolstikov, V., Corwin, J. A., Kliebenstein, D. J., Keasling, J. D., & Dehesh, K. (2012). Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*, 149(7), 1525–1535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.038>
- Yagi, Y., & Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Frontiers in Plant Science*, 5(April 2015). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00061>

Yasumura, Y., Moylan, E. C., & Langdale, J. A. (2005). A Conserved Transcription Factor Mediates Nuclear Control of Organelle Biogenesis in Anciently Diverged Land Plants. *The Plant Cell Online*, 17(7), 1894–1907. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033191>

Zhao, C., Wang, Y., Chan, K. X., Marchant, D. B., Franks, P. J., Randall, D., Tee, E. E., Chen, G., Ramesh, S., Phua, S. Y., Zhang, B., Hills, A., Dai, F., Xue, D., Gilliam, M., Tyerman, S., Nevo, E., Wu, F., Zhang, G., ... Chen, Z. H. (2019). Evolution of chloroplast retrograde signaling facilitates green plant adaptation to land. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(11), 5015–5020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812092116>

Zhao, X., Huang, J., & Chory, J. (2018). Genome uncoupled 1 mutants are hypersensitive to norflurazon and lincomycin. *Plant Physiology*, 1, pp.00772.2018. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00772>