



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Caracterización morfológica y proteómica de los plástidos
incolores del alga *Polytomella parva*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
EMMA OLIVA FUENTES RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: **DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:

DRA. XÓCHITL PÉREZ
MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
CELULAR

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE
DE LEÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO

DICIEMBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 324-Norte del Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por los apoyos otorgados (239219 y 279125), así como a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA-UNAM) por el apoyo otorgado para este proyecto (IN209220).

Se reconoce la valiosa contribución de mi comité tutor, conformado por la Dra. Berenice García Ponce de León, la Dra. Xóchitl Pérez Martínez y el Dr. Diego González Halphen.

Se reconoce al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por el apoyo académico y administrativo otorgado.

Se agradece a la Unidad de Cómputo por el apoyo técnico brindado, especialmente a Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega.

Se agradece a la Unidad de Imagenología por el apoyo técnico brindado, especialmente al M.C. Rodolfo Paredes López y a la Dra. Ruth Rincón Heredia.

Se agradece al laboratorio de la Dra. Rosa Estela Navarro González por el apoyo técnico con la microscopía, especialmente a la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

También, se reconoce el apoyo intelectual, técnico y material de las siguientes personas: Profesor Ulrich Brandt, Dr. Sergio Guerrero Castillo, Dr. Alfredo Cabrera Orefice, Dr. Augusto César Poot Hernández, Dr. David R. Smith, Dr. Adrián Reyes Prieto y Dr. Francisco Figueroa Martínez.

Se reconoce a la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo por el apoyo administrativo para la asistencia a los congresos en los que se presentó este trabajo.

Se reconoce el apoyo brindado por Rosario Villaseñor Ávila y Gabriela Valdés Silva de las Secretarías de Biología Celular y de Genética Molecular, respectivamente.

Se agradece a Sara Méndez Ibáñez de la Coordinación de Enseñanza por el apoyo administrativo brindado.

Se agradece a los integrantes del jurado de este trabajo: Dra. Rosa Estela Navarro González, Dra. Berenice García Ponce de León, Dr. Alejandro Sosa Peinado, Dr. Dimitris Georgellis y Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda.

La ciencia es esa forma de conocimiento que se elabora con la menor ideología posible.

Jorge Wagensberg

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Fotosíntesis oxigénica y su impacto sobre la vida en la Tierra.....	3
1.2 <i>Archaeplastida</i> o los primeros eucariontes fotosintéticos	3
1.3. Endosimbiosis: el descubrimiento	4
1.4. Endosimbiosis: un evento excepcional	8
1.5. Pérdida de la fotosíntesis en la naturaleza	8
1.6. Organismos que han perdido la fotosíntesis	11
1.7. <i>Polytomella parva</i>	11
1.8. Pérdida de la fotosíntesis y los plástidos de <i>Polytomella</i>	13
2. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Crecimiento de <i>Polytomella parva</i>	15
3.2. Aislamiento de los plástidos de <i>Polytomella</i>	15
3.3. Caracterización morfológica	15
3.3.1. Microscopía de luz	15
3.3.2 Microscopía de Nomarski	15
3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión: rebanadas de células de <i>Polytomella parva</i>	16
3.3.4. Microscopía electrónica de transmisión: plástidos aislados.....	16
3.4 Análisis de espectrometría de masas.....	17
3.5 Análisis <i>in silico</i>	17
3.6. Anotación del proteoma.....	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Caracterización morfológica	19
4.1.1. Observación de <i>Polytomella parva</i> y sus plástidos mediante microscopía óptica y microscopía de Nomarski	19
4.1.2. Observación de <i>Polytomella parva</i> y sus plástidos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	20

4.1.3. Observación de tres fracciones diferentes obtenidas del protocolo de aislamiento de plástidos	20
4.1.4. Morfología de los plástidos a diferentes concentraciones del osmoprotector sorbitol	21
4.1.5. Liberación de los gránulos de almidón	22
4.1.6. Tamaño de los plástidos vs. tamaño de los gránulos de almidón	25
4.2. Caracterización proteómica	27
4.2.1 Patrón electroforético de los plástidos de <i>Polytomella</i>	27
4.2.2 Identificación de proteínas del plástido mediante espectrometría de masas y análisis por homología	27
4.2.3 Proteoma del plástido de <i>Polytomella parva</i>	28
4.2.4 Comparación entre los plástidos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> y <i>Polytomella parva</i>	54
4.2.5 Representatividad del proteoma del plástido de <i>Polytomella parva</i>	58
4.2.6 <i>Polytomella parva</i> conserva el sistema de translocación de proteínas de plástido	62
5. DISCUSIÓN	64
6. CONCLUSIÓN	77
7. PERSPECTIVAS	78
REFERENCIAS	79
ANEXO	96

RESUMEN

Los plástidos son organelos que surgieron hace 1,500 millones de años mediante un evento endosimbiótico entre una cianobacteria y un eucarionte fagótrofo; estos organelos llevan a cabo múltiples funciones metabólicas, entre ellas la fotosíntesis, mediante la cual se genera el oxígeno que respiramos y se consume el CO₂ con el que se sintetizan los carbohidratos. Este evento endosimbiótico dio origen a los primeros eucariontes fotosintéticos en la Tierra (*Archaeplastida*); sin embargo, dentro de este grupo de organismos ha surgido más recientemente un grupo que, de manera independiente y secundaria, ha perdido la capacidad de realizar la fotosíntesis, mientras que conserva plástidos donde se llevan a cabo múltiples rutas metabólicas, como la síntesis de aminoácidos, lípidos y nucleótidos, entre otras.

Este trabajo presenta información morfológica y proteómica de los plástidos incoloros del alga unicelular *Polytomella parva*, la cual perdió la capacidad de realizar fotosíntesis, pero conservó un plástido funcional en el cual están presentes un gran número de enzimas relacionadas con diversas rutas metabólicas. De manera sorprendente, encontramos también proteínas estudiadas originalmente en contextos fotosintéticos, como enzimas del ciclo de Calvin y algunas subunidades de sistemas de translocación de proteínas en membranas tilacoidales, lo que genera nuevas preguntas que podrán ser abordadas en estudios posteriores.

Este es el primer trabajo que caracteriza un plástido en un alga unicelular de vida libre que perdió la fotosíntesis, con lo cual, podemos acercarnos al estudio de estos organismos y describir funciones esenciales para su supervivencia y tratar de entender que cambios ocurrieron cuando adoptaron una forma de vida heterótrofa.

ABSTRACT

Plastids are organelles that arose 1.5 BYA through an endosymbiotic event between a cyanobacterium and a phagotrophic eukaryote. These organelles carry out multiple metabolic functions, including photosynthesis, through which the oxygen that we breath is generated, and the CO₂ is consumed for the biosynthesis of carbohydrates. This event gave rise to the photosynthetic eukaryotes now present in Earth (*Archaeplastida*); however, within this group of organisms another group has emerged more recently that independently and secondarily lost the ability to carry out photosynthesis, while preserving the rest of plastid metabolism such as the synthesis of carbohydrates, amino acids, lipids and nucleotides, among others.

This work presents morphologic and proteomic information about colorless plastids of the unicellular alga *Polytomella parva*, which lost the ability to carry out photosynthesis but preserves a functional plastid. Much of the preserved metabolism is related to carbon but intriguingly we also found proteins originally studied in photosynthetic contexts, such as enzymes of the Calvin cycle and some subunits of protein translocation pathways in thylakoid membranes, which raises new questions that may be followed in further studies.

This is the first characterization of a plastid of a free-living unicellular alga that lost photosynthesis, with which we can approach the study of these organisms and try to understand which changes led them to adopt a heterotrophic lifestyle.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fotosíntesis oxigénica y su impacto sobre la vida en la Tierra

La fotosíntesis oxigénica ha sido quizá el proceso biológico con más impacto en la evolución de la vida en la Tierra. Este fenómeno se originó en cianobacterias unicelulares de agua dulce hace aproximadamente 2,000 a 2,300 millones de años en el Paleoproterozoico, lo que dio lugar a la aparición del oxígeno en la atmósfera terrestre (Blank, 2013; Larkum, 2007). Mediante la fotosíntesis se transforman las moléculas de CO₂ en compuestos de carbono utilizando la energía de la luz y moléculas de agua para generar moléculas de ATP y poder reductor (equivalentes de hidrógeno) (McFadden, 2014). Mediante la fotosíntesis también se genera el oxígeno como producto colateral, un gas responsable de los mayores cambios en la atmósfera terrestre, ya que al aumentar su concentración, muchos microorganismos primitivos tuvieron que adaptarse a su presencia. Con la aparición de la fotosíntesis, la atmósfera terrestre, que estaba compuesta mayoritariamente por CO₂ y N₂, fue incrementando sus niveles de O₂ hasta llegar a la concentración actual de 21% (Halliwell, 2006). Algunas de las manifestaciones del incremento de O₂ terrestre fueron la formación de la capa de ozono, con la consecuente protección de los organismos de la radiación UV y la remoción del hierro de ambientes acuáticos para formar óxidos de hierro insolubles (Halliwell, 2006). Por supuesto, uno de los mayores impactos de la fotosíntesis se ve reflejado en las altas tasas de CO₂ convertido en biomasa; estimaciones indican que solamente las algas verdes y las plantas metabolizan 258,000 toneladas de CO₂ cada año (McFadden, 2014).

1.2 *Archaeplastida* o los primeros eucariontes fotosintéticos

Mil millones de años después del surgimiento de las cianobacterias, surgieron los primeros organismos eucariontes con capacidad fotosintética (McFadden, 2014). Esto ocurrió gracias a un evento endosimbiótico en el que una cianobacteria de agua dulce, probablemente un ancestro de la actual *Gloemargarita litophora*, fue devorada por un eucarionte fagótrofo (Ponce-Toledo et al., 2017; Ponce-Toledo & Moreira, 2019) sin ser destruida. De este evento surgió el primer grupo de eucariontes fotosintéticos que colonizaron la Tierra: los *Archaeplastida*, un grupo monofilético que podría estar constituido por 15,000 especies aproximadamente (Pyke, 2009). Este linaje se clasifica en tres clados: *Glaucophyta*, *Rodophyta* y *Viridiplantae*; el primero que surgió fue *Glaucophyta*, un grupo de algas unicelulares restringidas a ambientes de agua dulce, con características que semejan al linaje de *G. litophora*,

del cual presuntamente surgieron (Ponce-Toledo et al., 2017). Por su parte, el clado *Rodophyta* está constituido por algas rojas unicelulares y pluricelulares, mientras que el clado *Viridiplantae* está constituido por algas verdes unicelulares y pluricelulares y, a partir de éstas últimas, surgieron las plantas hace aproximadamente 450 millones de años (Pyke, 2009).

1.3. Endosimbiosis: el descubrimiento

Pero ¿qué es la endosimbiosis?, en palabras sencillas es el fenómeno en el cual una célula evoluciona dentro de otra hasta convertirse en un organelo, como resultado de un proceso evolutivo (de Vries & Archibald, 2018). Las primeras sugerencias del origen endosimbiótico de los plástidos las propuso Andreas Schimper en 1883, un botánico que trabajó con el metabolismo del almidón en las plantas, que llegó a la conclusión de que el almidón era no sólo un almacén de energía, sino un producto de la fotosíntesis. Sus observaciones lo llevaron a dar el nombre a los cloroplastos de las plantas y sugirió que estos organelos fueron producto de una *simbiogénesis* (McFadden, 2014). En 1905 Constantin Mereschkowsky retomó las ideas de Schimper y planteó que los organismos complejos que conocemos ahora habían surgido de la unión de organismos más simples; él los llamó *micoplasma* (procariotas) y *ameboplasma* (eucariotas), los cuales se unieron en simbiosis para conformar los organismos fotosintéticos. También aseveró que las plantas obtenían sin ningún esfuerzo cantidades considerables de carbohidratos suministradas por sus plástidos (Dagan et al., 2013; Kowallik & Martin, 2021). Posteriormente, Lynn Margulis en 1967 aportó más evidencias producto de sus propias observaciones y popularizó la teoría endosimbiótica (Lazcano & Peretó, 2017). Las evidencias que apoyaron a la teoría endosimbiótica fueron primordialmente de microscopía, dichas observaciones indicaban una clara semejanza de la estructura de los cloroplastos con la de las bacterias. Sin embargo, el descubrimiento seminal fue la identificación del DNA propio del organelo y la identificación de secuencias de RNAs ribosomales, con las cuales se pudo trazar su origen filogenético, encontrando cercanía de los cloroplastos con los procariotas. Con el paso del tiempo se sumaron una serie de observaciones que indicaron que el origen de los plástidos se remontaba a las cianobacterias (Pyke, 2009).

Actualmente, sabemos que este fenómeno ocurrió hace aproximadamente 1,500 millones de años (Figueroa-Martinez et al., 2015) y que las características de los plástidos que nos indican su origen en las cianobacterias son:

1) conservan una fracción de su propio DNA, el cual tiene semejanza con genomas bacterianos, particularmente de los genes que codifican para: los 3 rRNAs (rrnS, rrnL y rrnF), de 25 a 35 tRNAs, así como de 25 a 100 proteínas relacionadas con fotosíntesis, transcripción y traducción (Nakada et al., 2008);

2) están rodeados por una doble membrana y la membrana interna tiene características similares a las membranas bacterianas, las cuales son diferentes al resto de las membranas de la célula hospedera (Keeling, 2010);

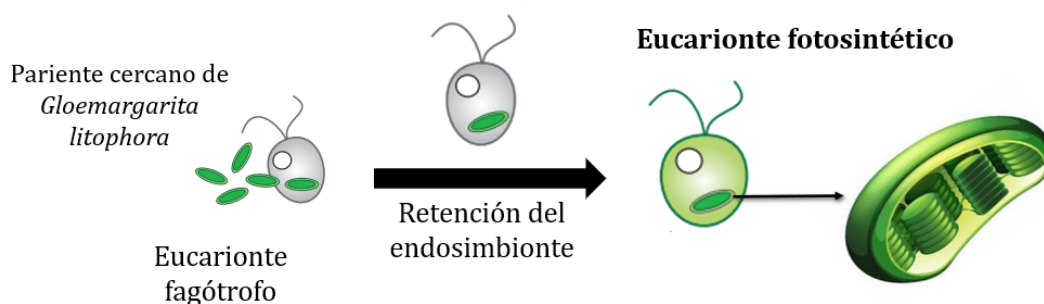
3) sus membranas tilacoidales poseen complejos proteicos similares a los de cianobacterias (Keeling, 2010);

4) en algunas algas los plástidos conservan un remanente de peptidoglicano (de Vries & Archibald, 2017);

5) se dividen por fisión binaria, de forma similar a como lo hacen las bacterias (Pyke, 2009);

6) al igual que las cianobacterias, contienen pigmentos fotosensibles (clorofilas *a* y *b* en *Viridiplantae*; ficobilisomas, ficoeritrina y clorofila *a* en *Rodophyta* y clorofila *a* en *Glaucophyta*) (Keeling, 2010);

7) los plástidos de *Viridiplantae* almacenan almidón, un polímero que se sintetiza mediante una ruta metabólica que tiene su origen en las cianobacterias (Keeling, 2010).



1,500 millones de años

Figura 1. Esquema que muestra la endosimbiosis entre un eucarionte fagótrofo y una cianobacteria de agua dulce. Modificado de (Reyes-Prieto et al., 2007).

La evidencia más contundente que ayudó a trazar de manera definitiva la relación de los plástidos con las cianobacterias, la aportó el grupo de Ponce-Toledo et al., (2017), quienes realizaron análisis filogenéticos con diferentes grupos de genes de cianobacterias comparándolos con genes de eucariontes fotosintéticos codificados en el núcleo y en el plástido. Así, encontraron que las cianobacterias que dieron lugar a los plástidos probablemente fueron ancestros cercanos al actual grupo de *G. litophora*, el cual está restringido a ambientes de agua dulce, lo que implica, según los autores, que los integrantes del filum *Archaeplastida* también pudieron haberse originado en ambientes de agua dulce (Ponce-Toledo et al., 2017). Este evento endosimbiótico ha sido único en el planeta y algunos autores han sugerido que pudo ser producto de una serie de rondas de *prueba y error* que eventualmente permitieron que se estableciera el primer eucarionte fotosintético (Bhattacharya et al., 2007; Reyes-Prieto et al., 2007).

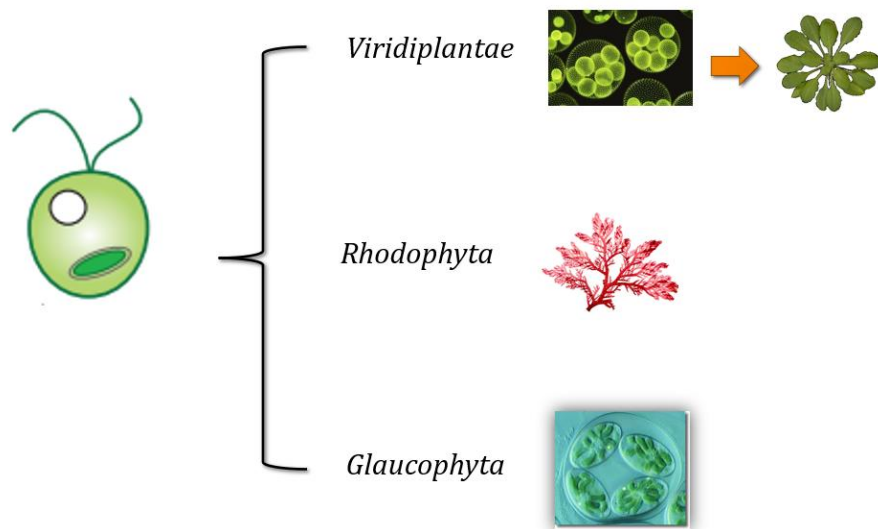


Figura 2. Tres grupos que conforman el linaje *Archaeplastida*.

Se ha intentado descifrar cuáles fueron los mecanismos que permitieron que el evento endosimbiótico arriba descrito tuviera tanto éxito, entre los cuales podemos citar los siguientes:

1) que los genes requeridos para la vida libre de la cianobacteria se transfirieron al núcleo del huésped y que sus productos proteicos ahora se importan y funcionan en el plástido. Esto permitió que hubiera un control sobre el endosimbionte que impidió que escapara de su

hospedero y regresara a su vida libre (Blank, 2013; McFadden, 2014; Ponce-Toledo & Moreira, 2019);

2) la transferencia de genes del endosimbionte al núcleo del hospedero, permitieron expandir las capacidades de monitoreo redox por parte de este último; este proceso conllevó a la evolución de rutas metabólicas que ayudaron al hospedero a poder contender con las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por el nuevo organelo (Ponce-Toledo & Moreira, 2019);

3) la coordinación de la expresión de genes del endosimbionte por parte del hospedero (Colleoni et al., 2010);

4) la coordinación de la tasa y el mecanismo de división del plástido, para lo cual se conservan las enzimas originales del endosimbionte pero ahora regulados por factores nucleares (McFadden, 2014);

5) los transportadores de metabolitos en el plástido, en gran parte se originaron mediante el re-etiquetado de proteínas de membranas del hospedero (en *Arabidopsis thaliana* 58% de los transportadores de plástidos son de origen eucariota); esto hizo que se estableciera una coordinación entre el metabolismo del endosimbionte con las necesidades energéticas del hospedero, particularmente a través de los transportadores de azúcares de fosfato y el translocador ADP/ATP (Blank, 2013; Colleoni et al., 2010; McFadden, 2014; Ponce-Toledo & Moreira, 2019; Rockwell et al., 2014; Weber et al., 2006);

6) la contribución del hospedero al proteoma del plástido, mediante el re-etiquetado de genes para dirigirlos hacia el endosimbionte, no sólo de transportadores de azúcares, sino de genes de mantenimiento (McFadden, 2014; Ponce-Toledo & Moreira, 2019);

7) la adquisición de la maquinaria de importación de proteínas en el endosimbionte (Colleoni et al., 2010);

Por lo anterior, algunos autores sugieren que muy probablemente todos estos mecanismos emergieron cuando el endosimbionte tenía capacidades bioquímicas que actualmente ya no tienen los plástidos (de Vries & Archibald, 2017), pero dichos mecanismos han sido tan exitosos que ahora el hospedero y su plástido están íntimamente integrados morfológica, metabólica y genéticamente (McFadden, 2014).

1.4. Endosimbiosis: un evento excepcional

De la misma manera que el surgimiento de las cianobacterias de agua dulce que crearon la fotosíntesis tuvo un impacto sobre la vida en la tierra, el surgimiento de los primeros eucariontes fotosintéticos también lo tuvo. Ahora sabemos que la colonización de la Tierra por los eucariontes fotosintéticos se dio después de la segunda mitad del Mesoproterozoico (1,200 – 1,500 millones de años), por lo que probablemente no se enfrentaron a las condiciones de anoxia que tuvieron las cianobacterias. Sin embargo, los eucariontes fotosintéticos también contribuyeron al aumento de la concentración del oxígeno en la atmósfera, que dio lugar a la generación de muchas formas de vida, incluida la especie humana (Blank, 2013). Sin embargo, la endosimbiosis no es un fenómeno común en la naturaleza, sino más bien excepcional, por lo que hasta ahora solamente se ha identificado un segundo linaje de eucariontes fotosintéticos surgido por endosimbiosis: la ameba de agua dulce *Paulinella chromatophora*, y los organelos que desempeñan la fotosíntesis se denominan cromatóforos, los cuales derivan del grupo de cianobacterias *Synechococcus/Prochlorococcus* (Ponce-Toledo & Moreira, 2019). Algunos investigadores ya lo han tomado como modelo de estudio para entender la endosimbiosis, así como las semejanzas y diferencias observadas con *Archaeplastida* (Delaye, L. et al, 2016).

La Figura 3, muestra el panorama de los linajes de eucariontes fotosintéticos que han surgido gracias a la endosimbiosis.

1.5. Pérdida de la fotosíntesis en la naturaleza

Ahora que hemos repasado brevemente la importancia y el impacto que ha tenido el surgimiento de los primeros eucariontes fotosintéticos, vale la pena voltear a ver a un grupo de organismos dentro de este gran linaje que desearon la fotosíntesis por completo y ahora son exclusivamente heterótrofos. Las preguntas que han surgido alrededor de este fenómeno son: ¿quiénes son?, ¿cómo sucedió?, ¿conservan todavía un plástido?, y si aún lo conservan ¿es funcional?, ¿fue un evento fortuito o le proporcionó una ventaja evolutiva a dichos organismos y a su supervivencia?, ¿cómo es su actual estilo de vida?, ¿por qué si es tan raro el establecimiento de eucariontes fotosintéticos, esos organismos ahora prescindan de la fotosíntesis?

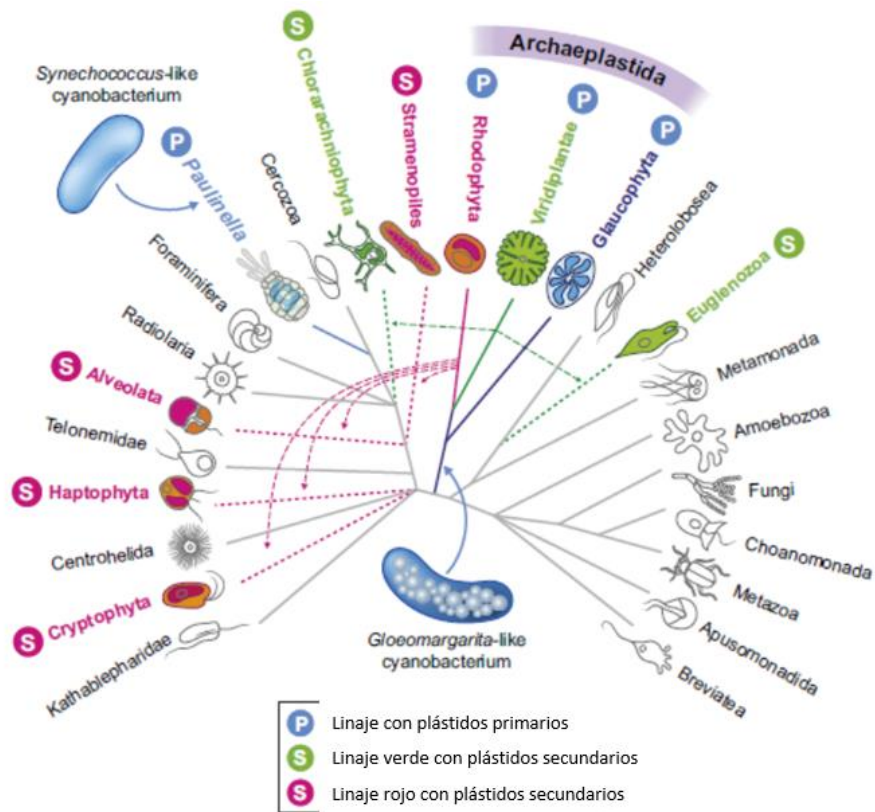


Figura 3. Distribución global de los linajes eucariontes fotosintéticos. Tomado de (Ponce-Toledo & Moreira, 2019).

Este campo de estudio ha despertado interés, aun cuando se han identificado pocas especies que han perdido la capacidad fotosintética. Para ser más precisos, se han identificado cuatro géneros de algas verdes que han perdido la fotosíntesis, dos de éstas son parásitas, *Prototheca wickerhamii* y *Helicosporidium* sp., y dos de vida libre, *Polytoma* y *Polytomella* sp. También existen algunas plantas parásitas como *Rafflesia lagascae* y *Epifagus virginiana* (Smith & Asmail, 2014). Por otra parte, alejado de las plantas y las algas, un protista surgido de una endosimbiosis secundaria, *Euglena longa*, también perdió la fotosíntesis (Záhonová et al., 2018).

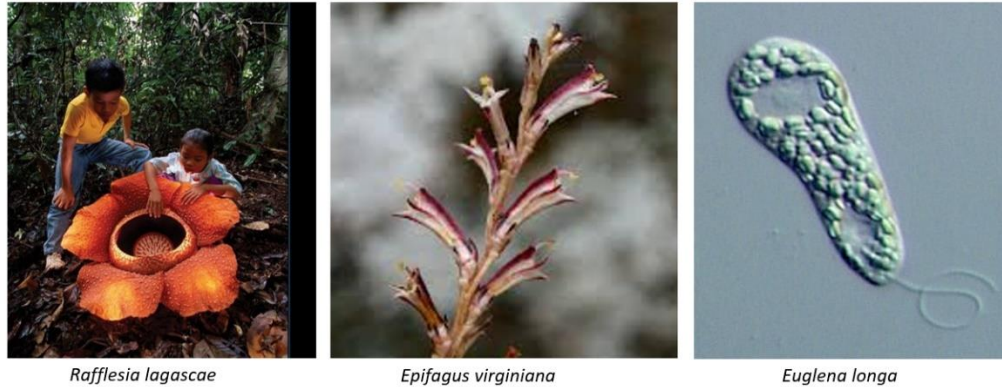


Figura 4. Imágenes de algunos organismos que han perdido la fotosíntesis de manera independiente, las plantas parásitas *Rafflesia lagascae* y *Epifagus virginiana* y el protista *Euglena longa*.

Se ha sugerido que aquellos organismos que perdieron la capacidad fotosintética primero pasaron por una etapa mixotrófica, es decir, que en un momento dado fueron tanto autótrofos como heterótrofos, lo cual es una situación muy costosa desde el punto de vista energético (Figueroa-Martinez et al., 2015; Smith, 2018), ya que mantener la maquinaria fotosintética involucra conservar también diversas rutas metabólicas que participan en la síntesis de proteínas y de pigmentos. Por lo mismo, pudo resultar ventajoso para estos organismos el haber perdido la fotosíntesis, aunque también cabe la posibilidad de que acontecieran ciertas mutaciones que afectaron la fotosíntesis y obligaran a estos organismos a tomar el camino hacia la heterotrofia (Asmail & Smith, 2016; Smith & Lee, 2014).

Como resultado de la pérdida de la fotosíntesis, muchos de estos organismos son incoloros, además, se ha observado que tienen estilos de vida y características heterogéneas, unos son de vida libre, otros parásitos, unos unicelulares y otros multicelulares; debido a esto se ha sugerido que este evento sucedió independientemente en diversos linajes como se muestra para el caso de las algas verdes (Figura 5).

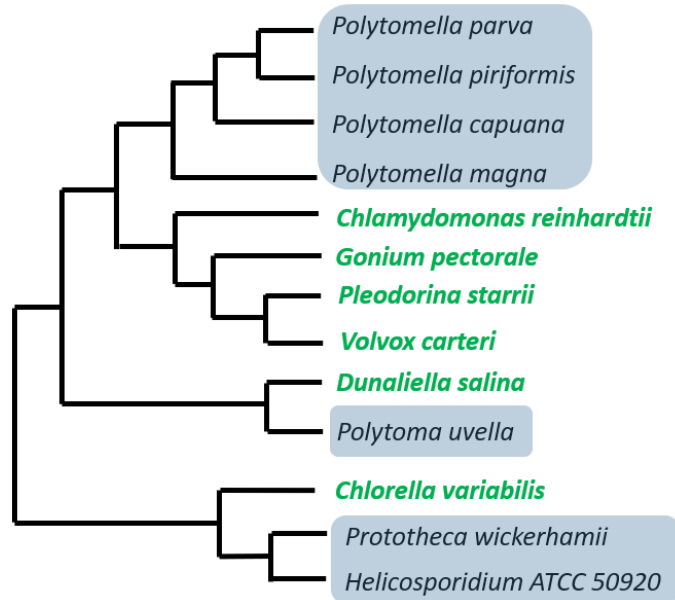


Figura 5. Árbol filogenético realizado con secuencias de rDNA18S, que muestra a las algas del clado *Chlorophyta*, dentro de las cuales se han identificado especies no fotosintéticas. Modificado de (Smith & Lee, 2014).

1.6. Organismos que han perdido la fotosíntesis

Los organismos que han perdido la capacidad fotosintética ya no poseen genes relacionados con la fotosíntesis, muchos de los cuales se encuentran típicamente codificados en el genoma del plástido, de hecho, parece existir una correlación entre la reducción del genoma del plástido de los organismos incoloros con respecto a sus parientes cercanos fotosintéticos (de Koning & Keeling, 2006; Keeling, 2010; Molina et al., 2014; Smith & Asmail, 2014; Smith & Lee, 2014; Yan et al., 2015). Sin embargo, esto no es una regla general, como se ha visto con el alga incolora de vida libre *Polytoma uvella*, la cual tiene un genoma plastídico grande (230 kb), incluso más grande que su pariente cercano fotosintético *Chlamydomonas leiostraca* (167 kb). A pesar de que el genoma del plástido de *P. uvella* no conserva genes fotosintéticos, sorprende que tiene grandes regiones no codificantes conservadas (75%) (Figuroa-Martinez, Nedelcu, Reyes-Prieto, et al., 2017; Figuroa-Martinez, Nedelcu, Smith, et al., 2017).

1.7. *Polytomella parva*

Polytomella es un grupo de algas unicelulares de vida libre las cuales perdieron la capacidad fotosintética; el grupo está conformado por cuatro especies: *parva*, *magna*, *capuana*

y *piriformis* (MacDonald & Lee, 2016). Estas algas son cercanas filogenéticamente a *Chlamydomonas reinhardtii*, la cual se considera el modelo de estudio de las algas verdes unicelulares (Smith & Lee, 2014).

Los primeros esfuerzos para caracterizar metabólicamente a *Polytomella* ocurrieron en los años 1950's, cuando se observó que esta alga crecía exclusivamente en presencia de etanol y acetato como fuentes de carbono; a esto se sumó la posterior identificación y caracterización de las enzimas que metabolizan dichas fuentes de carbono (Ballicora et al., 2004; Barker et al., 1951; Lwoff et al., 1950; Neuhaus & Emes, 2000). Después, en los años 1970's se observó mediante microscopía de Nomarski y microscopía electrónica de barrido la estructura de las células, incluyendo los flagelos, los plástidos con sus cúmulos de almidón y las diferentes etapas de enquistamiento por las que pasan estas algas (Brown, Massalski, & Leppard, 1976; Brown, Massalski, & Patenaude, 1976; Moore et al., 1970). De esos estudios a la fecha, no se habían presentado imágenes adicionales de esta alga y sus plástidos, si no hasta el presente trabajo.

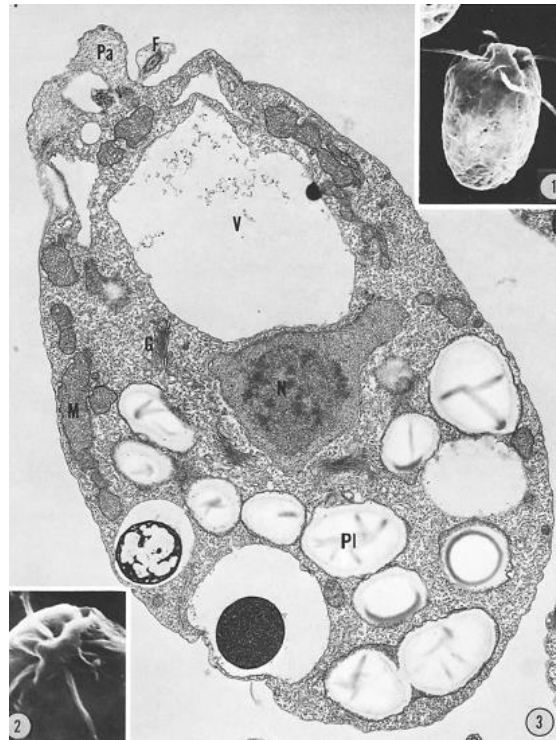


Figura 6. Fotografía de microscopía electrónica de una célula de *Polytomella parva*, en la que se observan el núcleo (N), una vacuola grande de color claro (V), las mitocondrias en la periferia de la célula (M) y los plástidos (PI) que contienen gránulos de almidón de color blanco, también se muestra la zona de la que emergen los cuatro flagelos del alga (Pa y F) (Brown, Massalski & Patenaude, 1976).

1.8. Pérdida de la fotosíntesis y los plástidos de *Polytomella*

En 2014, el grupo de David Smith secuenció el genoma de las cuatro especies de *Polytomella* y no pudieron identificar secuencias de genes que están típicamente localizados en el genoma del plástido, es decir, genes correspondientes al metabolismo de DNA de plástido, como: RNA's ribosomales, RNA's de transferencia, proteínas ribosomales y componentes de los fotosistemas. Esto llamó la atención de los autores, ya que los genes codificados en la mitocondria (el otro organelo surgido por endosimbiosis) sí estaban presentes (Smith & Lee, 2014). Por lo tanto, los autores concluyeron que estaban frente a un alga unicelular incolora que había perdido por completo el genoma del plástido. La ausencia de un genoma plastídico también se observó ese mismo año en la planta parásita *Rafflesia lagascae* (Molina et al., 2014). Adicionalmente, Asmail (2015) reportó el transcriptoma de las cuatro especies de *Polytomella*, registrando transcritos relacionados con el metabolismo del plástido, lo que indica que este organelo de *Polytomella*, aun cuando ya no sintetiza sus propias proteínas, sí es activo metabólicamente (Asmail, 2015). Lo anterior es consistente con un reporte anterior de Atteia et al., (2005) quienes habían identificado en el plástido del alga incolora a las enzimas GSAT (EC 5.4.3.8), PPOX (EC 1.3.3.4) y FeC (EC 4.99.1.1), cruciales para la síntesis del cofactor hemo, esencial en la respiración celular (Atteia et al., 2005). Además, al igual que Smith & Lee, (2014), Asmail (2015) tampoco pudo identificar transcritos de genes que típicamente se localizan en el genoma del plástido. Todo lo anterior concuerda con lo observado por algunos autores años atrás, acerca de lo infructuoso que había resultado detectar los genes y transcritos correspondientes a rRNA's del plástido de *Polytomella* (Nedelcu et al., 1996; Nedelcu, 2001).

2. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA

Los plástidos surgieron mediante un evento endosimbiótico excepcional y son los encargados de realizar la fotosíntesis, fenómeno que generó cambios en la atmósfera terrestre. En algunas especies de algas y plantas, estos organelos han perdido la capacidad fotosintética, pero aún se encuentran presentes en dichas especies.

El fenómeno de la pérdida de la fotosíntesis ha despertado interés y ha encaminado diversas investigaciones hacia un mayor conocimiento de estos organelos, por ello, con el objetivo de comprender cómo se han adaptado las especies no fotosintéticas, su fisiología y su estilo de vida, este trabajo tiene el objetivo de caracterizar el plástido de un alga unicelular de vida libre que perdió la fotosíntesis, *Polytomella parva*. Así, se pretende aportar nueva información a la extensa base de datos de los plástidos existentes, así como estudiar sus semejanzas y diferencias.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Crecimiento de *Polytomella parva*

Polytomella parva (*Polytomella* sp., número de cepa SAG 198.80, de la Colección de Algas en la Universidad de Gotinga, Alemania), fue cultivada a temperatura ambiente por 48 h en un matraz de fondo plano sin agitación con un medio de cultivo descrito previamente (Colina-Tenorio et al., 2016).

3.2. Aislamiento de los plástidos de *Polytomella*

Los plástidos se aislaron utilizando el protocolo empleado por Atteia et al., (2005), con la modificación como se describe a continuación: 48 L del cultivo de *P. parva* fueron centrifugados a 1600 x g por 10 minutos a 4° C, la pastilla resultante se resuspendió en el Medio de Aislamiento del Plástido (MAP) previamente reportado (Denyer & Pike, 2008). Las células obtenidas se incubaron a -70° C por 12 horas y posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF y 50 µg/mL TLCK). Las células resuspendidas se rompieron suavemente con un homogenizador de vidrio (Potter) con vástago de vidrio y los pasos subsecuentes se realizaron a 4° C. El extracto de células fue centrifugado a 500 x g por 2 min, generando una pastilla de color blanco y un sobrenadante de color café claro. La pastilla se lavó cuatro veces, es decir, se resuspendió suavemente en 5 mL de MAP y se centrifugó a 500 x g por 2 minutos, resultando una pastilla blanca enriquecida en plástidos incoloros. La fracción final fue resuspendida en 1 mL de MAP y almacenada en alícuotas de 200 µL a -70° C para usarse en análisis subsecuentes.

3.3. Caracterización morfológica

3.3.1. Microscopía de luz

Se tiñeron células de cultivos frescos de *Polytomella parva* con Lugol (Bates et al., 1943) y se observaron en un microscopio invertido Olympus IX71 con un objetivo 100x.

3.3.2 Microscopía de Nomarski

Adicionalmente, se observaron cultivos frescos de *P. parva* y fracciones de los plástidos aislados mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), o microscopía de Nomarski, para lo cual se siguió un protocolo previamente montado para el gusano

Caenorhabditis elegans (Porta-de-la-Riva et al., 2012). Las muestras se pusieron en una capa de agar (2%) previamente preparada sobre un portaobjetos y se observaron con un microscopio Nikon YFL; las imágenes se tomaron con la cámara Zeiss AxioCam MRc5.

3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión: rebanadas de células de *Polytomella parva*

Se observaron los plástidos incoloros dentro de las células mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las muestras se prepararon como se menciona a continuación: se centrifugaron 15 mL de un cultivo fresco de *Polytomella parva*, por 10 minutos a 4°C, la pastilla resultante se fijó mediante incubación en una solución de glutaraldehído (3%) por 8 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron post-fijadas con OsO₄ (1%) por 1 hora, se deshidrataron con etanol y se embebieron en la resina epóxica Spur. La preparación se cortó en rebanadas de 8 µm, las cuales se colocaron en rejillas y se observaron en un microscopio electrónico JEOL 1010 a 80 kV. Se midió el largo y ancho de los plástidos dentro de las células, así como de los gránulos de almidón que contienen, utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

3.3.4. Microscopía electrónica de transmisión: plástidos aislados

Las fracciones de los plástidos se diluyeron en agua para obtener concentraciones finales de sorbitol de 240, 150, 29, 8, 1.62 y 0.806 mM y se observaron mediante TEM como se describe a continuación: se colocaron 10 µL de la muestra en rejillas de carbón activado por 10 minutos, se expusieron las rejillas a un foco de 100 W a una distancia de 20 cm durante 10 minutos, y se observó en el microscopio electrónico JEOL 1010 a 80 kV. Para obtener los gránulos de almidón, la pastilla enriquecida de plástidos se dializó toda la noche a 4 °C con la solución MAP sin sorbitol. Para la diálisis, se utilizó un casete *Slide-A-Lyzer* (Thermo Fisher Scientific) con un corte de peso molecular de 10,000 Da. Posteriormente, una fracción de las muestras dializadas se incubó a 90 °C por 5 minutos para romper la estructura del plástido y se observaron mediante TEM siguiendo el procedimiento descrito arriba.

3.4 Análisis de espectrometría de masas

Se resolvieron dos alícuotas de 200 µL en geles de acrilamida al 10% (Schägger, 2006), éstos se tiñeron con azul de Coomassie, se cortaron y se prepararon para analizarlos por espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Heide et al., 2012) con ligeras modificaciones. Se cortaron las bandas del gel en 40 rebanadas de 1 mm de grosor aproximadamente y cada rebanada se incubó de manera independiente con 10 mM de DTT por 1 hora, seguido de una incubación con 30 mM de cloroacetamida por 45 minutos. Los péptidos resultantes se recuperaron, se secaron y se resuspendieron en una solución de 5% de acetonitrilo y 0.5% de ácido fórmico. Antes de ser analizados, los péptidos se separaron mediante cromatografía líquida con un gradiente de acetonitrilo de 5-40% y 40-80%; 15 y 3 minutos respectivamente, seguido de una elución final de 10 minutos con 80% de acetonitrilo. Los péptidos se analizaron en línea en un espectrómetro de masas *Q exactive* (Thermo Fisher Scientific), operando en modo de iones positivos con cambios automáticos entre MS1 y MS2, con los parámetros descritos previamente (Guerrero-Castillo et al., 2017; Huynen et al., 2016). Los datos crudos del espectrómetro de masas se usaron para una búsqueda mediante el software MaxQuant (v1.5.0.25) empleando la base de datos del transcriptoma de *P. parva* (Mallet & Lee, 2006; Smith et al., 2010). Las secuencias resultantes se buscaron mediante BLAST (Altschul et al., 1990) en las bases de datos públicas. El valor iBAQ especifica el enriquecimiento de ciertas secuencias de proteínas en cada rebanada, y con base en el iBAQ seleccionamos a aquellas proteínas con un valor de 1.0 para realizar la búsqueda por BLAST.

3.5 Análisis *in silico*

La anotación del proteoma de *P. parva* se realizó con base en los datos de espectrometría de masas, así como la similitud de las secuencias buscadas mediante BLAST. Dichas búsquedas se realizaron limitándolas al clado *Viridiplantae*. Las búsquedas de BLAST se realizaron bajo los siguientes criterios: alineamientos con BLOSUM62 y valor E de 1×10^{-10} . Las secuencias para realizar las búsquedas por BLAST se obtuvieron de la siguiente manera: el transcriptoma de *P. parva* SAG 63-3 (Mallet & Lee, 2006; Smith et al., 2010) se obtuvo de la base de datos *Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (sample MMETSP0052)* en iMicrobe (<https://www.imicrobe.us>). El cual también está disponible en NCBI (Sequence Read Archive SRX551283). En cuanto al proteoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, constituido de 996 secuencias (Terashima et al., 2011), se obtuvo de la base de datos *Fungal*

Genomics Resource (MycoCosm) v3.0 del *DOE Joint Genome Institute* (JGI) at <https://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Chlre3> y mediante BLAST se obtuvieron los números de acceso de las proteínas de *C. reinhardtii* depositadas en GenBank. Además, obtuvimos las secuencias de los proteomas de amiloplastos de trigo (Balmer et al., 2006), de los gránulos de almidón de arroz (Xing et al., 2016), de las 80 secuencias reportadas previamente en el transcriptoma del plástido de *P. parva* (Asmail, 2015), del compendio de proteínas en *Greencut*, la cual es una base de datos de proteínas exclusivas en organismos fotosintéticos (Karpowicz et al., 2011) y de la base de datos de proteomas de plantas (PPDB; <http://ppdb.tc.cornell.edu>) en la que están depositadas todas las proteínas identificadas experimentalmente en *Arabidopsis* y maíz (Sun et al., 2009).

Adicionalmente, el proteoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*, así como el proteoma del plástido de *P. parva* obtenido en este trabajo, fueron comparados mediante BLAST con el transcriptoma del plástido incoloro de *Euglena longa* (Záhonová et al., 2018), utilizando los mismos parámetros mencionados arriba.

3.6. Anotación del proteoma

Se clasificaron las proteínas en 27 diferentes rutas metabólicas mediante la base de datos Mercator4 (<https://plabipd.de/portal/mercator4>) (Schwacke et al., 2019), la cual incluye una sección de aquellas proteínas “no asignadas a una ruta metabólica en particular”. Las secuencias de aminoácidos de *P. parva* se buscaron en la base de datos STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2019) para obtener los números de accesos de KEGG, UNIPROT o, en su caso, el número E.C. para enzimas y, de nuevo, las búsquedas se restringieron al clado *Viridiplantae*. La predicción de los péptidos de tránsito se obtuvieron mediante los servidores ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) (Emanuelsson et al., 1999) y PredAlgo (Tardif et al., 2012). Las secuencias también se compararon con la base de datos PPDB (PPDB; <http://ppdb.tc.cornell.edu>) (Sun et al., 2009) en la cual las secuencias están anotadas especificando su localización subcelular. Se depositaron las secuencias de nucleótidos del transcriptoma de *P. parva* en el repositorio de GenBank, el cual otorgó los números de acceso MW052777 y de MT376979 a MT377490. También se depositaron los datos originales obtenidos por espectrometría de masas en la base de datos ProteomeXchange con el identificador PXD022051.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización morfológica

4.1.1. Observación de *Polytomella parva* y sus plástidos mediante microscopía óptica y microscopía de Nomarski

La Figura 7 muestra cultivos frescos de *Polytomella* tratados con Lugol y sin tratar, se aprecia el tamaño de la célula y la distribución y tamaño de los plástidos que alberga. El Lugol atraviesa las membranas de la célula y del organelo y se une a las cadenas de amilosa del almidón (A) por lo que se puede apreciar una tinción violeta de los plástidos mediante microscopía óptica. Por su parte, la microscopía de Nomarski (B) nos permite observar las células de *Polytomella* vivas y sin teñir. También observamos con esta técnica una fracción enriquecida de plástidos (C), encontrando que el tamaño de los organelos aislados es parecido al de los que se encuentran en el interior de la célula. Además, se pueden apreciar en los paneles A y B los flagelos de *Polytomella*.

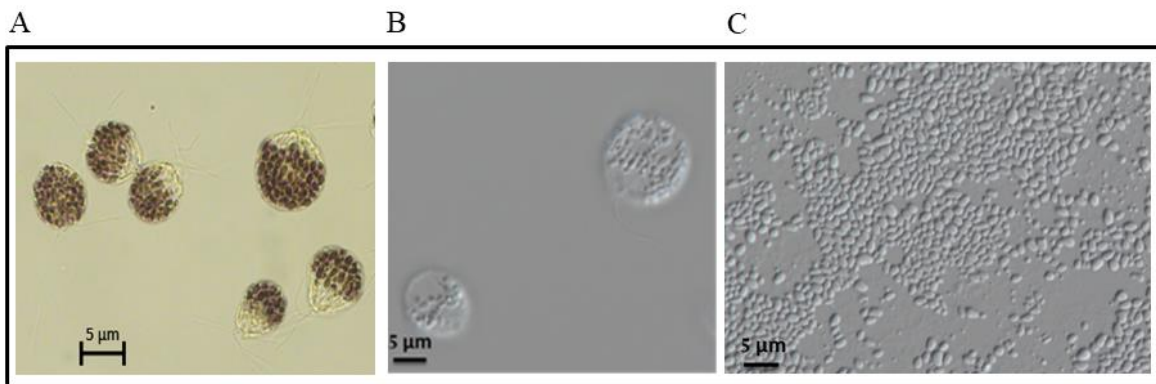


Figura 7. Imágenes de microscopía de las células de *Polytomella parva* y los plástidos que albergan. (A) Microscopía de luz de células de *P. parva* teñidas con Lugol; (B) Cultivo fresco de *P. parva* y (C) fracción enriquecida de plástidos, observados con microscopía de Nomarski (60x).

4.1.2. Observación de *Polytomella parva* y sus plástidos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Mediante microscopía óptica y de Nomarski obtuvimos una primera visualización de *Polytomella* y sus plástidos, sin embargo, para observar con mayor resolución estas estructuras, utilizamos TEM.

La Figura 8 muestra rebanadas de *Polytomella parva* en donde se observa la distribución de los diferentes organelos, las mitocondrias circunscritas a la parte basal y en la periferia de las células, el núcleo en el centro de la célula, la vacuola también en el centro de la célula, en algunos casos la base de los flagelos y los plástidos que son notorios por su aspecto blanquecino debido al almidón que contienen. En las imágenes B, C y D se observa con mayor detalle la doble membrana que rodea a los plástidos y también se logra distinguir cómo algunos plástidos están completamente llenos de almidón, mientras que otros tienen gránulos de almidón dispersos dentro del plástido y hay áreas en las que estos gránulos no están presentes. Así, se aprecia la morfología de los plástidos, su tamaño y distribución dentro de la célula, la doble membrana propia de los plástidos y el tamaño de los gránulos en su interior.

4.1.3. Observación de tres fracciones diferentes obtenidas del protocolo de aislamiento de plástidos

Las tres fracciones obtenidas durante el aislamiento de los plástidos se observaron mediante TEM. La Figura 9 muestra el esquema del protocolo de aislamiento de plástidos y fotografías al microscopio electrónico de cada una de las fracciones después de diluirlas con agua destilada.

La pastilla de plástidos corresponde a la observada anteriormente con microscopía de Nomarski. Apreciamos aquí el tamaño y la forma ovalada que tienen estos plástidos con sus gránulos de almidón en el interior, así como también la superficie de los organelos, que tiene una apariencia de red y que podría corresponder a la membrana externa. En la fracción 2 se observa una menor cantidad de plástidos con respecto a la pastilla de plástidos. Y en la fracción 3, que corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias (Atteia et al., 2005), no se observan plástidos ni se distingue con claridad la presencia de algún otro organelo.

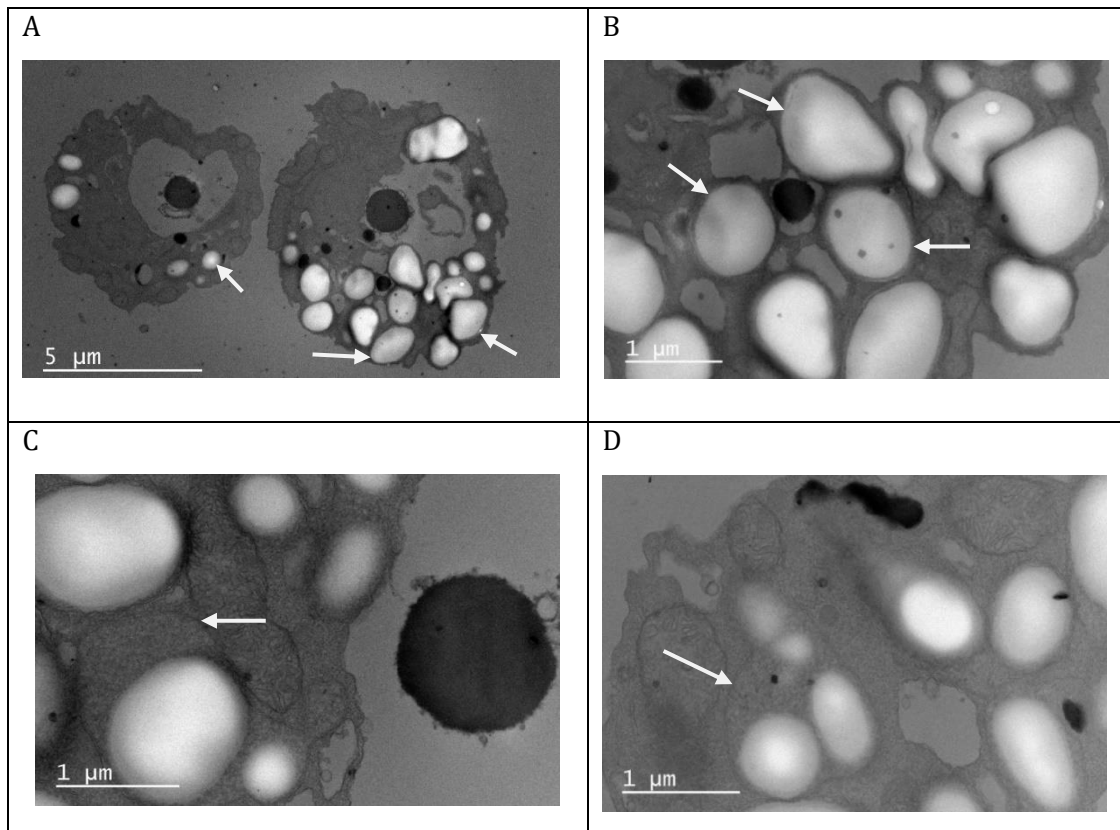


Figura 8. Fotografías de rebanadas de células de *P. parva* observadas mediante TEM con un microscopio JEOL-JEM 1200 a 80kV. (A) Las flechas indican la distribución de los plástidos dentro del alga; (B) las flechas señalan plástidos aparentemente llenos de gránulos de almidón; (C y D) las flechas señalan la membrana de los plástidos con gránulos de almidón dispersos en el interior del plástido.

Se observa que las tres fracciones son diferentes en contenido y que la fracción más abundante en plástidos es la primera fracción del protocolo, obtenida mediante centrifugación a baja velocidad.

4.1.4. Morfología de los plástidos a diferentes concentraciones del osmoprotector sorbitol

El sorbitol es un polialcohol que funciona como osmoprotector, evitando que los densos plástidos sufran un choque osmótico durante el aislamiento, por ello, muchos protocolos de aislamiento de plástidos contienen sorbitol en sus amortiguadores (Harries & Rösger, 2008; Müller et al., 2008). Como parte de la caracterización de los plástidos, evaluamos su morfología y tamaño a diferentes concentraciones de sorbitol.

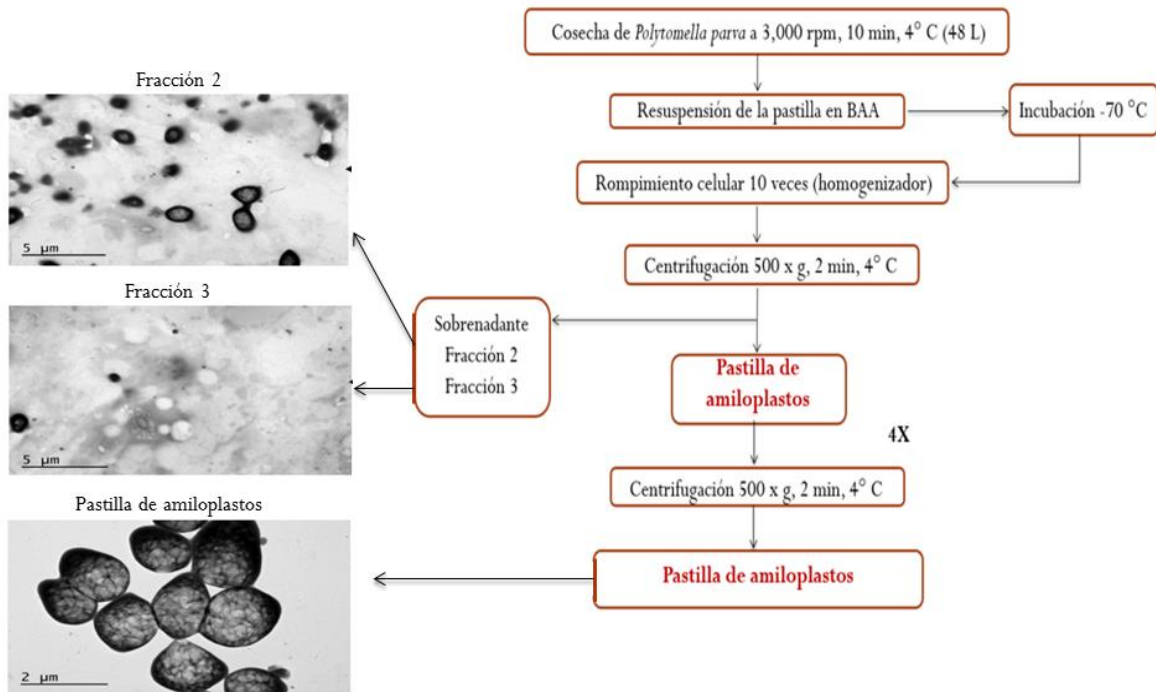


Figura 9. Esquema del protocolo de aislamiento de plástidos e imágenes de TEM de las tres fracciones obtenidas.

La Figura 10 muestra que los plástidos conservan su tamaño y su forma ovalada a diferentes concentraciones del osmoprotector, asimismo, la red que rodea a los organelos se conserva intacta y en algunas imágenes se pueden apreciar mejor los gránulos de almidón que se encuentran en su interior. Estas imágenes fueron tomadas de preparaciones independientes, lo cual también indica que el protocolo establecido es reproducible.

4.1.5. Liberación de los gránulos de almidón

La Figura 11 muestra cómo se afecta la integridad de los plástidos cuando se elimina el osmoprotector sorbitol mediante diálisis a 4 °C durante toda la noche, seguido de incubar a los plástidos a 90 °C durante 5 minutos.

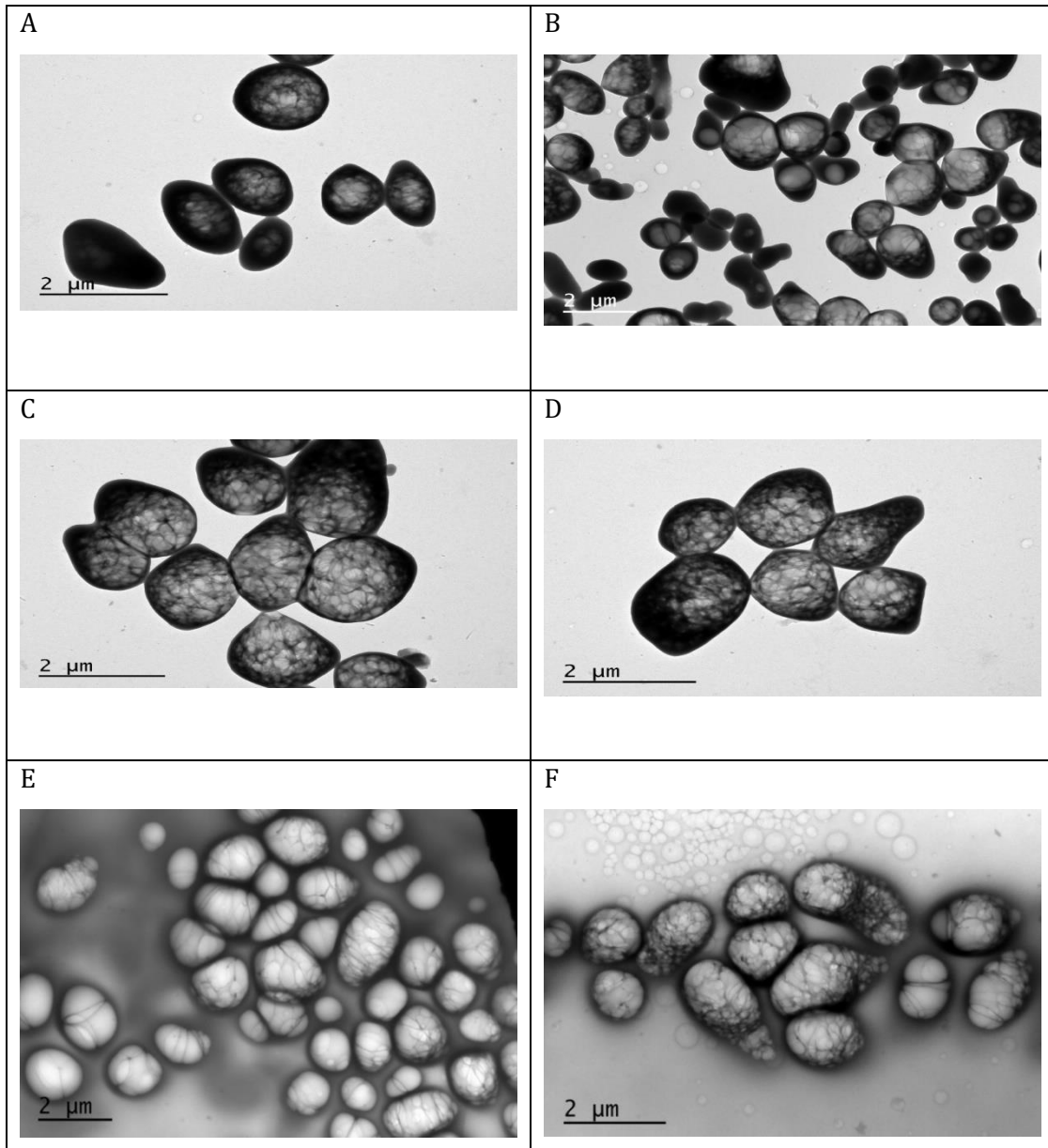


Figura 10. Fotografías que muestran la morfología de los plástidos a diferente osmolaridad. (A) 240 mM; (B) 150 mM; (C) 29 mM; (D) 8 mM; (E) 1.62 mM y (F) 0.806 mM, de sorbitol.

En el panel A se muestra la fracción enriquecida en plástidos resuspendida en un amortiguador con 150 mM de sorbitol; en el panel B se observa que la morfología de los plástidos cambia después de eliminar el sorbitol del medio, y en C se ven los gránulos de almidón liberados después del tratamiento a alta temperatura, lo que propicia la ruptura de la doble membrana del organelo. Todas las imágenes se obtuvieron a la misma magnificación, por lo que son claramente distinguibles los plástidos de los gránulos de almidón que contienen. Lo

anterior indica que los plástidos obtenidos mediante el protocolo de aislamiento se encuentran íntegros y que pueden utilizarse en estudios bioquímicos.

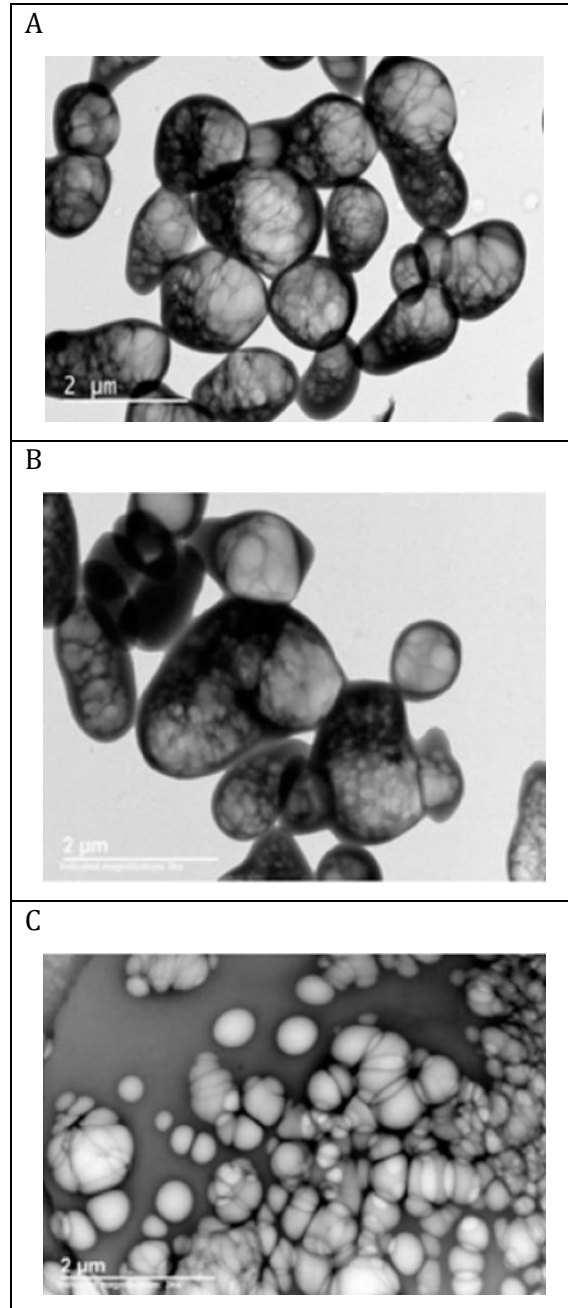


Figura 11. Fotografías que muestran la liberación de los gránulos de almidón de los plástidos, después de un tratamiento por choque osmótico y aumento de temperatura. (A) plástidos íntegros a 150 mM de sorbitol; (B) plástidos sin sorbitol; (C) gránulos de almidón liberados después de calentar los plástidos sin sorbitol.

4.1.6. Tamaño de los plástidos vs. tamaño de los gránulos de almidón

Al realizar la medición de los plástidos y de los gránulos de almidón mediante el software ImageJ, evaluamos las diferencias en tamaño. La Figura 12 muestra un ejemplo de cómo se realizó la medición de los organelos íntegros dentro de *Polytomella* (A) y aislados (B), y la medición de los gránulos de almidón dentro de los plástidos (C) y liberados mediante el tratamiento con calor (D).

El plástidos más pequeño tuvo un tamaño de $0.635 \times 1.354 \mu\text{m}$ y el más grande de $0.933 \times 2.858 \mu\text{m}$; mientras que el gránulo de almidón más pequeño fue de $0.188 \times 0.250 \mu\text{m}$ y el más grande de $0.781 \times 0.938 \mu\text{m}$.

Es importante destacar que el tamaño de los plástidos intactos observados en las rebanadas de *Polytomella* (A) es semejante al observado en los plástidos aislados, y el tamaño de los gránulos de almidón registrados en las rebanadas (C) también coinciden con los de los gránulos liberados (D).

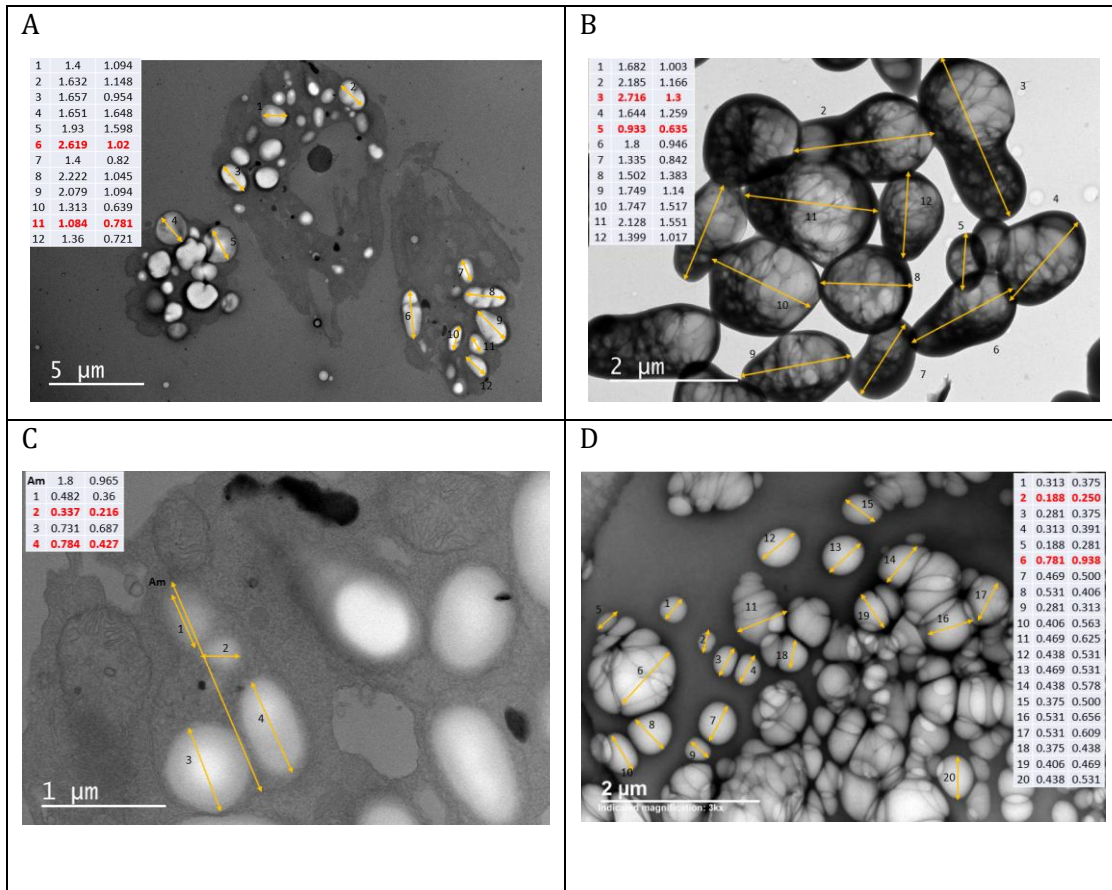


Figura 12. Fotografías de TEM empleadas para la medición de los plástidos y los gránulos de almidón con el software ImageJ, las líneas amarillas indican los plástidos y los gránulos de almidón medidos, y las tablas indican los resultados de la medición en μm ; en color rojo se señalan los tamaños más grandes y pequeños. (A) Rebanadas de *Polytomella* en las que se midieron los plástidos; (B) plástidos aislados a una concentración de 150 mM de sorbitol; (C) rebanadas de *Polytomella* en los que se midieron los gránulos de almidón contenidos en los plástidos; (D) gránulos de almidón liberados.

4.2. Caracterización proteómica

4.2.1 Patrón electroforético de los plástidos de *Polytomella*

Una vez que caracterizamos morfológicamente los plástidos, observamos el perfil electroforético de sus proteínas mediante un gel desnaturalizante SDS-PAGE, el cual se muestra en la Figura 13. Este patrón electroforético se analizó mediante espectrometría de masas.

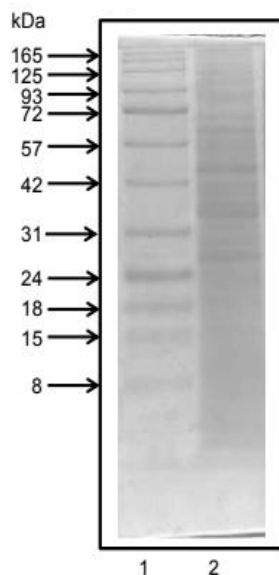


Figura 13. Patrón electroforético de los plástidos de *Polytomella*. En el carril 1 observamos el marcador de peso molecular, en el carril 2 tenemos el patrón electroforético de los plástidos de *Polytomella*, los cuales se solubilizaron con SDS (1%). En el carril 2 se cargó el equivalente a 300 microgramos de proteína, sin embargo, esta cantidad está sobreestimada, ya que al almidón interfiere en la cuantificación de proteína.

4.2.2 Identificación de proteínas del plástido mediante espectrometría de masas y análisis por homología

El proteoma del plástido de *Polytomella* se obtuvo mediante dos enfoques, espectrometría de masas y análisis por homología de secuencias o bioinformática, en este último comparamos el transcriptoma de *Polytomella* con secuencias de péptidos y transcritos de plástidos de algas y plantas que ya han sido caracterizados. El proteoma resultante consta de 309 proteínas; mediante espectrometría de masas identificamos 216, de las cuales 4 no fueron identificadas por el enfoque bioinformático. Por su parte, mediante el análisis bioinformático se identificaron 305 secuencias de proteínas, de las cuales 93 no se encontraron

por espectrometría de masas. La Figura 14 ilustra la contribución de cada metodología para la obtención del proteoma final del plástido.

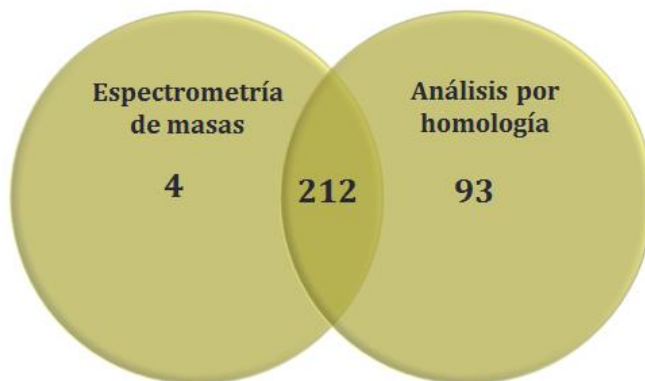


Figura 14. Diagrama de Venn que muestra la contribución de los dos enfoques, espectrometría de masas (EM) y análisis por homología (AH), para la obtención del proteoma del plástido de *P. parva*. En total, identificamos 309 proteínas, 216 se identificaron mediante EM y 305 mediante AH. 4 proteínas se identificaron exclusivamente por EM y 93 se identificaron solamente mediante AH. En total, 212 secuencias se identificaron con ambos métodos.

4.2.3 Proteoma del plástido de *Polytomella parva*

La Tabla 1 enlista todas las proteínas del plástido de *P. parva* cuyas secuencias fueron identificadas, agrupadas cada una de las rutas metabólicas a la que pertenecen. Este compendio se clasificó mediante el programa Mercator4 y se anotó con base en la homología de secuencias tal y como se menciona en la sección de Materiales y métodos. Las secuencias están clasificadas en 27 rutas metabólicas que incluyen una categoría de “*proteínas no asignadas*”, es decir, aquellas que no fueron clasificadas en alguna ruta metabólica particular por Mercator4.

La Figura 15 muestra el porcentaje de abundancia de secuencias dentro de cada ruta metabólica identificada. Al ser heterótrofa, esta alga ya no utiliza la energía de la luz para subsistir, sin embargo, conserva rutas bioquímicas fundamentales, como lo indica la gran abundancia de enzimas que participan en el metabolismo de almidón y de lípidos. También están altamente representadas las enzimas que participan en metabolismo de aminoácidos, particularmente en las vías relacionadas al aspartato, al glutamato y al shikimato. Llama la atención la presencia de algunas enzimas del Ciclo de Calvin y que representan un buen

porcentaje de todos los componentes del proteoma, así como de algunas enzimas que participan en procesos como la fotorrespiración y fotofosforilación. Están también presentes componentes que participan en la síntesis de grupos de azufre, cofactores y coenzimas. Las rutas metabólicas con mayor número de secuencias fueron el sistema de translocación de proteínas al interior del plástido, la biosíntesis de aminoácidos, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de nucleótidos y el metabolismo de almidón. En cuanto a las proteínas de membrana se conservan diversos transportadores de solutos, así como algunas subunidades pertenecientes a sistemas de translocación de proteínas en membrana tilacoidales. Esto último, despierta mucho interés ya que, a diferencia de los cloroplastos, los plástidos incoloros carecen de membranas tilacoidales, pero conservan una membrana interna.

Tabla 1. Proteoma del plástido de *Polytomella parva*. Las columnas de la izquierda a la derecha muestran: el número de secuencias identificadas por cada ruta metabólica; el nombre de la proteína a la que pertenece cada secuencia; la abreviación del nombre de cada proteína; el número de acceso en Bankit de los transcritos de *Polytomella* correspondientes; las predicciones de péptido señal con base en los algoritmos públicos ChloroP y PredAlgo; el número E.C. de las secuencias que corresponden a cada enzima; y finalmente, se indica mediante un asterisco (*) aquellas secuencias que se identificaron mediante espectrometría de masas (EM), y mediante un guión (-) aquellas que no se identificaron con dicha técnica. Nota: se anotan los nombres de las proteínas en inglés debido a que se considera que no todas las proteínas tienen una adecuada traducción al español.

#	Nombre de la proteína	Abreviación	Número de Acceso	ChloroP	PredAlgo	Número EC	EM
Biosíntesis de aminoácidos. Familia del Aspartato							
1	Threonine deaminase	THRD	MT376992	C	C	4.3.1.19	*
2	Threonine synthase	THRC	MT376980	-	C	4.2.3.1	*
			MT376981	C	-		
3	Aspartate kinase	AK	MT376984	C	C	2.7.2.4	*
4	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1, chloroplastic-like	AK	MT376985	-	-	2.7.2.4	*
5	Bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase	AKHSDH	MT377380	C	C	2.7.2.4	-
6	Aspartate aminotransferase	AATC	MT376997	-	-	2.6.1.1	*
			MT376998	-	-	2.6.1.78	
7	Aspartate semialdehyde dehydrogenase	DHAS	MT376993	C	C	1.2.1.11	*
8	Diaminopimelate decarboxylase	DCDA	MT376987	C	C	4.1.1.20	*
9	Diaminopimelate epimerase	DAPF	MT376990	-	C	5.1.1.7	*

10	LL-diaminopimelate aminotransferase	DAPAT	MT376989	C	-	2.6.1.83	*
11	Acetohydroxy acid isomeroeductase	AAI	MT376988	C	C	1.1.1.86	*
12	Acetolactate synthase, small subunit	ALS	MT376982	C	C	2.2.1.6	*
			MT376983	-	C		
13	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	DAPA	MT376991	C	C	4.3.3.7	*
14	Dihydroxy-acid dehydratase	DHAD	MT376979	C	-	4.2.1.9	*
15	Homoserine kinase	KHSE	MT376994	C	M	2.7.1.39	*
16	Vitamin B12 dependent methionine synthase/5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	MSTH	MT376995	-	-	2.1.1.13	*
17	Omega-amidase	OA	MT377001	-	-	3.5.1.3	-
18	2-iminopropanoate deaminase	RIDA	MT377002	C	C	3.5.99.10	-
			MT377003	-	C		-
19	2-isopropylmalate synthase	IPMS	MT377324	C	-	2.3.3.13	*
20	Cystathionine beta-lyase	METC	MT376996	C	-	4.4.1.13	*
			MT377381	C	C		-
21	Cysteine synthase	CS	MT376999	C	-	2.5.1.47	*
			MT377000	-	C		
22	Cystathionine gamma-synthase	CGS	MT376986	C	-	2.5.1.48	*
23	Cysteine synthase chloroplastic	OASB	MT377462	-	-	2.5.1.47	-
			MT377463	-	-	2.5.1.47	-
			MT377464	-	S	2.5.1.47	-

			MT377465	C	S	2.5.1.47	-
Biosíntesis de aminoácidos. Familia del Glutamato							
1	Acetylglutamate kinase	NAGK	MT377004	C	C	2.7.2.8	*
2	Histidinol phosphate aminotransferase	HPA	MT377005	-	-	2.6.1.9	*
3	Acetylornithine aminotransferase	ARGD	MT377006	C	C	2.6.1.11	*
			MT377007	-	-		
4	ATP phosphoribosyltransferase	HISN	MT377008	-	-	2.4.2.17	*
5	Argininosuccinate synthase	ARGS	MT377009	C	C	6.3.4.5	*
			MT377010	C	C		
6	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	ARGC	MT377011	-	C	1.2.1.38	*
7	Imidazole glycerol phosphate synthase	HISS	MT377012	C	C	4.3.2.10	*
8	Aspartate carbamoyltransferase	PYR	MT377013	-	M	2.1.3.2	*
9	Carbamoyl phosphate synthase, small subunit	CARP	MT377014	C	C	6.3.5.5	*
			MT377015		-		
10	Ornithine carbamoyltransferase	OTC	MT377016	-	-	2.1.3.3	*
11	Argininosuccinate lyase	ASL	MT377017	C	C	4.3.2.1	*
12	Arginine biosynthesis bifunctional	ARGJ	MT377018	-	-	2.3.1.35	*
13	N-acetylglutamate synthase	NAGS	MT377019	-	-	2.3.1.1	*
14	N-acetylglutamate synthase	NAGS	MT377474	C	-	2.3.1.1	-
Biosíntesis de aminoácidos. Familia de la Serina							
1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase family	SERA	MT377020	C	-	1.1.1.95	*
2	Phosphoserine aminotransferase	SERC	MT377021	C	C	2.6.1.52	*

3	Pyridoxine pyridoxamine 5 -phosphate oxidase chloroplastic-like	PXRC	MT377022	-	-	1.4.3.5	-
			MT377023	-	-		
			MT377024	-	-		
Biosíntesis de aminoácidos. Familia del Shikimato							
1	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1	AROG	MT377025	C	C	2.5.1.54	*
2	Chorismate synthase	AROC	MT377026	C	C	4.2.3.5	*
3	Anthranilate synthase alpha subunit	TRPE	MT377027	-	-	4.1.3.27	*
4	Bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase	DHQSD	MT377028	C	C	4.2.1.10	*
						1.1.1.25	
5	Shikimate kinase	SK	MT377029	-	-	2.7.1.71	*
6	Arogenate/prephenate dehydratase	ADT	MT377030	C	-	4.2.1.91	*
						4.2.1.51	
7	Pyridoxal phosphate-dependent aspartate aminotransferase	PLPAT	MT377031	C	-	2.6.1.79	*
8	Tryptophan synthase alpha chain	TRPA	MT377032	C	C	4.2.1.20	*
9	Indole-3-glycerol phosphate chloroplastic-like	IGP	MT377033	C	C	4.1.1.48	*
10	Chorismate mutase	CHM	MT377034	C	C	5.4.99.5	-
			MT377035	-	-		-
11	Anthranilate synthase beta subunit	ASB	MT377384	C	C	4.1.3.27	-
12	Phosphoribosylanthranilate isomerase	PAI4	MT377385	-	-	5.3.1.24	-
13	FMN-binding split barrel	FMNbp	MT377452	C	-	NA	-
14	3-dehydroquinate synthase	DHQS	MT377480	-	-	4.2.3.4	-

15	Arogenate/prephenate dehydrogenase	FisN	MT377481	C	C	1.3.1.78	-
16	Anthranilate phosphoribosyltransferase	TRPD	MT377482	-	-	2.4.2.18	-
Ciclo de Calvin							
1	Uridine kinase	UK	MT377036	-	-	2.7.1.48	*
			MT377037	-	-		
			MT377038	-	-		
2	Transketolase	TKT	MT377039	C	C	2.2.1.1	*
3	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	FBPAP	MT377040	-	-	4.1.2.13	*
			MT377041	-	C		
			MT377042	C	C		
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPCP1	MT377043	-	C	1.2.1.12	*
			MT377044	-	C		
5	Chaperonin 20 kDa	CH20	MT377045	-	-	NA	*
			MT377046	C	C		
6	Plastid triose phosphate isomerase, partial	TPIS	MT377047	C	C	5.3.1.1	*
7	Fructose 1,6-bisphosphatase II	FBP	MT377048	C	C	3.1.3.11	*
8	Ribulose phosphate-3-epimerase	RPE	MT377049	-	-	5.1.3.1	-
9	Phosphoglycolate phosphatase	PGP	MT377050	-	-	3.1.3.18	-
10	Ribose-5-phosphate isomerase	RPIA	MT377367	-	-	5.3.1.6	-
Metabolismo de Sacarosa							
1	Xylulose 5-phosphate/phosphate translocator	XPT	MT377051	-	S	NA	*
2	Plastid triose phosphate/phosphate translocator	TPT	MT377052	C	C	NA	*

3	Phosphoglucomutase	PGM	MT377053	-	-	5.4.2.2	*
4	Aldose-1-epimerase	GALC	MT377054	-	-	5.1.3.3	*
5	Isocitrate NADP-dependent isoform B	IDHN	MT377055	C	C	1.1.1.42	*
6	Hexokinase	HXK	MT377056	-	-	2.7.1.1	-
7	Zinc-containing alcohol dehydrogenase family protein	ADH	MT377349	C	C	NA	*
8	Fumarate hydratase 2, chloroplastic-like	FUM2	MT377372	C	S	4.2.1.2	-
9	Phosphatase IMPL1 chloroplastic	IMPL1	MT377460	-	-	3.1.3.25	-
Respiración Celular							
1	Phosphoglycerate kinase	PGK	MT377057	C	-	2.7.2.3	*
			MT377058	C	C		
2	6-phosphofructokinase 5	PFK5	MT377059	-	-	2.7.1.11	*
			MT377060	C	C		
Biosíntesis de Tetrapirroles							
1	Uroporphyrinogen decarboxylase 1	HEME1	MT377061	-	-	4.1.1.37	*
2	Protoporphyrinogen oxidase	PPOX	MT377062	-	-	1.3.3.4	*
3	Ferrochelatase	FC	MT377063	-	-	4.99.1.1	*
			MT377064	C	C	4.99.1.9	
4	Ornithine transaminase	OAT	MT377065	-	-	2.6.1.13	*
5	Chain A, Heme Oxygenase crystal structure	HMOX	MT377066	-	-	1.14.15.20	*
6	Glutamyl-trna reductase	HEM	MT377067	-	-	1.2.1.70	-
7	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD	MT377068	C	-	4.2.1.24	-

8	Porphobilinogen deaminase	HMBS	MT377069	C	-	2.5.1.61	-
9	Uroporphyrinogen-III synthase	UROS	MT377070	C	-	4.2.1.75	-
10	Homogentisate solanesyltransferase, partial	HSTC	MT377071	C	C	2.5.1.117	-
11	Uroporphyrinogen III decarboxylase chloroplastic precursor	UROD	MT377466	-	-	4.1.1.37	-
12	Non-discriminatory gln-glu-trna synthetase	GTS1	MT377468	C	-	6.1.1.17	*
13	Uroporphyrin-III C methyl transferase	UPM	MT377484	C	-	2.1.1.107	-
Metabolismo de coenzimas. Tiamina, tetrahidrofolato, biotina, prenilquinona y grupos hierro-azufre							
1	Thiamine biosynthetic bifunctional enzyme chloroplastic isoforms A & C	TPSC	MT377072	-	-	2.7.1.49	*
			MT377073	-	-	2.7.4.7	*
			MT377074	-	-	2.5.1.3	*
2	Branched chain amino acid aminotransferase	BCAT	MT377075	-	C	2.6.1.42	*
3	Fe-S cluster assembly ATP-binding protein	HCF	MT377076	-	C	NA	-
4	ABC transporter I family member 10, chloroplastic	AB10I	MT377077	-	-	7.6.2.2	-
5	Fe-S cluster assembly protein	SufD	MT377078	-	-	NA	-
6	Metal ABC transporter permease	ABP	MT377079	C	C	NA	-
			MT377080		C		-
7	Iron-sulfur cluster biosynthesis family protein	HSC	MT377081	-	-	NA	-
8	Iron-sulfur cluster assembly protein	ISU	MT377082	C	C	NA	-
9	Quinolinate synthase chloroplastic	QS	MT377394	C	-	2.5.1.72	-
10	Ferrochelataze-2	FC	MT377485	-	-	4.99.1.1	-
Respuesta a estímulos externos. Temperatura y desecación							

1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit-like protein	ADPR	MT377086	C	C	NA	*
2	Rubisco large subunit-binding subunit chloroplastic isoform A/Hsp chaperonin 60A	RCAL	MT377087	C	C	NA	*
			MT377088		C		
3	Heat shock protein 20	Hsp20	MT377093	C	-	NA	*
4	Chaperone protein	clpB 1	MT377094	-	-	NA	*
5	Peptide methionine sulfoxide reductase	MSRA	MT377095	-	-	1.8.4.11	*
6	Heat shock protein	HSP	MT377097	-	-	NA	*
7	Inorganic pyrophosphatase chloroplastic	IPY3	MT377283	C	C	3.6.1.1	*
Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato							
1	Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 2	GLYR2	MT377098	-	-	1.1.1.79	*
Metabolismo de Lípidos							
1	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSA	MT377099	-	S	6.2.1.1	*
			MT377100	-	M		
			MT377101	C	C		
			MT377102	-	-		
			MT377103	-	-		
2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I - isoform B	FABH	MT377104	C	C	2.3.1.179	*
			MT377105		C		
3	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 5 of pyruvate dehydrogenase	ODP5	MT377106	-	-	2.3.1.12	*
4	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	FABZ	MT377107	-	C	4.2.1.59	*

5	3-oxoacyl-[acyl-carrier] reductase 4-like	KAR	MT377108	C	C	1.1.1.100	*
6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	GPAT	MT377109	C	C	2.3.1.15	*
7	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit	ACCD	MT377110	C	C	6.4.1.2	*
			MT377111	C	C	2.1.3.15	*
			MT377112	C	C	6.3.4.14	*
8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha - subunit beta	PDH-E1 BETA	MT377113	C	C	1.2.4.1	*
			MT377114	-	-		
			MT377115	-	C		
9	Plastid acyl-carrier-protein desaturase/Stearoyl-ACP-desaturase	STAD	MT377116	C	M	1.14.19.2	*
			MT377117	-	-	1.14.19.11	
10	Omega-6-FAD, chloroplast isoform	O6F	MT377118	C	C	1.14.19.23	*
						1.14.19.45	
11	Enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]	INHA	MT377119	-	C	1.3.1.9	*
						1.3.1.10	
12	Acetyl-coa biotin carboxyl carrier	BCCP	MT377120	C	C	NA	*
13	Malonyl coenzyme A acyl carrier protein transacylase	FABD	MT377121	C	C	2.3.1.39	*
14	Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine synthesis protein/Betaine lipid synthase	BTA	MT377123	-	-	NA	*
15	Monogalactosyldiacylglycerol synthase	MGDG	MT377124	-	-	2.4.1.46	*
16	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	GPDA	MT377125	C	C	1.1.1.8	*
17	Acetyl-coa biotin carboxyl carrier	BCCP	MT377126	-	C	NA	-

18	Lipid transfer machine permease	TGD1	MT377127	-	S	NA	-
19	Phospholipid:diacylglycerol transferase	PDAT	MT377128	C	-	2.3.1.158	-
20	NADP malic enzyme	NADP-ME	MT377387	C		1.1.1.40	-
21	Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLDH	MT377388	-	-	1.8.1.4	-
22	Acetyl-CoA carboxylase / biotin carboxylase	ACCC	MT377389	C	C	6.4.1.2	-
23	Malonyl coenzyme A acyl carrier protein transacylase	MCAT	MT377390	C	C	2.3.1.39	-
24	Acyl carrier protein thioesterase	ATB	MT377391	-	-	3.1.2.14	-
Metabolismo de Nucleótidos							
1	Nucleoside diphosphate kinase 2	NDK2	MT377129	-	-	2.7.4.6	*
2	Phosphoribosylamine--glycine ligase	PURD	MT377130	C	C	6.3.4.13	*
3	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	DPYD	MT377131	C	-	1.3.1.2	*
4	Amidophosphoribosyltransferase	PUR1	MT377132	C	C	2.4.2.14	*
5	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	PURL	MT377133	-	C	6.3.5.3	*
6	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	GART	MT377134	C	C	6.3.3.1	*
7	Adenylate kinase	ADK	MT377135	-	M	2.7.4.3	*
			MT377136	-	-		
8	Adenylosuccinate lyase	ADSL	MT377137	C	-	4.3.2.2	*
9	Allantoinase	ALLB	MT377138	-	-	3.5.2.5	*
10	Uridine 5'- monophosphate synthase	UMPS	MT377139	-	-	2.4.2.10	*
						4.1.1.23	
11	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	PRPS	MT377140	C	C	2.7.6.1	*

12	Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	PAICS	MT377141	-	-	6.3.2.6	*
			MT377142	-	-		
13	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, eukaryotic-type	PAICC	MT377143	-	-	4.1.1.21	*
			MT377144	-	M		
14	Adenylosuccinate synthase	ADDS	MT377145	C	C	6.3.4.4	*
15	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide	HIS4	MT377146	-	C	5.3.1.16	*
16	Allantoate deiminase	AAH	MT377147	-	-	3.5.3.9	*
17	Bifunctional purine biosynthesis	PURH	MT377393	C	-	2.1.2.3	*
18	cGMP-dependent protein kinase	PRKG	MT377459	C	-	2.7.11.12	*
Asimilación de nutrientes: nitrógeno, azufre y hierro							
1	5'-adenylylsulfate reductase 2	APR2	MT377148	C	C	1.8.4.9	*
2	Sulfate adenylyltransferase	MET3	MT377149	C	C	2.7.7.4	*
3	Sulfite reductase [ferredoxin]	SIR	MT377150	-	M	1.8.7.1	*
			MT377151	C	C		
4	Glutamate synthase 1 [NADH] chloroplastic isoform X1	GOSHI	MT377152	C	C	1.4.1.14	*
Ruta oxidativa de las Pentosas Fosfato							
1	6-phosphogluconolactonase 5	PGL5	MT377153	C	C	3.1.1.31	*
			MT377154	-	-		
2	Transaldolase	TALC	MT377155	C	C	2.2.1.2	*
3	Plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PDC	MT377156	-	C	1.1.1.49	*

						1.1.1.363	
4	Ribulose-1,5 biphosphate carboxylase /oxygenase large subunit N-methyltransferase	RBCMT	MT377157	-	-	2.1.1.127	*
5	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD	MT377378	-	-	1.1.1.44	-
Fotofosforilación							
1	Ferredoxin	FDX	MT377158	C	C	NA	*
2	Plastid terminal oxidase	PTOX	MT377159	-	-	1.10.3.11	*
3	Chloroplast major light-harvesting complex II protein m9, partial	LHCII9	MT377160	-	-	NA	-
4	Chlorophyll a-b binding protein 8	LHCB8	MT377161	C	-	NA	-
5	Vesicle inducing protein in plastids 1	VIPP1	MT377162	C	C	NA	-
6	Ferredoxin-NADP reductase chloroplastic	FNRL	MT377458	-	C	1.18.1.2	*
Fotorrespiración							
1	Serine hydroxymethyltransferase 3	SHM3	MT377163	-	C	2.1.2.1	*
2	Carbonic anhydrase 7	CA7	MT377164	-	-	4.2.1.1	*
3	Carbonic anhydrase 6	CA6	MT377165	-	-		
4	Gamma carbonic anhydrase	GAMMACA	MT377166	-	-		
Degradación de proteínas. Familia de Peptidasas							
1	Leucine aminopeptidase 2	LAP2	MT377167	-	M	3.4.11.1	*
2	FtsH-like AAA+ protein	FTSH3	MT377168	-	S	3.4.24.-	*
3	Presequence protease 1	PREP1	MT377169	C	C	3.4.24.-	*

4	Xaa-Pro aminopeptidase P	XPP	MT377170	-	-	3.4.11.9	*
5	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA-like protein	clpA	MT377171	C	S	3.4.24.70	*
6	Protease Do-like 1	DEGP1	MT377173	-	-	3.4.21.107	-
7	Histone-lysine N-methyltransferase	SETD3	MT377180	C	-	2.1.1.85	-
			MT377181	C	-		-
8	Acylamino-acid-releasing enzyme	AARE	MT377182	C	-	3.4.19.1	-
9	Zinc protease PQQL-like isoform X4	FTSH4	MT377183	-	-	NA	-
Hidroxilación, fosforilación, plegamiento y maduración de proteínas							
1	Glutaredoxin, CPYC type	GRX	MT377184	-	-	NA	*
2	Chloroplast processing enzyme	CPE	MT377185	C	-	3.4.24.61	*
3	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPI	MT377186	C	M	5.2.1.8	*
4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	PPI	MT377187	-	-	5.2.1.8	*
			MT377188	-	-		
5	Casein kinase II subunit alpha-4	CKA4	MT377189	-	-	2.7.11.1	*
6	ABC1-like protein	ABC1	MT377190	-	-		*
7	Chloroplast processing peptidase	CPP	MT377191	-	-	3.4.21.89	*
8	Chaperone protein dnaJ 8	DJA8	MT377192	-	-	NA	*
9	Chaperone protein, chloroplastic isoform C	ClpB3	MT377193	-	-	NA	*
10	DnaJ-like protein/Chaperone protein dnaJ 2	DJA2	MT377194	C	C	NA	*
			MT377195	-	-		*
			MT377196	-	-		

11	Prolyl 4-hydroxylase	P4H	MT377197	-	-	1.14.11.2	-
			MT377198	-	-		-
			MT377199	-	-		-
			MT377200	-	-		-
			MT377201	C	C		-
			MT377202	-	-		-
12	Zinc metalloprotease chloroplastic-like	FTSH	MT377203	-	-	3.4.24.85	-
			MT377204	-	-		-
13	Chloroplast thylakoid processing peptidase	PLSP	MT377205	-	-	3.4.21.89	-
			MT377206	-	-		-
14	Hydroxyproline O-arabinosyltransferase	HPAT	MT377207	C	C	2.4.2.58	-
			MT377208		C		-
			MT377209		C		-
			MT377210		-		-
15	GrpE nucleotide release factor	GRPE	MT377211	C	-	NA	-
16	CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR1-like	POR1	MT377212	C	C	NA	-
Translocación de proteínas de Cloroplasto							
1	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 22	TIC22	MT377213	-	-	NA	*
2	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 40	TIC40	MT377226	-	-	NA	-
			MT377227		-		-
			MT377228		M		-

3	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 110	TIC110	MT377217	C	C	NA	*
4	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 100	Tic100	MW052777	-	-	NA	-
5	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 34	TOC34	MT377222	-	-	NA	*
6	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 75	TOC75	MT377220	-	-	NA	*
			MT377221	-	-	NA	
7	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 80	TOC80	MT377218	-	M	NA	*
8	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 90	TOC90	MT377215	C	-	NA	*
9	Heat shock protein 90C	HS90	MT377083	C	C	NA	*
			MT377084	C	-		*
			MT377085	-	-		*
10	Heat shock protein 70C, partial	HS70	MT377089	-	M	NA	*
			MT377090	C	C		
11	Heat shock cognate 70 kDa protein	HSP70	MT377364	-	-	NA	*
12	ClpB chaperone, Hsp100 family	CLPB	MT377091	-	-	NA	*
			MT377092	-	-		
13	Chaperone protein	ClpB2	MT377096	-	M	NA	*
14	ClpB chaperone, Hsp100 family	CLPB3	MT377362	-	-	NA	*

15	ATP-dependent zinc metalloprotease	FTSH	MT377174	-	-	3.4.24.-	-
			MT377175	-	-		-
			MT377176	C	-		-
			MT377177	-	-		-
			MT377178	C	-		-
16	Membrane AAA-metalloprotease, partial	FTSH	MT377179	C	-	3.4.24.-	*
17	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 9	FTSH9	MT377172	-	-	3.4.24.B20	*
18	Malate dehydrogenase	MDHP	MT377336	-	-	1.1.1.37	*
			MT377337	C	C		*
19	Malate dehydrogenase	MDH	MT377373	C	M	1.1.1.37	*
20	Signal recognition particle 54 kDa protein 1	SRP54	MT377223	-	M	NA	*
21	Protein translocase subunit SecA	SECA	MT377229	C	C	7.4.2.8	-
			MT377230		-		-
			MT377231		-		-
			MT377232		S		-
			MT377233		S		-
22	Chloroplast SRP receptor	CSRP	MT377225	-	-	NA	*
23	ALBINO3-like protein 2, chloroplastic isoform X1	ALB3L2	MT377224	C	M	NA	*
24	ALBINO3-like protein 1, chloroplastic isoform X4	ALB4	MT377234	-	-	NA	-
			MT377235		S		-
25	Sec-independent translocase/TatC	TatC	MT377236	-	S	NA	-
			MT377237		S		-

Homeostasis Redox								
1	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	TPXR	MT377241	C	C	1.8.1.9	*	
			MT377242	-	-			
			MT377243	-	-			
2	Thioredoxin-related protein	CITRX	MT377257	C	C	NA	-	
			MT377258		C		-	
3	Thioredoxin-like protein	TXN	MT377261	C	-	NA	-	
4	Thioredoxin M4	TRXM4	MT377256	-	C	NA	-	
5	Glutathione S-transferase DHAR3	DHAR3	MT377244	-	-	1.8.5.1	*	
						2.5.1.18	*	
6	Glutathione synthase	GSS	MT377254	-	-	6.3.2.3	-	
			MT377255		S		-	
7	Glutathione reductase	GSR	MT377251	-	-	1.8.1.7	*	
8	FeThRed_A domain-containing protein	FTRA	MT377399	-	C	1.8.7.2	-	
9	Ferredoxin-thioredoxin reductase, variable chain	FTRV	MT377248	-	C	1.8.7.2	*	
10	Ferredoxin thioredoxin reductase, catalytic chain	FTRC	MT377469	-	-	1.8.7.2	-	
11	Monothiol glutaredoxin	GRX	MT377238	C	-	1.20.4.1	*	
12	2-cys peroxiredoxin	PRDX	MT377239	-	-	1.11.1.15	*	
			MT377240		C		*	
13	Superoxide dismutase [Fe]	FSD	MT377245	-	-	1.15.1.1	*	
			MT377246		C			M
			MT377247		-			-

14	RETICULATA-RELATED chloroplastic-like isoform A	C2E21	MT377249	-	C	NA	*
			MT377250	C	C		
15	NADPH-dependent aldo-keto reductase, chloroplastic isoform X2	AKRC	MT377252	-	-	1.1.1.2	*
16	Gamma-glutamylcysteine synthetase	GCLS	MT377253	C	C	6.3.2.2	-
17	Methionine sulfoxide reductase B	MSRB	MT377259	-	-	1.8.4.12	-
18	Fruit protein pKIWI502-like	PKIWI502	MT377260	C	C	2.4.2.-	-
Compuestos que contienen nitrógeno. Glucosinolatos							
1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	LEU1L	MT377262	C	C	4.2.1.33	*
						4.2.1.35	
Ruta del Metileritrol Fosfato							
1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	DXR	MT377263	C	C	1.1.1.267	*
2	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	DXS	MT377264	-	-	2.2.1.7	*
3	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	GGPPS2	MT377265	-	-	2.5.1.1	*
4	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	ISPF	MT377266	-	C	4.6.1.12	-
5	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	GGPS	MT377396	-	-	2.5.1.1	-
6	Putative tocopherol O-methyltransferase chloroplastic	VTE4	MT377397	-	-	2.1.1.295	-

7	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase	LD85	MT377451	C	C	2.7.7.60	*
8	Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	ispE	MT377486	C	-	2.7.1.148	-
Biosíntesis de Terpenoides. Carotenoides							
1	Sterol 14 desaturase	STE14	MT377267	-	S	1.14.14.154 1.14.15.36	*
Transporte de solutos							
1	S-adenosylmethionine carrier 1	SAMC1	MT377268	C	M	NA	*
			MT377269	C	-		
2	Low-CO2-inducible chloroplast envelope	LIP	MT377270	-	-	NA	*
			MT377271		-		
3	Chloroplast oxoglutarate-malate translocator	OMT	MT377272	C	C	NA	*
4	K(+) efflux antiporter	KEA	MT377273	C	C	NA	*
5	Plastid ATP/ADP transporter, partial	AATP1	MT377274	C	C	NA	*
6	Outer envelope pore protein 24A	OP24	MT377275	C	-	NA	*
7	Protein DETOXIFICATION 45 (membrane protein)	DTX45	MT377276	C	C	NA	*
8	Putative sodium/metabolite cotransporter BASS4	BASS4	MT377277	-	-	NA	*
9	ABC transporter B family member	ABCB	MT377278	-	S	NA	*
10	CysA-like protein	CYSA	MT377279	C	C	7.3.2.3	*
11	CTR-type copper ion transporter	CTR1	MT377280	-	-	NA	*
12	ABC transporter G family member 2	Abcg2	MT377281	C	-	NA	-
			MT377282		M		-

			MT377284		M		-
			MT377285		M		-
			MT377286		-		-
13	Plastidal glycolate glycerate translocator	PLGG	MT377287	C	S	NA	-
14	Chloroplast sulfate permease 1	SUL1	MT377288	-	S	NA	-
15	UPF0187 chloroplastic, Ion channel-forming bestrophin family protein	BEST	MT377289	-	-	NA	-
16	Sulfate binding protein, component of chloroplast transporter	SulP	MT377290	-	-	NA	-
Metabolismo de almidón							
1	Soluble starch synthase	SS	MT377293	C	M	2.4.1.21	*
			MT377295	-	C	2.4.1.21	*
2	Soluble starch synthase II	SSII	MT377292	-	-	2.4.1.21	*
3	Soluble starch synthase II	SSSII	MT377346	C	-	2.4.1.21	-
4	Soluble starch synthase III	SSIII	MT377291	C	C	2.4.1.21	*
5	Starch binding domain containing protein	STBD	MT377294	C	C	2.4.1.21	*
6	Phosphoglucan, water dikinase	GWD	MT377296	C	-	2.7.9.5	*
			MT377297	-	-		
			MT377298	-	S		
			MT377299	-	-		
			MT377300	C	C		
7	R1 protein, alpha-glucan water dikinase	R1	MT377301	-	-	2.7.9.4	*

8	Alpha-amylase	AMY	MT377302	C	C	3.2.1.1	*
9	Granule-bound starch synthase	WAXY	MT377303	-	-	2.4.1.242	*
10	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	AGPS	MT377304	C	C	2.7.7.27	*
			MT377305	-	-		
11	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	AGPL	MT377306	C	C		
			MT377307	C	C		
12	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	APS1	MT377308	C	C		
13	4-alpha-glucanotransferase	DPE1	MT377309	C	-	2.4.1.25	*
			MT377310	-	-		
14	Starch phosphorylase	SP	MT377311	C	C	2.4.1.1	*
			MT377312	C	C		
15	Isoamylase, starch debranching enzyme/1,4-alpha-glucan branching enzyme II	VIT	MT377313	-	-	3.2.1.68	*
			MT377314	-	-		
			MT377315	-	-		
			MT377316	-	C		
16	Starch branching enzyme (1,4-alpha-glucan branching enzyme II)	SBE2	MT377317	-	S	2.4.1.18	*
			MT377318	C	C		*
			MT377319	C	C		
17	UDP-Glucose:protein transglucosylase	UPTG	MT377320	-	-	5.4.99.30	*
18	Phosphoglucan phosphatase chloroplastic	LSF	MT377321	-	-	3.1.3.-	-
			MT377322		-		-

19	Fructokinase-1	FRK1	MT377323	C	C	2.7.1.4	-
20	Granule-bound starch synthase I	GBSS1	MT377347	-	C	2.4.1.242	-
21	Pullulanase 1, chloroplastic isoform X1	PUX1	MT377348	C	-	3.2.1.41	-
22	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	MT377377	-	-	5.3.1.9	-
23	Alpha-amylase	AMY	MT377470	C	-	3.2.1.1	-
24	Beta-amylase 3 chloroplastic	BAM3	MT377471	-	M	3.2.1.2	-
No asignadas a una ruta metabólica							
1	Predicted protein	-	MT377122	-	-	3.5.1.108	*
2	Oxidoreductase HTATIP2	HTATIP2	MT377214	-	-	NA	*
3	Short chain dehydrogenase	SDR	MT377216	-	-	NA	*
4	SUMO-activating enzyme subunit 2	SAE2	MT377219	-	-	NA	*
5	Dynamamin-related GTPase	DRP	MT377325	C	C	3.6.5.5	*
6	Thiosulfate sulfurtransferase 16, chloroplastic-like isoform X2	THS16	MT377326	-	-	2.8.1.1	*
7	Protein DCL, chloroplastic-like	DCL	MT377327	-	-	NA	*
8	50S ribosomal protein L24	RPL24	MT377328	-	-	NA	*
9	NAD dependent epimerase/dehydratase	TERH	MT377329	-	-	4.2.1.93	*
10	Protein phosphatase 2C-like protein	PP2C	MT377330	-	-	3.1.3.16	*
11	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	rib4	MT377331	-	-	2.5.1.78	*
12	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolyase/phosphoribosyl-AMP cyclohydrolyase	hisIE	MT377332	-	-	3.6.1.31	*

13	3-Isopropylmalate dehydrogenase, splicing variant a	leuBA	MT377333	-	C	1.1.1.85	*
14	Acetate Kinase 1 protein	ackA	MT377334	-	-	2.7.2.1	*
15	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating)	QPRT	MT377335	-	-	2.4.2.19	*
16	Eyespot assembly protein, ABC1 kinase family	EYE3	MT377338	C	S	NA	-
17	Iron-sulfur cluster biosynthesis family protein	SufE	MT377339	-	-	NA	-
18	Predicted protein	NA	MT377340	-	S	NA	-
19	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein	APH	MT377341	-	-	NA	-
20	Inositol monophosphatase family protein	HISN	MT377379	-	C	3.1.3.25	-
21	RNA-binding RBM5 and related containing G-patch and RRM domains	ISS	MT377457	C	C	NA	*
22	Glycine-rich RNA-binding protein 2	RBG2	MT377490	-	-	NA	*

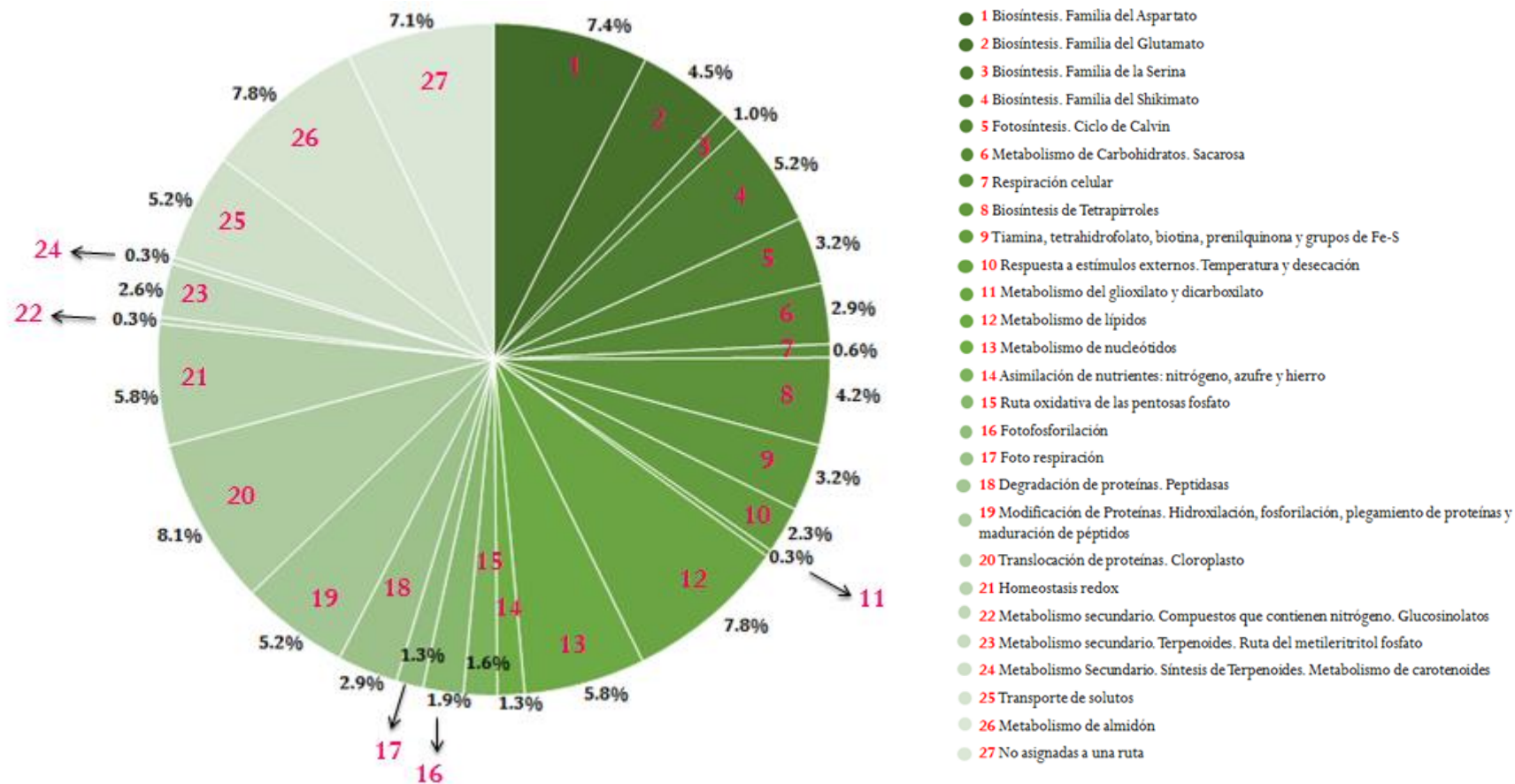


Figura 15. Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de abundancia de las secuencias identificadas para cada ruta metabólica en el plástido de *Polytomella parva*. Las rutas metabólicas están identificadas con números en color rojo del 1 al 27, los cuales se muestran a la derecha.

4.2.4 Comparación entre los plástidos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella parva*

La Figura 16 muestra una comparación del número de secuencias identificadas en el plástido de *Polytomella* y las reportadas para el proteoma del cloroplasto de *Chlamydomonas* (103). La comparación se hizo para cada ruta metabólica. Como se esperaba, la mayor diferencia corresponde a las proteínas involucradas en la fotofosforilación, 119 en el alga verde contra menos de 10 en el alga incolora. Las Figuras 17 y 18 ilustran las rutas metabólicas principales que suceden en el cloroplasto de *Chlamydomonas* (17) y aquellas que se conservaron en el plástido del alga incolora (18).

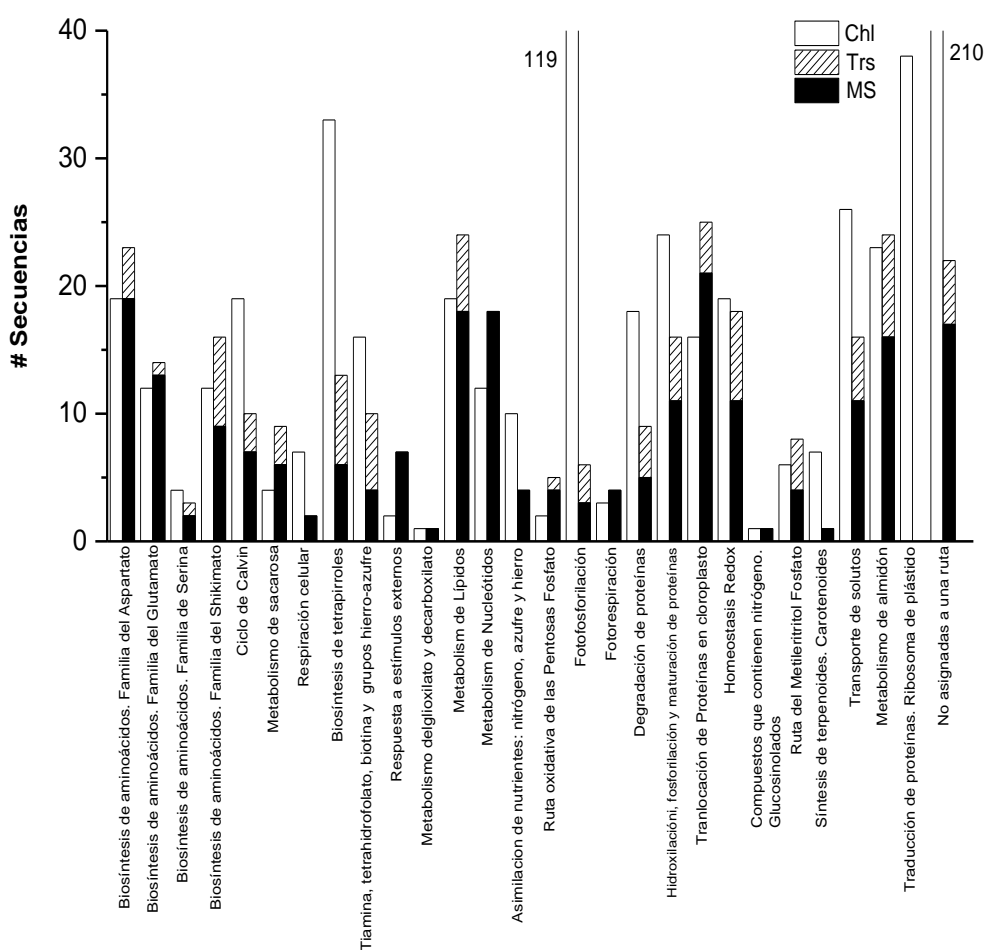


Figura 16. Gráfica de barras que muestra el número de secuencias identificadas en los proteomas de los plástidos de *Chlamydomonas* y *Polytomella*. (Chl) secuencias registradas en el proteoma del cloroplasto de *Chlamydomonas* (Terashima et al., 2011), (Trs) secuencias de transcritos de *Polytomella* identificadas únicamente por homología de secuencias, (MS) secuencias de péptidos de *Polytomella* identificadas por espectrometría de masas y además por homología, únicamente cuatro secuencias MS no se identificaron por homología, (Fuentes-Ramírez et al., 2021).

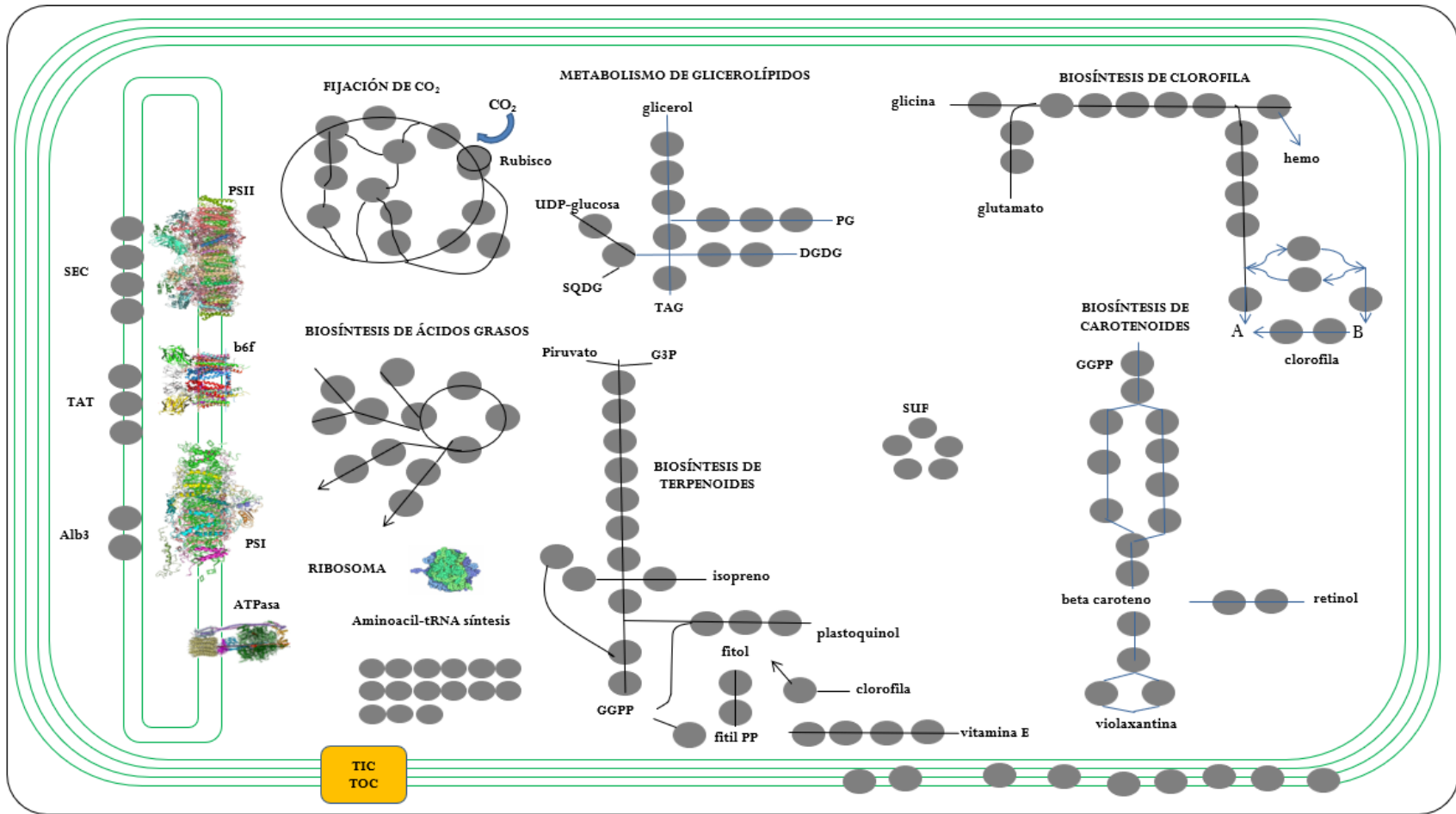


Figura 17. Principales rutas metabólicas que ocurren en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*. Los círculos grises ejemplifican los principales componentes de esas rutas metabólicas. A la izquierda se ejemplifican los tilacoides y los componentes principales de la fotosforilación, así como los sistemas se translocación de proteínas en tilacoides. También se esquematizan componentes de las membranas externa e interna como el sistema TIC/TOC y los transportadores de solutos.

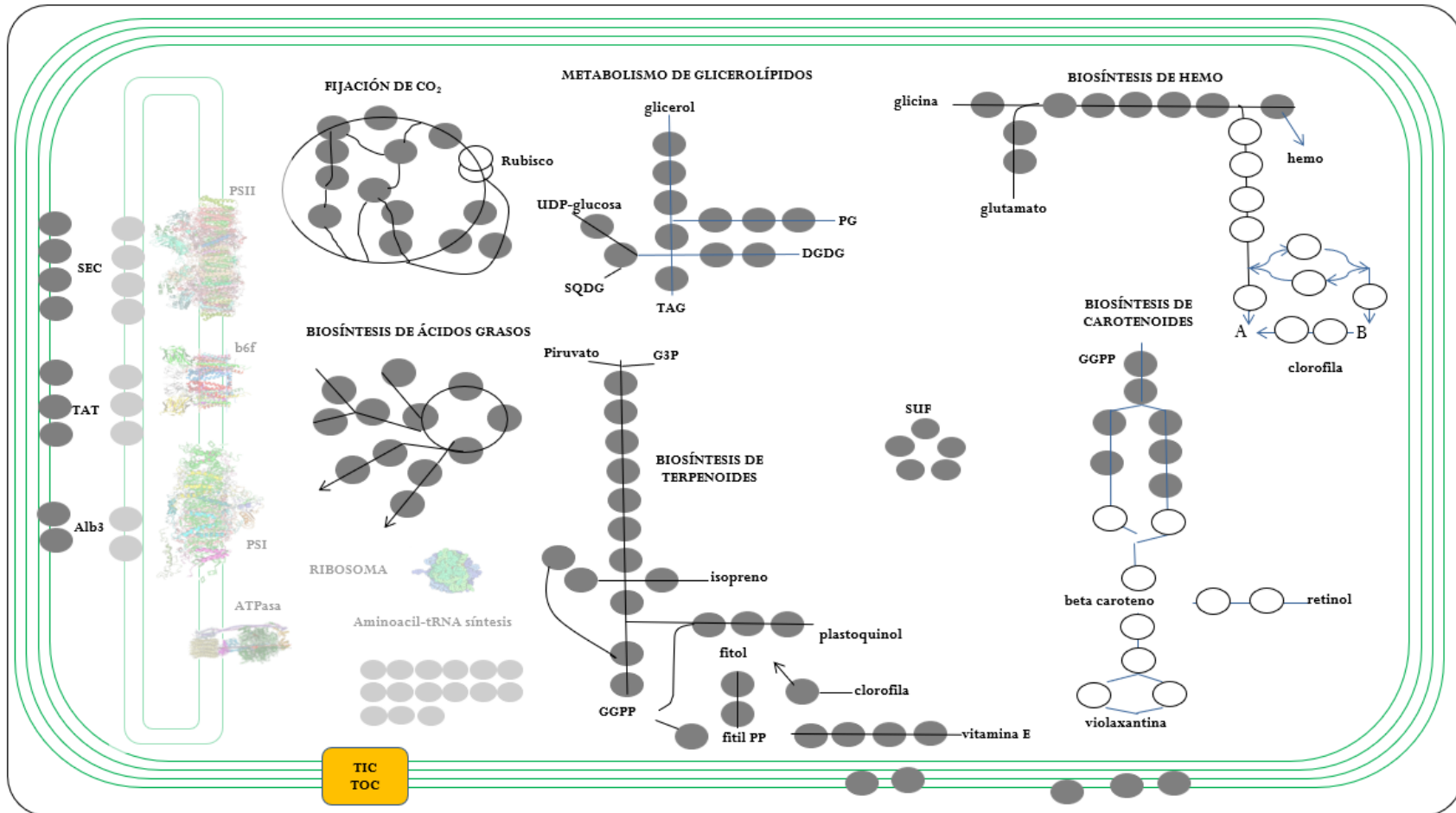


Figura 18. Rutas metabólicas del plástido de *Polytomella parva*. Los círculos blancos indican las enzimas presentes en el cloroplasto de *Chlamydomonas* que están ausentes en el plástido incoloro. En las secciones traslúcidas se muestran las rutas metabólicas ausentes en *Polytomella*, como la membrana tilacoidal y sus proteínas, excepto TAT, SEC y Alb; en este trabajo suponemos que, al no haber tilacoides, se encuentran en la membrana interna del plástido.

Entre las diferencias esperadas están la ausencia de fotosistemas y la biosíntesis de clorofila en *Polytomella*; por otro lado, algo notable es la ausencia de elementos ribosomales y de síntesis de proteínas de origen plastídico en *Polytomella*, lo que confirma lo anteriormente reportado por Smith & Lee (2014), que dicha alga carece de genoma y por lo tanto tampoco cuenta con la maquinaria de síntesis de proteínas plástidicas. Lo anterior presupone que todas las proteínas reportadas en este trabajo deben ser translocadas desde el citosol de *Polytomella* al interior del organelo. Para ello, en este trabajo fue de especial importancia identificar la presencia de los sistemas canónicos de translocación de proteínas de plástidos: TIC/TOC; así como también la subunidad Tic100 del complejo de translocación recientemente reportado en *Chlamydomonas* por Ramundo et al., (2020). Asimismo, identificamos los complejos motores asociados a TIC/TOC, las chaperonas CLPB, HS70 y HS90 (Chotewutmontri & Bruce, 2015; P. K. Huang et al., 2016; Inoue et al., 2013; Nielsen et al., 1997; Shi & Theg, 2010), además de algunas subunidades del complejo Ycf2- FtsHi-MDH, las cuales pueden tener una función motora en la translocación de proteínas (Kikuchi et al., 2018).

Entre las semejanzas que encontramos entre los plástidos incoloros y los cloroplastos, están los componentes que participan en la homeostasis redox, en el metabolismo de almidón, en la degradación y modificación de proteínas, en la asimilación de nutrientes (como el nitrógeno, el azufre y el hierro), en la biosíntesis de coenzimas y en la sección inicial de la biosíntesis de tetrapirroles.

De las observaciones de TEM en el presente trabajo y de varios que lo antecedieron, es evidente la ausencia de tilacoides en los plástidos de *Polytomella*. Esto concuerda con la ausencia de fotosistemas y de la maquinaria de síntesis de pigmentos fotosintéticos; sin embargo, llama la atención la presencia de algunas subunidades de sistemas de translocación de proteínas propios de tilacoides, como TatC, SecA y Alb3, así como la conservación de algunas enzimas del ciclo de Calvin, de la fotofosforilación y de la fotorrespiración. Asimismo, llama la atención la conservación de la proteína de membrana Vipp1 que se ha sugerido que está involucrada en la biosíntesis de tilacoides (Liu et al., 2007; Vothknecht et al., 2012). Todo ello da pauta para plantear nuevas preguntas de investigación acerca de la localización de esas subunidades y su función; nosotros planteamos la hipótesis de que, al ser proteínas pertenecientes a la membrana tilacoidal, podrían localizarse en la membrana interna del plástido realizando funciones que podrán investigarse en estudios futuros.

Por otro lado, el metabolismo biosintético de aminoácidos, de lípidos y de nucleótidos, se conserva íntegro y de hecho pudimos registrar más enzimas que las reportadas para el cloroplasto de *Chlamydomonas*, de la misma manera que para la vía oxidativa de las pentosas fosfato y las proteínas involucradas en la respuesta a estímulos externos.

4.2.5 Representatividad del proteoma del plástido de *Polytomella parva*

La Tabla 2 muestra el número de secuencias identificadas para cada ruta metabólica en el plástido de *Polytomella*, así como el número de secuencias homólogas que resultaron de comparar el proteoma del plástido incoloro con los proteomas de plástidos de plantas y algas, así como con el transcriptoma del plástido de *Euglena longa*. Dicha comparación sugiere fuertemente que el proteoma del plástido de *Polytomella parva* está muy bien representado dentro del linaje *Archaeplastida*, ya que presenta muchos elementos comunes con los otros proteomas y transcriptomas plastídicos analizados.

Tabla 2. Número de proteínas homólogas del plástido de *Polytomella parva* y de los plástidos de las diferentes especies comparadas. Clasificación por ruta metabólica.

Ruta metabólica	<i>P. parva</i> (este 59trabaj o)	<i>P. parva</i> (Asmail, 2015)	<i>C. reinhardtii</i>	Trigo	Gránulos de almidón de arroz	<i>Euglena</i> <i>longa</i>	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	Maíz	Arroz
Biosíntesis. Familia del Aspartato	23	14	21	11	1	16	23	23	23
Biosíntesis. Familia del Glutamato	14	7	12	10	0	8	14	13	14
Biosíntesis. Familia de la Serina	3	0	3	1	0	2	3	3	3
Biosíntesis. Familia del Shikimato	16	14	14	6	0	6	16	16	16
Fotosíntesis. Ciclo de Calvin	10	0	9	5	1	8	9	9	9
Metabolismo de Carbohidratos. Sacarosa	9	0	4	4	1	4	9	9	9
Respiración celular	2	0	2	1	1	2	2	2	2
Metabolismo de coenzimas. Biosíntesis de Tetrapirroles	13	10	10	4	0	6	13	11	12
Metabolismo de coenzimas. Tiamina, tetrahidrofolato, biotina, prenilquinona y grupos de Fe-S	10	2	6	4	0	4	10	10	10
Respuesta a estímulos externos. Temperatura y desecación	7	0	2	5	5	1	7	7	7

Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato	1	0	1	0	0	1	1	1	1
Metabolismo de lípidos	24	0	21	12	0	9	23	21	21
Metabolismo de nucleótidos	18	0	11	9	0	8	18	18	18
Asimilación de nutrientes: nitrógeno, azufre y hierro	4	1	4	2	0	4	4	4	4
Metabolismo de carbohidratos. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato	5	0	2	2	0	2	5	5	5
Fotosíntesis. Fotofosforilación	6	0	5	3	0	2	6	6	6
Fotosíntesis. Fotorespiración	4	0	1	0	0	1	4	4	4
Degradación de proteínas. Peptidasas	9	0	8	3	0	5	9	8	9
Modificación de Proteínas. Hidroxilación, fosforilación, plegamiento de proteínas y maduración de péptidos	16	0	12	1	0	7	16	16	15
Translocación de proteínas. Cloroplasto	25	0	18	10	6	4	24	21	22
Homeostasis redox	18	0	16	4	0	1	18	17	18

Metabolismo Secundario. Compuestos que contienen nitrógeno. Glucosinolatos	1	0	1	1	0	0	1	1	1
Metabolismo secundario. Terpenoides. Ruta del metileritritol fosfato	8	5	5	3	0	1	8	8	8
Metabolismo Secundario. Síntesis de Terpenoides. Metabolismo de carotenoids	1	0	1	0	0	0	1	1	1
Transporte de solutos	16	0	11	0	0	1	13	12	12
Metabolismo de almidón	24	8	17	9	9	0	23	23	23
No asignadas a una ruta	22	1	8	3	0	0	18	18	18
TOTAL	309	62	225	113	24	103	298	287	291

El proteoma del plástido presentado aquí es único debido a que *Polytomella parva* es un alga unicelular, de vida libre, no fotosintética. Al hacer la comparación de aquellas proteínas que se han conservado en el plástido de *Polytomella* con respecto a otras especies de plantas y algas, podemos concluir que este proteoma está bastante bien representado y que puede tomarse como punto de referencia para otras especies incoloras presentes en el filum *Archaeplastida* (como el caso del alga *Polytoma*), además, se puede advertir qué rutas metabólicas han sido cruciales para mantener la funcionalidad del plástido del alga incolora.

4.2.6 *Polytomella parva* conserva el sistema de translocación de proteínas de plástido

Una de las rutas metabólicas con mayor porcentaje (8.1%) de secuencias en el proteoma presentado aquí, es la que se encarga de translocar las proteínas al interior del plástido, la cual suministra al organelo todos los componentes necesarios para llevar a cabo su metabolismo.

La Figura 19 muestra un esquema del sistema de translocación de proteínas presente en el plástido de *Polytomella parva*. Como puede observarse, se conserva gran parte del sistema canónico TIC-TOC (Shi & Theg, 2013), además de los complejos motores que proporcionan la energía utilizada en la translocación de proteínas: 1) las chaperonas HSP70, HS90 y CLPB (Bölter, 2018; Huang et al., 2016; Inoue et al., 2013; Kovacheva et al., 2005; Li, 2020; Shi & Theg, 2010); y 2) las subunidades del complejo Ycf2-FtsHi-pdNAD-MDH (Kikuchi et al., 2018; Schreier et al., 2018). Además, se identificó la subunidad Tic100 del complejo de Tic214-Tic20-Tic100-Tic56 identificado en la membrana interna del cloroplasto de *Arabidopsis* (Kikuchi et al., 2013) y recientemente en *Chlamydomonas* (Ramundo et al., 2020).

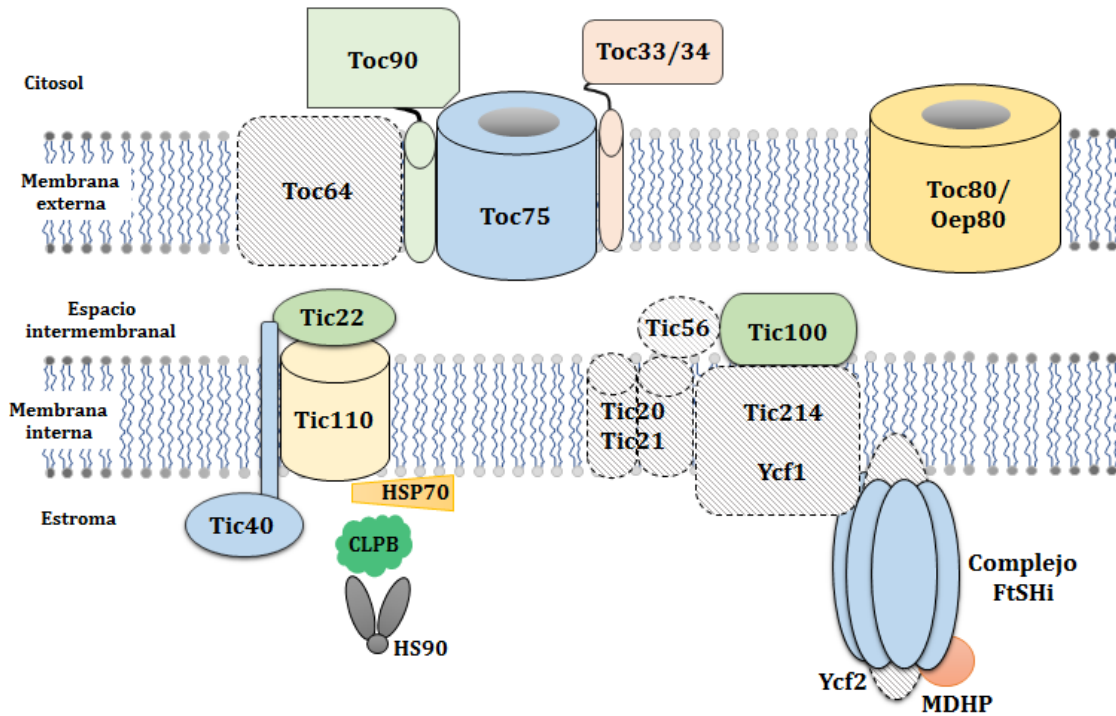


Figura 19. Esquema del sistema de translocación de proteínas conservado en el plástido de *Polytomella parva*. Se conservan las subunidades del sistema de translocación canónico TIC/TOC y los complejos motores asociados: las chaperonas y el complejo Ycf2-FtsHi-MDH. Las subunidades marcadas en trama gris (▨), presentes en el cloroplasto de *Chlamydomonas*, no se identificaron en *Polytomella* (Toc64, Tic56, Tic20, Tic21, Tic214 y Ycf2).

5. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización morfológica de los plástidos de *Polytomella parva*

5.1.1. Un primer acercamiento

Mediante microscopía de Nomarski, observamos las células de *Polytomella parva* gracias a la protuberancia de los plástidos y su contenido de almidón. Mediante la tinción con Lugol se observó la distribución de dichos plástidos y se hizo evidente la gran cantidad de almidón que almacenan. Es importante mencionar que no es la primera vez que la microscopía de Nomarski se emplea para observar las células de *Polytomella*, sin embargo, en las primeras observaciones no se mencionan algunos detalles, como la amplificación del lente empleado, (Brown, Massalski, & Leppard, 1976). Por lo cual, mediante este trabajo aportamos observaciones actualizadas y con mayor resolución a las ya reportadas hace casi 50 años.

Con los primeros esfuerzos por observar un alga incolora mediante TEM, se detectó que los plástidos de las algas incoloras tenían gránulos de almidón y una doble membrana bien definida (Lang, 1963). Aquellos trabajos fueron los primeros en reportar que un alga unicelular incolora tiene plástidos *verdaderos*, ovalados, rodeados por membranas y llenos de gránulos de almidón, (Lang, 1963; Moore et al., 1970; Brown, Massalski, & Patenaude, 1976; Brown, Massalski, & Leppard, 1976). En el presente trabajo, además de la observación de las células de *Polytomella*, de los plástidos y de los gránulos de almidón, se estimó el tamaño promedio de cada una de estas estructuras. Asimismo, se pudo observar la forma ovalada de los plástidos, que carecen de membranas tilacoidales y cómo, en algunos casos, están completamente llenos de almidón, mientras que en otros se observan gránulos separados y áreas dentro del plástido libres de gránulos.

En las imágenes obtenidas en este trabajo no se observan membranas tilacoidales, lo que coincide con las primeras observaciones en donde tampoco es posible observar tales membranas, (Brown, Massalski, & Patenaude, 1976; Brown, Massalski, & Leppard, 1976). En este sentido, cabe aclarar que mediante TEM sí es posible observar las membranas tilacoidales que rodean a los gránulos de almidón, lo que fue reportado para los cloroplastos del alga verde *Caulerpa*, (Hori, 1974).

5.1.2. Observaciones de plástidos aislados

Este es el primer trabajo que muestra la morfología de plástidos aislados de un alga incolora, esto es importante porque el análisis del proteoma de estos organelos requiere de una buena caracterización de las fracciones obtenidas durante el aislamiento. Por ello, se monitoreó el aislamiento de las diferentes fracciones obtenidas mediante microscopía de Nomarski (Figura 7) y TEM (Figura 8). Por otro lado, es importante mencionar que gracias a la espectrometría de masas, en la preparación de plástidos incoloros se detectaron péptidos que pertenecen a otros organelos, principalmente a mitocondrias (Fuentes-Ramírez et al., 2021). Esto último coincide con lo encontrado por Sharaf et al., (2019), quienes realizaron un monitoreo del aislamiento simultáneo de plástidos y mitocondrias a partir del alga fotosintética *Chromera velia*. Los autores reportan que después del aislamiento de los plástidos todavía hay membranas mitocondriales adosadas a ellos. Por lo anterior, nosotros consideramos que, debido a que las mitocondrias están conformadas por una extensa red de membranas, es de esperarse que después de aislar los plástidos, las mitocondrias sigan presentes en las fracciones enriquecidas en plástidos.

Normalmente se lleva a cabo algún tipo de tinción para poder observar las membranas de los plástidos por TEM (Sharaf et al., 2019). Sin embargo, en este trabajo no se empleó ningún tipo de tinción. Por esa razón, consideramos que se evitó introducir artificios en la visualización de los organelos y, aunque no se observaron detalles de las membranas, sí se distinguió la morfología de los plástidos y se obtuvieron imágenes de su apariencia superficial.

Otro punto que nos interesa destacar, es que no detectamos indicios de plástidos desintegrados, como lo han reportado otros autores (Sharaf et al., 2019). Probablemente esto se debe a la osmolaridad en la que se aíslan los organelos, en el presente trabajo se empleó una osmolaridad de 0.8 M, mientras que Sharaf et al., (2019) usaron una osmolaridad de 0.33 M.

5.1.3. Liberación de gránulos de almidón

En este trabajo se corroboró la integridad de los organelos aislados mediante un sencillo experimento bioquímico, en el que se eliminó al sorbitol mediante una diálisis a 4 °C durante toda la noche con el mismo medio de aislamiento MAP carente del osmoprotector. Posteriormente, calentamos los plástidos a 90 °C, liberando los gránulos de

almidón que son evidentemente más pequeños que los plástidos íntegros, según nuestras mediciones con el software ImageJ, (Figura 12).

El sorbitol es un osmoprotector que se comenzó a emplear en concentraciones de 0.33 M en los primeros aislamientos de cloroplastos (Walker, 1964, 1971), mientras que el presente trabajo se basó en protocolos de aislamiento de amiloplastos de tejidos vegetales, como las semillas de maíz (Denyer & Pike, 2008), en los cuales la concentración de sorbitol utilizada fue de 0.8 M. Se utiliza una concentración mayor porque los amiloplastos son más densos que los cloroplastos, debido a la abundancia de almidón y porque el aislamiento de plástidos de semillas de maíz implica procesos de rompimiento más agresivos. Aunque el rompimiento de las células de *Polytomella* se lleva a cabo mediante procesos mecánicos suaves, puesto que carece de pared celular, en el presente trabajo tomamos como referencia la concentración de 0.8 M de sorbitol.

5.1.4. Tamaño de plástidos vs. tamaño de gránulos de almidón

El tamaño de los gránulos de almidón de *Polytomella* va de 0.188 x 0.250 μm a 0.781 x 0.938 μm , mientras que los plástidos tienen un rango de 0.635 x 1.354 μm a 0.933 x 2.858 μm . Podemos notar claramente que son diferentes en tamaño.

Por otro lado, los gránulos de almidón de *Chlamydomonas* presentan tamaños no mayores a 1.3 μm (Dauvillée et al., 2006), lo que nos indica que el tamaño de los gránulos de almidón en algas clorofíceas se mantiene en un rango que no supera los 2 μm ; también nos indica que los plástidos son evidentemente más grandes que los gránulos de almidón que almacenan. Por otro lado, cabe aclarar que en plantas sí es posible encontrar gránulos de almidón superiores a 2 μm (Xing et al., 2016) y los amiloplastos pueden alcanzar un tamaño de 20 μm , como se ha reportado en maíz, (Singh et al., 2013).

5.2 Caracterización proteómica de los plástidos de *Polytomella parva*

5.2.1. ¿Para qué un proteoma más?

En este trabajo, aportamos un proteoma que nos ayudará a comprender el funcionamiento del plástido de un alga unicelular de vida libre, la cual tiene la peculiaridad de haber perdido el genoma plastídico y la capacidad fotosintética. Sin embargo, este no ha sido el primer reporte del proteoma de un plástido, ya que este campo de estudio se ha

abordado desde hace dos décadas aproximadamente, lo que ha permitido realizar clasificaciones funcionales de las proteínas y conocer el número de éstas en los plástidos de distintos organismos.

A la fecha, se han publicado casi 20 trabajos proteómicos de diferentes plástidos, pertenecientes a diferentes organismos: plantas, algas verdes y rojas, dinoflagelados, y diatomeas (Behrens et al., 2013; Dupont, 2008; Ferro et al., 2003; Friso et al., 2004; Gruber et al., 2015; M. Huang et al., 2013; Jiang et al., 2017; Lande et al., 2017; Mastrobuoni et al., 2012; Nosenko et al., 2006; Novák et al., 2019; Peltier et al., 2002; Simm et al., 2013; Tamburino et al., 2017; Terashima et al., 2011; Wang et al., 2016; Xing et al., 2016). Con ello, se pueden conocer las rutas metabólicas que están mayormente representadas en cada uno de estos plástidos, lo cual nos permite comparar lo que encontramos en el plástido de *Polytomella* y poder comprender, posteriormente, la fisiología de los diferentes organismos.

Por otro lado, se han realizado estimaciones teóricas del número de las diferentes proteínas en el cloroplasto en plantas, para lo cual se ha tomado como modelo a *Arabidopsis* (Martin & Herrmann, 1998; Kleffmann et al., 2004). Las bases de datos más actualizadas proponen 3,150 proteínas (M. Huang et al., 2013), lo que nos permite comparar con lo que reportamos en el presente trabajo y, en un momento dado, sugerir un número mínimo de proteínas para mantener activo a este organelo en un organismo del linaje *Archaeplastida*.

El presente proteoma está conformado por 309 proteínas y se obtuvo comparando secuencias y llevando a cabo un análisis por espectrometría de masas. Es significativamente más pequeño que el reportado para *Chlamydomonas reinhardtii*, de 996 proteínas (Terashima et al., 2011). La ausencia de los componentes fotosintéticos, de los componentes involucrados en la síntesis de pigmentos y de aquellos involucrados en la traducción de proteínas, explican en parte esta diferencia importante.

Una pregunta constante acerca del plástido de *Polytomella* es ¿por qué esta alga incolora conservó el plástido cuando la fotosíntesis ya no está presente?, para contestarla es importante recordar que este organelo no solamente desarrolla la fotosíntesis, sino todo un conjunto de funciones metabólicas diferentes, las cuales se agruparon en 27 rutas distintas. Dentro de éstas, las más abundantes están relacionadas con metabolismo de carbono, debido a que es la principal fuente de energía de esta alga heterótrofa; también se conserva gran parte del metabolismo de aminoácidos, de nucleótidos, el metabolismo redox, parte de la síntesis de tetrapirroles, respuesta a estímulos externos y los complejos

translocadores de proteínas; todos ellos son componentes cuyos genes se encuentran generalmente localizados en el núcleo (Martin & Herrmann, 1998; Smith & Lee, 2014).

Por otro lado, cabe mencionar que previamente se ha aportado información sobre la importancia de conservar al plástido, particularmente para la síntesis del ácido 5-aminolevulínico (ALA), el cual se sintetiza exclusivamente en este organelo por las enzimas GSAT (EC 5.4.3.8), PPOX (EC 1.3.3.4) y FeC (EC 4.99.1.1). Hay que recordar que ALA es precursor en la síntesis del cofactor hemo, (Atteia et al., 2005), importante en diversos procesos de la célula, como la respiración celular (Voß et al., 2011).

5.2.2. Metabolismo de carbono

En este trabajo identificamos 24 proteínas relacionadas únicamente con el metabolismo de almidón, lo que constituye el 7.8% de todo el proteoma, y nueve de esas 24 podrían presentar isoformas, ya que identificamos más de una secuencia tanto del transcrito como del péptido; esto subraya la importancia de la síntesis del almidón en la fisiología de *Polytomella*. Su participación podría relacionarse en primera instancia como fuente de energía, sin embargo, también podría tener una función de resistencia osmótica cuando *Polytomella* entra en etapas de enquistamiento (Brown, Massalski, & Leppard, 1976; Moore et al., 1970), ya que las moléculas derivadas del almidón, pueden comportarse como osmolitos cuando el organismo está bajo estrés hídrico o bajo estrés por temperatura, algo que se ha observado en plantas y en algunas algas (Hare et al., 1998; Karsten et al., 2005; Müller et al., 2008). De esta manera, el metabolismo de almidón es esencial, porque nos podría explicar cómo esta alga puede subsistir sin una pared celular cuando el medio ambiente no presenta las condiciones osmóticas idóneas.

Por otro lado, cabe mencionar que el metabolismo de carbono en *Polytomella* ha sido motivo de estudio desde hace siete décadas (Lwoff et al., 1950), ya que llamaba la atención que esta alga no pudiera asimilar fuentes de carbono comunes como la glucosa, la sacarosa y la maltosa y que, por el contrario, subsistiera exclusivamente con acetato y etanol. Este fenómeno se pudo comprender gracias a la identificación de las enzimas responsables de metabolizar esas fuentes de carbono y de comprender su regulación (Ballicora et al., 2004; Barker et al., 1951; Lwoff et al., 1950; Neuhaus & Emes, 2000). Con el presente trabajo, se suma información adicional sobre el metabolismo de carbono de esta alga incolora.

Otra de las rutas metabólicas en la que identificamos una gran cantidad de proteínas es la de lípidos, que corresponde al 7.8% del proteoma y tiene también 24 proteínas con 5 enzimas que podrían presentar isoformas. El metabolismo de lípidos que desarrollan los plástidos ha sido una de las grandes aportaciones de la endosimbiosis al linaje *Archaeplastida*, de hecho, las plantas sintetizan lípidos *de novo* solamente en los plástidos y uno de los precursores metabólicos centrales, la acetil-CoA, es sintetizado dentro del organelo (Rawsthorne, 2002). Esta es la razón por la cual algunas especies de lípidos son específicos de *Archaeplastida*. Actualmente, se ha demostrado que algunos de estos lípidos forman parte de la membrana externa de los plástidos con un propósito no sólo estructural, sino funcional, por ejemplo, en la translocación de proteínas al interior del organelo (Bruce, 1998; Warakanont et al., 2015), lo que convierte a esta ruta metabólica en un atractivo campo de estudio.

5.2.3. Metabolismo de aminoácidos

Polytomella conserva gran parte de las rutas metabólicas de aminoácidos, lo que conforma el 18.1% de todo el proteoma del plástido. Las familias que se identificaron fueron la del aspartato, glutamato, serina y shikimato. Dentro de las enzimas identificadas, 21 parecen tener un péptido señal, el cual las dirige hacia el plástido.

Es preciso mencionar que la gran mayoría de los genes para la síntesis de aminoácidos en los plástidos no se originaron en las cianobacterias, sino que su origen se debe al huésped, pero durante la endosimbiosis las proteínas se etiquetaron con presecuencias para ser reclutadas por el plástido, (Reyes-Prieto & Moustafa, 2012). Esto sugiere que *Polytomella* está conservando proteínas del plástido que no provienen originalmente de este organelo, lo cual nos lleva a plantear las siguientes preguntas: ¿por qué estas proteínas se siguen etiquetando hacia el plástido?, ¿es necesario que su metabolismo lo desarrollen dentro de este organelo? La respuesta a estas preguntas nos ayudaría a comprender la importancia de conservar el plástido, a pesar de que ya no hay fotosíntesis.

Cabe destacar que gran parte de este metabolismo ya había sido descrito mediante el transcriptoma por Asmail (2015). En este trabajo identificamos más secuencias a las ya reportadas, detectamos qué secuencias conservan el péptido señal y reportamos secuencias de proteínas, lo cual confirma a los transcritos anteriormente reportados.

5.2.4. Metabolismo remanente de la fotosíntesis

En el presente proteoma se identificaron secuencias que forman parte del ciclo de Calvin, lo cual llama la atención, ya que *Polytomella* no es fotosintética. Recordemos que el ciclo de Calvin es una ruta metabólica central en los cloroplastos, puesto que en él se sintetizan moléculas de carbono a partir de moléculas de CO₂ utilizando la energía generada en la fase luminosa de la fotosíntesis; pero también debemos tener en cuenta que en este ciclo se sintetizan compuestos que pueden funcionar como intermediarios metabólicos en otras vías, como la biosíntesis de nucleótidos. Además, el ciclo de Calvin comparte algunas enzimas con la ruta de las pentosas fosfato, que genera principalmente intermediarios metabólicos y poder reductor para los procesos de biosíntesis (Sillero et al., 2006). Por lo anterior, es comprensible que encontremos en el plástido enzimas que originalmente formaban parte del ciclo de Calvin.

Asimismo, identificamos proteínas clasificadas dentro de los procesos de fotofosforilación y fotorrespiración, como la ferredoxina, la oxidasa terminal de plástido (PTOX) (EC 1.10.3.11), la proteína Vipp1, la proteína 8 de unión a clorofila a-b, la serina hidroximetil transferasa (EC 2.1.2.1), así como una anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1), y la subunidad grande de la Rubisco (EC 2.1.1.127), que se clasificó en la ruta de las pentosas fosfato. Todas estas proteínas se han identificado y caracterizado en procesos relacionados a la fotosíntesis y a la fotorrespiración. Al parecer *Polytomella* no es el único organismo que conserva proteínas relacionadas con el proceso fotosintético, en otras especies no fotosintéticas como *Orobancha* (Delavault & Thalouarn, 2002; Wolfe & DePamphilis, 1997), *Prototheca wickerhamii* (Knauf & Hachtel, 2002), *Cuscuta* (McNeal et al., 2007) y en algunas orquídeas (Barrett & Freudenstein, 2008) endoparásitas del género *Pilostyles* (Bellot & Renner, 2016), se ha conservado principalmente la subunidad grande de la Rubisco, pero también otros genes relacionados a fotosíntesis, como algunas subunidades de la ATP sintasa del plástido (Knauf & Hachtel, 2002). Todos estos organismos, sin embargo, presentan algún nivel de parasitismo, lo que los hace diferentes de *Polytomella*, claramente un organismo de vida libre. El otro eucarionte no fotosintético de vida libre que también conserva los genes de la subunidad grande la Rubisco (*rbcL*) es *Cryptomonas paramecium*, aunque a diferencia de *Polytomella parva*, a la fecha no se ha reportado la secuencia de aminoácidos (Tanifuji et al., 2020). Por otra parte, *Polytoma*, otra alga clorofícea no fotosintética de vida libre, no conserva estos genes (Figueroa-Martinez et al., 2017), lo que

hace aún más interesante su presencia en *Polytomella*. Algunos autores proponen que posiblemente todas estas proteínas tengan funciones alternativas a las relacionadas con la fotosíntesis (Krause, 2008; Záhonová et al., 2016), un ejemplo de ello es la proteína Vipp1, involucrada en la biosíntesis de los tilacoides, pero que también participa en respuesta a estrés y en la biogénesis de vesículas para comunicar al plástido con otras regiones de la célula (Liu et al., 2007; Vothknecht et al., 2012).

A partir de lo anterior, queremos destacar que el presente trabajo reporta por primera vez la presencia de la subunidad grande de la Rubisco en un organismo no fotosintético de vida libre. Por lo que consideramos de interés, estudiar la participación de estas proteínas en la fisiología de un organismo que ha perdido la capacidad de realizar fotosíntesis y poder determinar con precisión qué función llevan a cabo.

Otro ejemplo de proteínas que merecen ser estudiadas son las subunidades SecY, TatC y Alb3, que son parte de tres distintos complejos de translocación de proteínas en membranas tilacoidales. Como el plástido de *Polytomella* carece de membranas tilacoidales, suponemos que estos translocadores de proteínas podrían encontrarse en la membrana interna del plástido, al igual que el translocador de ADP/ATP (Ngernprasirtsiri et al., 1989; Thuswaldner et al., 2007). Por otro lado, Kamikawa et al., (2015), demostraron la conservación de genes de la ATP sintasa del plástido de *Nitzschia sp.*, una diatomea no fotosintética; adicionalmente, correlacionaron dicha conservación con la necesidad de hidrolizar ATP para la translocación de proteínas en los tilacoides mediante el sistema TAT (Kamikawa et al., 2015). Aunque estos autores no apoyan su propuesta con análisis funcionales, resulta interesante pensar en un papel alternativo para la ATP sintasa, realizando ahora una función exclusivamente hidrolítica en un contexto no fotosintético. Resulta de interés, pues, salirse del paradigma inicialmente propuesto para muchas proteínas e investigar su presencia y función en estos organismos no fotosintéticos.

5.2.5. Metabolismo de nucleótidos

La ruta de biosíntesis de nucleótidos es una de las mejor representadas en el proteoma del plástido de *Polytomella* (5.8%), con 18 enzimas identificadas, además de la carbamoilfosfato sintasa (EC 6.3.5.5), la aspartato carbamoiltransferasa (2.1.3.2) y la uridina cinasa (EC 2.7.1.48), que fueron clasificadas por Mercator 4 en la ruta de biosíntesis de aspartato y el ciclo de Calvin, aunque otros autores las incluyen dentro del metabolismo

de nucleótidos (Zrenner et al., 2006). Los nucleótidos se pueden sintetizar *de novo* dentro de los plástidos, particularmente en los endosimbiontes primarios (Ast et al., 2009). Estos compuestos tienen un papel central para la célula, desde ser componentes de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), hasta precursores de vitaminas y coenzimas y de la síntesis de ATP (Rolland et al., 2018). En *Polytomella* identificamos 10 de las 11 enzimas necesarias para sintetizar las purinas *de novo* (EC: 2.4.2.14, 6.3.4.13, 6.3.5.3, 6.3.3.1, 4.1.1.21, 6.3.2.6, 4.3.2.2, 2.1.2.3, 6.3.4.4, 2.7.4.3, 3.5.2.5 y 3.5.3.9) y también encontramos las dos primeras enzimas necesarias para la síntesis *de novo* de las pirimidinas (EC: 6.3.5.5 y 2.1.3.2) (Zrenner et al., 2006). De todas estas enzimas, 12 preservan un péptido señal, apoyando su localización plástica.

5.2.6. Metabolismo redox y respuesta a estímulos externos

En *Polytomella* encontramos 18 proteínas clasificadas dentro de la homeostasis redox, lo que representa el 5.8% de todo el proteoma. Además, presenta enzimas que participan en la asimilación de hierro y azufre, la cual se ha reportado que está interconectada con la homeostasis redox como parte de una regulación, (Pérez-Pérez et al., 2013).

La homeostasis redox es otro legado de las cianobacterias a los eucariontes fotosintéticos; existen teorías de que el fenómeno de la endosimbiosis dio lugar a una repentina generación de cantidades considerables de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro del eucarionte, por lo que dichas especies tenían que ser continuamente monitoreadas y eliminadas (Rockwell et al., 2014). Para ello, los genes de la cianobacteria endosimbionte se resguardaron en el núcleo del hospedero. Este metabolismo redox es complejo e involucra la comunicación y regulación entre diferentes rutas metabólicas y el impacto de su mal funcionamiento recae en más de un tipo de respuesta fisiológica. Por ejemplo, en este trabajo identificamos proteínas de la familia *Reticulata-related*, que se ha sugerido que participan coordinadamente en procesos de homeostasis de aminoácidos y de especies reactivas de oxígeno, lo cual tiene un impacto en el crecimiento de las células en hojas de *Arabidopsis*, además de un posible papel en la embriogénesis (Pérez-Pérez et al., 2013).

Adicionalmente, identificamos a la enzima PTOX (EC 1.10.3.11), que participa en la homeostasis redox y el estrés lumínico que se genera en los cloroplastos debido a la

fotosíntesis, esto lo hace drenando los electrones de la poza de plastoquinonas (Niyogi, 2000; Pfannschmidt et al., 2001). La presencia de esta enzima es particularmente interesante, puesto que *Polytomella* carece de fotosíntesis y no se produce un estrés lumínico, por esa razón resultaría atractivo un estudio más detallado de esta proteína.

Por otro lado, identificamos secuencias de diversas peptidasas y chaperonas, las cuales participan en la respuesta a estímulos externos. Dicha respuesta está interconectada con diversos procesos fisiológicos que involucran casi todo el metabolismo del plástido, como ya lo demostraron Mühlhaus et al., (2011) al someter a *Chlamydomonas* a estrés por calor y elaborar una lista de 244 proteínas que cambiaron sus niveles de expresión. Dichas proteínas están involucradas en todo el metabolismo del cloroplasto, desde la fotosíntesis y el metabolismo del carbono, hasta el metabolismo de compuestos centrales como los aminoácidos y los nucleótidos (Schroda et al., 2015). Por supuesto, este también es un campo vasto para futuros estudios.

5.2.7. Metabolismo de tetrapirroles

En *Polytomella* se identificaron componentes de la ruta biosintética de tetrapirroles, la cual está truncada hasta la síntesis del grupo hemo y ya no continúa hasta la formación de clorofila, tal como lo había sugerido Asmail, (2015), quien reportó previamente las secuencias de transcritos.

En esta ruta metabólica, originalmente se sintetizan varios pigmentos lineales y las clorofilas que, entre algunas de sus funciones, es que los eucariontes fotosintéticos puedan monitorear y metabolizar la concentración de oxígeno generada por la fotosíntesis y de esa manera enfrentar el estrés oxidativo generado por el endosimbionte (Rockwell et al., 2014). Claramente, en *Polytomella* estas funciones no son necesarias, puesto que ya no hay fotosíntesis, sin embargo, se ha sugerido que la conservación de esta ruta se limita precisamente a la producción del cofactor hemo, sobre todo porque *Polytomella* carece de la enzima ALA sintasa, que es la responsable de producir hemo mediante la vía mitocondrial de Shemin (Atteia et al., 2005; Smith & Lee, 2014). Vale la pena recordar que el grupo hemo es un cofactor crucial en diferentes rutas metabólicas, de la cual la respiración celular es sin duda la más importante (Oborník & Green, 2005).

5.2.8. Proteínas membranales de plástidos

En este trabajo identificamos una cantidad apreciable de proteínas de membrana que pertenecen a los transportadores de solutos, así como a los sistemas de translocación de proteínas al interior del organelo, lo que representa el 5.2% y 8.1% del proteoma, respectivamente. Entre los transportadores de solutos, encontramos al translocador de oxoglutarato-malato y al transportador de ATP/ADP, que presumiblemente tienen 12 cruces transmembranales, cada uno (Neuhaus & Wagner, 2000). Lo anterior contrasta con las siete hojas beta que tiene el canal no selectivo OP24 (Flügge, 2000), que también identificamos en este trabajo y que aparentemente transloca una diversa cantidad de compuestos, como triosas-fosfato, ATP, fósforo inorgánico, y aminoácidos cargados (Flügge, 2000). Lo anterior indica que tuvimos una representación significativa del proteoma membranal del plástido, y que las proteínas encontradas están representadas por haces de alfa-hélices, pero también por barriles de beta-plegadas.

Lo anterior es importante, puesto que pocos estudios han reportado proteomas membranales de plástidos debido a los desafíos que presentan, entre éstos se encuentran la baja expresión que tienen las proteínas de membrana, así como la longitud y la hidrofobicidad de los segmentos transmembranales (Barrera & Robinson, 2011). La estrategia empleada para superar estos retos se ha enfocado principalmente en el aislamiento de las proteínas empleando soluciones salinas o solventes orgánicos para enriquecer las muestras antes de analizarlas (Ferro et al., 2003; Simm et al., 2013; Friso et al., 2004). Por lo que es importante destacar que en este trabajo no se emplearon técnicas especializadas para la purificación y posterior identificación, de las proteínas membranales.

5.2.9. Sistema de translocación de proteínas del plástido

En este trabajo identificamos la mayoría de los complejos proteicos del sistema canónico de translocación de proteínas TIC-TOC, así como también la recientemente identificada subunidad Tic100 descrita en la membrana interna, y los complejos motores asociados a dichos sistemas. Esto es relevante, puesto que el sistema de translocación de proteínas es una pieza clave para entender cómo llegan al interior del plástido los participantes del vasto metabolismo que describimos en este trabajo.

La Figura 19 muestra la actualización más reciente de este gran complejo de translocación. Los primeros elementos que se descubrieron son las subunidades del

complejo TIC/TOC (Cline et al., 1985; Cline, 1986; Pain & Blobel, 1987; Waegemann, K., & Soil, 1991; Schnell et al., 1994; Knopp et al., 2020). Posteriormente, se reportaron complejos motores que probablemente proveen energía para la translocación de las proteínas: el sistema de chaperonas HSP70, HS90 y CLPB, y el sistema Ycf2-FstHi-pdNAD-MDH (Caliebe et al., 1997; Chotewutmontri & Bruce, 2015; P. K. Huang et al., 2016; Bölter, 2018; Huang et al., 2016; Inoue et al., 2013; Kovacheva et al., 2005; Li, 2020; Shi & Theg, 2010; Kikuchi et al., 2013, 2018; Schreier et al., 2018;). Más recientemente, se ha sumado otro complejo de translocación localizado en la membrana interna y compuesto de cuatro subunidades, (Ramundo et al., 2020), una de las cuales es Tic100, identificada en este trabajo.

Actualmente, existe un amplio debate sobre cuáles son las proteínas esenciales para el funcionamiento del sistema TIC-TOC (Bölter & Soll, 2017; de Vries et al., 2015), por lo que nuestros hallazgos podrían aportar información valiosa sobre qué componentes son los relevantes para la importación de proteínas en el contexto de un plástido que ya no hace fotosíntesis. Por ejemplo, en el genoma y transcriptoma de *Polytomella* no se encontraron las secuencias de *ycf1* y *ycf2* (Smith & Lee, 2014), que algunos autores han planteado que son cruciales para la translocación de proteínas al interior del organelo (Kikuchi et al., 2018), lo cual nos hace pensar que dichas proteínas quizá podrían ser importantes para el cloroplasto pero ya no esenciales para un plástido incoloro.

Por otro lado, cabe mencionar que se han realizado estudios en donde se analizan los efectos de la alteración de este sistema de translocación y en algunos casos se nota claramente cómo el fenotipo mostrado es semejante al de plástidos incoloros: acumulan almidón, no tienen membranas tilacoidales y no llevan a cabo la fotosíntesis (Leister, 2003; Wise, R. R., & Hooper, 2007). Es por ello que la disfuncionalidad del complejo TIC-TOC, ha dado lugar a una de las hipótesis para determinar la pérdida de la fotosíntesis (Kikuchi et al., 2018). Y aunque todavía queda mucho por investigar, lo que sí podemos afirmar con este trabajo, es que *Polytomella* puede prescindir de la fotosíntesis, de la maquinaria de síntesis de proteínas dentro del plástido y de su genoma plastídico, pero no puede prescindir de su sistema de translocación de proteínas, para poder importar al interior del plástido a todos los componentes que conforman el proteoma aquí descrito. Por ello, explorar con más detalle el sistema de translocación de proteínas en *Polytomella*, es uno de los intereses de nuestro laboratorio.

5.2.10. Proteínas de plástido esenciales en el linaje Archaeplastida

Las rutas metabólicas de los plástidos han sido estudiadas en contextos fotosintéticos y el alga incolora *Polytomella parva* puede representar un modelo alternativo para estudiar las mismas rutas, pero en un contexto no fotosintético. Algunos autores han sugerido que aparentemente no hay un grupo claro de genes de plástido que se conserven y que muestren ser esenciales en plantas parásitas (Wicke & Naumann, 2018), en este sentido, el presente trabajo aporta un amplio compendio de proteínas que probablemente sean esenciales para la supervivencia de un eucarionte no fotosintético del linaje *Archaeplastida*.

5.2.11. Representatividad del proteoma del plástido de *Polytomella parva*

De las 309 proteínas identificadas en el proteoma aquí estudiado, la gran mayoría tiene ortólogos en *Arabidopsis*, maíz y arroz, (96%, 93% y 94% respectivamente), así como en *Chlamydomonas* (73%), lo que nos lleva a pensar que el proteoma del plástido de *Polytomella* está bien representado. Por otro lado, observamos algunas semejanzas con el plástido secundario de *Euglena longa*, un protista que también perdió la fotosíntesis y que tiene un plástido con tres membranas derivado de un evento de endosimbiosis secundaria (Záhonová et al., 2018). Así, se encontraron semejanzas entre algunas enzimas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos, de coenzimas, de lípidos, y de nucleótidos, así como enzimas del ciclo de Calvin, lo que refuerza la hipótesis de la función alternativa de dicho ciclo en la generación de intermediarios metabólicos y no exclusivamente en la fijación de CO₂. Por otro lado, se encontraron diferencias interesantes, las más notables son las siguientes:

- 1) La maquinaria de translocación TIC-TOC que se conserva en el plástido de *Polytomella parva* está ausente en *Euglena longa*.
- 2) Como ya se indicó, *Polytomella* carece del metabolismo de RNA propio de los plástidos y por lo tanto no se muestra en la Tabla 2, por lo que no se comparó directamente con el resto de las especies, sin embargo, se ha reportado que *Euglena longa* claramente conserva dicho metabolismo (Záhonová et al., 2018).

6. CONCLUSIÓN

En este trabajo estudiamos los plástidos incoloros de un alga no fotosintética de vida libre. Mediante microscopía de luz y microscopía de Nomarski observamos la distribución de los plástidos dentro de la célula, su morfología y tamaño. Con TEM, caracterizamos la doble membrana de los plástidos, los gránulos de almidón almacenados, así como la integridad de los organelos y el tamaño del plástido y de los gránulos de almidón.

Mediante el proteoma del plástido incoloro de *Polytomella parva* aportamos información acerca de su fisiología, corroboramos la presencia de rutas metabólicas previamente descritas en la literatura y, sorprendentemente, encontramos rutas bioquímicas no descritas en este tipo de plástidos, como el ciclo de Calvin y los sistemas de translocación de proteínas tilacoidales. Adicionalmente, reportamos varias proteínas membranales, las cuales transportan solutos y metabolitos, identificando el sistema canónico de translocación de proteínas TIC/TOC y algunos de sus complejos motores asociados.

Aun cuando este proteoma consta de 309 proteínas, la tercera parte de las proteínas identificadas en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, consideramos que está muy bien representado entre los plástidos descritos del linaje *Archaeplastida*, como pudimos comprobarlo en las comparaciones hechas con diferentes especies de algas y plantas.

Nosotros, proponemos que *Polytomella parva* puede ser un modelo para estudiar la función alternativa de un conjunto de proteínas estudiadas originalmente en contextos fotosintéticos y que se conservan en esta alga incolora.

7. PERSPECTIVAS

La ciencia genera conocimiento que nos permite comprender nuestro entorno y cuando una investigación científica es fructífera genera respuestas, pero sobre todo muchas preguntas. El presente trabajo no sólo ha generado una cantidad considerable de información del metabolismo del plástido de *Polytomella*, sino que nos está brindando oportunidades para estudiar la dinámica de al menos 20 rutas metabólicas diferentes que se han conservado en un organismo que podría considerarse modelo de estudio. Es por ello, que me parece pertinente mencionar algunas perspectivas para estudios futuros:

- El sistema de translocación de proteínas TIC/TOC y los complejos motores asociados son de especial interés, ya que es el responsable de transportar a toda la maquinaria al interior del plástido. Por lo que propongo:
 - Clonar y caracterizar las subunidades identificadas
 - Montar un protocolo de importación en el plástido de *Polytomella*
- Proponemos considerar a *Polytomella parva* como un modelo de estudio para elucidar la función de proteínas que hasta ahora se han analizado exclusivamente en contextos fotosintéticos, por ejemplo:
 - ¿qué función desempeña la subunidad grande la Rubisco si ya no hay fijación de CO₂ en *Polytomella*?
 - ¿cuál es la función y la localización subcelular de las subunidades SecY, TatC y Alb3 si ya no hay membranas tilacoidales?
 - En cuanto a la proteína 8 de unión a clorofila a-b, de la cual identificamos el transcrito, ¿se conserva el péptido?, ¿es funcional?
- Debido a que el metabolismo redox y la respuesta a estímulos externos es uno de los legados más importantes conservado en los eucariontes fotosintéticos, es interesante evaluar la función de las peptidasas y chaperonas conservadas y otras enzimas, por ejemplo:
 - ¿cuál es la localización subcelular y la función de PTOX si *Polytomella* ya no tiene tilacoides y ya no hace fotosíntesis?

Esas perspectivas son solamente algunas de las que surgen a raíz de los resultados de nuestro trabajo, esperamos que futuros estudios generen más información que nos ayuden a comprender a este organelo y a *Polytomella*.

REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Asmail, S. (2015). Inferring plastid metabolic pathways within the nonphotosynthetic free-living green algal genus *Polytomella*. *Electronic Thesis and Dissertation Repository. The University of Western Ontario. Paper 3225, September.*
- Asmail, S. R., & Smith, D. R. (2016). Retention, erosion, and loss of the carotenoid biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *New Phytologist*, 209(3), 899–903. <https://doi.org/10.1111/nph.13682>
- Ast, M., Gruber, A., Schmitz-Esser, S., Neuhaus, H. E., Kroth, P. G., Horn, M., & Haferkamp, I. (2009). Diatom plastids depend on nucleotide import from the cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3621–3626.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808862106>
- Atteia, A., Van Lis, R., & Beale, S. I. (2005). Enzymes of the heme biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic alga *Polytomella* sp. *Eukaryotic Cell*, 4(12), 2087–2097.
<https://doi.org/10.1128/EC.4.12.2087-2097.2005>
- Ballicora, M. A., Iglesias, A. A., & Preiss, J. (2004). ADP-glucose pyrophosphorylase: A regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynthesis Research*, 79(1), 1–24.
<https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000011916.67519.58>
- Balmer, Y., Vensel, W. H., DuPont, F. M., Buchanan, B. B., & Hurkman, W. J. (2006). Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. *Journal of Experimental Botany*, 57(7), 1591–1602.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj156>
- Barker, S. A., Bebbington, A., & Bourne, E. J. (1951). Carbohydrate primers for Q-enzyme. *Nature*, 168, 834–835.
- Barrera, N. P., & Robinson, C. V. (2011). Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: From individual proteins to intact complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 247–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062309->

- Barrett, C. F., & Freudenstein, J. V. (2008). Molecular evolution of rbcL in the mycoheterotrophic coralroot orchids (*Corallorhiza* Gagnebin, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *47*(2), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.014>
- Bates, F. L., French, D., & Rundle, R. E. (1943). Amylose and Amylopectin Content of Starches Determined by their Iodine Complex Formation. *Journal of the American Chemical Society*, *65*(2), 142–148. <https://doi.org/10.1021/ja01242a003>
- Behrens, C., Blume, C., Senkler, M., Eubel, H., Peterhänsel, C., & Braun, H. P. (2013). The “protein complex proteome” of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics*, *91*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.07.001>
- Bellot, S., & Renner, S. S. (2016). The plastomes of two species in the endoparasite genus *pilostyles* (apodanthaceae) each retain just five or six possibly functional genes. *Genome Biology and Evolution*, *8*(1), 189–201. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv251>
- Bhattacharya, D., Archibald, J. M., Weber, A. P. M., & Reyes-Prieto, A. (2007). How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays*, *29*(12), 1239–1246. <https://doi.org/10.1002/bies.20671>
- Blank, C. E. (2013). Origin and early evolution of photosynthetic eukaryotes in freshwater environments: Reinterpreting proterozoic paleobiology and biogeochemical processes in light of trait evolution. *Journal of Phycology*, *49*(6), 1040–1055. <https://doi.org/10.1111/jpy.12111>
- Bölter, B. (2018). En route into chloroplasts : preproteins ' way home. *Photosynthesis Research*, *138*(3), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0542-8>
- Bölter, B., & Soll, J. (2017). Ycf1/Tic214 Is Not Essential for the Accumulation of Plastid Proteins. *Molecular Plant*, *10*(1), 219–221. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.10.012>
- Brown, D. L., Massalski, A., & Leppard, G. G. (1976). Fine structure of excystment of the quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. *Protoplasma*, *90*(1–2), 155–171. <https://doi.org/10.1007/BF01276485>

- Brown, D. L., Massalski, A., & Patenaude, R. (1976). Organization of the flagellar apparatus and associate cytoplasmic microtubules in the quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. *The Journal of Cell Biology*, *69*, 106–125.
- Bruce, B. D. (1998). The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Molecular Biology*, *38*(1–2), 223–246. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5298-3_12
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J., & Heins, L. (1997). The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO Journal*, *16*(24), 7342–7350. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.24.7342>
- Chotewutmontri, P., & Bruce, B. D. (2015). Non-native, N-terminal Hsp70 molecular motor recognition elements in transit peptides support plastid protein translocation. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(12), 7602–7621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633586>
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Lubben, T. H., & Keegstra, K. (1985). Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(6), 3691–3696. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83678-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83678-5)
- Cline, K. (1986). Proteins into Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 14804–14810.
- Colina-Tenorio, L., Miranda-Astudillo, H., Cano-Estrada, A., Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Remacle, C., & González-Halphen, D. (2016). Subunit Asa1 spans all the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1857*(4), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.012>
- Colleoni, C., Linka, M., Deschamps, P., Handford, M. G., Dupree, P., Weber, A. P. M., & Ball, S. G. (2010). Phylogenetic and biochemical evidence supports the recruitment of an ADP-glucose translocator for the export of photosynthate during plastid endosymbiosis. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(12), 2691–2701. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq158>
- Dagan, T., Roettger, M., Stucken, K., Landan, G., Koch, R., Major, P., Gould, S. B., Goremykin,

- V. V., Rippka, R., De Marsac, N. T., Gugger, M., Lockhart, P. J., Allen, J. F., Brune, I., Maus, I., Pühler, A., & Martin, W. F. (2013). Genomes of stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biology and Evolution*, 5(1), 31–44.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evs117>
- Dauvillée, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, J. P., Colleoni, C., Hicks, G., Wattebled, F., Deschamps, P., D’Hulst, C., Liénard, L., Cournac, L., Putaux, J. L., Dupeyre, D., & Ball, S. G. (2006). Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, 48(2), 274–285.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02870.x>
- de Koning, A. P., & Keeling, P. J. (2006). The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. *BMC Biology*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-12>
- de Vries, J., & Archibald, J. M. (2018). Quick guide Plastid genomes. *Current Biology*, 28(8), R336–R337. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.027>
- de Vries, J., & Archibald, J. M. (2017). Endosymbiosis: Did Plastids Evolve from a Freshwater Cyanobacterium? *Current Biology*, 27(3), R103–R105.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.006>
- de Vries, J., Sousa, F. L., Bölter, B., Soll, J., & Goulda, S. B. (2015). YCF1: A green TIC? *Plant Cell*, 27(7), 1827–1833. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135541>
- Delavault, P., & Thalouarn, P. (2002). The obligate root parasite *Orobanche cumana* exhibits several *rbcl* sequences. *Gene*, 297(1–2), 85–92.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00868-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00868-5)
- Delaye, L., et al. (2016). How really ancient is *Paulinella chromatophora*? *PLoS Currents*, 8.
- Denyer, K., & Pike, M. (2008). Isolation of amyloplasts. *Current Protocols in Cell Biology*, SUPPL. 38, 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0328s38>
- Dupont, F. M. (2008). Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *BMC Plant Biology*, 8, 1–18.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-39>

- Emanuelsson, O., Nielsen, H., & Heijne, G. Von. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, 8(5), 978–984. <https://doi.org/10.1110/ps.8.5.978>
- Ferro, M., Salvi, D., Brugière, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., & Rolland, N. (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 2(5), 325–345. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300030-MCP200>
- Figueroa-Martinez, F., Nedelcu, A. M., Reyes-Prieto, A., & Smith, D. R. (2017). The plastid genomes of nonphotosynthetic algae are not so small after all. *Communicative and Integrative Biology*, 10(1), 1–3. <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1283080>
- Figueroa-Martinez, F., Nedelcu, A. M., Smith, D. R., & Reyes-Prieto, A. (2015). When the lights go out: The evolutionary fate of free-living colorless green algae. *New Phytologist*, 206(3), 972–982. <https://doi.org/10.1111/nph.13279>
- Figueroa-Martinez, F., Nedelcu, A. M., Smith, D. R., & Reyes-Prieto, A. (2017). The plastid genome of *polytoma uvella* is the largest known among colorless algae and plants and reflects contrasting evolutionary paths to nonphotosynthetic lifestyles. *Plant Physiology*, 173(2), 932–943. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01628>
- Flügge, U. I. (2000). Transport in and out of plastids: Does the outer envelope membrane control the flow? *Trends in Plant Science*, 5(4), 135–137. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01578-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01578-8)
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., Rudella, A., Sun, Q., & Van Wijk, K. J. (2004). In-Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database. *Plant Cell*, 16(2), 478–499. <https://doi.org/10.1105/tpc.017814>
- Fuentes-Ramírez, E. O., Vázquez-Acevedo, M., Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., & González-Halphen, D. (2021). The plastid proteome of the nonphotosynthetic chlorophycean alga *Polytomella parva*. *Microbiological Research*, 243(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126649>
- Gruber, A., Rocab, G., Kroth, P. G., Armbrust, E. V., & Mock, T. (2015). Plastid proteome

- prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage. *Plant Journal*, *81*(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/tpj.12734>
- Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H. J., Arnold, S., Brandt, U., & Nijtmans, L. (2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism*, *25*(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.002>
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, *141*(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, *21*(6), 535–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Harries, D., & Rösgen, J. (2008). A Practical Guide on How Osmolytes Modulate Macromolecular Properties. *Methods in Cell Biology*, *84*(07), 679–735. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84022-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84022-2)
- Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Dröse, S., Schwamb, B., Zörnig, M., Reichert, A. S., Koch, I., Wittig, I., & Brandt, U. (2012). Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex i assembly complex. *Cell Metabolism*, *16*(4), 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.009>
- Hori, T. (1974). Electron microscope observations on the fine structure of the chloroplasts of algae. II. The chloroplasts of *Caulerpa* (Chlorophyceae). *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, *59*, 239–245.
- Huang, M., Friso, G., Nishimura, K., Qu, X., Olinares, P. D. B., Majeran, W., Sun, Q., & Van Wijk, K. J. (2013). Construction of plastid reference proteomes for maize and arabidopsis and evaluation of their orthologous relationships; The concept of orthoproteomics. *Journal of Proteome Research*, *12*(1), 491–504. <https://doi.org/10.1021/pr300952g>
- Huang, P. K., Chan, P. T., Su, P. H., Chen, L. J., & Li, H. M. (2016). Chloroplast Hsp93 directly binds to transit peptides at an early stage of the preprotein import process. *Plant Physiology*, *170*(2), 857–866. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01830>

- Huynen, M. A., Mühlmeister, M., Gotthardt, K., Guerrero-Castillo, S., & Brandt, U. (2016). Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.009>
- Inoue, H., Li, M., & Schnell, D. J. (2013). An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 3173–3178. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219229110>
- Jiang, Y., Xiao, P., Shao, Q., Qin, H., Hu, Z., Lei, A., & Wang, J. (2017). Metabolic responses to ethanol and butanol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0931-9>
- Kamikawa, R., Tanifuji, G., Ishikawa, S. A., Ishii, K. I., Matsuno, Y., Onodera, N. T., Ishida, K. I., Hashimoto, T., Miyashita, H., Mayama, S., & Inagaki, Y. (2015). Proposal of a twin arginine translocator system-mediated constraint against loss of ATP synthase genes from nonphotosynthetic plastid genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2598–2604. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv134>
- Karpowicz, S. J., Prochnik, S. E., Grossman, A. R., & Merchant, S. S. (2011). The greenCut2 resource, a phylogenomically derived inventory of proteins specific to the plant lineage. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21427–21439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233734>
- Karsten, U., Michalik, D., Michalik, M., & West, J. A. (2005). A new unusual low molecular weight carbohydrate in the red algal genus *Hypoglossum* (Delesseriaceae, Ceramiales) and its possible function as an osmolyte. *Planta*, 222(2), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1527-3>
- Keeling, P. J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541), 729–748. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0103>
- Kikuchi, S., Asakura, Y., Imai, M., Nakahira, Y., Kotani, Y., Hashiguchi, Y., Nakai, Y., Takafuji, K., Bédard, J., Hirabayashi-Ishioka, Y., Mori, H., Shiina, T., & Nakai, M. (2018). A Ycf2-

- FtsHi heteromeric AAA-ATPase complex is required for chloroplast protein import. *Plant Cell*, 30(11), 2677–2703. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00357>
- Kikuchi, S., Bédard, J., Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, M., Takase, M., Ide, T., & Nakai, M. (2013). Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science*, 339(6119), 571–574. <https://doi.org/10.1126/science.1229262>
- Kleffmann, T., Russenberger, D., Von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., & Baginsky, S. (2004). The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, 14(5), 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039>
- Knauf, U., & Hachtel, W. (2002). The genes encoding subunits of ATP synthase are conserved in the reduced plastid genome of the heterotrophic alga *Prototheca wickerhamii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267(4), 492–497. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0681-6>
- Knopp, M., Garg, S. G., Handrich, M., Gould, S. B., Knopp, M., Garg, S. G., Handrich, M., & Gould, S. B. (2020). Major Changes in Plastid Protein Import and the Origin of the Chloroplastida Major Changes in Plastid Protein Import and the Origin of the Chloroplastida. *ISCIENCE*, 23(3), 100896. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100896>
- Kovacheva, S., Bédard, J., Patel, R., Dudley, P., Twell, D., Ríos, G., Koncz, C., & Jarvis, P. (2005). In vivo studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. *Plant Journal*, 41(3), 412–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02307.x>
- Kowallik, K. V., & Martin, W. F. (2021). *BioSystems The origin of symbiogenesis : An annotated English translation of Mereschkowsky ' s 1910 paper on the theory of two plasma lineages. 199.*
- Krause, K. (2008). From chloroplasts to “cryptic” plastids: Evolution of plastid genomes in parasitic plants. *Current Genetics*, 54(3), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0208-8>
- Lande, N. V., Subba, P., Barua, P., Gayen, D., Keshava Prasad, T. S., Chakraborty, S., & Chakraborty, N. (2017). Dissecting the chloroplast proteome of chickpea (*Cicer*

- arietinum L.) provides new insights into classical and non-classical functions. *Journal of Proteomics*, 165, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.06.005>
- Lang, N. J. (1963). Electron-Microscopic Demonstration of Plastids in *Polytoma*. *The Journal of Protozoology*, 10(3), 333–339. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1963.tb01685.x>
- Larkum, A. W. (2007). The evolution of photosynthesis. In *Primary Processes of Photosynthesis* (pp. 491–521).
- Lazcano, A., & Peretó, J. (2017). On the origin of mitosing cells: A historical appraisal of Lynn Margulis endosymbiotic theory. *Journal of Theoretical Biology*, 434, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.036>
- Leister, D. (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics*, 19(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00003-3)
- Li, H. M., Schnell, D., & Theg, S. M. (2020). Protein Import Motors in Chloroplasts : On the Role of chaperones. *The Plant Cell*, 32(March), 536–542. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00300>
- Liu, C., Willmund, F., Golecki, J. R., Cacace, S., Heß, B., Markert, C., & Schroda, M. (2007). The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant Journal*, 50(2), 265–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03047.x>
- Lwoff, A., Ionesco, H., & Gutmann, A. (1950). Synthèse et utilisation de l'amidon chez un flagellé sans chlorophylle incapable d'utiliser les sucres. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 270–275.
- MacDonald, S. M., & Lee, R. W. (2016). A survey of *Polytomella* (Chlorophyceae, Chlorophyta) strains in public culture collections. *Journal of Phycology*, 52(4), 656–663. <https://doi.org/10.1111/jpy.12430>
- Mallet, M. A., & Lee, R. W. (2006). Identification of three distinct *Polytomella* lineages based on mitochondrial DNA features. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(2), 79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00079.x>

- Martin, W., & Herrmann, R. G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology*, *118*(1), 9–17.
<https://doi.org/10.1104/pp.118.1.9>
- Mastrobuoni, G., Irgang, S., Pietzke, M., Aßmus, H. E., Wenzel, M., Schulze, W. X., & Kempa, S. (2012). Proteome dynamics and early salt stress response of the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genomics*, *13*(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-215>
- McFadden, G. I. (2014). Origin and evolution of plastids and photosynthesis in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(4).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016105>
- McNeal, J. R., Kuehl, J. V., Boore, J. L., & De Pamphilis, C. W. (2007). Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*. *BMC Plant Biology*, *7*, 1–22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-57>
- Molina, J., Hazzouri, K. M., Nickrent, D., Geisler, M., Meyer, R. S., Pentony, M. M., Flowers, J. M., Pelser, P., Barcelona, J., Inovejas, S. A., Uy, I., Yuan, W., Wilkins, O., Michel, C. I., Locklear, S., Concepcion, G. P., & Purugganan, M. D. (2014). Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Molecular Biology and Evolution*, *31*(4), 793–803.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu051>
- Moore, J., Cantor, M. H., Sheeler, P., & Kahn, W. (1970). The ultrastructure of *Polytomella agilis*. *The Journal of Protozoology*, *17*(4), 671–676.
- Mühlhaus, T., Weiss, J., Hemme, D., Sommer, F., & Schroda, M. (2011). Quantitative shotgun proteomics using a uniform ¹⁵N-labeled standard to monitor proteome dynamics in time course experiments reveals new insights into the heat stress response of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and Cellular Proteomics*, *10*(9), 1–27.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004739>
- Müller, C. M. O., Yamashita, F., & Laurindo, J. B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, *72*(1), 82–

87. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.026>

Nakada, T., Misawa, K., & Nozaki, H. (2008). Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *48*(1), 281–291.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.016>

Neuhaus, H. E., & Emes, M. J. (2000). Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annual Review of Plant Biology*, *51*, 111–140.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.111>

Neuhaus, H. Ekkehard, & Wagner, R. (2000). Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1465*(1–2), 307–323.

[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00146-2)

Ngernprasirtsiri, J., Takabe, T., & Akazawa, T. (1989). Immunochemical analysis shows that an ATP/ADP-translocator is associated with the inner-envelope membranes of amyloplasts from acer pseudoplatanus L. *Plant Physiology*, *89*(4), 1024–1027.

<https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1024>

Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., & Keegstra, K. (1997). Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO Journal*, *16*(5), 935–946. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.935>

Niyogi, K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *3*(6), 455–460. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00113-8)

Nosenko, T., Lidie, K. L., Van Dolah, F. M., Lindquist, E., Cheng, J. F., & Bhattacharya, D. (2006). Chimeric plastid proteome in the Florida “red tide” dinoflagellate *Karenia brevis*. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(11), 2026–2038.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msl074>

Novák Vanclová, A. M., Zoltner, M., Kelly, S., Soukal, P., Záhonová, K., Füssy, Z., ... & Hampl, V. (2019). Metabolic quirks and the colourful history of the *Euglena gracilis* secondary plastid. *New Phytologist*, *225*, 1578–1592. <https://doi.org/10.1111/nph.16237>

- Oborník, M., & Green, B. R. (2005). Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12), 2343–2353. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi230>
- Pain, D., & Blobel, G. (1987). Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(10), 3288–3292. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3288>
- Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D. A., Söderberg, L., Roepstorff, P., Von Heijne, G., & Van Wijk, K. J. (2002). Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell*, 14(1), 211–236. <https://doi.org/10.1105/tpc.010304>
- Pérez-Pérez, J. M., Esteve-Bruna, D., González-Bayón, R., Kangasjärvi, S., Caldana, C., Hannah, M. A., Willmitzer, L., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2013). Functional redundancy and divergence within the arabidopsis RETICULATA-RELATED gene family. *Plant Physiology*, 162(2), 589–603. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217323>
- Pfannschmidt, T., Schütze, K., Brost, M., & Oelmüller, R. (2001). A Novel Mechanism of Nuclear Photosynthesis Gene Regulation by Redox Signals from the Chloroplast during Photosystem Stoichiometry Adjustment. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36125–36130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105701200>
- Ponce-Toledo, R. I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K., & Moreira, D. (2017). An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. *Current Biology*, 27(3), 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056>
- Ponce-Toledo, R. I., & Moreira, D. (2019). *Tansley insight Horizontal and endosymbiotic gene transfer in early plastid evolution*. <https://doi.org/10.1111/nph.15965>
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic Caenorhabditis elegans methods: Synchronization and observation. *Journal of Visualized Experiments*, 64, 1–9. <https://doi.org/10.3791/4019>
- Pyke, K. (2009). What are plastids and where did they come from ? In *Plastid Biology*.
- Ramundo, S., Asakura, Y., Salomé, P. A., & Strenkert, D. (2020). *Co-expressed subunits of dual*

genetic origin define a conserved supercomplex mediating essential protein import into chloroplasts. 10.

- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, 41(2), 182–196. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00023-6)
- Reyes-Prieto, A., & Moustafa, A. (2012). Plastid-localized amino acid biosynthetic pathways of Plantae are predominantly composed of non-cyanobacterial enzymes. *Scientific Reports*, 2, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep00955>
- 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, 147–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Rockwell, N. C., Lagarias, J. C., & Bhattacharya, D. (2014). Primary endosymbiosis and the evolution of light and oxygen sensing in photosynthetic eukaryotes. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00066>
- Rolland, N., Bouchnak, I., Moyet, L., Salvi, D., & Kuntz, M. (2018). The main functions of plastids. *Methods in Molecular Biology*, 1829, 73–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8654-5_5
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schnell, D. J., Kessler, F., & Blobel, G. (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, 266(5187), 1007–1012. <https://doi.org/10.1126/science.7973649>
- Schreier, T. B., Cléry, A., Schläfli, M., Galbier, F., Stadler, M., Demarsy, E., Albertini, D., Maier, B. A., Kessler, F., Hörtensteiner, S., & Zeeman, S. C. (2018). *Plastidial NAD-Dependent Malate Dehydrogenase : A Moonlighting Protein Involved in Early Chloroplast Development through Its Interaction with an FtsH12-FtsHi. 30(August)*, 1745–1769. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00121>

- Schroda, M., Hemme, D., & Mühlhaus, T. (2015). The Chlamydomonas heat stress response. *Plant Journal*, *82*(3), 466–480. <https://doi.org/10.1111/tpj.12816>
- Schwacke, R., Ponce-soto, G. Y., Krause, K., Bolger, A. M., Arsova, B., Hallab, A., Gruden, K., Stitt, M., & Bolger, M. E. (2019). *MapMan4 : A Refined Protein Classification and Annotation Framework Applicable to Multi-Omics Data Analysis*. *June*, 879–892. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.003>
- Sharaf, A., Füßy, Z., Tomčala, A., Richtová, J., & Oborník, M. (2019). Isolation of plastids and mitochondria from *Chromera velia*. *Planta*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03259-3>
- Shi, L. X., & Theg, S. M. (2010). A stromal heat shock protein 70 system functions in proteinimport into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, *22*(1), 205–220. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071464>
- Shi, L. X., & Theg, S. M. (2013). The chloroplast protein import system: From algae to trees. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(2), 314–331. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.002>
- Sillero, A., Selivanov, V. A., & Cascante, M. (2006). Pentose phosphate and Calvin cycles: Similarities and three-dimensional views. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *34*(4), 275–277. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034042627>
- Simm, S., Papatirou, D. G., Ibrahim, M., Leisegang, M. S., Müller, B., Schorge, T., Karas, M., Mirus, O., Sommer, M. S., & Schleiff, E. (2013). Defining the core proteome of the chloroplast envelope membranes. *Frontiers in Plant Science*, *4*(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00011>
- Singh Narpinder, K. A. & S. K. (2013). Maize: Nutrition dynamics and novel uses. *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*, *9788132216*, 1–161. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1623-0>
- Smith, David R. (2018). Lost in the Light : Plastid Genome Evolution in Nonphotosynthetic Algae. In *Advances in Botanical Research* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.10.001>
- Smith, David Roy, & Asmail, S. R. (2014). Next-generation sequencing data suggest that

- certain nonphotosynthetic green plants have lost their plastid genomes. *New Phytologist*, 204(1), 7–11. <https://doi.org/10.1111/nph.12919>
- Smith, David Roy, Hua, J., & Lee, R. W. (2010). Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*. *Current Genetics*, 56(5), 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0311-5>
- Smith, David Roy, & Lee, R. W. (2014). A Plastid without a genome: Evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *Plant Physiology*, 164(4), 1812–1819. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233718>
- Sun, Q., Zybailov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P. D. B., & van Wijk, K. J. (2009). PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 969–974. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn654>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tamburino, R., Vitale, M., Ruggiero, A., Sassi, M., Sannino, L., Arena, S., Costa, A., Batelli, G., Zambrano, N., Scaloni, A., Grillo, S., & Scotti, N. (2017). Chloroplast proteome response to drought stress and recovery in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0971-0>
- Tanifuji, G., Kamikawa, R., Moore, C. E., Mills, T., Onodera, N. T., Archibald, J. M., Inagaki, Y., & Hashimoto, T. (2020). *GBE Comparative Plastid Genomics of Cryptomonas Species Photosynthesis*. 12(2), 3926–3937. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa001>
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., Vallon, O., & Cournac, L. (2012). Predalgo: A new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae. *Molecular Biology and Evolution*, 29(12), 3625–3639. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss178>
- Terashima, M., Specht, M., & Hippler, M. (2011). The chloroplast proteome: A survey from the *Chlamydomonas reinhardtii* perspective with a focus on distinctive features.

Current Genetics, 57(3), 151–168. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0339-1>

Thuswaldner, S., Lagerstedt, J. O., Rojas-Stütz, M., Bouhidel, K., Der, C., Leborgne-Castel, N., Mishra, A., Marty, F., Schoefs, B., Adamska, I., Persson, B. L., & Spetea, C. (2007). Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8848–8859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609130200>

Voß, B., Meinecke, L., Kurz, T., Al-Babili, S., Beck, C. F., & Hess, W. R. (2011). Hemin and magnesium-protoporphyrin IX induce global changes in gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 155(2), 892–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158683>

Vothknecht, U. C., Otters, S., Hennig, R., & Schneider, D. (2012). Vipp1: A very important protein in plastids?! *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1699–1712. <https://doi.org/10.1093/jxb/err357>

Waegemann, K., & Soil, J. (1991). Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *The Plant Journal*, 1, 149–158.

Walker, D. A. (1964). Improved rates of carbon dioxide fixation by illuminated chloroplasts. *Biochemical Journal*, 92, 22–23.

Walker, D. A. (1971). Chloroplasts (and Grana): Aqueous (including high carbon fixation ability). *Nature*, 1(c), 211–220.

Wang, J., Yu, Q., Xiong, H., Wang, J., Chen, S., Yang, Z., & Dai, S. D. (2016). Proteomic insight into the response of *Arabidopsis* chloroplasts to darkness. *PLoS ONE*, 11(5), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154235>

Warakanont, J., Tsai, C. H., Michel, E. J. S., Murphy, G. R., Hsueh, P. Y., Roston, R. L., Sears, B. B., & Benning, C. (2015). Chloroplast lipid transfer processes in *Chlamydomonas reinhardtii* involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 2 (TGD2) orthologue. *Plant Journal*, 84(5), 1005–1020. <https://doi.org/10.1111/tpj.13060>

Weber, A. P. M., Linka, M., & Bhattacharya, D. (2006). Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in Plantae from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 609–612. <https://doi.org/10.1128/EC.5.3.609-612.2006>

- Wicke, S., & Naumann, J. (2018). Molecular Evolution of Plastid Genomes in Parasitic Flowering Plants. In *Plastid Genome Evolution* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.014>
- Wise, R. R., & Hooper, J. K. (2007). *The structure and function of plastids*.
- Wolfe, A. D., & DePamphilis, C. W. (1997). Alternate paths of evolution for the photosynthetic gene *rbcL* in four nonphotosynthetic species of *Orobanche*. *Plant Molecular Biology*, *33*(6), 965–977. <https://doi.org/10.1023/A:1005739223993>
- Xing, S., Meng, X., Zhou, L., Mujahid, H., Zhao, C., Zhang, Y., Wang, C., & Peng, Z. (2016). Proteome profile of starch granules purified from rice (*Oryza sativa*) endosperm. *PLoS ONE*, *11*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168467>
- Yan, D., Wang, Y., Murakami, T., Shen, Y., Gong, J., Jiang, H., Smith, D. R., Pombert, J. F., Dai, J., & Wu, Q. (2015). *Auxenochlorella protothecoides* and *Prototheca wickerhamii* plastid genome sequences give insight into the origins of non-photosynthetic algae. *Scientific Reports*, *5*(August), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep14465>
- Záhonová, K., Füssy, Z., Birčák, E., & Vanclová, A. M. G. N. (2018). *Peculiar features of the plastids of the colourless alga Euglena longa and photosynthetic euglenophytes unveiled by transcriptome analyses*. *July*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35389-1>
- Záhonová, K., Füssy, Z., Oborník, M., Eliáš, M., & Yurchenko, V. (2016). RuBisCO in non-photosynthetic alga *Euglena longa*: Divergent features, transcriptomic analysis and regulation of complex formation. *PLoS ONE*, *11*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158790>
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., & Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 805–836. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421>

ANEXO

ARTÍCULO PUBLICADO

**The plastid proteome of the nonphotosynthetic chlorophycean
alga *Polytomella parva***



The plastid proteome of the nonphotosynthetic chlorophycean alga *Polytomella parva*

Emma O. Fuentes-Ramírez^a, Miriam Vázquez-Acevedo^a, Alfredo Cabrera-Orefice^b, Sergio Guerrero-Castillo^{b,c}, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico

^b Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Department of Pediatrics, Radboud University Medical Center, Geert Grooteplein-Zuid 10, 6525, GA, Nijmegen, the Netherlands

^c University Children's Research@Kinder-UKE, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Nonphotosynthetic algae
Polytomella parva
Chlorophycean algae
Chlamydomonas reinhardtii
Amyloplast
Plastid proteome

ABSTRACT

The unicellular, free-living, nonphotosynthetic chlorophycean alga *Polytomella parva*, closely related to *Chlamydomonas reinhardtii* and *Volvox carteri*, contains colorless, starch-storing plastids. The *P. parva* plastids lack all light-dependent processes but maintain crucial metabolic pathways. The colorless alga also lacks a plastid genome, meaning no transcription or translation should occur inside the organelle. Here, using an algal fraction enriched in plastids as well as publicly available transcriptome data, we provide a morphological and proteomic characterization of the *P. parva* plastid, ultimately identifying several plastid proteins, both by mass spectrometry and bioinformatic analyses. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD022051. Altogether these results led us to propose a plastid proteome for *P. parva*, i.e., a set of proteins that participate in carbohydrate metabolism; in the synthesis and degradation of starch, amino acids and lipids; in the biosynthesis of terpenoids and tetrapyrroles; in solute transport and protein translocation; and in redox homeostasis. This is the first detailed plastid proteome from a unicellular, free-living colorless alga.

1. Introduction

Photosynthetic capabilities have been lost multiple times independently throughout eukaryotic evolution, including certain parasitic plants (Wicke et al., 2013), parasitic algae like the trebouxiophyte genera *Helicosporidium* and *Prototheca* (Borza et al., 2005; de Koning and Keeling, 2006), and free-living algae like the colorless genera *Polytomella* and *Polytoma* (Round, 1980; Vernon et al., 2001); the last two belonging to the Chlamydomonadalean order of the Chlorophyceae (Leliaert et al., 2012).

Nonphotosynthetic green algae are often characterized by the presence of non-pigmented plastids that synthesize and store starch (α -1,4 and α -1,6 polymers of glucose). The presence of plastids with large starch granules in *Polytomella* algae, referred to as amyloplasts in early works, was first reported in *P. coeca* (Bourne et al., 1950) and later observed in electron microscopy images of permanganate-fixed *P. agilis* cells (Webster et al., 1968). It was noted that the amount of stored starch

increased as cultures entered stationary phase (Moore et al., 1970), and that the starch granules are fuel reservoirs instrumental for encystment and excystment (Lewis et al., 1974; Brown et al., 1976a, b).

Unlike other explored nonphotosynthetic green algae, the plastids of *Polytomella* species seem to have lost their genomes, since plastid DNA or nuclear-encoded proteins associated with plastid gene expression could not be identified (Smith and Lee, 2014; Smith and Asmail, 2014). Nevertheless, several metabolic pathways operating within the *Polytomella* plastids have been described, including amino acid, tetrapyrrole, starch, and carotenoid biosynthesis (Asmail, 2015; Asmail and Smith, 2016). However, there has yet to be a detailed description of the plastid proteome from *Polytomella*, to provide information about the metabolic pathways conserved in the plastids of a free-living, colorless alga. Here, using a simple procedure for isolating *P. parva* plastids, we present their morphological and proteomic characterization.

* Corresponding author at: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510, Mexico.

E-mail addresses: efuentes0300@gmail.com (E.O. Fuentes-Ramírez), mvazquez@ifc.unam.mx (M. Vázquez-Acevedo), alfredbiomed@gmail.com (A. Cabrera-Orefice), s.guerrercastillo@uke.de (S. Guerrero-Castillo), dhalphen@ifc.unam.mx (D. González-Halphen).

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126649>

Received 22 July 2020; Received in revised form 23 October 2020; Accepted 13 November 2020

Available online 28 November 2020

0944-5013/© 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. *Polytomella parva* growth conditions

Polytomella parva cells (*Polytomella* sp., strain number SAG 198.80, from the culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany) were grown at room temperature for 48 h in wide-bottom culture flasks without shaking in the culture medium previously described (Colina-Tenorio et al., 2016).

2.2. Isolation of *Polytomella colorless* plastids

Intact algal plastids were obtained using a modification of a described procedure (Attea et al., 2005). In brief, 48 L of *Polytomella* culture were centrifuged at 1600 x g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was resuspended in 10 mL of Plastid Isolation Medium (PIM) (Denyer and Pike, 2008). Algal cells were frozen at -70 °C for 12 h and thawed at room temperature in the presence of added proteases inhibitors (1 mM PMSF and 50 µg/mL TLCK). The suspended cells were broken by ten gentle manual strokes in a Dounce homogenizer. All further steps were carried out at 4 °C. The cell extract was then centrifuged at 500 x g for 2 min, giving a white pellet and a yellow-brown supernatant. The pellet was washed and recovered four times by resuspending in 5 mL of PIM and centrifuging at 500 x g for 2 min, yielding a white pellet, highly enriched in colorless plastids. The final fraction was resuspended in 1 mL of PIM and stored in 200 µL aliquots at -70 °C for subsequent analysis.

3. Morphological characterization

3.1. Light microscopy

P. parva cells from fresh cultures were stained with Lugol's iodine (Bates et al., 1943) and observed in an inverted microscope Olympus IX71 with a 100x objective.

3.2. Nomarski microscopy

P. parva cells from fresh cultures and the isolated plastid pellet were observed using Differential Interference Contrast (DIC) microscopy (Nomarski microscopy), following a protocol for *Caenorhabditis elegans* (Porta-de-la-Riva et al., 2012). Samples (20 µL), were placed on an agar layer under a coverslip, observed in a Nikon YFL microscope, and its images taken with a Zeiss AxioCam MRc5.

3.3. Transmission Electron Microscopy: algal cells slices

The colorless plastids within the algal cells were observed by Transmission Electron Microscopy (TEM). Samples were prepared as follows: 15 mL of a fresh *P. parva* culture were centrifuged at 1600 x g for 10 min at 4 °C, and the resulting pellet was fixed by incubation in a 3.0 % glutaraldehyde solution for 8 h at room temperature. Samples were then post-fixed in 1 % OsO₄ for 1 h, dehydrated with ethanol, embedded in a Spur epoxy resin, cut into 8 µm slices, placed on grids, and observed in a JEOL 1010 electron microscope at 80 kV. The length and width of the plastids within the cells and its stored starch granules were measured using the ImageJ software (Schneider et al., 2012).

3.4. Transmission Electron Microscopy: isolated colorless plastids

Plastid fractions were diluted in distilled water to obtain the indicated final concentrations of sorbitol and the samples were observed by TEM. Ten µL of the sample were placed onto carbon activated grids for 10 min (the excess sample was removed by placing a piece of filter paper on the edge of the grid), exposed for 10 min to a 100 W bulb at a distance of 20 cm, and observed in a JEOL microscope at 80 kV. To observe starch

granules, plastids were dialyzed overnight at 4 °C against PIM buffer lacking sorbitol using a Slide-A-Lyzer dialysis cassette (Thermo Fischer Scientific) with a 10,000 Da molecular weight cutoff, heated at 90 °C for five minutes to disrupt their structure, and subjected to TEM.

4. Mass spectrometry analysis

A couple of 200 µL aliquots of two independent plastid preparations were resolved by Tricine SDS-PAGE (Schägger, 2006) in 10 % acrylamide gels, stained with Coomassie Brilliant Blue, cut and prepared for LC-MS/MS as described (Heide et al., 2012), with slight modifications. Gel lanes were cut in 40 even slices (~1 mm) and independently incubated with 10 mM DTT for 1 h, and then in 30 mM chloroacetamide for 45 min followed by an overnight tryptic digestion at 37 °C. The resulting peptides were recovered, dried, and resuspended in a solution of 5.0 % acetonitrile and 0.5 % formic acid. Peptides were separated by liquid chromatography with an acetonitrile gradient of 5–40 % and 40–80 %; 15 and 3 min respectively, followed by a final 10 min elution with 80 % acetonitrile and analyzed on-line in a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), operating in positive ion mode switching automatically between MS1 and MS2 with the parameters described previously (Huynen et al., 2016; Guerrero-Castillo et al., 2017). The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the Proteomics Identifications Database (PRIDE) partner repository (Perez-Riverol et al., 2019) with the dataset identifier PXD022051. The mass spectrometry raw data were used to carry out a search using MaxQuant (v1.5.0.25) against the translated transcriptome of *P. parva*. The following settings were applied: N-terminal acetylation and methionine oxidation as variable modifications; cysteine carbamidomethylation as fixed modification; two trypsin missed cleavages; matching between runs, 2 min matching time window; 6 residues as minimal peptide length; common contaminants included; the rest of parameters were kept as default. Individual protein identifiers of the resulting entries were obtained by manual matching of transcriptome identifiers and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990) in databases. For the analysis, we considered the intensity-based absolute quantification (iBAQ) values that specify the enrichment of certain protein groups in each gel slice. In addition, *de novo* peptide sequencing was carried out using PEAKS X+ (Bioinformatics Solutions Inc.), an approach that assigns fragment ions from a mass spectrum and derives the corresponding amino acid sequences without requiring a preexisting database (Tran et al., 2018). The search was done using default settings and including fixed and variable modifications as described above.

5. In silico sequence analysis

The *P. parva* plastid proteome annotation was based on mass spectrometry data as well as BLAST similarity with Viridiplantae plastid sequences. BLAST searches (Altschul et al., 1990) between *P. parva* transcriptome and plastid published proteomes were done using the alignment score matrix BLOSUM62, filtering out low complexity regions, and setting an expectation value of 1×10^{-10} . Sequences for BLAST searches were obtained as follows: the transcriptome of *P. parva* SAG 63-3 (Mallet and Lee, 2006; Smith et al., 2010) was retrieved from the Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (sample MMETSP0052) at iMicrobe (<https://www.imicrobe.us>). The *P. parva* transcriptome data is also available at NCBI (Sequence Read Archive SRX551283). The 996 protein sequences pertaining to the chloroplast proteome of *C. reinhardtii* (Terashima et al., 2011) were mined in the *C. reinhardtii* v3.0 database at the Fungal Genomics Resource (Mycocosm) of the DOE Joint Genome Institute (JGI) at <https://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Chlr e3> and using BLAST, accession numbers for the chloroplast proteins of *C. reinhardtii* deposited in GenBank were obtained. Sequences were also

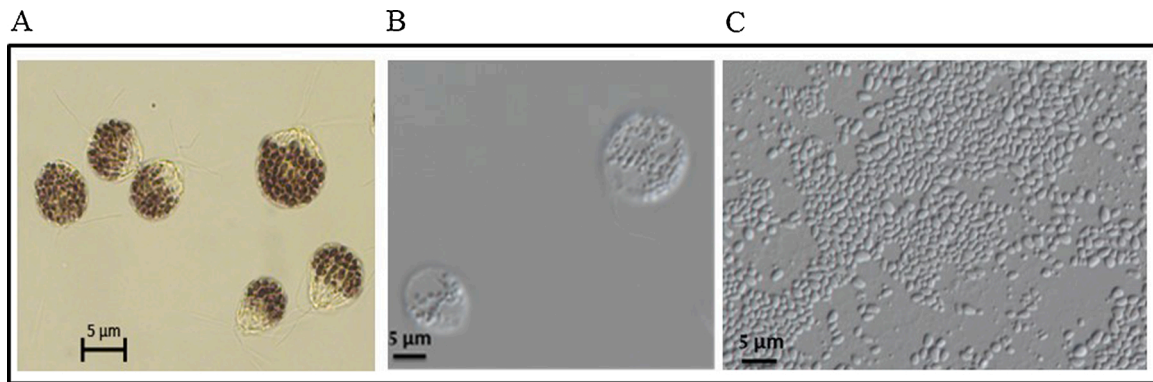


Fig. 1. *Polytomella parva* cells and plastids observed by light and Nomarski microscopy. (A) Light microscopy: *Polytomella parva* cells stained with Lugol's iodine. (B) Nomarski microscopy (60X magnification): (B) cells obtained from a fresh culture and (C) plastid enriched fraction.

retrieved from the proteomes of wheat amyloplasts (Balmer et al., 2006), rice starch granules (Xing et al., 2016), and the 80 *P. parva* plastid transcripts previously reported (Asmail, 2015). Two additional data bases were used, the “GreenCut2”, a set of proteins restricted to diverse photosynthetic organisms (Karpowicz et al., 2011) and the Plant Proteomics Database (PPDB; <http://ppdb.tc.cornell.edu>), an integrated resource for experimentally identified proteins in Arabidopsis, maize and rice (Sun et al., 2009).

Additionally, *C. reinhardtii* chloroplast proteome and putative *P. parva* plastid sequences obtained in this work were blasted against the *E. longa* plastid transcriptome (Záhonová et al., 2018), using the same parameters mentioned above.

6. Protein annotation

All protein sequences were classified in 27 different metabolic pathways by Mercator4 (<https://plabipd.de/portal/mercator4>; Schwacke et al., 2019), that includes a section of “Not Assigned” proteins. To obtain corresponding KEGG or UNIPROT accession numbers and EC classification numbers, the corresponding *P. parva* amino acid sequences were loaded on STRING: functional protein association networks server (<https://string-db.org/>; Szklarczyk et al., 2019), and searches were restricted to Viridiplantae sequences. Transit peptides were predicted using the ChloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>; Emanuelsson et al., 1999), the TargetP 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Almagro-Armenteros et al., 2019), and the PPDB curated database (PPDB; <http://ppdb.tc.cornell.edu>; Sun et al., 2009). In order to contribute to the *P. parva*

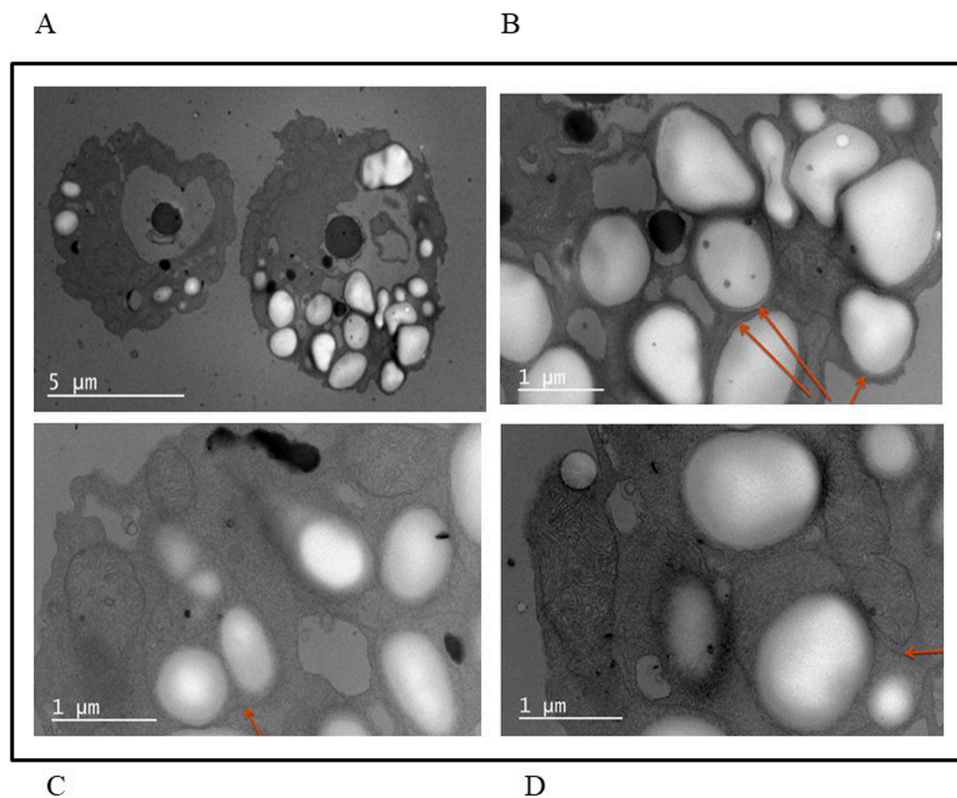


Fig. 2. *Polytomella parva* thin sections observed by TEM. Algal cell slices were observed in a JEOL-JEM 1200 microscope at 80 kV. (A) Starch-containing plastids occupy a considerable volume of the cell. (B) Some plastids seem to be filled with starch, while others (C and D) exhibit separated starch granules. The double membranes of the colorless plastids are indicated by red arrows.

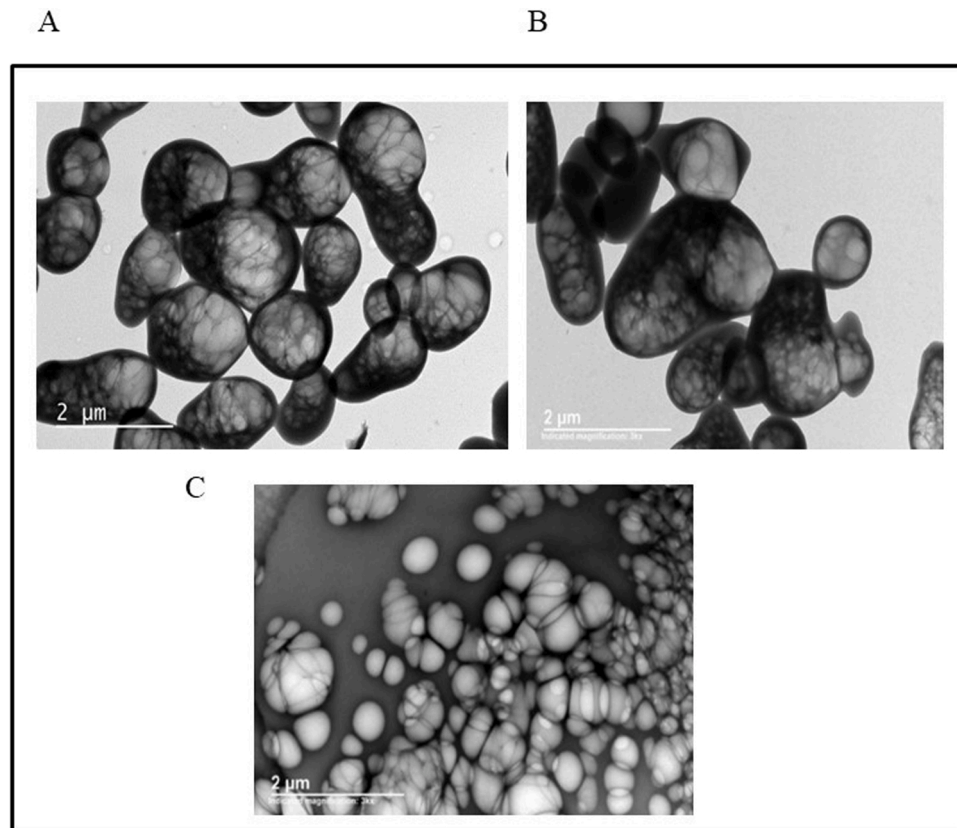


Fig. 3. *Polytomella parva* isolated plastids observed by TEM. Isolated algal plastids were observed in a JEOL-JEM 1200 microscope at 80 kV. (A) Plastids in PIM buffer containing 150 mM sorbitol. (B) Plastids dialyzed overnight at 4 °C against PIM buffer lacking sorbitol. (C) The sample shown in panel B after heating at 90 °C for five minutes.

transcriptome annotation, nucleotide sequences identified in this work were deposited in the GenBank database with accession numbers MW052777 and MT376979 to MT377490.

7. Results

7.1. Morphological characterization of *P. parva* colorless plastids

Taking advantage of amylose chemical properties (Bates et al., 1943), *P. parva* cells were stained with Lugol's iodine to observe the plastids housed in the alga (Fig. 1, Panel A). Further, based on Nomarski microscopy, isolated *P. parva* plastids (Fig. 1, Panel C) exhibited a similar size and shape to those of intact *P. parva* cells (Fig. 1, Panel B). TEM of *P. parva* cell slices (Fig. 2) showed that some plastids have a single large starch granule whereas others have more than one starch granule. TEM of isolated algal plastids in the presence of 150 mM sorbitol (Fig. 3, Panel A) showed ovoid-shaped plastids surrounded by a mesh of electron-dense fibers. A similar morphology was observed after elimination of sorbitol by dialysis (Fig. 3, Panel B). When the dialyzed sample was incubated for five minutes at 90 °C and observed by TEM, the large ovoid structures were no longer present and only free starch granules could be seen (Fig. 3, Panel C). The estimated size of the intact isolated plastids (0.93–2.86 μm in length and 0.63–1.35 μm in width) was like that of plastids observed within living cells (0.73–2.62 μm in length and 0.63–1.29 μm in width). Stored starch granules within plastids from the cell slices were smaller and measured in length from 0.33 to 1.21 μm , and in width from 0.22 to 1.04 μm .

7.2. Identifying *P. parva* plastid proteins using mass spectrometry

The entire polypeptide pattern of the *P. parva* plastids obtained by

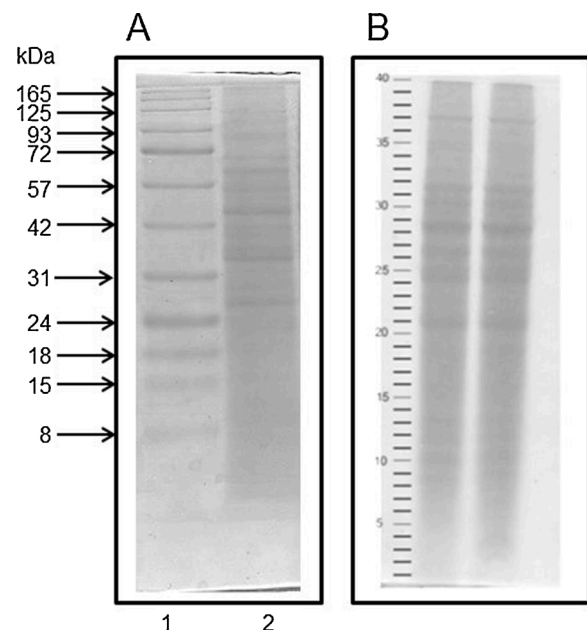


Fig. 4. Electrophoretic protein pattern of isolated *P. parva* plastids after 10 % Tricine SDS-PAGE. (A) Lane 1, molecular weight markers (arrows indicate apparent molecular masses in kDa); Lane 2, polypeptide pattern of SDS-solubilized isolated algal plastids. Approximately 300 μg of protein were loaded on lane 2; protein content is largely overestimated because of starch interference. (B) An equivalent gel lane was cut and the individual slices were analyzed by LC-MS/MS.

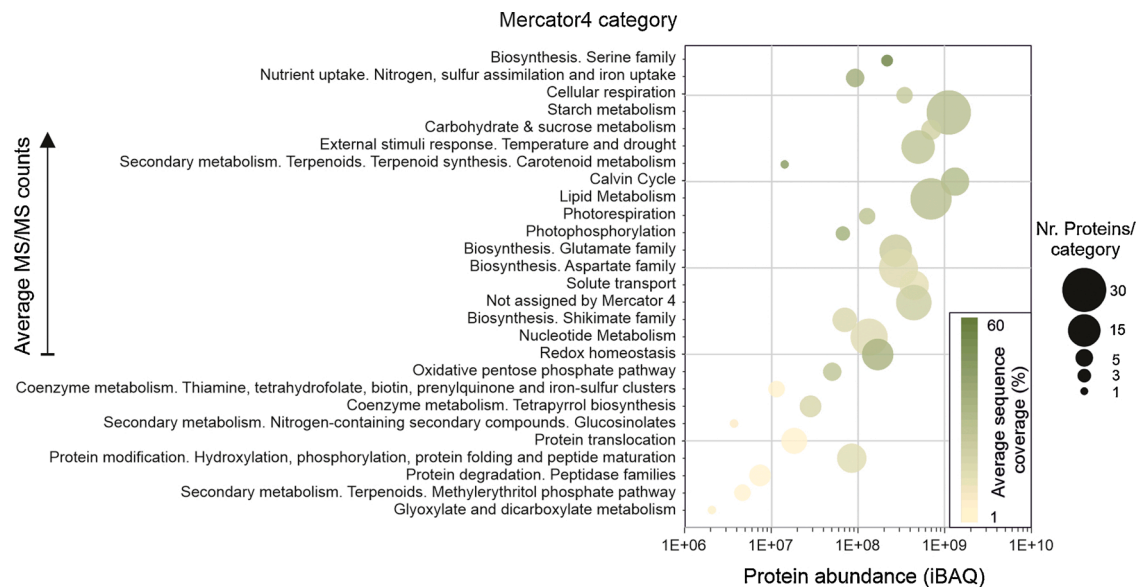


Fig. 5. Mass spectrometry parameters of proteins grouped by functional categories. Categories (listed by Mercator4) are sorted from top (higher) to bottom (lower) average MS/MS counts. Protein abundance is the sum of intensity Based Absolute Quantification (iBAQ) values of all proteins in each category. The number of proteins per category is represented by the size of the dots. The dots are colored by the average sequence coverage of the proteins in each category.

SDS-PAGE (Fig. 4) was analyzed by mass spectrometry and 15,030 unique peptides were identified and matched to 2045 protein entries by data base searches (MaxQuant), which allowed us to annotate 408 *P. parva* proteins (Supplementary Table S1). In addition, *de novo* sequencing analysis allowed the identification of ~78,000 unique peptides, but only those with a score value ≥ 75 were considered (19,697 peptides), i.e., peptides exhibiting more than ≥ 75 % probability of having been correctly assigned (Supplementary Figure S1, Panel A; Supplementary Tables S2 and S3). By using the two approaches, 3353 unique peptides were identified. These peptides were matched to 1247 protein entries from the translated transcriptome of *P. parva* (Supplementary Figure S1, Panel B). The most abundant proteins detected by LC-MS/MS in the colorless plastids were participants in the protein translocation machinery and enzymes related to lipid and carbohydrate metabolism, including starch and sucrose pathways (Fig. 5). Mass spectrometry also revealed that the plastid fraction carries contamination of heavy cell components of nuclear, ribosomal, and mitochondrial origin, which were not considered further, but are listed in Supplementary Table S1.

7.3. Mining the *P. parva* transcriptome for putative plastid proteins

Building on previous work (Aasmal, 2015), we reclassified 80 *P. parva* transcripts encoding putative plastid proteins using Mercator4. BLAST analyses revealed that out of the 996 *C. reinhardtii* chloroplast proteome sequences, 245 (25 %) had homologs in the *P. parva* transcriptome; out of the 282 proteins from wheat amyloplasts, 189 (67 %) gave hits in *P. parva*; out of the 91 highly represented proteins in rice starch granules, 45 (49 %) have homologs in *P. parva*; and out of the 597 proteins of the “GreenCut2”, 266 (45 %) matched proteins from the *P. parva* transcriptome were identified. In addition, the PPDB contains 1559 chloroplast sequences of *Arabidopsis thaliana* and 1564 of maize; out of these higher plant sequences, 387 (25 %) homologs were found to be present in *Polytomella*. Altogether, we curated a list of 408 *P. parva* transcripts homologous to proteins from the species mentioned above, 309 (76 %) of which were plastidial (Supplementary Table S1).

7.4. The *P. parva* Plastid Proteome

The sum of the bioinformatic approach and LC-MS/MS evidence

(Supplementary Figure S2) allowed us to build a set of 309 proteins which we call the *P. parva* Plastid Proteome (Table 1). Proteins were grouped into 27 functional categories according to Mercator4, including one for “Not assigned proteins”. Altogether, LC-MS/MS confirmed 49 out of 80 (61 %) *P. parva* plastid proteins previously identified (Aasmal, 2015); 170 (69 %) of the 245 *P. parva* homologs that matched *C. reinhardtii* chloroplast proteins; 133 (70 %) of the 189 algal proteins homologous to those found in the wheat amyloplasts proteome; 35 (78 %) of the 45 *P. parva* proteins that matched counterparts in the starch grain proteome of rice; and 81 out of 266 (30 %) *P. parva* homologs of the plant lineage specific inventory “GreenCut2” (Karpowicz et al., 2011). The similarity of the 309 proteins with plastid proteins of other organisms, and the fact that more than half of these algal proteins (54.6 %) are predicted to carry a chloroplast targeting sequence, suggests that this plastid proteome is well-represented. The *P. parva* sequences of the proteins shown in Table 1 are also listed in Supplementary Table S1.

7.5. Mining the *E. longa* plastid transcriptome against chlorophycean algae plastid proteomes

We independently blasted the 309 *P. parva* transcripts listed in Table 1 and the 996 proteins of the *C. reinhardtii* chloroplast proteome against the *E. longa* plastid transcriptome and found 108 and 339 matches respectively (Supplementary Table S1).

When the number of *P. parva* proteins identified in this work was compared to the number of homologs found in the transcriptomes or proteomes of other species (*C. reinhardtii*, wheat, rice starch grains, *E. longa*, the GreenCut2 inventory, and the PPDB database), it becomes evident that a large proportion *P. parva* plastid components are similar to the chloroplast and plastid proteins present in these higher plants and algae (Supplementary Table S4 and Supplementary Figure S3).

8. Discussion

Here, we provide a morphological and proteomic characterization of *P. parva* plastids. We assessed the integrity of the isolated plastids that was only altered when removing the osmoprotector sorbitol and heating the sample, resulting in membrane disruption and release of starch granules. A highly enriched plastid fraction was subjected to SDS-PAGE followed by LC-MS/MS, and in combination with a bioinformatics

approach, the proteome of the plastids of the unicellular, free-living, nonphotosynthetic alga was obtained. In our analysis, we corroborated the presence of those components involved in the metabolism of carbohydrates and amino acids (Aasmal, 2015), and identified other metabolic pathways as lipid metabolism and synthesis of coenzymes and terpenes. In addition, several proteins related to protein translocation, solute transport, lipid transport and redox homeostasis were identified anew. Thus, the *P. parva* plastid proteome has a high coverage and provides essential information on the physiology of this alga.

In the early 1950s it was observed that *Polytomella coeca* could not grow in carbon sources like glucose, maltose, sucrose or trehalose, and attempts to obtain mutants that use sugars as a carbon source failed; it was also observed that algal starch was similar to most natural starches (composed of amylose and amylopectin). Thus, attention turned towards finding out how this alga synthesizes starch from acetate or ethanol. A phosphorylase that utilized glucose-1-phosphate as a substrate was identified (Lwoff et al., 1950), which corresponds to ADP-Glucose Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27), a regulatory enzyme for starch synthesis (Ballicora et al., 2004). This enzyme requires ATP (Neuhaus and Emes, 2000), which must be provided by the ADP/ATP translocator (KEGG entry K03301) identified in this work. Since phosphorylases are known to catalyze the formation of amylose only (building 1, 4- α -glycosidic linkages), it was suggested that *P. coeca* employed a second enzyme to build the branch points of amylopectin, a factor similar to the so-called Q-enzyme of potato. The algal enzyme, also called Q-enzyme, was isolated and characterized (Barker et al., 1951), and found to convert amylose into a branched polysaccharide. This algal Q-enzyme corresponds to the 1, 4- α -glucan branching enzyme (EC 2.4.1.18), which was identified in both our bioinformatic and proteomic analyses. Starch synthesis also relies on metabolites that must be imported from the cytosol, either glucose-6-phosphate or triose phosphate compounds. Glucose-6-phosphate could also be generated from fructose-6-phosphate, and intermediate of the Calvin Cycle, indeed, we could identify both fructose-1,6 bisphosphatase (KEGG entry K02446) and phosphoglucumutase (KEGG entry K01835) in our analysis. We also identified a triose phosphate translocator (KEGG entry K15283), which is not usually expressed in plant heterotrophic tissues (Martin and Ludewig, 2007). Thus, *P. parva* may utilize two different pathways providing precursors for starch synthesis.

In plants, fatty acids are synthesized *de novo* only in plastids (Rawsthorne, 2002) and rely on the import of precursors necessary for acetyl-Coenzyme A synthesis. Also, when *C. reinhardtii* is grown in heterotrophic conditions, acetate and CoA are incorporated into plastids to form acetyl-CoA. In this work, we identified in *P. parva* plastids acetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.1), and an acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2) whose precursors are predicted to contain a plastid transit peptide. We also identified other components of lipid metabolism in *P. parva*, including monogalactosyldiacylglycerol synthase (MGDG synthase, EC 2.4.1.46), which produces MGDG from diacylglycerol and UDP-galactose, that is known to be located in the outer envelope of the *C. reinhardtii* chloroplast (Warakanont et al., 2015).

Many enzymes of the Calvin cycle were present in the colorless alga plastids. Since photosynthesis is abolished in *P. parva* plastids, these enzymes are not expected to participate in CO₂ fixation, but along with enzymes of the Pentose Phosphate Cycle (Sillero et al., 2006), they may generate metabolic intermediates for the synthesis of starch and sugars, e.g. ribose-5-phosphate, a precursor for the synthesis of nucleotides. Further, the plastid enzymes classified as participants in photorespiration (Tirumani et al., 2019), like phosphoglycolate phosphatase and serine hydroxymethyl transferase (Ruszkowski et al., 2018), could instead be involved in the synthesis of glycine and serine respectively.

Due to their low abundance and the absence of polar side chains in amino acid residues, membrane proteins are more difficult to identify in mass spectrometry analyses (Barrera and Robinson, 2011). Nevertheless, several solute transporters, residing in the inner envelope of the amyloplast (Facchinelli and Weber, 2011), were identified in *P. parva*,

like the oxoglutarate-malate transporter and the xylulose phosphate/-phosphate translocator. We also identified a terminal oxidase (PTOX, EC 1.10.3.11), a plastid-located plastoquinol: oxygen oxidoreductase containing a non-heme di-iron center (Berthold and Stenmark, 2003). PTOX drains electrons from the plastoquinol pool of the photosynthetic electron transport chain in excess light conditions (Niyogi, 2000). In the case of the algal plastids, where photosynthesis has been abolished, PTOX could play a role in carotenoid biosynthesis (Carol and Kuntz, 2001); when plastoquinone (PQ) is reduced by phytoene, the precursor of colored carotenoids, the resulting PQH₂ is oxidized by PTOX. While *Polytomella magna* exhibits carotenoid synthesis, in *P. parva* this pathway is truncated after formation of geranyl-geranyl-diphosphate, the precursor of diterpenes (Aasmal and Smith, 2016), and neither genes nor transcripts for any of the enzymes involved in carotenoid biosynthesis could be identified in this alga, although the enzymes involved in isoprenoids synthesis were present. Indeed, *C. reinhardtii* mutants lacking phytoene synthase, one of the first enzymes of carotenoid biosynthesis, ultra-structurally resemble a colorless alga (Inwood et al., 2008). Currently, the role of PTOX in the *P. parva* plastids is obscure and deserves further exploration.

Without a plastid genome (Smith and Lee, 2014), no transcription or translation processes should occur in the *P. parva* plastids, unless they still retain functional ribosomes and are capable of internalizing mRNAs from the cytosol. Import of mRNAs is a process that happens in plant chloroplasts (Nicolai et al., 2007; Gómez and Pallás, 2010), but is not known to occur in the colorless alga. Thus, we can assume that no transcription or translation processes occur in the *P. parva* plastids, and that all its proteins must be imported from the cytosol, mainly through the TIC-TOC protein-translocating machinery (Richardson et al., 2017). Using reciprocal BLAST searches with defined plant TIC and TOC components, a model for the protein import complexes of the *C. reinhardtii* chloroplast was proposed (Kalanon and McFadden, 2008). Here, we identified several orthologs of the 13 components of the TIC-TOC machinery of *C. reinhardtii* in the *P. parva* transcriptome, including Toc33/34 and 75; Tic22, 40, and 110; as well as two more translocators of the outer envelope (80 and 90 kDa, respectively) (Supplementary Table S5 and Supplementary Figure S4). Several of these TIC-TOC subunits were also identified by mass spectrometry, suggesting that the main protein-import components of the *C. reinhardtii* chloroplasts are conserved in *P. parva* plastids. Nevertheless, the classical TIC complex model (Richardson et al., 2017) has been debated since a novel 1 MDa complex that functions as a protein translocator in the chloroplast inner envelope membrane was identified. This novel TIC complex contains a Tic20 subunit at its core, plus three additional, not previously characterized constituents Tic56, Tic100 and Tic214, this last one encoded in the plastid Ycf1 gene (Kikuchi et al., 2013). This highly active Tic20/56/100/214 system works coupled to TOC and to an AAA-ATPase motor (Kikuchi et al., 2018), and seems to sustain the high demands of photosynthetic protein import into chloroplasts (Nakai, 2018). Recently, it was shown that a functional Tic20/56/100/214 complex is also present in *C. reinhardtii*, and that the conditional repression of Tic214, severely diminished chloroplast protein import (Ramundo et al., 2020). In *P. parva*, the apparent absence of the plastid-encoded Tic214 and the nucleus-encoded Tic56 subunits, critical components of the Tic20/56/100/214 (Supplementary Figure S4 and Supplementary Table S5), leads us to speculate that a functional 1 MDa complex is not present in the colorless alga, and that its plastid components are imported through an alternative TIC system similar to the one proposed to be present in grasses (Nakai, 2018).

Other membrane-bound proteins, components of translocation complexes like Alb3, SecY and TatC, that transport proteins from the plastid stroma to the thylakoid lumen, were also identified in *P. parva* plastids. Since amyloplast are known to have only two membranes (Alban et al., 2008; Harinasut et al., 1988), we assume that these components must be embedded in the plastid inner membrane; the proteins that are internalized through these translocators remain to be identified.

Table 1
The *P. parva* Plastid Proteome.

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
Biosynthesis. Aspartate Family															
1	Threonine deaminase	THRD	MT376992	69.21	60.41	C	C	4.3.1.19	K01754	*	10	20.6	2809300	16	2.154E-18
2	Threonine synthase	THRC	MT376980	66.26	24.34	-	-	4.2.3.1	K01733	*	2	4.5	254890	3	5.584E-16
3	Aspartate kinase	AK	MT376981	54.91	51.92	-	C			*	6	11.4	1726100	15	1.367E-15
4	Aspartate kinase	AK	MT376984	58.24	17.98	C	C	2.7.2.4	K00928	*	5	11	1809600	11	1.857E-17
4	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1, chloroplastic-like	AK	MT376985	40.17	41.36	-	-	2.7.2.4	K12524	*	4	14.5	602080	3	4.046E-08
5	Bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase	AKHSDH	MT377380	-	-	C	C	2.7.2.4	K12524	-	-	-	-	-	-
6	Aspartate aminotransferase	AATC	MT376997	42.66	102.66	-	-	2.6.1.1	K15849	*	5	14	973780	6	1.253E-14
			MT376998	48.46	12.31	C	-	2.6.1.78		*	21	51.7	55259000	340	8.50E-138
7	Aspartate semialdehyde dehydrogenase	DHAS	MT376993	41.48	38.34	C	C	1.2.1.11	K00133	*	22	59.8	66913000	227	3.37E-249
8	Diaminopimelate decarboxylase	DCDA	MT376987	68.41	9.09	C	C	4.1.1.20	K01586	*	6	11.6	2991100	13	6.886E-22
9	Diaminopimelate epimerase	DAPF	MT376990	32.34	30.55	-	-	5.1.1.7	K01778	*	7	25.3	2885300	12	7.743E-30
10	LL-diaminopimelate aminotransferase	DAPAT	MT376989	49.08	44.62	C	C	2.6.1.83	K10206	*	5	12.2	1699400	13	1.35E-19
11	Acetohydroxy acid isomeroeductase	AAI	MT376988	61.52	56.00	C	C	1.1.1.86	K00053	*	14	27.1	30480000	228	4.036E-67
12	Acetolactate synthase, small subunit	ALS	MT376982	73.64	70.29	C	C	2.2.1.6	K01653	*	12	19.2	4301100	48	2.48E-45
			MT376983	51.69	19.39	-	-			*	23	51.1	34537000	143	3.07E-228
13	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	DAPA	MT376991	38.91	12.31	C	C	4.3.3.7	K01714	*	4	13.8	1755300	8	1.127E-10
14	Dihydroxy-acid dehydratase	DHAD	MT376979	64.04	60.41	C	C	4.2.1.9	K01687	*	6	10.5	2728800	26	1.782E-21
15	Homoserine kinase	KHSE	MT376994	36.69	19.39	C	C	2.7.1.39	K00872	*	1	3.6	293890	1	0.0005527
16	Vitamin B12 dependent methionine synthase/5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	MSTH	MT376995	153.13	17.98	-	-	2.1.1.13	K00548	*	2	3.4	62076	5	6.86E-07
17	Omega-amidase	OA	MT377001	-	-	-	-	3.5.1.3	K13566	-	-	-	-	-	-
18	2-iminopropanoate deaminase	RIDA	MT377002	-	-	C	C	3.5.99.10	K09022	-	-	-	-	-	-
			MT377003	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-
19	2-isopropylmalate synthase	IPMS	MT377324	65.16	20.92	C	C	2.3.3.13	K01649	*	17	42.6	15488000	114	6.03E-119
20	Cystathionine beta-lyase	METC	MT376996	51.06	16.66	C	C	4.4.1.13	K01760	*	2	5.4	390260	0	4.55E-06
			MT377381	-	-	-	C			-	-	-	-	-	-
21	Cysteine synthase	CS	MT376999	41.99	11.41	M	C	2.5.1.47	K01738	*	8	26.7	4506900	36	2.919E-43
			MT377000	34.06	32.95	-	-			*	17	67.8	58375000	189	5.41E-142
22	Cystathionine gamma-synthase	CGS	MT376986	48.38	38.34	-	C	2.5.1.48	K01739	*	5	13.4	2506400	27	1.108E-20
			MT377462	-	-	-	-	2.5.1.47	K01738	-	-	-	-	-	-
			MT377463	-	-	-	-	2.5.1.47	K01738	-	-	-	-	-	-
23	Cysteine synthase chloroplastic	OASB	MT377464	-	-	-	-	2.5.1.47	K01738	-	-	-	-	-	-
			MT377465	-	-	S	C	2.5.1.47	K01738	-	-	-	-	-	-
Biosynthesis. Glutamate Family															
1	Acetylglutamate kinase	NAGK	MT377004	34.86	30.55	M	C	2.7.2.8	K00930	*	15	56.5	27631000	67	1.4E-158
2	Histidinol phosphate aminotransferase	HPA	MT377005	11.34	22.56	-	-	2.6.1.9	K00817	*	3	30.7	5553400	8	6.049E-06
			MT377006	48.57	13.28	-	C			*	1	4.6	1027700	14	2.9E-24
3	Acetylornithine aminotransferase	ARGD	MT377007	49.71	65.16	-	-	2.6.1.11	K00818	*	6	17.6	4295200	23	3.985E-29
4	ATP phosphoribosyltransferase	HISN	MT377008	37.22	41.36	-	-	2.4.2.17	K00765	*	6	19.8	1640500	7	7.825E-14
5	Argininosuccinate synthase	ARGS	MT377009	49.25	51.92	C	C	6.3.4.5	K01940	*	28	61.8	94696000	475	4.68E-240
			MT377010	45.05	12.31	C	C			*	7	16.8	60774000	80	1.15E-193
6	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	ARGC	MT377011	43.17	38.34	-	-	1.2.1.38	K00145	*	15	53.9	29576000	115	4.27E-121
7	Imidazole glycerol phosphate synthase	HISS	MT377012	61.16	20.92	-	C	4.3.2.10	K01663	*	9	20.2	2147000	10	2.275E-33
8	Aspartate carbamoyltransferase	PYR	MT377013	28.44	38.34	-	-	2.1.3.2	K00608	*	6	30.1	7685700	22	4.081E-38
9	Carbamoyl phosphate synthase, small subunit	CARP	MT377014	48.95	44.62	C	C	6.3.5.5	K01956	*	10	29.3	11272000	97	4.575E-58
			MT377015	104.43	110.74	C	C			*	24	25.9	4474800	110	3.192E-79
10	Ornithine carbamoyltransferase	OTC	MT377016	40.37	35.55	-	-	2.1.3.3	K00611	*	5	21.4	3511200	12	7.343E-23
11	Argininosuccinate lyase	ASL	MT377017	55.11	48.13	C	C	4.3.2.1	K01755	*	16	34.1	14389000	117	1.26E-145
12	Arginine biosynthesis bifunctional	ARGJ	MT377018	44.86	22.56	-	-	2.3.1.35	K00620	*	7	21.7	1240600	11	2.181E-26

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP	
13	N-acetylglutamate synthase	NAGS	MT377019	28.78	24.34	-	-	2.3.1.1	K14682	*	6	28.6	2290900	14	1.382E-19	
14	N-acetylglutamate synthase	NAGS	MT377474	-	-	-	C	2.3.1.1	K14682	-	-	-	-	-	-	
Biosynthesis. Serine Family																
1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase family	SERA	MT377020	61.03	56.00	C	C	1.1.1.95	K00058	*	26	55	131140000	433	0	
2	Phosphoserine aminotransferase	SERC	MT377021	42.95	38.34	C	C	2.6.1.52	K00831	*	25	65.6	85381000	313	1.51E-138	
3	Pyridoxine pyridoxamine 5 -phosphate oxidase chloroplast-like	PXRC	MT377023	-	-	-	-	1.4.3.5	K00275	-	-	-	-	-	-	
			MT377024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Biosynthesis. Shikimate Family																
1	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1	AROG	MT377025	56.43	51.92	C	C	2.5.1.54	K01626	*	19	46	24965000	161	6.48E-122	
2	Chorismate synthase	AROC	MT377026	42.93	13.28	M	C	4.2.3.5	K01736	*	18	50.6	31381000	124	9.23E-138	
3	Anthranilate synthase alpha subunit	TRPE	MT377027	61.79	65.16	-	-	4.1.3.27	K01657	*	8	18.2	2318300	15	1.14E-28	
4	Bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase	DHQSD	MT377028	69.20	128.85	C	C	4.2.1.10 1.1.1.25	K13832	*	5	8.6	573700	15	2.431E-10	
5	Shikimate kinase	SK	MT377029	21.02	22.56	-	-	2.7.1.71	K00891	*	1	15	106850	1	0.0006155	
6	Arogenate/prephenate dehydratase	ADT	MT377030	45.78	28.32	-	C	4.2.1.91 4.2.1.51	K05359	*	5	18.6	2458300	7	1.831E-25	
7	Pyridoxal phosphate-dependent aspartate aminotransferase	PLPAT	MT377031	43.91	41.36	-	C	2.6.1.79	K15849	*	2	6.7	478280	3	0.0002242	
8	Tryptophan synthase alpha chain	TRPA	MT377032	31.73	19.39	C	C	4.2.1.20	K01695	*	6	35.8	3220500	23	8.156E-61	
9	Indole-3-glycerol phosphate chloroplast-like	IGP	MT377033	38.63	19.39	-	C	4.1.1.48	K01609	*	4	11	4619200	33	7.118E-18	
10	Chorismate mutase	CHM	MT377034 MT377035	-	-	-	C	5.4.99.5	K01850	-	-	-	-	-	-	
11	Anthranilate synthase beta subunit	ASB	MT377384	-	-	C	C	4.1.3.27	K01658	-	-	-	-	-	-	
12	Phosphoribosylanthranilate isomerase	PAI4	MT377385	-	-	-	-	5.3.1.24	K01817	-	-	-	-	-	-	
13	FMN-binding split barrel	FMNbp	MT377452	-	-	M	C	NA	NA	-	-	-	-	-	-	
14	3-dehydroquinate synthase	DHQS	MT377480	-	-	-	-	4.2.3.4	K01735	-	-	-	-	-	-	
15	Arogenate/prephenate dehydrogenase	FisN	MT377481	-	-	C	C	1.3.1.78	K15227	-	-	-	-	-	-	
16	Anthranilate phosphoribosyltransferase	TRPD	MT377482	-	-	-	-	2.4.2.18	K00766	-	-	-	-	-	-	
Photosynthesis. Calvin Cycle																
1	Uridine kinase	UK	MT377036	44.04	15.45	-	-	-	-	-	2	4.9	305110	2	3.33E-12	
			MT377037	51.49	15.45	-	-	2.7.1.48	K00876	*	3	6.5	751660	9	3.759E-07	
			MT377038	44.40	48.13	-	-	-	-	-	-	7	20.4	2608300	18	3.401E-26
2	Transketolase	TKT	MT377039	77.96	26.25	C	C	2.2.1.1	K00615	*	16	32.2	9430900	93	3.97E-62	
			MT377040	21.40	41.36	-	-	-	-	-	-	11	52.8	270180000	230	4.14E-223
3	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	FBPAP	MT377041	37.24	41.36	C	-	4.1.2.13	K01622	*	30	84.5	570080000	406	0	
			MT377042	16.44	41.36	C	C	-	-	-	-	18	75.2	653980000	312	1.74E-277
			MT377043	17.42	38.34	C	-	-	-	-	-	11	65	79829000	86	5.93E-134
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPCP1	MT377044	10.03	38.34	C	-	1.2.1.12	K00134	*	2	39.1	29539000	23	4.792E-26	
			MT377045	21.75	9.81	-	-	-	NA	K04078	*	1	6	1506900	1	0.001434
5	Chaperonin 20 kDa	CH20	MT377046	23.28	9.81	C	C	NA	K04078	*	4	25.3	18968000	8	4.595E-14	
6	Plastid triose phosphate isomerase, partial	TPIS	MT377047	30.59	24.34	C	C	5.3.1.1	K01803	*	18	75.4	256740000	380	2.3E-214	
7	Fructose 1,6-bisphosphatase II	FBP	MT377048	43.49	41.36	C	C	3.1.3.11	K02446	*	10	32.5	3362400	26	3.482E-61	
8	Ribulose phosphate-3-epimerase	RPE	MT377049	-	-	-	-	5.1.3.1	K01783	-	-	-	-	-	-	
9	Phosphoglycolate phosphatase	PGP	MT377050	-	-	-	-	3.1.3.18	K19269	-	-	-	-	-	-	
10	Ribose-5-phosphate isomerase	RPIA	MT377367	-	-	M	-	5.3.1.6	K01807	-	-	-	-	-	-	
Carbohydrate metabolism. Sucrose metabolism																
1	Xylulose 5-phosphate/phosphate translocator	XPT	MT377051	28.75	24.34	-	-	NA	K15283	*	1	4.5	581220	2	4.131E-05	
2	Plastid triose phosphate/phosphate translocator	TPT	MT377052	41.79	26.25	C	C	NA	K15283	*	4	16.4	128120000	75	1.705E-76	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
3	Phosphoglucomutase	PGM	MT377053	60.45	24.34	-	-	5.4.2.2	K01835	*	30	65.1	91514000	569	1.23E-215
4	Aldose-1-epimerase	GALC	MT377054	44.10	44.62	-	-	5.1.3.3	K01785	*	1	3.8	113540	2	6.256E-09
5	Isocitrate NADP-dependent isoform B	IDHN	MT377055	38.24	48.13	C	C	1.1.1.42	K00031	*	6	17.6	2899700	17	2.928E-30
6	Hexokinase	HXK	MT377056	-	-	-	-	2.7.1.1	K00844	-	-	-	-	-	-
7	Zinc-containing alcohol dehydrogenase family protein	ADH	MT377349	44.22	32.95	C	C	NA	NA	*	26	56.3	480650000	546	3.52E-304
8	Fumarate hydratase 2, chloroplastic-like	FUM2	MT377372	-	-	-	C	4.2.1.2	K01679	-	-	-	-	-	-
9	Phosphatase IMPL1 chloroplastic	IMPL1	MT377460	-	-	-	-	3.1.3.25	K10047	-	-	-	-	-	-
Cellular respiration															
1	Phosphoglycerate kinase	PGK	MT377057	48.42	44.62	-	C	2.7.2.3	K00927	*	2	5.3	394410	0	2.109E-06
			MT377058	46.95	44.62	C	C				34	75.5	230780000	530	1.48E-270
2	6-phosphofructokinase 5	PFK5	MT377059	71.84	15.45	-	-	2.7.1.11	K00850	*	1	1.6	1259900	12	2.248E-05
			MT377060	53.92	51.92	C	C				17	39.1	112880000	292	1.87E-237
Coenzyme metabolism. Tetrapyrrol biosynthesis															
1	Uroporphyrinogen decarboxylase 1	HEME1	MT377061	47.29	38.34	-	-	4.1.1.37	K01599	*	2	6.4	212350	2	1.517E-06
2	Protoporphyrinogen oxidase	PPOX	MT377062	50.85	60.41	-	-	1.3.3.4	K00231	*	10	24.9	1535400	12	2.449E-39
	Ferrocyclase	FC	MT377063	41.01	13.28	S	-	4.99.1.1	K01772	*	1	3.2	113530	2	0.0012739
			MT377064	51.12	41.36	C	C	4.99.1.9			20	59.7	10604000	66	6.4E-206
4	Ornithine transaminase	OAT	MT377065	43.84	44.62	-	-	2.6.1.13	K00819	*	7	22	2321900	10	3.053E-29
5	Chain A, Heme Oxygenase crystal structure	HMOX	MT377066	34.26	24.34	-	-	1.14.15.20	K21480	*	16	53.8	13357000	40	2.81E-133
6	Glutamyl-trna reductase	HEM	MT377067	-	-	C	-	1.2.1.70	K02492	-	-	-	-	-	-
7	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD	MT377068	-	-	-	C	4.2.1.24	K01698	-	-	-	-	-	-
8	Porphobilinogen deaminase	HMBS	MT377069	-	-	C	C	2.5.1.61	K01749	-	-	-	-	-	-
9	Uroporphyrinogen-III synthase	UROS	MT377070	-	-	-	C	4.2.1.75	K01719	-	-	-	-	-	-
10	Homogentisate solanesyltransferase, partial	HSTC	MT377071	-	-	C	C	2.5.1.117	K12501	-	-	-	-	-	-
11	Uroporphyrinogen III decarboxylase chloroplastic precursor	UROD	MT377466	-	-	-	-	4.1.1.37	K01599	-	-	-	-	-	-
12	Non-discriminatory gln-glu-trna synthetase	GTS1	MT377468	-	-	-	C	6.1.1.17	K01885	*	1	1.9	15203	1	0.0015862
13	Uroporphyrin-III C methyl transferase	UPM	MT377484	-	-	M	C	2.1.1.107	K02303	-	-	-	-	-	-
Coenzyme metabolism. Thiamine, tetrahydrofolate, biotin, prenilyquinone and iron-sulfur clusters															
1	Thiamine biosynthetic bifunctional enzyme chloroplastic isoforms A & C	TPSC	MT377072	34.22	12.31	-	-	2.7.1.49	K00877	*	2	5.8	1944000	10	4.861E-06
			MT377073	53.13	24.34	-	-	2.7.4.7	K00877	*	9	21.1	5799900	47	8.973E-47
			MT377074	86.09	28.32	-	-	2.5.1.3	K00788	*	4	7.3	1019700	10	7.65E-15
2	Branched chain amino acid aminotransferase	BCAT	MT377075	40.71	41.36	C	-	2.6.1.42	K00826	*	6	18.4	2635600	10	1.21E-16
3	Fe-S cluster assembly ATP-binding protein	HCF	MT377076	-	-	M	-	NA	K09013	-	-	-	-	-	-
4	ABC transporter I family member 10, chloroplastic	AB10I	MT377077	-	-	-	-	7.6.2.2	NA	-	-	-	-	-	-
5	Fe-S cluster assembly protein	SufD	MT377078	-	-	-	-	NA	K09015	-	-	-	-	-	-
6	Metal ABC transporter permease	ABP	MT377079	-	-	-	C	NA	K05663	-	-	-	-	-	-
			MT377080	-	-	-	-				-	-	-	-	-
7	Iron-sulfur cluster biosynthesis family protein	HSC	MT377081	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-
8	Iron-sulfur cluster assembly protein	ISU	MT377082	-	-	M	C	NA	K09014	-	-	-	-	-	-
9	Quinolinate synthase chloroplastic	QS	MT377394	-	-	-	C	2.5.1.72	K03517	-	-	-	-	-	-
10	Ferrocyclase-2	FC	MT377485	-	-	-	-	4.99.1.1	K01772	-	-	-	-	-	-
External stimuli response. Temperature and drought															
1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit-like protein	ADPR	MT377086	102.48	70.29	-	C	NA	K03696	*	20	23.8	12472000	181	4.553E-82
2	Rubisco large subunit-binding subunit chloroplastic isoform A/Hsp chaperonin 60A	RCAL	MT377087	62.02	60.41	-	C	NA	K04077	*	17	35.9	14685000	151	1.48E-78
			MT377088	61.56	60.41	-	-				17	38.1	8638200	55	8.809E-61
3	Heat shock protein 20	Hsp20	MT377093	28.65	28.32	C	C	NA	K13993	*	6	30.1	2315600	8	3.704E-21
4	Chaperone protein	clpB 1	MT377094	34.00	13.28	-	-	NA	K03695	*	1	4.1	361130	2	3.679E-06
5	Peptide methionine sulfoxide reductase	MSRA	MT377095	24.45	30.55	-	-	1.8.4.11	K07304	*	6	29.7	3569200	9	1.232E-14

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
6	Heat shock protein	HSP	MT377097	20.82	19.39	-	-	NA	K13993	*	16	65.4	119750000	111	2.97E-131
7	Inorganic pyrophosphatase chloroplastic	IPY3	MT377283	31.35	30.55	C	C	3.6.1.1	K01507	*	12	47.7	77660000	125	1.12E-88
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism															
1	Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 2	GLYR2	MT377098	30.54	19.39	-	-	1.1.1.79	K00090	*	4	13.8	2030600	7	6.721E-10
Lipid Metabolism															
1	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSA	MT377099	59.88	75.82	-	-				2	1.8	134770	3	1.42E-270
			MT377100	73.47	75.82	-	-				36	55.4	84803000	429	0
			MT377101	77.68	75.82	C	C	6.2.1.1	K01895	*	26	42.3	46462000	335	1.57E-184
			MT377102	71.31	70.29	-	-				29	51.8	20636000	217	1.14E-156
2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I – isoform B	FABH	MT377103	32.03	75.82	-	-				3	14.4	2964200	25	2.621E-93
			MT377104	48.67	48.13	C	C	2.3.1.179	K09458	*	13	40.1	10537000	43	5.71E-150
			MT377105	50.84	48.13	C	C				6	26.9	2732900	13	8.716E-86
3	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 5 of pyruvate dehydrogenase	ODP5	MT377106	54.27	30.55	-	-	2.3.1.12	K00627	*	6	17.2	1158700	9	6.601E-26
4	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	FABZ	MT377107	21.50	119.45	-	-	4.2.1.59	K01716	*	7	51.8	18699000	34	7.963E-51
5	3-oxoacyl-[acyl-carrier] reductase 4-like	KAR	MT377108	31.12	24.34	M	C	1.1.1.100	K00059	*	20	68.1	212130000	119	2.32E-174
6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	GPAT	MT377109	48.50	44.62	-	C	2.3.1.15	K00629	*	13	33.9	7726600	72	3.86E-65
7	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit	ACCD	MT377110	44.76	41.36	C	C	6.4.1.2	K01946	*	6	25.6	5099400	25	3.747E-46
			MT377111	56.16	51.92	-	C	2.1.3.15	K01946	*	19	45.1	18704000	127	1.875E-82
			MT377112	37.30	30.55	C	C	6.3.4.14	K01946	*	9	34.8	7163400	33	1.115E-32
8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha - subunit beta	PDH-E1 BETA	MT377113	46.60	41.36	C	C				2	5.6	157290	2	0.0023042
			MT377114	37.85	38.34	-	-	1.2.4.1	K00161	*	3	19.4	120750	5	1.439E-13
9	Plastid acyl-carrier-protein desaturase/Stearoyl-ACP-desaturase	STAD	MT377115	39.07	35.55	M	-				13	55.5	30768000	67	4.89E-180
			MT377116	49.76	41.36	-	C	1.14.19.2	K03921	*	14	39	4740400	32	6.158E-66
			MT377117	39.73	38.34	-	-	1.14.19.11			23	67.7	62155000	140	2.17E-274
10	Omega-6-FAD, chloroplast isoform	O6F	MT377118	48.71	38.34	C	C	1.14.19.23 1.14.19.45	K10255	*	10	27.9	8371400	59	4.517E-42
11	Enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]	INHA	MT377119	35.84	30.55	M	-	1.3.1.9 1.3.1.10	K00208	*	21	71.8	95031000	102	7.76E-283
12	Acetyl-coa biotin carboxyl carrier	BCCP	MT377120	25.65	10.58	C	C	NA	K02160	*	1	5.8	337200	1	0.001531
13	Malonyl coenzyme A acyl carrier protein transacylase	FABD	MT377121	36.83	32.95	-	C	2.3.1.39	K00645	*	6	19.5	1498200	7	1.658E-18
14	Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine synthesis protein/Betaine lipid synthase	BTA	MT377123	76.38	70.29	-	-	NA	K13621	*	13	22	2104900	54	2.297E-46
15	Monogalactosyldiacylglycerol synthase	MGDG	MT377124	46.50	44.62	-	-	2.4.1.46	K03715	*	2	3.3	526520	2	0.0002163
16	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	GPDA	MT377125	98.87	81.79	-	C	1.1.1.8	K00006	*	35	47	53707000	594	0
17	Acetyl-coa biotin carboxyl carrier	BCCP	MT377126	-	-	C	-	NA	K02160	-	-	-	-	-	
18	Lipid transfer machine permease	TGD1	MT377127	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	
19	Phospholipid:diacylglycerol transferase	PDAT	MT377128	-	-	-	C	2.3.1.158	K00679	-	-	-	-	-	
20	NADP malic enzyme	NADP-ME	MT377387	-	-	C	C	1.1.1.40	K00029	-	-	-	-	-	
21	Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLDH	MT377388	-	-	-	-	1.8.1.4	K00382	-	-	-	-	-	
22	Acetyl-CoA carboxylase / biotin carboxylase	ACCC	MT377389	-	-	-	C	6.4.1.2	K01946	-	-	-	-	-	
23	Malonyl coenzyme A acyl carrier protein transacylase	MCAT	MT377390	-	-	M	C	2.3.1.39	K00645	-	-	-	-	-	
24	Acyl carrier protein thioesterase	ATB	MT377391	-	-	-	-	3.1.2.14	K10782	-	-	-	-	-	
Nucleotide Metabolism															
1	Nucleoside diphosphate kinase 2	NDK2	MT377129	12.65	15.45	-	-	2.7.4.6	K00940	*	5	36.3	17534000	15	1.366E-33
2	Phosphoribosylamine-glycine ligase	PURD	MT377130	46.49	26.25	M	C	6.3.4.13	K01945	*	1	2.9	357280	2	5.495E-08
3	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	DPYD	MT377131	45.70	44.62	C	C	1.3.1.2	K00207	*	3	8.1	980280	7	5.59E-09
4	Amidophosphoribosyltransferase	PURI	MT377132	66.70	56.00	C	C	2.4.2.14	K00764	*	6	12	1982500	24	1.774E-33
5	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	PURL	MT377133	159.64	14.32	M	-	6.3.5.3	K01952	*	4	2.8	332130	6	1.361E-11
6	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	GART	MT377134	38.47	8.43	C	C	6.3.3.1	K01933	*	5	21.3	1770000	8	1.893E-12

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
7	Adenylate kinase	ADK	MT377135 MT377136	28.61 26.28	24.34 26.25	-	-	2.7.4.3	K00939	*	4 10	17.8 48.3	2047500 24016000	5 49	3.32E-20 2.24E-102
8	Adenylosuccinate lyase	ADSL	MT377137	56.37	48.13	-	C	4.3.2.2	K01756	*	14	38.9	5195600	48	5.64E-55
9	Allantoinase	ALLB	MT377138	64.06	65.16	-	-	3.5.2.5	K01466	*	9	22.3	2929800	30	1.27E-72
10	Uridine 5'- monophosphate synthase	UMPS	MT377139	57.08	51.92	-	-	2.4.2.10 4.1.1.23	K13421	*	16	34.6	13023000	103	4.667E-63
11	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	PRPS	MT377140	42.80	32.95	-	C	2.7.6.1	K00948	*	14	45.3	5463200	24	3.635E-73
12	Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	PAICS	MT377141 MT377142	45.53 56.59	16.66 10.58	-	-	6.3.2.6	K01587	*	3 3	6.2 6.9	966610 1201000	8 6	3.011E-06 1.567E-09
13	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, eukaryotic-type	PAICC	MT377143 MT377144	33.79 28.57	75.82 119.45	-	-	4.1.1.21	K11808	*	5 6	17.7 32.4	1178000 6223200	9 26	1.841E-14 1.836E-35
14	Adenylosuccinate synthase	ADDS	MT377145	51.90	48.13	C	C	6.3.4.4	K01939	*	20	38.5	23211000	158	2.56E-142
15	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide	HIS4	MT377146	30.17	17.98	-	-	5.3.1.16	K01814	*	2	11.2	625090	5	9.763E-08
16	Allantoate deiminase	AAH	MT377147	55.10	12.31	S	-	3.5.3.9	K02083	*	5	12.3	15397000	9	7.418E-15
17	Bifunctional purine biosynthesis	PURH	MT377393	61.90	51.92	-	C	2.1.2.3	K00602	*	16	36.6	8838600	74	5.72E-211
18	cGMP-dependent protein kinase	PRKG	MT377459	42.59	41.36	-	C	2.7.11.12	K07376	*	2	7.3	739220	6	1.99E-09
Nutrient uptake. Nitrogen, sulfur assimilation and iron uptake															
1	5'-adenylylsulfate reductase 2	APR2	MT377148	47.50	44.62	C	C	1.8.4.9	K05907	*	16	50.8	10591000	63	5.22E-114
2	Sulfate adenylyltransferase	MET3	MT377149	48.49	41.36	C	C	2.7.7.4	K00958	*	13	32.5	9382500	91	1.036E-41
3	Sulfite reductase [ferredoxin]	SIR	MT377150 MT377151	85.12 72.26	11.41 70.29	-	-	1.8.7.1	K00392	*	16 34	29.7 49.2	5092000 32032000	53 162	3.438E-65 1.95E-237
4	Glutamate synthase 1 [NADH] chloroplastic isoform X1	GOSHI	MT377152	240.70	128.85	-	C	1.4.1.14	K00264	*	90	49.9	35234000	1205	0
Carbohydrate metabolism. Oxidative pentose phosphate pathway															
1	6-phosphogluconolactonase 5	PGL5	MT377153 MT377154	38.88 19.75	35.55 35.55	C	C	3.1.1.31	K01057	*	13 8	52.5 50.5	4693500 37240000	28 31	1.527E-58 9.353E-65
2	Transaldolase	TALC	MT377155	47.00	35.55	C	C	2.2.1.2	K00616	*	4	8.5	2259300	11	4.247E-14
3	Plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PDC	MT377156	51.14	56.00	-	-	1.1.1.49 1.1.1.363	K00036	*	16	44.5	5719400	44	1.16E-101
4	Ribulose-1,5 biphosphate carboxylase /oxygenase large subunit N-methyltransferase	RBCMT	MT377157	67.94	65.16	-	-	2.1.1.127	K00592	*	4	7.2	349730	5	3.696E-10
5	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD	MT377378	-	-	-	-	1.1.1.44	K00033	-	-	-	-	-	-
Photosynthesis. Photophosphorylation															
1	Ferredoxin	FDX	MT377158	13.87	12.31	C	C	NA	K02639	*	2	25	1640900	4	3.832E-10
2	Plastid terminal oxidase	PTOX	MT377159	41.84	44.62	-	-	1.10.3.11	K17893	*	15	48	51730000	206	3.37E-101
3	Chloroplast major light-harvesting complex II protein m9, partial	LHCII9	MT377160	-	-	-	-	NA	K08912	-	-	-	-	-	-
4	Chlorophyll a-b binding protein 8	LHCB8	MT377161	-	-	-	C	NA	K08909	-	-	-	-	-	-
5	Vesicle inducing protein in plastids 1	VIPP1	MT377162	-	-	C	C	NA	K03969	-	-	-	-	-	-
6	Ferredoxin-NADP reductase chloroplastic	FNRL	MT377458	38.63	35.55	M	-	1.18.1.2	K02641	*	16	52.9	13209000	33	1.11E-111
Photosynthesis. Photorespiration															
1	Serine hydroxymethyltransferase 3	SHM3	MT377163	52.79	48.13	M	-	2.1.2.1	K00600	*	19	53.2	30264000	173	2.47E-111
2	Carbonic anhydrase 7	CA7	MT377164	28.38	28.32	-	-	-	-	-	1	7.2	2273100	20	3.373E-15
3	Carbonic anhydrase 6	CA6	MT377165	24.44	20.92	-	-	4.2.1.1	K01672	*	2	8.8	830940	2	0.0017968
4	Gamma carbonic anhydrase	GAMMACA	MT377166	32.46	28.32	M	-	-	-	-	19	64.3	93956000	152	2.82E-267
Protein degradation. Peptidase families															

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
1	Leucine aminopeptidase 2	LAP2	MT377167	68.40	75.82	-	-	3.4.11.1	K01255	*	8	17.3	881530	8	3.025E-40
2	FtsH-like AAA + protein	FTSH3	MT377168	140.22	19.39	-	-	3.4.24.-	K03798	*	2	1.7	157810	2	0.0006391
3	Presequence protease 1	PREP1	MT377169	140.60	110.74	-	C	3.4.24.-	K06972	*	10	7.8	325380	12	7.703E-28
4	Xaa-Pro aminopeptidase P	XPP	MT377170	80.24	11.41	-	-	3.4.11.9	K01262	*	2	3.1	285200	2	4.814E-05
5	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA-like protein	clpA	MT377171	84.82	8.43	M	-	3.4.24.70	K01414	*	21	35.8	5424600	47	2.09E-74
6	Protease Do-like 1	DEGP1	MT377173	-	-	-	-	3.4.21.107	K04771	-	-	-	-	-	-
7	Histone-lysine N-methyltransferase	SETD3	MT377180 MT377181	-	-	-	C	2.1.1.85	K19199	-	-	-	-	-	-
8	Acylamino-acid-releasing enzyme	AARE	MT377182	-	-	-	C	3.4.19.1	K01303	-	-	-	-	-	-
9	Zinc protease PQQL-like isoform X4	FTSH4	MT377183	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-
Protein modification. Hydroxylation, phosphorylation, protein folding and peptide maturation															
1	Glutaredoxin, CPYC type	GRX	MT377184	11.12	10.58	-	-	NA	K03676	*	2	20.4	2466100	7	1.07E-06
2	Chloroplast processing enzyme	CPE	MT377185	140.87	17.98	-	C	3.4.24.61	K01411	*	4	3.3	318190	15	2.743E-10
3	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPI	MT377186	16.47	13.28	M	C	5.2.1.8	K03767	*	6	36.2	42297000	19	5.338E-41
4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	PPI	MT377187 MT377188	45.52 11.88	19.39 17.98	-	-	5.2.1.8	K03767	*	4 4	11.5 39.4	3776000 14479000	7 18	4.883E-15 1.579E-42
5	Casein kinase II subunit alpha-4	CKA4	MT377189	41.07	38.34	-	-	-	K08957	*	11	41.3	5086300	13	1.397E-47
6	ABC1-like protein	ABC1	MT377190	69.21	70.29	-	-	2.7.11.1	K02218	*	1	2.4	40449	1	0.0005877
7	Chloroplast processing peptidase	CPP	MT377191	37.17	48.13	-	-	3.4.21.89	K03100	*	3	13.9	811160	8	3.452E-17
8	Chaperone protein dnaJ 8	DJA8	MT377192	23.41	15.45	-	-	NA	K03686	*	2	18	732560	2	5.521E-16
9	Chaperone protein, chloroplastic isoform C	ClpB3	MT377193	64.70	10.58	-	-	NA	K03695	*	3	5.1	815250	4	1.272E-35
10	DnaJ-like protein/Chaperone protein dnaJ 2	DJA2	MT377194 MT377195 MT377196 MT377197 MT377198 MT377199	45.72 46.10 48.66	41.36 48.13 56.00	C	C	-	K03686 K09503	*	9 11 10	24.5 31.6 27.4	4112900 4372300 5205100	34 33 20	6.724E-32 4.628E-70 7.317E-47
11	Prolyl 4-hydroxylase	P4H	MT377200 MT377201 MT377202 MT377203	-	-	-	-	1.14.11.2	K00472	-	-	-	-	-	-
12	Zinc metalloprotease chloroplastic-like	FTSH	MT377204 MT377205	-	-	-	-	3.4.24.85	K07765	-	-	-	-	-	-
13	Chloroplast thylakoid processing peptidase	PLSP	MT377206 MT377207	-	-	-	-	3.4.21.89	K03100	-	-	-	-	-	-
14	Hydroxyproline O-arabinosyltransferase	HPAT	MT377208 MT377209 MT377210	-	-	-	C	2.4.2.58	K20782	-	-	-	-	-	-
15	GrpE nucleotide release factor	GRPE	MT377211	-	-	C	C	NA	K03687	-	-	-	-	-	-
16	CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR1-like	POR1	MT377212	-	-	M	C	NA	K03667	-	-	-	-	-	-
Protein translocation. Chloroplast															
1	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts	TIC22	MT377213 MT377226	52.64	35.55	-	-	NA	Q9SZB2	*	5	16.9	942560	11	2.054E-22
2	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts	TIC40	MT377227 MT377228	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-
3	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 110	TIC110	MT377217	140.67	10.58	C	C	NA	Q8LPR9	*	8	7.2	1250200	49	3.245E-28
4	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 100	Tic100	MW052777	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-
5	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts	TOC34	MT377222	43.96	48.13	-	-	NA	Q38906	*	7	18.8	4660400	22	2.159E-19

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP	
6	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 75	TOC75	MT377220 MT377221	94.25	13.28 17.98	-	-	NA	A8IE32	*	6 2	8.1 3.9	976690 248140	7 3	9.873E-16 4.791E-06	
7	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 80	TOC80	MT377218	83.77	44.62	-	-	NA	Q9C5J8	*	7	10.7	4504800	10	1.485E-18	
8	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 90	TOC90	MT377215 MT377083	39.79 86.18	16.66 81.79	-	M	C	NA	Q6S5G3	*	1	3.7	447970	1	0.0008523
9	Heat shock protein 90C	HS90	MT377084 MT377085	94.92 80.31	81.79 81.79	-	-	C	NA	K09487	*	25 22	39.5 34.5	6127300 6566800	95 103	2.74E-122 1.53E-161
10	Heat shock protein 70C, partial	HS70	MT377089 MT377090	69.71 73.09	70.29 75.82	M	-	C	NA	K04079	*	42 27	59.2 46.3	111890000 16178000	515 201	0 4.97E-237
11	Heat shock cognate 70 kDa protein	HSP70	MT377364	70.63	24.34	-	-	NA	K03283	*	9	14.8	5885800	44	1.624E-40	
12	ClpB chaperone, Hsp100 family	CLPB	MT377091	129.70	20.92	-	-	NA	K03695	*	35	63.7	106680000	578	0	
13	Chaperone protein	ClpB2	MT377092	101.30	13.28	-	-	NA	K03695	*	12	12.6	2111800	75	8.19E-54	
14	ClpB chaperone, Hsp100 family	CLPB3	MT377096 MT377362 MT377174 MT377175	95.39 83.1	17.98 88.2	-	-	NA	K03695	*	5 22	8.9 36.8	573440 7040700	7 103	4.591E-16 3.07E-98	
15	ATP-dependent zinc metalloprotease	FTSH	MT377176 MT377177 MT377178	-	-	-	-	C	3.4.24.-	K03798	-	-	-	-	-	
16	Membrane AAA-metalloprotease, partial	FTSH	MT377179	-	-	-	-	C	3.4.24.-	K08955	*	4	9.3	170010	3	5.442E-16
17	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 9	FTSH9	MT377172	40.89	10.58	-	-	-	3.4.24.B20	K03798	*	1	2.1	92612	1	0.0008093
18	Malate dehydrogenase	MDHP	MT377336 MT377337	36.89 37.96	20.92 32.95	-	-	C	1.1.1.37	K00024	*	19	57.6	245180000	289	8.54E-185
19	Malate dehydrogenase	MDH	MT377373	35.2	35.5	M	C	1.1.1.37	K00026	*	1	2.5	867330	1	1.59E-29	
20	Signal recognition particle 54 kDa protein 1	SRP54	MT377223 MT377229 MT377230	67.23	9.81	-	-	NA	P37107	*	21	60.9	79787000	147	8.49E-141	
21	Protein translocase subunit SecA	SECA	MT377229 MT377230 MT377231 MT377232 MT377233	-	-	-	-	C	7.4.2.8	K03070	-	-	-	-	-	
22	Chloroplast SRP receptor	CSRP	MT377225	58.25	56.00	-	-	NA	K03110	*	1	2.1	92612	1	0.0008093	
23	ALBINO3-like protein 2, chloroplastic isoform X1	ALB3L2	MT377224	48.93	41.36	M	C	NA	K03217	*	1	2.5	867330	1	1.59E-29	
24	ALBINO3-like protein 1, chloroplastic isoform X4	ALB4	MT377234 MT377235	-	-	-	-	NA	K03217	-	19	57.6	245180000	289	8.54E-185	
25	Sec-independent translocase/TatC	TatC	MT377236 MT377237	-	-	-	-	NA	K03118	-	21	60.9	79787000	147	8.49E-141	
Redox homeostasis																
1	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	TPXR	MT377241 MT377242 MT377243	38.61 12.01 16.28	20.92 10.58 14.32	M	-	C	1.8.1.9	K00384	*	16 5 4	66 49.1 40.7	15089000 33490000 9098100	49 15 5	1.13E-118 1.193E-17 6.063E-14
2	Thioredoxin-related protein	CITRX	MT377257 MT377258	-	-	-	C	NA	NA	-	-	-	-	-	-	
3	Thioredoxin-like protein	TXN	MT377261	-	-	-	C	NA	NA	-	-	-	-	-	-	
4	Thioredoxin M4	TRXM4	MT377256	-	-	-	-	NA	K03671	-	-	-	-	-	-	
5	Glutathione S-transferase DHAR3	DHAR3	MT377244	24.80	28.32	-	-	-	1.8.5.1 2.5.1.18	K21888 K00799	*	9	57.3	13605000	22	9.65E-57
6	Glutathione synthase	GSS	MT377254 MT377255	-	-	-	-	-	6.3.2.3	K21456	-	-	-	-	-	
7	Glutathione reductase	GSR	MT377251	52.02	51.92	-	-	-	1.8.1.7	K00383	*	10	28.2	4079500	29	1.581E-37
8	FeThRed_A domain-containing protein	FTRA	MT377399	-	-	-	C	-	1.8.7.2	K17892	-	-	-	-	-	
9	Ferredoxin-thioredoxin reductase, variable chain	FTRV	MT377248	11.30	10.58	-	-	-	1.8.7.2	K17892	*	3	35.9	3195700	6	1.633E-09
10	Ferredoxin thioredoxin reductase, catalytic chain	FTRC	MT377469	-	-	-	-	-	1.8.7.2	K17892	-	-	-	-	-	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
11	Monothiol glutaredoxin	GRX	MT377238	34.68	11.41	C	C	1.20.4.1	K00537	*	3	11.2	960790	6	4.072E-11
12	2-cys peroxiredoxin	PRDX	MT377239	17.28	15.45	-	-	1.11.1.15	K03386	*	7	67.3	12622000	24	7.147E-28
			MT377240	26.61	19.39	C	-		K11065	*	7	41.6	19012000	30	7.413E-81
			MT377245	22.63	20.92	-	-				6	30.6	7588700	16	6.01E-34
13	Superoxide dismutase [Fe]	FSD	MT377246	26.21	20.92	M	C	1.15.1.1	K04564	*	9	47	4611900	15	2.078E-40
			MT377247	22.69	19.39	-	-				11	58.4	17564000	36	2.509E-65
	RETICULATA-RELATED chloroplastic-like isoform A	C2E21	MT377249	39.60	30.55	C	-	NA	A0A1S2XPB2	*	11	25.2	21015000	83	3.204E-48
			MT377250	43.35	30.55	-	C				14	34.8	6166700	23	7.633E-52
15	NADPH-dependent aldo-keto reductase, chloroplastic isoform X2	AKRC	MT377252	45.58	16.66	-	-	1.1.1.2	K00002	*	2	5.7	465380	4	0.0010298
16	Gamma-glutamylcysteine synthetase	GCLS	MT377253	-	-	-	C	6.3.2.2	K01919	-	-	-	-	-	-
17	Methionine sulfoxide reductase B	MSRB	MT377259	-	-	-	-	1.8.4.12	K07305	-	-	-	-	-	-
18	Fruit protein pKIWI502-like	PKIWI502	MT377260	-	-	-	C	2.4.2.-	K20784	-	-	-	-	-	-
Secondary metabolism. Nitrogen-containing secondary compounds. Glucosinolates															
1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	LEU1L	MT377262	52.51	48.13	C	C	4.2.1.33 4.2.1.35	K01703	*	5	15.1	4083200	19	4.226E-17
Secondary metabolism. Terpenoids. Methylerythritol phosphate pathway															
1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	DXR	MT377263	54.40	19.39	-	C	1.1.1.267	K00099	*	2	4.2	878820	6	4.12E-05
2	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	DXS	MT377264	79.84	20.92	-	-	2.2.1.7	K01662	*	3	4.9	600140	7	5.684E-07
									K13789						
3	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	GGPPS2	MT377265	39.19	41.36	-	-	2.5.1.1	K00787	*	2	5.9	263520	4	1.19E-08
4	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	ISPF	MT377266	-	-	-	-	4.6.1.12	K01770	-	-	-	-	-	-
5	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	GGPS	MT377396	-	-	-	-	2.5.1.1	K13789	-	-	-	-	-	-
6	Putative tocopherol O-methyltransferase chloroplastic	VTE4	MT377397	-	-	-	-	2.1.1.295	K18534	-	-	-	-	-	-
7	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase	LD85	MT377451	31.05	26.25	M	C	2.7.7.60	K00991	*	4	13.2	2844100	13	1.683E-11
8	Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	ispE	MT377486	-	-	C	C	2.7.1.148	K00919	-	-	-	-	-	-
Secondary metabolism. Terpenoids. Terpenoid synthesis. Carotenoid metabolism															
1	Sterol 14 desaturase	STE14	MT377267	55.94	56.00	-	-	1.14.14.154 1.14.15.36	K05917	*	20	51	14130000	103	9.16E-146
Solute transport															
1	S-adenosylmethionine carrier 1	SAMC1	MT377268	39.81	30.55	-	C	NA	K15111	*	14	53	80252000	241	3.78E-115
			MT377269	37.58	22.56	-	C	NA			2	8.4	318100	2	7.664E-19
			MT377270	38.36	19.39	-	-	NA	K15109	*	5	15.1	933010	7	6.342E-14
2	Low-CO2-inducible chloroplast envelope	LIP	MT377271	45.59	44.62	-	-	NA			4	13.2	1588400	3	1.274E-08
3	Chloroplast oxoglutarate-malate translocator	OMT	MT377272	57.78	32.95	C	C	NA	A8JDE6	*	8	17.1	34505000	89	1.861E-81
4	K(+) efflux antiporter	KEA	MT377273	138.80	10.58	C	C	NA	Q9ZT77	*	9	8.9	1317600	25	2.378E-55
5	Plastid ATP/ADP transporter, partial	AATP1	MT377274	63.65	44.62	C	C	NA	K03301	*	17	33.7	103810000	281	7.74E-128
6	Outer envelope pore protein 24A	OP24	MT377275	24.38	24.34	-	C	NA	Q1H5C9	*	24	81.9	218490000	137	0
7	Protein DETOXIFICATION 45 (membrane protein)	DTX45	MT377276	56.58	38.34	C	C	NA	Q9SVE7	*	5	13.4	671210	12	7.726E-35
8	Putative sodium/metabolite cotransporter BASS4	BASS4	MT377277	50.84	26.25	-	-	NA	K14347	*	2	4.4	586230	4	1.527E-06
9	ABC transporter B family member	ABCB	MT377278	43.49	8.43	-	-	NA	K05656	*	3	6.9	845570	3	8.374E-08
10	CysA-like protein	CYSA	MT377279	55.61	56.00	C	C	7.3.2.3	K02045	*	5	11.1	1289900	17	2.271E-19
11	CTR-type copper ion transporter	CTR1	MT377280	42.97	70.29	-	-	NA	K14686	*	2	5.6	964990	5	1.628E-06
			MT377281	-	-	-	-				-	-	-	-	-
			MT377282	-	-	-	-				-	-	-	-	-
12	ABC transporter G family member 2	Abcg2	MT377284	-	-	-	C	NA	K05681	-	-	-	-	-	-
			MT377285	-	-	-	-				-	-	-	-	-
			MT377286	-	-	-	-				-	-	-	-	-

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
13	Plastidal glycolate glycerate translocator	PLGG	MT377287	–	–	C	C	NA	NA	–	–	–	–	–	–
14	Chloroplast sulfate permease 1	SUL1	MT377288	–	–	–	–	NA	K02046	–	–	–	–	–	–
15	UPF0187 chloroplastic, Ion channel-forming bestrophin family protein	BEST	MT377289	–	–	–	–	NA	K08994	–	–	–	–	–	–
16	Sulfate binding protein, component of chloroplast transporter	SuLP	MT377290	–	–	–	–	NA	K23163	–	–	–	–	–	–
Starch metabolism															
1	Soluble starch synthase	SS	MT377293 MT377295	66.58 71.27	60.41 24.34	C –	C –	2.4.1.21 2.4.1.21	K00703 K00703	* *	18 4	42.4 5.8	8427100 1688100	54 11	3.64E-130 2.065E-10
2	Soluble starch synthase II	SSII	MT377292	69.03	56.00	–	–	2.4.1.21	K00703	*	28	48.5	36144000	106	3.71E-301
3	Soluble starch synthase II	SSSII	MT377346	–	–	C	C	2.4.1.21	K00703	–	–	–	–	–	–
4	Soluble starch synthase III	SSIII	MT377291	133.81	102.66	–	C	2.4.1.21	K00703	*	71	61	281440000	1129	0
5	Starch binding domain containing protein	STBD	MT377294	57.18	14.32	C	C	2.4.1.21	K00703	*	7	17.2	4726400	21	2.598E-35
6	Phosphoglucan, water dikinase	GWD	MT377296	33.05	19.39	–	C	–	–	–	7	22.8	17042000	34	2.007E-56
			MT377297	16.40	110.74	–	–	–	–	–	2	16.4	760550	4	2.673E-09
			MT377298	23.23	110.74	–	–	2.7.9.5	K15535	*	5	36.9	3908700	9	4.227E-14
			MT377299	38.41	26.25	–	–	–	–	–	10	32	33077000	101	7.757E-55
			MT377300	30.27	9.09	–	C	–	–	–	2	6.5	1017200	7	1.647E-06
7	R1 protein, alpha-glucan water dikinase	R1	MT377301	177.71	119.45	–	–	2.7.9.4	K08244	*	63	50.8	25907000	697	0
8	Alpha-amylase	AMY	MT377302	54.15	48.13	–	C	3.2.1.1	K01176	*	16	35.5	46044000	165	4.68E-126
9	Granule-bound starch synthase	WAXY	MT377303	91.56	88.23	–	–	2.4.1.242	K13679	*	49	70.8	112340000	573	0
10	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	AGPS	MT377304	64.18	48.13	C	C	2.7.7.27	K00975	*	12	27.3	26506000	114	6.47E-194
11	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	AGPL	MT377305	24.65	48.13	–	–	–	–	–	13	57.3	52592000	99	8.569E-91
			MT377306	58.66	51.92	C	C	–	–	–	34	66.4	74360000	338	0
			MT377307	55.70	51.92	C	C	–	–	–	16	38.3	25778000	214	2.19E-223
12	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	APS1	MT377308	55.85	48.13	C	C	–	–	26	55.6	72089000	342	1.15E-188	
13	4-alpha-glucanotransferase	DPE1	MT377309	56.29	88.23	–	C	2.4.1.25	K00705	*	2	4.3	643570	3	6.044E-09
14	Starch phosphorylase	SP	MT377310	52.78	60.41	–	–	–	–	–	5	12.4	2119200	10	2.49E-18
			MT377311	49.45	11.41	–	C	2.4.1.1	K00688	*	4	10.3	1382700	6	3.317E-15
15	Isoamylase, starch debranching enzyme/1,4-alpha-glucan branching enzyme II	VIT	MT377312	98.92	88.23	–	C	–	–	–	54	69.9	188920000	1303	0
			MT377313	26.22	24.34	–	–	3.2.1.68	K01214	*	4	16	5575200	7	1.948E-18
			MT377314	32.23	70.29	–	–	–	–	–	3	14	2745300	5	1.055E-10
			MT377315	102.68	60.41	–	–	–	–	–	5	7.6	541940	16	4.914E-18
16	Starch branching enzyme (1,4-alpha-glucan branching enzyme II)	SBE2	MT377316	83.70	81.79	–	–	–	–	–	18	33.2	3713600	53	1.689E-87
			MT377317	30.56	41.36	–	–	2.4.1.18	K00700	*	4	14.8	8656400	2	1.241E-06
			MT377318	103.55	95.17	–	C	–	–	–	41	51	31252000	380	9.3E-251
17	UDP-Glucose:protein transglucosylase	UPTG	MT377319	70.29	–	C	C	–	–	–	31	55.3	47710000	333	0
			MT377320	39.14	38.34	–	–	5.4.99.30	K13379	*	16	59.9	4677600	28	1.715E-63
18	Phosphoglucan phosphatase chloroplastic	LSF	MT377321	–	–	–	–	3.1.3.-	K04382	–	–	–	–	–	–
19	Fructokinase-1	FRK1	MT377323	–	–	C	C	2.7.1.4	K00847	–	–	–	–	–	–
20	Granule-bound starch synthase I	GBSS1	MT377347	–	–	C	–	2.4.1.242	K13679	–	–	–	–	–	–
21	Pullulanase 1, chloroplastic isoform X1	PUX1	MT377348	–	–	–	C	3.2.1.41	K01200	–	–	–	–	–	–
22	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	MT377377	–	–	–	–	5.3.1.9	K01810	–	–	–	–	–	–
23	Alpha-amylase	AMY	MT377470	–	–	–	C	3.2.1.1	K01176	–	–	–	–	–	–
24	Beta-amylase 3 chloroplastic	BAM3	MT377471	–	–	–	–	3.2.1.2	K01177	–	–	–	–	–	–
Not assigned															
1	Predicted protein	–	MT377122	75.12	44.62	–	–	3.5.1.108	K02535	*	9	15	2230700	22	3.152E-50
2	Oxidoreductase HTATIP2	HTATIP2	MT377214	24.75	22.56	–	–	NA	Q8H0U5	*	13	58.5	30619000	59	4.697E-68
3	Short chain dehydrogenase	SDR	MT377216	39.34	38.34	–	–	NA	A2RVM0	*	8	26.6	2694600	17	3.77E-39

(continued on next page)

Table 1 (continued)

#	Protein name	Abbreviation	Accession number	Mw (kDa)	OMw (kDa)	TargetP2	ChloroP	EC number	KEGG or UNIPROT	LC-MS/MS	Nr. peptides	Sequence coverage [%]	iBAQ	MS/MS Count	PEP
4	SUMO-activating enzyme subunit 2	SAE2	MT377219	46.44	30.55	-	-	NA	Q9LVH5	*	1	2.4	990950	7	7.202E-06
5	Dynamin-related GTPase	DRP	MT377325	78.66	70.29	-	C	3.6.5.5	K01528	*	10	14.3	1503800	30	5.269E-26
6	Thiosulfate sulfurtransferase 16, chloroplastic-like isoform X2	THS16	MT377326	14.19	14.32	-	-	2.8.1.1	K02439	*	2	16.5	1690500	2	3.474E-06
7	Protein DCL, chloroplastic-like	DCL	MT377327	22.37	14.32	-	-	NA	NA	*	3	37.1	5106000	8	3.805E-28
8	50S ribosomal protein L24	RPL24	MT377328	20.70	22.56	-	-	NA	K02895	*	2	19.7	564220	2	1.928E-11
9	NAD dependent epimerase/dehydratase	TERH	MT377329	29.02	30.55	-	-	4.2.1.93	K17757	*	10	41.6	14014000	51	1.596E-74
10	Protein phosphatase 2C-like protein	PP2C	MT377330	45.73	13.28	-	-	3.1.3.16	K14497	*	3	8.9	763130	3	9.005E-10
11	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	rib4	MT377331	16.35	14.32	-	-	2.5.1.78	K00794	*	3	28.1	1524600	3	2.158E-13
12	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase/phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	hisIE	MT377332	31.52	32.95	-	-	3.6.1.31	K11755	*	7	38.5	856140	8	1.821E-27
13	3-Isopropylmalate dehydrogenase, splicing variant a	leuBA	MT377333	42.49	60.41	C	-	1.1.1.85	K00052	*	2	7.8	234410	2	6.908E-07
14	Acetate Kinase 1 protein	ackA	MT377334	43.80	44.62	-	-	2.7.2.1	K00925	*	23	73.3	108800000	400	2.08E-224
15	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating)	QPRT	MT377335	33.44	32.95	-	-	2.4.2.19	K00767	*	9	45.6	5630400	28	2.87E-37
16	Eyespot assembly protein, ABC1 kinase family	EYE3	MT377338	-	-	-	C	NA	NA	-	-	-	-	-	-
17	Iron-sulfur cluster biosynthesis family protein	SuffE	MT377339	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-
18	Predicted protein	NA	MT377340	NA	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-
19	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein	APH	MT377341	-	-	-	-	NA	K09775	-	-	-	-	-	-
20	Inositol monophosphatase family protein	HISN	MT377379	-	-	M	-	3.1.3.25	K18649	-	-	-	-	-	-
21	RN a-b inding RBMS and related containing G-patch and RRM domains	ISS	MT377457	62.25	16.66	-	C	NA	NA	*	3	5.9	320220	3	5.474E-06
22	Glycine-rich RN a-b inding protein 2	RBG2	MT377490	18.53	10.58	-	-	NA	A8IZ55	*	5	31.1	18102000	30	8.789E-22

The table lists the identity of each protein assigned to the *P. parva* plastid proteome and its abbreviation (columns B and C); its GenBank accession number (column D); its predicted molecular weight (Mw) (column E); the observed molecular weight (OMw) in accordance with its migration in SDS-PAGE and mass spectrometry detection (column F, where values in red and violet indicate a large and moderate disparity with the predicted molecular weights respectively); presence of a plastid targeting sequence as predicted by TargetP2 and ChloroP (columns G and H, respectively, where C = chloroplastic targeting sequence; M = mitochondrial targeting sequence; S = secretory pathway signal peptide); its EC number, its KEGG (or UNIPROT) identifier (columns I and J respectively); an asterisk indicating positive identification by mass spectrometry (column K); and identification and quantification parameters derived from MS analysis: number of peptides, percentage of sequence coverage, intensity based absolute quantification values (iBAQ), MS/MS counts and posterior error probability (columns L-P). Mass spectrometry was carried out with two independent biological samples obtained from a highly reproducible, plastid-isolation protocol. Blue horizontal bars separate group of proteins according to the different metabolic pathways assigned by Mercator4. NA stands for "not assigned".

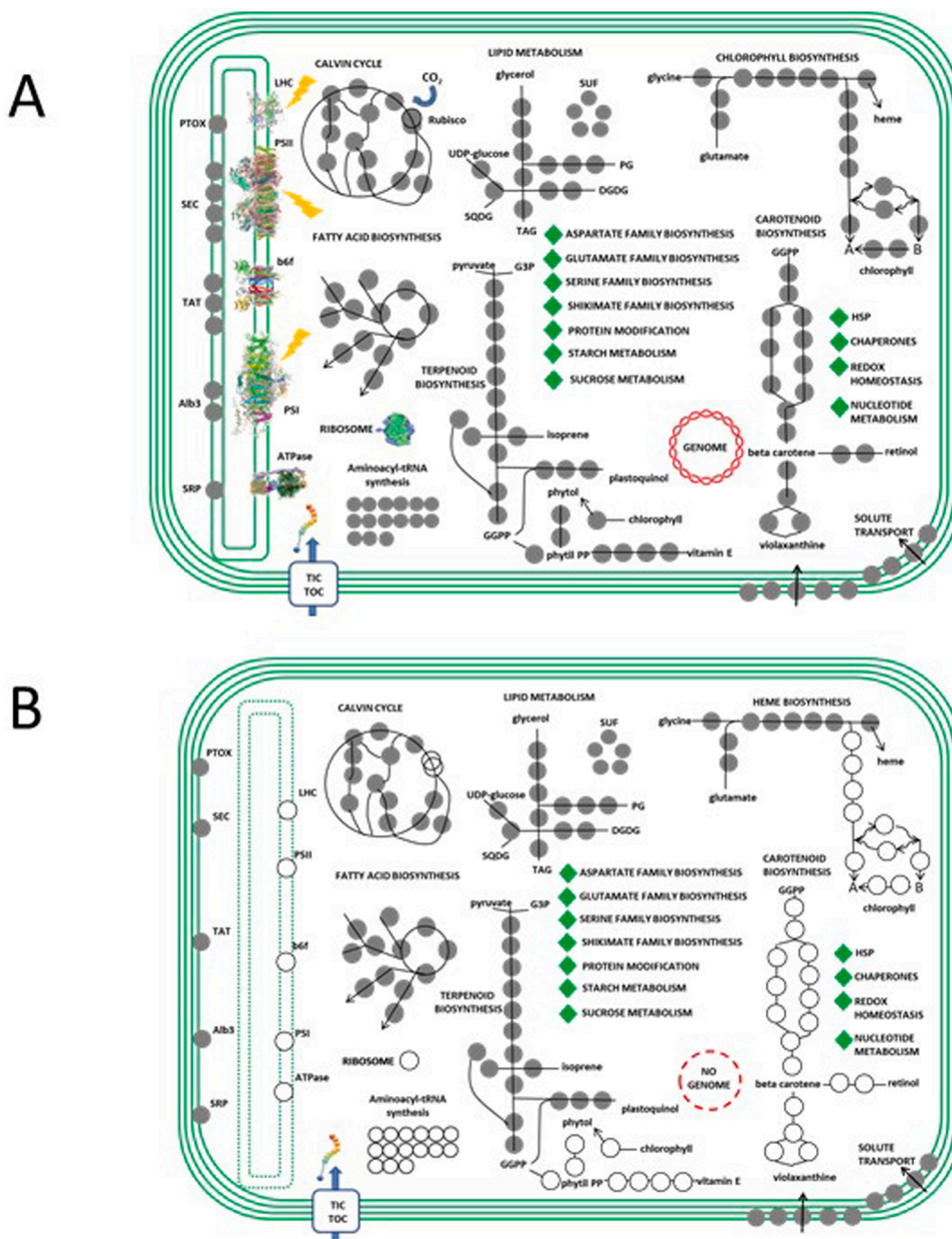


Fig. 6. Schematic comparison of *P. parva* and *C. reinhardtii* plastid metabolism. (A) Metabolic routes found in *C. reinhardtii* (A) and *P. parva* (B) plastids. Components present in both are marked in gray dots; the ones lost in the *P. parva* colorless plastids are shown as empty dots. In *P. parva*, the plastid genome is no longer present; ribosomes and aminoacyl-tRNA components are absent; the chlorophyll and carotenoid biosynthesis pathways are truncated; and thylakoid membranes along with its photosynthetic components are lost. The rest of metabolic routes, present in both plastids, are listed with green rhomboids. The TIC-TOC translocation machinery is highlighted, and homologs of membrane transporters present in the *C. reinhardtii* thylakoid membranes are presumed to be in the inner envelope of *P. parva* plastids. Scheme adapted from (Novák Vanclová et al., 2019).

The same happens with the *P. parva* plastid ADP/ATP translocator, similar to the one present in land plant thylakoids (Thuswaldner et al., 2007), which may also be located in the amyloplast inner membrane (Ngernprasirtsiri et al., 2008).

Performing comparative genomics on 20 genomes, an inventory of 597 nucleus-encoded proteins restricted to plants and green algae was compiled and designated the “GreenCut2” (Karpowicz et al., 2011). This set includes 183 proteins not associated to plastids and that do not participate directly in photosynthesis, but that may be indirectly involved in plastid function. Only 45 % of the listed proteins were found to have homologs in *P. parva*, since the majority of the components active in photophosphorylation, chlorophyll biosynthesis, and carotenoid metabolism, that represent an important fraction of the green lineage inventory, are not present in the colorless alga (Supplementary Table S6).

Besides chlorophycean algae, loss of photosynthesis has also occurred in some members of the unrelated super group Excavata, in particular, in the Euglenozoa protists that contain a complex three-membrane-bounded plastid that originated through a secondary endosymbiotic event, that may be traced to the engulfment of an algae closely related to members of the genus *Pyramimonadales* (Turmel et al., 2009). The green *Euglena gracilis* has its colorless counterpart *Euglena longa* (Hadariová et al., 2018), whose plastid transcriptome has been analyzed (Záhonová et al., 2018). As expected, no orthologs of the enzymes that participate in starch metabolism were found in *E. longa*, since it stores paramylon (a β -1,3 polymer of glucose) in rod-like bodies throughout the cytoplasm (Monfils et al., 2011). Also, many components of the TIC-TOC translocation machinery are absent in *E. longa* (Záhonová et al., 2018). Nevertheless, *E. longa* and *C. reinhardtii* plastids contain many proteins that participate in chromatin organization, RNA biosynthesis, RNA processing, aminoacyl-tRNA synthetase activities, and in the assembly of organelle translation machineries, all of whom are absent in the *P. parva* proteome.

In land plants, amyloplasts represent an intermediate stage on the chloroplast differentiation pathway (Whatley, 1977), as illustrated by the ability of potato amyloplasts to turn green when illuminated. By contrast, in *P. parva*, the colorless plastids are evolutionary remnants of chloroplasts that conserve light-independent metabolic routes. Indeed, the proteins that pertain to the *P. parva* plastids are clearly homologous to a subset of chloroplast proteins of its green relative *C. reinhardtii* (Fig. 6 and Supplementary Figure S5).

9. Conclusions

Although pigment synthesis and photosynthetic capabilities have been lost in the colorless plastids of *P. parva*, our work shows that important metabolic routes, essential for plastid function, have been retained. Since these plastids lack a genome, the protein synthesis machinery is also absent, and therefore all its components must be imported from the cytosol mainly through TIC-TOC translocators. This is the first time that a proteomic characterization of the plastids from a unicellular, free-living, nonphotosynthetic organism is put forward.

Author statement

The work described in this manuscript “The Plastid Proteome of the Nonphotosynthetic Chlorophycean Alga *Polytomella parva*” of authors Emma O. Fuentes-Ramírez, Miriam Vázquez-Acevedo, Alfredo Cabrera-Orefice, Sergio Guerrero-Castillo, and Diego González-Halphen, has not been published previously and it is not under consideration for publication elsewhere. Its publication is approved by all authors and tacitly by the responsible authorities where the work was carried out. If this manuscript is accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

Author contributions

Fuentes-Ramírez and González-Halphen designed the research. Fuentes-Ramírez and Vázquez-Acevedo performed the experiments. Guerrero-Castillo and Cabrera-Orefice performed the mass spectrometry and peptides/protein identification searches. Fuentes-Ramírez, Cabrera-Orefice, Guerrero-Castillo and González-Halphen analyzed the data. Fuentes-Ramírez performed the bioinformatic approach. Fuentes-Ramírez and González-Halphen wrote the manuscript. Guerrero-Castillo, Cabrera-Orefice, and Vázquez-Acevedo critically reviewed and approved the final manuscript.

Funding sources

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, Mexico (grant numbers 239219 and 279125), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico, (grant number IN209220)). Emma Oliva Fuentes-Ramírez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 261684 from CONACyT and a research assistant fellowship from el Sistema Nacional de Investigadores (Mexico).

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We are indebted to Professor Ulrich Brandt (Radboud University Medical Center, The Netherlands) for generously providing us access to mass spectrometry facilities. We acknowledge the technical expertise and support of Rodolfo Paredes López (Unidad de Imagenología, IFC, UNAM), César Poot Hernández (Unidad de Bioinformática, IFC, UNAM), Gerardo Coello Coutiño (Unidad de Cómputo, IFC, UNAM) and Dr. José Luis Torres Santillán (IFC, UNAM). We are indebted to Drs. Xochitl Pérez-Martínez and Berenice García-Ponce-de-León (UNAM) for their insightful comments throughout the development of this project, and to Dr. Rosa Navarro and M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez (IFC, UNAM) for their help with DIC microscopy. We are grateful for the critical comments to the manuscript of Drs. David R. Smith (The University of Western Ontario, Canada), Adrian Reyes-Prieto (University of New Brunswick, Canada), Francisco Figueroa-Martínez (UAM, Mexico), and Félix Vega deLuna (L'Université de Liège, Belgium).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126649>.

References

- Alban, C., Joyard, J., Douce, R., 2008. Preparation and characterization of envelope membranes from Nongreen Plastids. *Plant Physiol.* 88, 709–717. <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.709>.
- Almagro-Armenteros, J.J., Salvatore, M., Winther, O., Emanuelsson, O., von Heijne, G., Elofsson, A., Nielsen, H., 2019. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci. Alliance* 2. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429> e201900429.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Asmail, S., 2015. Inferring plastid metabolic pathways within the nonphotosynthetic free-living green algal genus *Polytomella*. Electronic Thesis and Dissertation Repository The University of Western Ontario. Paper 3225. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/3225>.
- Asmail, S.R., Smith, D.R., 2016. Retention, erosion, and loss of the carotenoid biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *New Phytol.* 209, 899–903. <https://doi.org/10.1111/nph.13682>.

- Atteia, A., Van Lis, R., Beale, S.I., 2005. Enzymes of the heme biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic alga *Polytomella* sp. Eukaryot. Cell 4, 2087–2097. <https://doi.org/10.1128/EC.4.12.2087-2097.2005>.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A., Preiss, J., 2004. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. Photosynth. Res. 79, 1–24. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000011916.67519.58>.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., DuPont, F.M., Buchanan, B.B., Hurkman, W.J., 2006. Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. J. Exp. Bot. 57, 1591–1602. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj156>.
- Barker, S.A., Bebbington, A., Bourne, E.J., 1951. Carbohydrate primers for Q-Enzyme. Nature 168, 834–835. <https://doi.org/10.1038/168834b0>.
- Barrera, N.P., Robinson, C.V., 2011. Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: from individual proteins to intact complexes. Annu. Rev. Biochem. 80, 247–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062309-093307>.
- Bates, F.L., French, D., Rundle, R.E., 1943. Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation. J. Am. Chem. Soc. 65, 142–148. <https://doi.org/10.1021/ja01242a003>.
- Berthold, D.A., Stenmark, P., 2003. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. Annual Rev. Plant Biol. 54, 497–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.54.031902.134915>.
- Borza, T., Popescu, C.E., Lee, R.W., 2005. Multiple metabolic roles for the nonphotosynthetic plastid of the green alga *Prototheca wickerhamii*. Eukaryot. Cell 4, 253–261. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.253-261.2005>.
- Bourne, E.J., Stacey, M., Wilkinson, I.A., 1950. The composition of the polysaccharide synthesized in *Polytomella coeca*. J. Chem. Soc. 2694–2698.
- Brown, D.L., Leppard, G.G., Massalski, A., 1976a. Fine structure of encystment of the quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. Protoplasma 90, 139–154. <https://doi.org/10.1007/BF01276484>.
- Brown, D.L., Massalski, A., Leppard, G.G., 1976b. Fine structure of encystment of the quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. Protoplasma 90, 155–171. <https://doi.org/10.1007/BF01276485>.
- Carol, P., Kuntz, M., 2001. A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. Trends Plant Sci. 6, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01811-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01811-2).
- Colina-Tenorio, L., Miranda-Astudillo, H., Cano-Estrada, A., Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Remacle, C., González-Halphen, D., 2016. Subunit Asa1 spans all the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophyte alga *Polytomella* sp. Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics 1857, 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.012>.
- de Koning, A.P., Keeling, P.J., 2006. The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. BMC Biol. 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-12>.
- Denyer, K., Pike, M., 2008. Isolation of amyloplasts. Curr. Protoc. Cell Biol. 38 (3), 28. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0328s38>, 1-3, 28.15.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G., 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Protein Sci. 8, 978–984. <https://doi.org/10.1110/ps.8.5.978>.
- Facchinelli, F., Weber, A.P.M., 2011. The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. Front. Plant Sci. 2, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00050>.
- Gómez, G., Pallás, V., 2010. Can the import of mRNA into chloroplasts be mediated by a secondary structure of a small non-coding RNA? Plant Sign. Behav. 5, 1517–1519. <https://doi.org/10.4161/psb.5.11.13711>.
- Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H.J., Arnold, S., Brandt, U., Nijtmans, L., 2017. The assembly pathway of mitochondrial respiratory chain complex I. Cell Metab. 25, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.002>.
- Hadariová, L., Vesteg, M., Hampl, V., Krajčovič, J., 2018. Reductive evolution of chloroplasts in non-photosynthetic plants, algae and protists. Curr. Genet. 64, 365–387. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0761-0>.
- Harinasut, P., Akazawa, T., Zhou, F.G., Takabe, T., 1988. Polypeptide compositions of stroma, internal membranes, and inner and outer envelope membranes of amyloplast from suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). Plant Cell Physiol. (Japan) 29, 1315–1321. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077641>.
- Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Dröse, S., Schwamb, B., Zörnig, M., Reichert, A.S., Koch, I., Wittig, I., et al., 2012. Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. Cell Metab. 16, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.009>.
- Huynen, M.A., Muhlmeister, M., Gotthardt, K., Guerrero-Castillo, S., Brandt, U., 2016. Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1863, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2015.10.009>.
- Inwood, W., Yoshihara, C., Zalpuri, R., Kim, K.S., Kustu, S., 2008. The ultrastructure of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking phytoene synthase resembles that of a colorless alga. Mol. Plant 1, 925–937. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn046>.
- Kalanon, M., McFadden, G.I., 2008. The chloroplast protein translocation complexes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a bioinformatic comparison of Toc and Tic components in plants, green algae and red algae. Genetics 179, 95–112. <https://doi.org/10.1534/genetics.1007.085704>.
- Karpowicz, S.J., Prochnik, S.E., Grossman, A.R., Merchant, S.S., 2011. The GreenCut2 resource, a phylogenomically derived inventory of protein specific to plant lineage. J. Biol. Chem. 286, 21427–21439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233734>.
- Kikuchi, S., Bédard, J., Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, M., Takase, M., Ide, T., Nakai, M., 2013. Uncovering the protein translocan at the chloroplast inner envelope membrane. Science 339, 571–574. <https://doi.org/10.1126/science.122926>.
- Kikuchi, S., Asakura, Y., Imai, M., Nakahira, Y., Kotani, Y., Hashiguchi, Y., Nakai, Y., Takafuji, K., Bédard, J., Hirabayashi-Ishioaka, Y., Mori, H., Shiina, T., Nakai, M., 2018. A Ycf2-FtsHi heteromeric AAA-ATPase complex is required for chloroplast protein import. Plant Cell 30, 2677–2703. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00357>.
- Lelliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., De Clerck, O., 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. Crit. Rev. Plant Sci. 31, 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>.
- Lewis, E., Mungler, G., Watson, R., Wise, D., 1974. Life cycle of *Polytomella caeca* (Phytomonadida, polyblepharidae). J. Protozool. 21, 647–649. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03720.x>.
- Lwoff, A., Ionesco, H.G.A., 1950. Synthèse et utilisation de l'amylose chez un flagellé sans chlorophylle incapable d'utiliser les sucres. Biochim. Biophys. Acta 4, 270–275. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90033-3).
- Mallet, M.A., Lee, R.W., 2006. Identification of three distinct *Polytomella* lineages based on mitochondrial DNA features. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00079.x>.
- Martin, T., Ludwig, F., 2007. Transporters in starch synthesis. Funct. Plant Biol. 34, 474–479. <https://doi.org/10.1071/FP06280>.
- Monfils, A.K., Triemer, R.E., Bellairs, E.F., 2011. Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). Phycologia 50, 156–169. <https://doi.org/10.2216/09-112.1>.
- Moore, J., Cantor, M.H., Sheeler, P., Kahn, W., 1970. The ultrastructure of *Polytomella agilis*. J. Protozool. 17, 671–676. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1970.tb04747.x>.
- Nakai, M., 2018. New perspectives on chloroplast protein import. Plant Cell Physiol. 59, 1111–1119. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy083>.
- Neuhaus, H.E., Emes, M.J., 2000. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. Ann. Rev. Plant Biol. 51, 111–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.51.1.111>.
- Ngernprasirtsiri, J., Takabe, T., Akazawa, T., 2008. Immunocytochemical analysis shows that an ATP/ADP-Translocator is associated with the inner-envelope membranes of amyloplasts from *Acer pseudoplatanus* L. Plant Physiol. 89, 1024–1027. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1024>.
- Nicolaï, M., Duprat, A., Sormani, R., Rodriguez, C., Roncato, M.A., Rolland, N., Robaglia, C., 2007. Higher plant chloroplasts import the mRNA coding for the eucaryotic translation initiation factor 4E. FEBS Lett. 581, 3921–3926. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.017>.
- Niyogi, K.K., 2000. Safety valves for photosynthesis. Curr. Op. Plant Biol. 3, 455–460. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)0113-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)0113-8).
- Novák Vanclová, A.M.G., Zoltner, M., Kelly, S., Soukal, P., Záhonová, K., Füßy, Z., Ebenezzer, T.E., Lacová Dobáková, E., Eliáš, M., Lukeš, J., et al., 2019. Metabolic quirks and the colourful history of the *Euglena gracilis* secondary plastid. New Phytol. 225, 1578–1592. <https://doi.org/10.1111/nph.16237>.
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Linares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D., J., Inguganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., et al., 2019. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. Nucleic Acids Res. 47 (D1), D442–D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>.
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., Cerón, J., 2012. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. J. Vis. Exp. 64, 419. <https://doi.org/10.37971/4019>.
- Ramundo, S., Asakura, Y., Salomé, P.A., Strenkert, D., Boone, M., Mackinder, L.C.M., Takafuji, K., Dinc, E., Rahire, M., Crèvecoeur, M., Magneschi, L., Schaad, O., Hippler, M., Jonikas, M.C., Merchant, S., Nakai, M., Roach, J.-D., Walter, P., 2020. Co-expressed Subunits of Dual Genetic Origin Define a Conserved Supercomplex Mediating Essential Protein Import Into Chloroplasts. bioRxiv preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.07.04.188128>.
- Rawsthorne, S., 2002. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. Prog. Lipid Res. 41, 182–196. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00023-6).
- Richardson, L.G.L., Singhal, R., Schnell, D.J., 2017. The integration of chloroplast targeting with plant developmental and stress responses. BMC Biol. 51, 118. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0458-3>.
- Round, F.E., 1980. The evolution of pigmented and unpigmented unicells - a reconsideration of the protista. Biosystems 12, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(80\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0303-2647(80)90038-6).
- Ruszkowski, M., Sekula, B., Ruskowska, A., Dauter, Z., 2018. Chloroplastic serine hydroxymethyltransferase from medicago truncatula: a structural characterization. Front. Plant Sci. 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00584>.
- Schägger, H., 2006. Tricine – SDS-PAGE. Nat. Protoc. 1, 16–23. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Meth. 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Schwacke, R., Ponce-Soto, G.Y., Krause, K., Bolger, A.M., Arsova, B., Hallab, A., Gruden, K., Stitt, M., Bolger, M.E., Usadel, B., 2019. MapMan4: a refined protein classification and annotation framework applicable to multi-omics data analysis. Mol. Plant 12, 879–892. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.003>.
- Sillero, A., Selivanov, V.A., Cascante, M., 2006. Pentose phosphate and Calvin cycles: similarities and three-dimensional views. Biochem. Mol. Biol. Ed. 34, 275–277. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034042627>.
- Smith, D.R., Asmail, S.R., 2014. Next-generation sequencing data suggest that certain nonphotosynthetic green plants have lost their plastid genomes. New Phytol. 204, 7–11. <https://doi.org/10.1111/nph.12919>.
- Smith, D.R., Lee, R.W., 2014. A plastid without a genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. Plant Physiol. 164, 1812–1819. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233718>.

- Smith, D.R., Hua, J., Lee, R.W., 2010. Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*. *Curr. Genet.* 56, 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0311-5>.
- Sun, Q., Zybailov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P.D.B., J van Wijk, K., 2009. PPDB, the plant proteomics database at cornell. *Nucleic Acids Res.* J37 <https://doi.org/10.1093/nar/gkn654> (Database issue): D969–974.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al., 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucl. Acids Res.* 47, D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- Terashima, M., Specht, M., Hippler, M., 2011. The chloroplast proteome: a survey from the *Chlamydomonas reinhardtii* perspective with a focus on distinctive features. *Curr. Genet.* 57, 151–168. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0339-1>.
- Thuswaldner, S., Lagerstedt, J.O., Rojas-Stütz, M., Bouhidel, K., Der, C., Leborgne-Castel, N., Mishra, A., Marty, F., Schoefs, B., Adamska, I., et al., 2007. Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 282, 8848–8859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609130200>.
- Tirumani, S., Gothandam, K.M.J., Rao, B., 2019. Coordination between photorespiration and carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: transcript and protein changes during light-dark diurnal cycles and mixotrophy conditions. *Protoplasma* 256, 117–130. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1283-4>.
- Tran, N.H., Qiao, R., Xin, L., Chen, X., Liu, C., Zhang, X., Shan, B., Ghodsi, A., Li, M., 2018. Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. *Nat. Methods* 16, 63–66. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0260-3>.
- Turmel, M., Gagnon, M.C., O'Kelly, C.J., Otis, C., Lemieux, C., 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26, 631–648. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn285>.
- Vernon, D., Gutell, R.R., Cannone, J.J., Rumpf, R.W., Birky, J., 2001. Accelerated evolution of functional plastid rRNA and elongation factor genes due to reduced protein synthetic load after the loss of photosynthesis in the chlorophyte alga *Polytoma*. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1810–1822. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003968>.
- Warakanont, J., Tsai, C.H., Michel, E.J.S., Murphy, G.R., Hsueh, P.Y., Roston, R.L., Sears, B.B., Benning, C., 2015. Chloroplast lipid transfer processes in *Chlamydomonas reinhardtii* involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 2 (TGD2) orthologue. *Plant J.* 84, 1005–1020. <https://doi.org/10.1111/tpj.13060>.
- Webster, D.A., Hackett, D.P., Park, R.B., 1968. The respiratory chain of colorless algae. III. Electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 21, 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80154-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80154-0).
- Whatley, J., 1977. Variations in the basic pathway of chloroplast development. *New Phytol.* 78, 407–420. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1977.tb04846.x>.
- Wicke, S., Muller, K.F., de Pamphilis, C.W., Quandt, D., Wickett, N.J., Zhang, Y., Renner, S.S., Schneeweiss, G.M., 2013. Mechanisms of functional and physical genome reduction in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants of the broomrape family. *Plant Cell* 25, 3711–3725. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113373>.
- Xing, S., Meng, X., Zhou, L., Mujahid, H., Zhao, C., Zhang, Y., Wang, C., Peng, Z., 2016. Proteome profile of starch granules purified from rice (*Oryza sativa*) endosperm. *PLoS One* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168467>.
- Záhonová, K., Füssy, Z., Bircák, E., Novák Vanclová, A.M.G., Klimeš, V., Vesteg, M., Krajčovič, J., Oborník, M., Eliáš, M., 2018. Peculiar features of the plastids of the colourless alga *Euglena longa* and photosynthetic euglenophytes unveiled by transcriptome analyses. *Sci. Rep.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35389-1>.