



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Búsqueda de nuevos genes implicados en la adaptación a  
la temperatura.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Jordà Segura, Joan

Tutor/a: Agustí Feliu, Javier

Cotutor/a externo: BLAZQUEZ RODRIGUEZ, MIGUEL ANGEL

Director/a Experimental: CATARINO, BRUNO

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



# Búsqueda de nuevos factores de transcripción implicados en la adaptación a luz y temperatura en *M. polymorpha* y *A. thaliana*

**Autor:** Joan Jordà Segura

**Tutores:** Bruno Catarino

Miguel A. Blázquez Rodríguez

**Tutor UPV:** Javier Agustí Feliu

Trabajo Final de Máster

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

València, Febrero 2024



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA





## AGRADECIMIENTOS

---

Lo primero de todo me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo; en primer lugar y como no podría ser de otra forma a Bruno, por todo lo que me has enseñado durante todo este tiempo, por tu pasión por la ciencia y tu esfuerzo para que las cosas saliesen bien. Gracias también a Miguel por toda la ayuda y la paciencia dedicada a este trabajo en largas reuniones en tu despacho y por tu confianza depositada en mí. No puedo imaginar tutores mejores que vosotros, de este trabajo me llevo una profunda gratitud y admiración hacia vosotros.

Agradecer también a la gente del laboratorio 2.07, por crear un ambiente de trabajo tan acogedor y por toda la ayuda prestada, es un placer trabajar con gente tan profesional. Además me gustaría extender este agradecimiento al laboratorio 2.08. No pudo dejarme a mis amigos del máster, ellos también han sido un pilar en el que apoyarme cuando más falta me hacía. También a Manuel por toda la ayuda depositada en el trabajo, hemos formado un gran equipo.

Por último, agradecer a mi familia y pareja por apoyarme en cada decisión y estar a mi lado incondicionalmente.

## ABREVIACIONES

---

ABA: Ácido abscísico

PHY: Fitocromo

PIF: Factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR

COP1: CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1

HY5: Factor de transcripción ELONGATED HYPOCOTYL 5

*At: Arabidopsis thaliana*

*Mp: Marchantia polymorpha*

FT: Factor de transcripción

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

miRNA: micro RNA

bZIP: Basic leucine zipper

bHLH: Basic helix-loop-helix

UVR8: UV RESISTANCE LOCUS8

UVB: Ultravioleta B

SPL: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE

GRN: Red de regulación génica

Pr: Estado activo del fitocromo B

Pfr: Estado inactivo del fitocromo B

RNA-seq: secuenciación de RNA

HygR: Resistencia a hygromicina

## RESUMEN

---

La luz y la temperatura son dos factores ambientales importantísimos para las plantas ya que regulan múltiples procesos de la planta como su crecimiento y desarrollo. En condiciones naturales, estos dos factores se encuentran ligados, con altas temperaturas cuando mayor es la intensidad lumínica y bajas temperaturas cuando la intensidad lumínica es menor, por lo que en las plantas terrestres ambos estímulos se encuentran integrados en un mismo mecanismo. Aunque muchos de los componentes centrales de este mecanismo está conservado entre las hepáticas y las angiospermas, poco se sabe de los FTs que actúan aguas debajo de este mecanismo de integración multisensorial en ambos linajes.

El presente trabajo se centra en inferir las rutas regulatorias transcripcionales que existen aguas debajo de este mecanismo integrador validando experimentalmente los FTs obtenidos mediante el análisis de redes en las especies *Marchantia polymorpha* (planta briofita) y *Arabidopsis thaliana* (planta angiosperma). Además, se busca comprobar si ambas rutas regulatorias transcripcionales se encuentran conservadas entre los dos linajes.

Los resultados mostrados en este trabajo sugieren que el análisis de redes fue exitoso ya que se han reportado dos FTs que actúan en esta integración multisensorial, uno en la especie *M. polymorpha* (MpBZIP4) y otro en *A. thaliana* (HB40), aunque todavía son necesarios más análisis para demostrar si las rutas regulatorias transcripcionales de cada especie son específicas de linaje.

**Palabras clave:** luz, temperatura, evolución, factor de transcripción

## ABSTRACT

---

Light and temperature are two extremely important environmental factors for plants as they regulate multiple plant processes such as growth and development. Under natural conditions, these two factors are linked, with higher temperatures occurring when light intensity is greater, and lower temperatures when light intensity is lower. Therefore, in terrestrial plants, both stimuli are integrated into the same mechanism. Although many central components of this mechanism are conserved between liverworts and angiosperms, little is known about the TFs that act downstream of this multisensory integration mechanism in both lineages.

This study focuses on inferring the transcriptional regulatory pathways that exist downstream of this integrating mechanism, experimentally validating the TFs obtained through network analysis in the species *Marchantia polymorpha* (bryophyte) and *Arabidopsis thaliana* (angiosperm). Additionally, it seeks to verify if both transcriptional regulatory pathways are conserved between the two lineages.

The results presented in this study suggest that the network analysis was successful since two TFs acting in this multisensory integration have been reported: one in *M. polymorpha* (MpBZIP4) and another in *A. thaliana* (HB40). However, further analysis is still needed to demonstrate whether the transcriptional regulatory pathways of each species are lineage-specific.

**Key words:** light; temperature; evolution; transcriptional factor

## ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS .....	III
ABREVIACIONES.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Evolución de las plantas terrestres y colonización de la superficie terrestre.....	1
1.2 Integración de luz y temperatura en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
1.3 Evolución de los mecanismos de integración de luz y temperatura .....	6
1.4 Análisis de las redes de integración multisensorial en los diferentes linajes. ....	8
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
3.1 Análisis de inferencia de redes regulatorias .....	10
3.2 Obtención de líneas mutantes.....	10
3.3 Genotipados.....	11
3.4 Cultivo de plantas.....	12
3.5 Análisis fenotípicos .....	13
3.6 Análisis estadísticos e índice de integración .....	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Las distintas redes transcripcionales dependientes de luz y temperatura en las plantas terrestres. ....	16
4.2 Factores de transcripción que pueden tener un papel en la integración de luz y temperatura en <i>M. polymorpha</i> . ....	17
4.3 Factores de transcripción que pueden tener un papel en la integración de luz y temperatura en <i>A. thaliana</i> . ....	23
5. DISCUSIÓN .....	33
6. CONCLUSIONES .....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Evolución de las plantas terrestres y colonización de la superficie terrestre

La colonización de la superficie terrestre por parte de los organismos fotosintéticos hace aproximadamente unos 490 millones de años, fue uno de los eventos más importantes para la evolución de la vida en la tierra (Donoghue et al., 2021a). Esta colonización trajo múltiples consecuencias en la atmósfera y biosfera terrestre, afectando al ciclo hidrológico, variando el balance energético y la química atmosférica, complejizando así los ciclos biogeoquímicos (Dahl & Arens, 2020; Donoghue et al., 2021b).

La diversificación de las plantas antes y después de la colonización de la superficie terrestre ha tenido una vital importancia para todos los sistemas presentes en la Tierra. Desde el punto de vista taxonómico, las plantas han divergido enormemente y en conjunto forman el clado Chloroplastida, compuesto por clorofitas y estreptofitas (de Vries & Archibald, 2018). En las primeras se incluyen una gran diversidad de algas marinas, con una amplia diversidad morfológica, desde organismos unicelulares hasta colonias multicelulares (L. Fang et al., 2017). En el segundo grupo en cambio, en las algas estreptofitas, el cual es un grupo parafilético, se engloban algunas algas de aguas dulces, o salobres, también llamadas algas carofitas y las plantas terrestres o embriofitas (Fürst-Jansen et al., 2020). Dentro de las algas encontramos la clase Zygnematophyceae, la cual es el pariente más cercano a las plantas terrestres, teniendo una posición importante en el árbol filogenético de las estreptofitas, estas se caracterizan por su tipo de reproducción sexual en la que la formación del cigoto se da por conjugación, sin la presencia de gametos flagelados (Zhou & Von Schwanberg, 2020). Finalmente, dentro de las plantas terrestres encontramos dos grandes grupos monofiléticos: las briofitas y las traqueofitas o plantas vasculares (Liu et al., 2022).

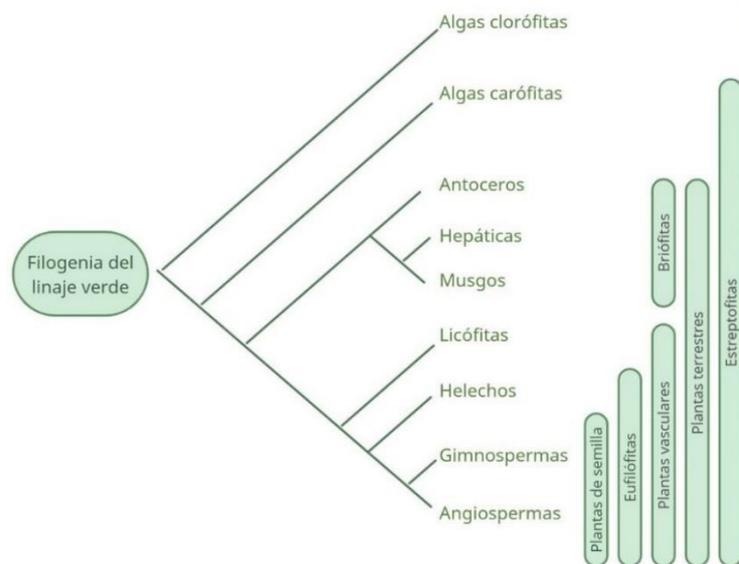
La colonización de la tierra fue posible gracias a la evolución de mecanismos reguladores los cuales facilitaron esta transición del medio acuático al medio terrestre y permitieron a las plantas sobrevivir en nuevos hábitats (Vermeij, 2017). Algunas de las algas carofitas desarrollaron varias adaptaciones bioquímicas y fisiológicas que permitieron que dicha transición fuese posible (de Vries & Archibald, 2018). Algunas de estas adaptaciones que se mencionan para hacer frente a factores como alta irradiación o

la sequía, están relacionadas con la biología de los plastidios. Se comprobó que, durante las respuestas a estrés, tanto en algas estreptofitas, como en plantas terrestres, los genes con mayor regulación diferencial se encontraban los relacionados con la biología de plastidios. Con esto se puede ver como algunas de las adaptaciones que permitieron a los organismos estreptofitos colonizar la superficie terrestre fue una respuesta afinada a los factores estresantes de los plastidios (De Vries et al., 2018). En condiciones de estrés, se induce una comunicación cloroplasto-núcleo que activan respuestas aclimatadoras, por ejemplo, la síntesis de ácido abscísico (ABA), cuya síntesis se inicia en los cloroplastos y es fundamental para la respuesta celular a la sequía y al exceso de luz (Zhao et al., 2019). Como se observa, la evolución de las redes de señalización hormonal así como las interacciones entre estas jugaron un papel fundamental en la colonización de la superficie terrestre, ya que las interacciones defensa-crecimiento o estrés biótico-abiótico suelen estar mediadas por interacciones hormonales. Se observó también que los elementos centrales de estas redes e interacciones suelen estar muy conservadas en las plantas terrestres (Berens et al., 2017). A parte de estas adaptaciones que precedieron la colonización de la superficie terrestre, fue el desarrollo de relaciones simbióticas con otros organismos como hongos y bacterias, los que ayudaron a que esta colonización fuese posible. Estos simbioses han coevolucionado con sus huéspedes favoreciéndoles el crecimiento ya que les facilitan la adquisición de nutrientes escasos, a pesar de las distancias evolutivas entre ambos organismos, las interacciones micorrícicas o las fijadoras de nitrógeno poseen características altamente conservadas asociadas a la colonización de las raíces de la planta (Martin et al., 2017). Además, también se adquirieron mecanismos de defensa para proteger los tejidos vegetales de patógenos microbianos, por ejemplo, el musgo *Physcomitrium patens* percibe patrones moleculares asociados a patógenos y mediante receptores en la membrana plasmática, activa cascadas de señalización que inducen la expresión de genes que codifican proteínas con funciones de resistencia de la planta (Ponce de León & Montesano, 2017). Una vez que la superficie de la tierra fue colonizada, las plantas desarrollaron algunas innovaciones morfológicas que les permitieron un mejor desarrollo en nuevos hábitats, en primer lugar, la aparición de una fase gametofítica haploide y una fase esporofítica diploide, ambas fases multicelulares. En la fase haploide del ciclo de vida de la planta aparecen formas multicelulares con crecimiento apical y múltiples ejes de crecimiento, en cuanto a la fase diploide, los esporofitos axiales multicelulares fueron una

innovación temprana que impulsó la posterior diversificación de formas ramificadas indeterminadas (Harrison et al., 2017).

Una vez que las plantas colonizaron la superficie terrestre, estas siguieron un proceso evolutivo, hasta diversificar en diferentes grupos, cada uno de ellos presenta características únicas que los diferencian del resto (Pellicer et al., 2018). Las primeras en divergir fueron las briófitas, un grupo monofilético formado por antoceros, musgos y hepáticas (Puttick et al., 2018), las cuales poseen cuerpos vegetales organizados en talos aplanados o bien en tejidos ramificados, estas carecen de raíces pero poseen rizoides filamentosos los cuales anclan las plantas al sustrato (Budke et al., 2018). La absorción de nutrientes y agua se realiza a través de la superficie de los gametófitos sobre el suelo, estas no poseen vasculatura, aunque algunas briófitas realizan transporte interno mediante células conductoras. En cuanto a su ciclo de vida, la fase de esporofito diploide es relativamente discreta en comparación con la fase gametofítica, este esporofito está unido al gametofito materno, dependiendo nutricionalmente de éste durante toda su vida (Horn et al., 2021). Por lo que respecta a las plantas vasculares o traqueofitas, éstas fueron ramificando hasta formar diferentes grupos, que en su conjunto forman un grupo monofilético. Las primeras en divergir fueron las plantas licofitas, estas son las plantas más similares a las primeras plantas vasculares, por lo que son de gran importancia para estudiar las innovaciones que surgieron en los ancestros de las plantas, poseen formas de crecimiento que varían mucho entre ellas (Spencer et al., 2021), y se caracterizan por poseer microfílas, hojas de pequeño tamaño con una sola vena no ramificada y sin espacios foliares (Fernández, 2018). Por lo que al grupo de las eufilofitas respecta, este grupo está formado por helechos y plantas con semilla, este grupo ya posee verdaderas hojas, en cuanto a los helechos, comprende un grupo de unas 12000 especies (Y. Fang et al., 2022), y se caracterizan por su capacidad de colonizar un gran cantidad de ecosistemas, y por el tamaño de su genoma, así como el gran número de cromosomas que poseen el cual se hipotetiza que es causa de repetidas rondas de duplicaciones genómicas (Marchant et al., 2021). Para finalizar con las plantas con semilla, estas se dividen en dos grupos, las angiospermas y las gimnospermas, las gimnospermas son un linaje de plantas sin flor, que representan cuatro de los cinco grupos de plantas con semilla existentes, incluyendo coníferas, cícadas, ginkos y gnetófitos (Wan et al., 2018). Las diferencias más notables entre ambos grupos se dan a nivel morfológico, las flores son la principal innovación

funcional de las angiospermas, además estas desarrollaron un método más eficiente de transporte de agua a través de vasos, por último, las rutas de síntesis de algunos productos del metabolismo secundario, como la biosíntesis de terpenos o diferentes rutas de biosíntesis de alcaloides, evolucionaron de manera paralela en ambos grupos (De La Torre et al., 2020).



**Figura 1:** Árbol filogenético del linaje Chloroplastida.

Como se observa en la figura 1, esta gran diversificación en las plantas es la

consecuencia a su adaptación a diferentes hábitats, con entornos muy diferentes y cambiantes, por lo que la capacidad de percibir señales del entorno como la luz o la temperatura, fue de extrema importancia para la óptima colonización del medio terrestre.

## 1.2 Integración de luz y temperatura en *Arabidopsis thaliana*

En las plantas terrestres, la luz y la temperatura son factores ambientales de los más importantes ya que regulan algunos procesos de la planta como su crecimiento y desarrollo. En condiciones naturales, la luz va ligada a temperaturas más cálidas, mientras que la oscuridad se acompaña de temperaturas más frías, lo que sugiere que la interpretación de ambas señales pueden estar también estrechamente relacionadas (Qi et al., 2022).

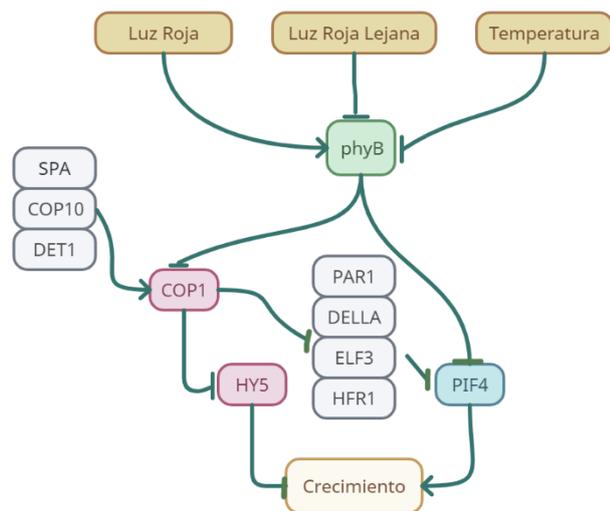
Los fitocromos son unos de los fotorreceptores que regulan más aspectos del desarrollo de la planta. Existen cinco tipos de fitocromos en angiospermas, que se nombran de phyA al phyE, siendo phyA y phyB los dos mejor caracterizados (Legris et al., 2019). En *A. thaliana*, el primer punto de integración entre luz y temperatura es precisamente phyB, ya que es capaz de detectar variaciones tanto en luz como en temperatura. La percepción de la luz la consigue porque presenta dos formas: la inactiva (Pr), y la activa (Pfr); el paso de Pr a Pfr es estimulado por la longitud de onda del rojo,

mientras que la transición opuesta se estimula por el rojo lejano. Además, el aumento de la temperatura también provoca una reversión Pfr →Pr, permitiendo de esta manera una percepción térmica a través del cambio de proporción Pr/Pfr determinado por la temperatura ambiental (Burgie et al., 2023; Jung et al., 2016; Legris et al., 2016).

Aguas abajo de este receptor existen diferentes componentes que en conjunto integran estas señales en la planta. Esta integración multisensorial ayuda a optimizar la arquitectura de la planta al entorno y ayuda a evitar la ambigüedad que tiene lugar cuando un solo indicio no proporciona suficiente información para especificar el entorno en el que se encuentra la planta (Casal & Quësta, 2018). El circuito genético central que integra las dos señales lo compondrían, además de phyB, el PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) y un módulo formado por CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) y ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5). Las dinámicas de acumulación y localización de estos componentes centrales dependen de las condiciones de luz y temperatura (Legris et al., 2017). Estas respuestas adaptativas de las plantas a la luz, implican la asociación regulada de phyB con los componentes mencionados, como por ejemplo, la interacción en *A. thaliana* del fitocromo B (AtphyB) con el motivo APB de los PIF (AtPIF) (Golonka et al., 2019).

PIF4 es un factor transcripcional (FT) bHLH que actúa como regulador negativo clave en la fotomorfogénesis (Y. Xu & Zhu, 2021). La familia de FTs a la que pertenece poseen tanto el dominio de interacción con el DNA bHLH, como el motivo APB de unión a phyB anteriormente mencionado (Legris et al., 2017). Los mutantes *pif4* muestran características como cotiledones expandidos o hipocótilos muy cortos, mientras que la sobreexpresión de *PIF4* da lugar a hipocótilos y peciolo largos además de la activación de genes reguladores de la etiolación, demostrando el rol regulador de los PIF, en específico de PIF4 en el crecimiento del hipocótilo controlado por luz (Gangappa et al., 2017). Por lo que respecta a la otra rama del núcleo de señalización, como se ha mencionado anteriormente está formado principalmente por HY5 y COP1, el primero es un factor de transcripción bZIP, que actúa como regulador maestro capaz de unirse a los promotores de miles de genes, regulando una amplia diversidad de respuestas, este interactúa físicamente con COP1, el cual es un regulador negativo de la fotomorfogénesis esta interacción regula no solo a los fotorreceptores, sino también efectores posteriores (Bhatnagar et al., 2020; D. Xu, 2020). COP1 es una ubiquitina

ligasa que al ubiquitinar y mandar a degradar diferentes sustratos por el proteasoma regulando así aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta (Ponnu & Hoecker, 2021). Cuando al phyB se encuentra en forma activa, activado por la luz roja, este inactiva a la ubiquitina ligasa COP1, mediante el bloque de la unión COP1-SPA1 en el núcleo, esta inactivación permite a su vez, la estabilización de HY5, dando paso así a la fotomorfogénesis. En condiciones de baja intensidad lumínica, phyB se encuentra en forma inactiva, por lo que no puede bloquear la acción de la ubiquitina ligasa COP1, que se une a HY5 y lo degrada, bloqueando la fotomorfogénesis (Bhatnagar et al., 2020). La temperatura también puede jugar un papel importante en este proceso, en condiciones de bajas temperaturas, se induce la translocación de COP1 del núcleo al citoplasma, dando lugar a una estabilización de HY5 y se inducen a parte de la expresión de genes que promueven la fotomorfogénesis, la expresión de genes de respuesta a frío (Bian et al., 2022) (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema del circuito central de integración de luz y temperatura en angiospermas

### 1.3 Evolución de los mecanismos de integración de luz y temperatura

Como se ha visto, en *A. thaliana* este mecanismo de integración de luz y temperatura está muy bien caracterizado y estudiado, no es así en el caso de las briófitas y otros linajes de plantas terrestres, por lo que aún faltan muchos detalles por descubrir de cómo estos mecanismos evolucionaron hasta el complejo proceso que integra luz y temperatura en las angiospermas. Aunque muchos de los componentes de este mecanismo estén presentes en briófitas, aún se investiga si sus funciones están conservadas. Se ha descrito que en la briófitas *Marchantia polymorpha*, solamente existe un gen fitocromo MpPHY, y solamente un gen *PIF*, MpPIF, el primero es estable a la luz y se induce su translocación al núcleo cuando es irradiada con luz roja o roja lejana, una vez translocado, este regula la germinación de las gemas, además de regular la

expresión de un gran número de genes para adaptarse a ambientes luminosos cambiantes. Por lo que respecta a MpPIF, éste, al igual que en *A. thaliana*, actúa como regulador negativo en la señalización de MpPhy (Inoue et al., 2016; Inoue, Nishihama, & Kohchi, 2019). En el musgo *P. patens* existen 4 homólogos, desde PIF1 a PIF4, y se ha demostrado que complementan la pérdida de función de PIFs en *A. thaliana* (T. Xu et al., 2020), por lo que este proceso de integración de luz parece estar conservado en las plantas terrestres.

Además de los procesos mencionados, también ha sido descrito el papel de MpPHY en la regulación de la formación de gametangióforos de forma análoga al modo de acción que poseen las angiospermas cuando son expuestas a una alta irradiancia de luz roja lejana, además de esto, cuando se mutaba el gen MpPIF, esta respuesta era abolida completamente, y cuando éste se sobreexpresaba, esta respuesta se aceleraba, estos hallazgos sugieren que las plantas ya habían adquirido esta señalización ante la irradiancia con luz roja lejana mediada por fitocromo y PIF en una etapa muy temprana de la evolución de las plantas terrestres (Inoue et al., 2019). Otro de los mecanismos que parecen estar conservados entre briófitas y angiospermas es la respuesta a luz UVB, en angiospermas, estas respuestas están reguladas por el fotoreceptor UV RESISTANCE LOCUS8 (UVR8), incluida la inducción de biosíntesis de flavonoides protectores. Se caracterizaron las respuestas de *M. polymorpha* a UVB, mediante mutaciones en los componentes de la ruta de señalización UVB y la ruta biosintética de los flavonoides, también se hicieron transgénicas que sobreexpresaban la secuencia MpUVR8 de *M. polymorpha*. Los resultados indicaron que *M. polymorpha* poseía muchos de los componentes en común con *A. thaliana*, entre los que se incluyen la producción de flavonoides absorbentes de UVB y el papel de activador central de MpHY5, esto sugiere que la inducción de flavonoides mediada por MpUVR8 es un carácter de tolerancia a UVB conservado en las plantas terrestres (Clayton et al., 2018).

Otro proceso dependiente de luz es la dormancia de los meristemos en *M. polymorpha*, este proceso está regulado por el factor de transcripción MpSPL1, cuya actividad, está regulada por el miRNA específico de hepáticas Mpo-MR13, el cual a su vez está regulado por la señalización mediada por MpPIF. En *A. thaliana*, este proceso es similar, regulado por un miRNA, MIR156, este reprime la expresión de un gen SPL diferente el cual inhibe la ramificación mediante la dormancia de meristemos axilares. Estas similitudes reflejan la conservación del mecanismo, que modula la arquitectura de

ramificación en hepáticas y angiospermas a través de la señalización luminosa. No obstante, la señalización mediada por PIF, reprime la expresión de diferentes genes miRNA con diferentes dianas *SPL*, esto se podría deber a que el mecanismo aguas debajo de PIF evolucionó de manera distinta en los dos clados (Streubel et al., 2023).

#### 1.4 Análisis de las redes de integración multisensorial en los diferentes linajes.

Estudios previos en el laboratorio en los que se compara la capacidad de integración de luz y temperatura en organismos de diferentes linajes como lo son una alga clorofita, *Ostreococcus tauri*, una alga carofita, *Mesotaenium endlicherianum*, una planta briofita *M. polymorpha*, y una planta traqueofita *A. thaliana*, indicaban que el ancestro común de la alga estreptofita acuática *M. endlicherianum* ya integraba luz y temperatura antes de la colonización de la superficie terrestre, suponiendo un antes y un después en la adaptación a nuevos entornos. Este hecho se debe a que la red molecular basada en HY5, PHY y PIF ya estaba activa para integrar conjuntamente la luz y la temperatura en el ancestro común de las plantas terrestres, y esta red también puede que sea fundamental para la integración de luz y temperatura en el alga carofita *M. endlicherianum*. En la alga clorofita *Ostreococcus tauri* esta integración conjunta de luz y temperatura no se da ya que posiblemente carece de esta red molecular (Rodríguez Marín, 2022). En plantas terrestres, al estudiar el fenotipo de integración de mutantes en PHYB, PIF4 y HY5 en las dos plantas terrestres (*A. thaliana* y *M. polymorpha*) se comprobó que ambos linajes efectúan la integración a través de un mismo circuito genético conservado. Por lo que podemos afirmar que estos componentes son fundamentales en todas las plantas terrestres y que esta sinergia en la integración de estímulos se podría tratar de una pre-adaptación que facilitaría la terrestrialización de las plantas.

Sin embargo, la identidad de los genes regulados por dicho circuito en ambos linajes son muy diferentes entre sí, indicando que durante la divergencia de ambos linajes ha habido cambios específicos de linaje tanto en las secuencias reguladoras de los genes diana (aparición y desaparición de elementos *cis* para PIF y HY5), así como la incorporación de nuevos FTs aguas abajo del circuito central de integración. La existencia de estos FTs es la hipótesis de este trabajo, y el objetivo general es identificar algunos de ellos.

## 2. OBJETIVOS

---

La luz y la temperatura son pues, dos factores capaces de controlar numerosos procesos, que además, se encuentran integrados en las plantas angiospermas como *A. thaliana*, lo que ha permitido que estas sean capaces de percibir y adaptarse de manera más eficiente a las condiciones ambientales. Este mismo mecanismo también ha sido descrito en otras especies del linaje verde como la briófito *M. polymorpha*. A partir de unos resultados de RNA-seq realizados en el laboratorio se hipotetizó, que aunque la red molecular de integración de luz y temperatura sea común para todas las plantas terrestres, los factores de transcripción (FTs) que actúan aguas debajo de esta red son específicos de cada clado. A partir de aquí, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Predecir mediante análisis de redes aquellos FTs candidatos para ser reguladores específicos de cada linaje.
- Validar experimentalmente la predicción de FTs candidatos en briófitas, a través de la planta modelo *M. polymorpha*.
- Validar experimentalmente la predicción de FTs candidatos en angiospermas, a través de la planta modelo *A. thaliana*.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1 Análisis de inferencia de redes regulatorias

El punto de partida de este trabajo fue un análisis mediante RNA-seq realizado previamente en el laboratorio (Rodríguez Marín, 2022), en el que se analizaban plantas tanto de *M. polymorpha* como de *A. thaliana* entre otras especies a 16°C y 24°C a 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica. De este análisis, se tomaron todos los genes que se encontraban desregulados, es decir, diferencialmente expresados, en cualquiera de las 4 condiciones mencionadas. Estas listas de genes desregulados se llevaron a la plataforma PlantRegMap (<http://plantregmap.gao-lab.org/>) y con la herramienta “TF Enrichment”, se buscaron factores de transcripción (FTs) los cuales tuvieran dianas significativamente sobrerrepresentadas en la lista de genes aportadas, además con el fin de acotar la lista de FTs candidatos para la especie *A. thaliana*, además de estos requisitos, solamente se escogieron aquellos FTs que además ellos mismos estaban diferencialmente expresados en el análisis de RNA-seq. Una vez conseguida esta lista de factores de transcripción, se hizo la asociación de cada uno de estos FTs con todos sus genes diana que se encontraban desregulados en el análisis de RNA-seq, para ver si estos FTs se asociaban a los genes siguiendo patrones de clusters jerárquicos, los resultados indicaron que no era así, y que estos FTs se unían a genes independientemente del cluster jerárquico al que pertenecían. Por último se realizó una red de interacción molecular para cada especie en la plataforma Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) tal y como se muestra en las figuras 3a y 3b en el apartado de resultados.

### 3.2 Obtención de líneas mutantes

En este apartado es necesario separar las líneas de mutantes de *A. thaliana* y las de *M. polymorpha*, en cuanto a las primeras, fueron cedidas por diferentes laboratorios: *myb59* y MYB59-OE (Fasani et al., 2019), *hb40* (Gonzalez-Grandio et al., 2017), *myb107-1* (Gou et al., 2017) y *jkd-4* (Bustillo-Avenidaño et al., 2018), todos ellos mutantes del ecotipo Col-0. En cuanto a las líneas mutantes de *M. polymorpha* se obtuvieron en el laboratorio mediante la técnica CRISPR-Cas9. El primer paso fue el diseño de las guías, para ello primero se importaron las secuencias de cada uno de los genes seleccionados desde la base de datos MarpolBase (<https://marchantia.info/>) a la plataforma Benchling

(<https://benchling.com>), una vez en esta plataforma se seleccionó la función CRISPR y se seleccionaron las guías en función de su posición en la secuencia, su on-target score y su off-target score tal y como se indica en la tabla 1. Una vez las guías fueron sintetizadas, estas fueron clonadas mediante Gateway en el plásmido pMpGE010 (HygR). Respecto a la transformación, esta fue mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y se utilizaron explantes de talos de ecotipo TAK1 con 2 semanas de edad cultivadas a luz continua con medio Gamborg B5 (Gamborg et al., n.d.) y 1% de fito-agar. El cocultivo se realizó durante 3 días en un matraz de Erlenmeyer con medio M51C (Kubota et al., 2013) al 2% de sacarosa y acetosiringona, todo ello en agitación. Una vez transcurridos estos 3 días, se lavaban los explantes y se cultivaban con el medio Gamborg B5 con cefotaxima e higromicina a luz continua hasta la aparición de los transformantes. Los mutantes obtenidos fueron *Mpbzip4-1*, *Mpbzip4-2*, *Mpbzip4-3*, *Mpgata2-1*, *Mpgata2-2*, *Mpwrky10-1*, *Mpwrky10-2*.

**Tabla1:** Lista de guías de RNA para mutación “knockout” mediante CRISPR-Cas9

Gen	Número de Guía	Accesión	sgRNA	On-Target score	Off-Target score	Oligo Forward	Oligo Reverse
MpBZIP4	1	Mp2g07170	aacctctccg acgccctacg	67	49	ctcgaacctctccga cgccctacg	aaacctctccgctcgg agtgggt
MpBZIP4	2	Mp2g07170	ggtgccatgta tccgacgg	77	50	ctcgggtgccatgtat ccgacgg	aaacctctccgataca tggcacc
MpWRKY10	1	Mp7g06550	cattctccaag cagaccag	70	48	ctcgattctccaagc acgaccag	aaacctctctgctgtgg agaatg
MpWRKY10	2	Mp7g06550	gcagagcagc agcagcccgg	72	48	ctcggcagagcagca gcagcccgg	aaacctctctgctgtct gctctgc
MpGATA2	1	Mp1g03950	tctccaacgag gacattgcg	67	49	ctcgtctccaacgag gacattgcg	aaacctctctctctgt tggaga

### 3.3 Genotipados

Para la comprobación de que los transformantes que se obtuvieron eran mutantes reales para el gen de estudio, se amplificó la región del gen de interés y se secuenció. El primer paso fue recolectar una muestra de talo de cada uno de los transformantes, posteriormente, se realizó una extracción de DNA genómico siguiendo un método sencillo y rápido para su obtención para el análisis mediante PCR (Edwards et al., n.d.). Éste método consiste en triturar el material vegetal con la ayuda del nitrógeno líquido, a la vez que se preparan tubos de 1,5 mL con 300 µl de isopropanol, una vez triturado el material vegetal, se añaden 400 µl de buffer de extracción TNES, se agita y

posteriormente se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto, pasado este minuto se recogen 300 µl del sobrenadante y se añaden en el tubo con isopropanol. Una vez éste paso se ha realizado, se mezclan ambos líquidos por inversión y se dejan 5 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se vuelve a centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. Por último, se elimina el sobrenadante y una vez el pellet está totalmente seco, éste se disuelve en 50 µl de agua miliQ y se cuantifica la cantidad de DNA obtenida.

Para la amplificación por PCR de la región del gen de interés, se diseñaron y sintetizaron los oligos tal y como se indica en la tabla 2. Una vez sintetizados los oligos, se realizó la propia PCR utilizando la polimerasa de alta afinidad Phusion con el buffer HF (Thermo Fisher Scientific) con tal de disminuir la tasa de error de dicha polimerasa. Una vez realizada la reacción, con el fin de aislar el segmento de interés del resto de DNA genómico, se realizó una electroforesis con un gel de agarosa 1% y una vez terminó de correr el gel, se cortó la banda y se extrajo dicha banda utilizando el kit de extracción NucleoSpin (Macherey-Nagel). Por último, el DNA obtenido después de todo este proceso fue secuenciado.

**Tabla 2:** Lista de oligos utilizados para amplificación y secuenciación del gen de interés.

Gen	Secuencia	Especificaciones
MpBZIP4	catgtgtcagctc gatgacg	Oligo forward para sgBZIP4 1 y 2
MpBZIP4	gcctttgccaccatcactgc	Oligo reverse para sgBZIP4 1 y 2
MpWRKY10	cctgtgtctgactgcctg	Oligo forward para sgWRKY10 1
MpWRKY10	caattttgggcacgaaattgg	Oligo reverse para sgWRKY10 1
MpGATA2	cgaacttcgaaccccgtaac	Oligo forward para sgGATA2 1 y 2
MpGATA2	cgagccaacaaagtgttacg	Oligo reverse para sgGATA2 1 y 2
MpWRKY10	gacgagtgcgacttccatcc	Oligo forward para sgWRKY10 2
MpWRKY10	gatccatccgccgaaggcat	Oligo reverse para sgWRKY10 2

### 3.4 Cultivo de plantas

Respecto al cultivo de las plantas de *A. thaliana*, tanto las semillas de los genotipos mutantes (*Atjkd-4*, *Atmyb107-1*, *Atmyb59* y *Athb40*), cómo de la línea sobreexpresora *AtMYB59-OX*, cómo del genotipo silvestre Col-0, fueron primeramente esterilizadas con etanol 70% y Tritón X-100 0,05% durante 15 minutos en rotación y posteriormente tratadas con etanol puro durante 5 minutos también con rotación. Pasado este proceso de esterilización, las semillas fueron cultivadas en placas con medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) con un 0,7% de fito-agar a 4°C con oscuridad

durante 3 días con tal de someterlas a un proceso de estratificación. Posteriormente, estas placas se colocaron a 20°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica durante 2 días con tal de aclimatarlas y que el proceso de germinación sea homogéneo en cada una de las condiciones. Por último, las semillas se cultivaron en sus respectivas condiciones de estudio durante 5 días para los ensayos dónde se analizaban los hipocótilos y 7 días en los ensayos dónde se analizaban las raíces, al cabo de los cuales se analizaron sus fenotipos.

En cuanto a *M. polymorpha*, se cogieron gemas tanto de genotipo silvestre TAK-1 como de cada una de las líneas de los mutantes que se generaron en el laboratorio (*Mpwrky10*, *Mpbzip4* y *Mpgata2*) con medio Gamborg B5 (Gamborg et al., n.d.) y se cultivaron durante 10 días en cada una de las condiciones de estudio para posteriormente realizar los análisis fenotípicos pertinentes.

### 3.5 Análisis fenotípicos

Para los análisis fenotípicos de *A. thaliana* se realizaron dos ensayos; en uno de ellos se analizó la longitud de los hipocótilos, mientras que en el otro ensayo se estudió la longitud de las raíces. Para el ensayo en el que se analizó la longitud de los hipocótilos se esterilizaron 400 semillas de cada genotipo y se colocaron en 4 condiciones diferentes: 100 semillas a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica, 100 semillas a 16°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , otras 100 a 24°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz, y por último 100 semillas a 16°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pasado el tiempo de cultivo especificado en el apartado de cultivo de plantas, se tomaron fotos de las plántulas y se realizaron las mediciones con ImageJ (Schneider et al., 2012). En el ensayo para el análisis de las longitudes de las raíces, el procedimiento fue muy parecido, las dos únicas diferencias radican en el número de semillas, ya que en este ensayo se esterilizaron 24 semillas por genotipo y condición, y que las placas se colocaron en vertical, facilitando así el posterior análisis de las raíces, dicho análisis también se hizo en ImageJ.

Por lo que respecta a la especie *M. polymorpha*, se analizó la superficie de los talos. Para ello, se colocaron 16 gemas por genotipo bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas (a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 24°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 16°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 10 días, pasados los cuales se tomaron

fotos de cada una de las placas con la lupa Leica DMS 1000 y se midieron las superficies de los talos con ImageJ.

### 3.6 Análisis estadísticos e índice de integración

Para el análisis estadístico, lo primero que se realizó fue recolectar cada una de las mediciones obtenidas, tanto para la superficie de los talos de *M. polymorpha*, así como el tamaño de los hipocótilos y las raíces de *A. thaliana*, en tablas de Excel que posteriormente se importaron en la plataforma R studio como input de datos. Seguidamente se realizó un análisis ANOVA unifactorial seguido de un test TurkeyHSD comparando cada uno de los mutantes con el genotipo silvestre con tal de buscar diferencias significativas, todo ello, usando la librería “*multcompView*”. Los boxplots también fueron realizados en la plataforma R studio utilizando la librería “*ggplot2*”. Para demostrar el grado de integración de luz y temperatura de cada uno de los genotipos, tanto mutantes como silvestres, se definió el índice de integración, el cual se trata del ángulo formado entre dos rectas, que corresponden a las dos temperaturas de estudio, que se forman por la unión de los valores del parámetro que se analiza (talo, hipocótilo o raíz) a diferentes condiciones lumínicas. Para facilitar el cálculo de los ángulos, se han tomado como factores las intensidades de luz, estableciendo que  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  corresponde a 0 y  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 1. Así, la pendiente de cada recta siempre será resta de la mediana de las mediciones del parámetro que se analiza a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  menos la mediana de las mediciones a  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , es decir:  $p1 = M(100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) - M(10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$ . Además, para el caso de los hipocótilos de *A. thaliana*, se pasaron las unidades de cm a mm con el fin de facilitar los cálculos de los ángulos. Una vez obtenidas ambas pendientes de las rectas, se utiliza la siguiente ecuación para obtener el ángulo formado entre ellas:

$$\alpha(^{\circ}) = \left| \text{atan} \left( \frac{p2 - p1}{1 + p2 \times p1} \right) \right| \times \frac{180}{\pi}$$

Para el error ( $\epsilon$ ) de cada uno de los ángulos, primeramente se tuvo que calcular el error individual de cada una de las condiciones, para cada genotipo del análisis, es decir, la desviación estándar de cada condición y muestra. En este caso, las pendientes se calcularon como se menciona anteriormente, como la diferencia de las medianas de las mediciones a diferentes condiciones lumínicas, por lo que el error absoluto de la diferencia de dos o más magnitudes es la suma de los errores absolutos de dichas

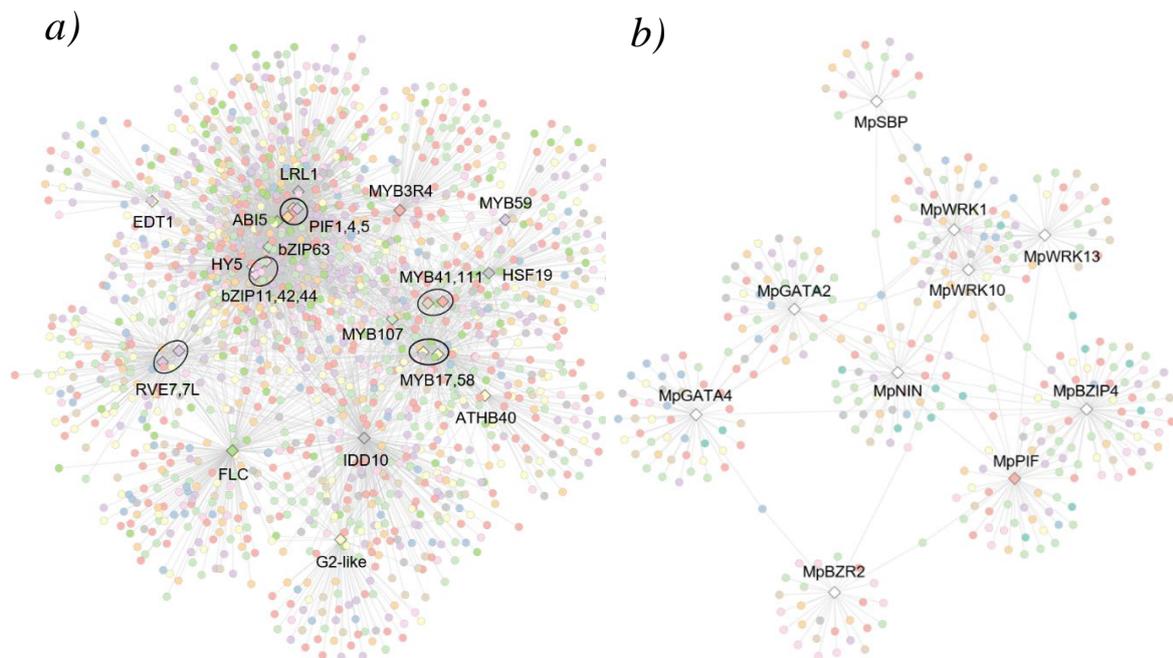
magnitudes, por lo que el error absoluto de cada pendiente se calculará como  $\varepsilon_x = \varepsilon_{100} + \varepsilon_{10}$ . Para calcular el error total, como en este caso se tendría una función con dos errores independientes y aleatorios, el que corresponde a la pendiente a 24°C, el cual llamaremos  $\varepsilon_x$ , y el que corresponde a la pendiente de las medianas a 16°C, el cual se llamará  $\varepsilon_y$ , según la fórmula general para la propagación de errores este se calcularía de la siguiente manera:

$$\varepsilon_{\alpha(^{\circ})} = \left( \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x} \varepsilon_x\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y} \varepsilon_y\right)^2} \right) \times \frac{180}{\pi}$$

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Las distintas redes transcripcionales dependientes de luz y temperatura en las plantas terrestres.

Como se ha explicado en la introducción, resultados previos en el laboratorio habían identificado genes diferencialmente expresados en respuesta a luz y temperatura en *A. thaliana* y en *M. polymorpha*. El comportamiento transcripcional de dichos genes permitía distinguir 10 agrupaciones (o clusters) distintas, y la identidad de dichos genes en ambos linajes era diferente en su gran mayoría. Estos resultados sugerían que la regulación génica aguas debajo de luz y temperatura era específica para cada linaje en plantas terrestres. Para comprobarlo, el primer paso consistió en efectuar un análisis de inferencia de redes regulatorias a partir de genes diferencialmente expresados en respuesta a luz y temperatura en *A. thaliana* y *M. polymorpha* tal y como se explica en materiales y métodos, se realizó un análisis bioinformático en el cual, del RNA-seq realizado en el laboratorio, y se buscaron los factores de transcripción (FTs) que tuvieran dianas significativamente sobrerrepresentadas en dicha lista de genes. Una vez obtenidos estos FTs, se hizo la asociación de cada uno de estos FTs con todos los genes diana que se encontraban desregulados en el análisis de RNA-seq con el fin de ver si la asociación de estos FTs a los genes dianas dependía del cluster al que pertenecen estos genes. Como se observa en la Figura 3, no existe una asociación preferente de un FT



**Figura 3:** Redes de interacción molecular aguas abajo de la regulación por luz y/o temperatura en a) *A. thaliana* y b) *M. polymorpha*, donde los círculos representan genes diana y los rombos los FTs. Los diferentes colores corresponden al cluster al que pertenece cada gen

determinado por un cluster concreto, ya que cada FT se asocia con genes diana de más de un cluster.

Cabe recordar que los requisitos de selección de FTs son diferentes para las dos especies que se analizan, siendo más laxos con la especie *M. polymorpha*, en la que se seleccionaron todos los FTs, mientras que para la especie *A. thaliana*, además de tener sus dianas sobrerrepresentadas en la lista de genes diferencialmente expresados en el análisis de RNA-seq, ellos mismos se encontraban diferencialmente expresados en dicho análisis.

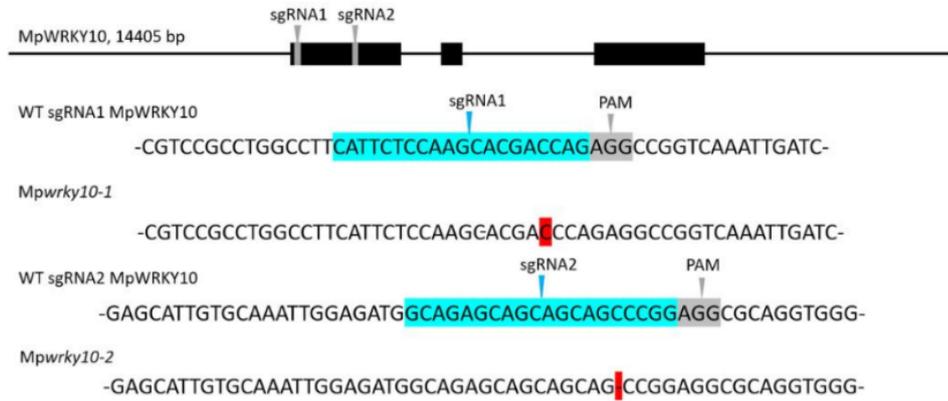
El hecho de encontrar algunos FTs los cuales ya se sabe que actúan en esta integración de luz y temperatura como es el caso de PIF 1,4 y 5 y HY5 en *A. thaliana* o MpPIF en *M. polymorpha* es un buen indicador para demostrar la robustez del análisis y que, además, puede albergar más FTs involucrados en esta integración, por lo que decidimos elegir 4 FTs candidatos para *A. thaliana* y 3 FTs candidatos en *M. polymorpha* para estudiar su posible efecto en esta integración de luz y temperatura. Los FTs seleccionados para su estudio en la planta angiosperma *A. thaliana* fueron AtMYB107, AtMYB59, AtHB40 i AtIDD10, también conocido, y a partir de ahora me referiré a él, como AtJKD. Por lo que a la briófita *M. polymorpha* respecta, se seleccionaron los FTs MpWRKY10, MpGATA2 y MpBZIP4.

#### 4.2 Factores de transcripción que pueden tener un papel en la integración de luz y temperatura en *M. polymorpha*.

Para la especie briófita *M. polymorpha*, las líneas mutantes fueron generadas mediante tecnología CRISPR-Cas9, tal y como se indica en las figuras 4, 5 y 6. Una vez generados estos mutantes, con tal de responder a la pregunta inicial y ver si cada uno de estos FTs tienen un papel en la integración de luz y temperatura en la planta, se sometieron al análisis fenotípico mencionado anteriormente, en que cada genotipo mutante se comparaba con el silvestre a diferentes condiciones de luz y temperatura con la finalidad de ver si había diferencias en la integración de las dos señales. Los resultados de estos análisis para la especie *M. polymorpha*, se presentan en los gráficos de cajas de las figuras 4, 5 y 6, donde arriba de las cajas se muestran las letras resultantes del análisis ANOVA y el posterior test TurkeyHSD realizado con tal de observar si existen diferencias significativas entre las líneas mutantes y la silvestre en cada una de las condiciones de estudio. Además de este análisis, se calculó el índice de

integración para cada genotipo tal y como se indican en la tabla 3 para la especie *M. polymorpha*.

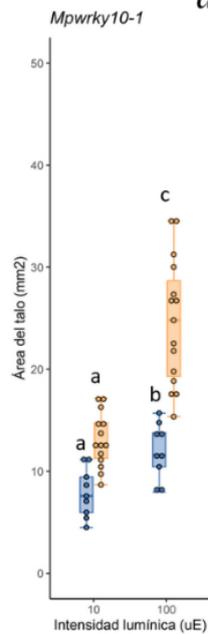
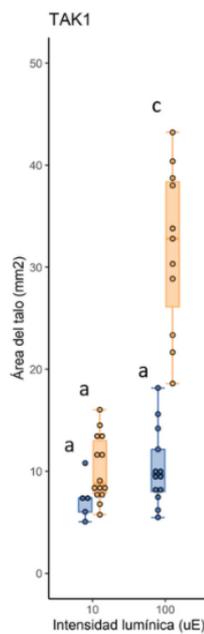
a)



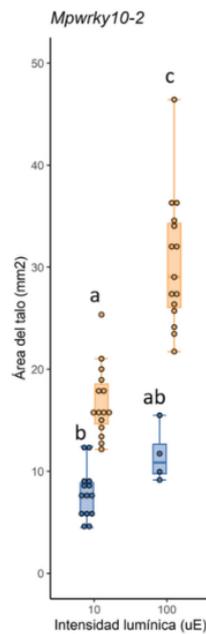
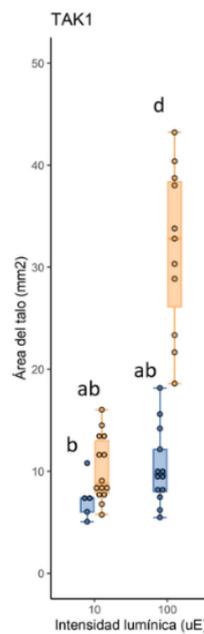
b)



c)



d)



Temperatura 16 °C ● 24 °C ●

**Figura 4:** Regulación del tamaño del talo de *M. polymorpha* mediado por *MpWRKY10* aguas abajo de luz y temperatura. a) Modelo genético de *MpWRKY10*. b) Proteína WT y proteína esperada de cada mutante. c) y d) Gráficos de caja donde se comparan las superficies de los talos del genotipo mutante y el genotipo silvestre a diferentes condiciones de crecimiento siendo c) *Mpwrky10-1* y d) *Mpwrky10-2*.

Para el gen *MpWRKY10*, se obtuvieron dos alelos utilizando dos guías diferentes. El mutante *Mpwrky10-1* presenta una inserción de una citosina mientras que el mutante *Mpwrky10-2* presenta una deleción de una timina (Figura 4a).

Los resultados del mutante *Mpwrky10-1*, indican que existe una diferencia significativa a 16°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  entre el genotipo silvestre y el mutante *Mpwrky10-1* (Figura 4c), lo que se traduce en que el índice de integración de este mutante sea bastante más grande que el índice de integración del genotipo silvestre (Tabla 3).

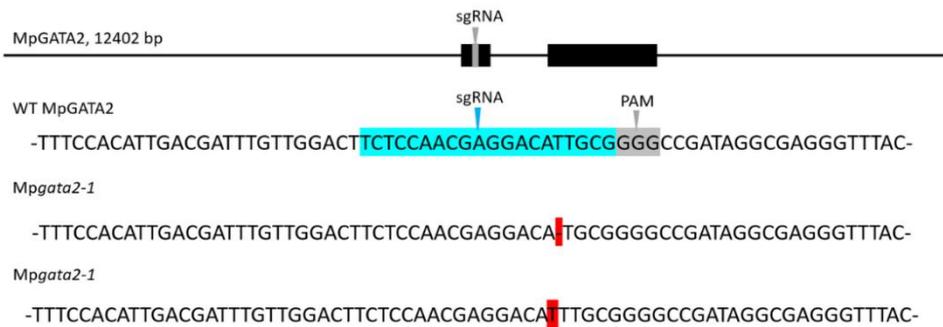
En el caso del mutante *Mpwrky10-2*, vemos que también presenta diferencias significativas respecto al genotipo silvestre a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en este caso también se traducen en una diferencia en el índice de integración respecto al genotipo silvestre, pero al contrario que en el alelo anteriormente mencionado, este índice de integración es bastante más pequeño que en el silvestre (Figura 4d).

Estos resultados de los mutantes *Mpwrky10* no son suficientes para concluir si este gen es necesario para la integración de luz y temperatura en la regulación del crecimiento del talo en la especie *M. polymorpha*.

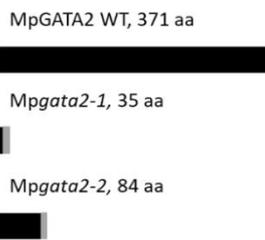
Del gen *MpGATA2* se obtuvieron dos mutantes de pérdida de función, ambos generados usando la misma guía. El alelo *Mpgata2-1* presenta una deleción en una timina, lo que rompe la pauta de lectura de la secuencia, para el segundo alelo de este mutante, *Mpgata2-2*, el caso es similar, pero en vez de una deleción es la inserción de una timina en la misma posición la que rompe la pauta de lectura de la secuencia (Figura 5a). Se sometieron estos mutantes al análisis fenotípico anteriormente explicado, donde se colocaban las plantas a diferentes condiciones de luz y temperatura, y se comparaban con el genotipo silvestre. Los resultados del análisis fenotípico del gen *MpGATA2* indicaron que para el alelo *Mpgata2-1* aunque no se ven diferencias significativas entre el genotipo mutante y el genotipo silvestre (Figura 5c), sí que existe una diferencia sustancial entre los dos índices de integración (Tabla 3).

El caso contrario ocurre con el segundo alelo, *Mpgata2-2*, el cual presenta diferencias significativas respecto el genotipo silvestre a 24°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pero estas diferencias no son notables en el índice de integración, el cual es muy similar al del genotipo silvestre (Figura 5d).

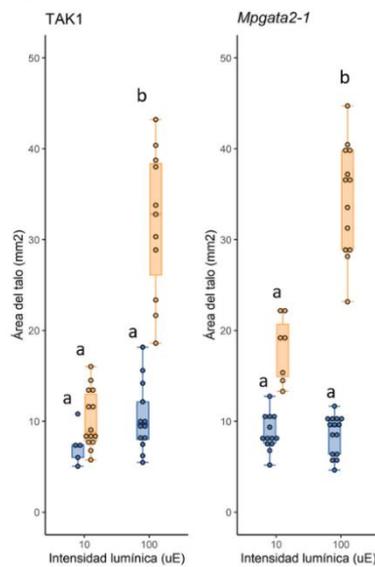
a)



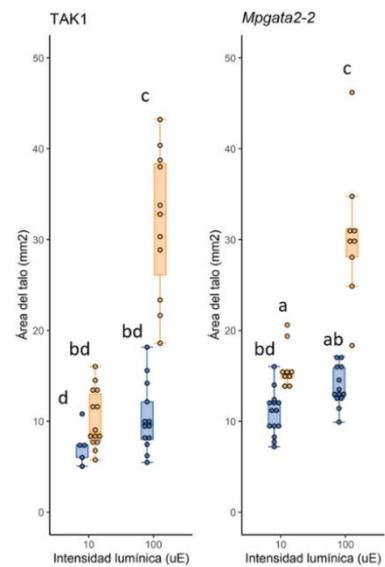
b)



c)



d)



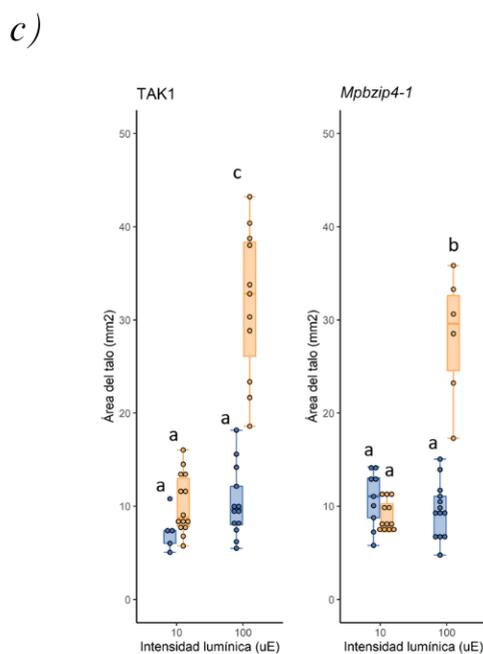
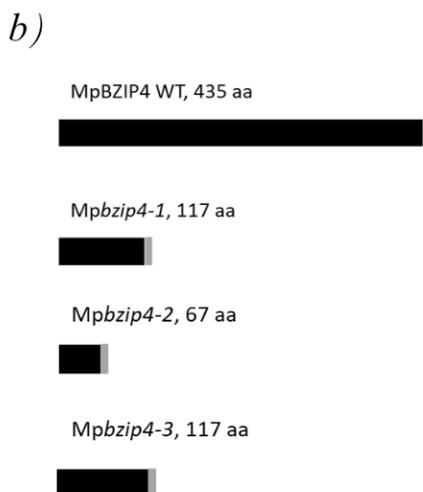
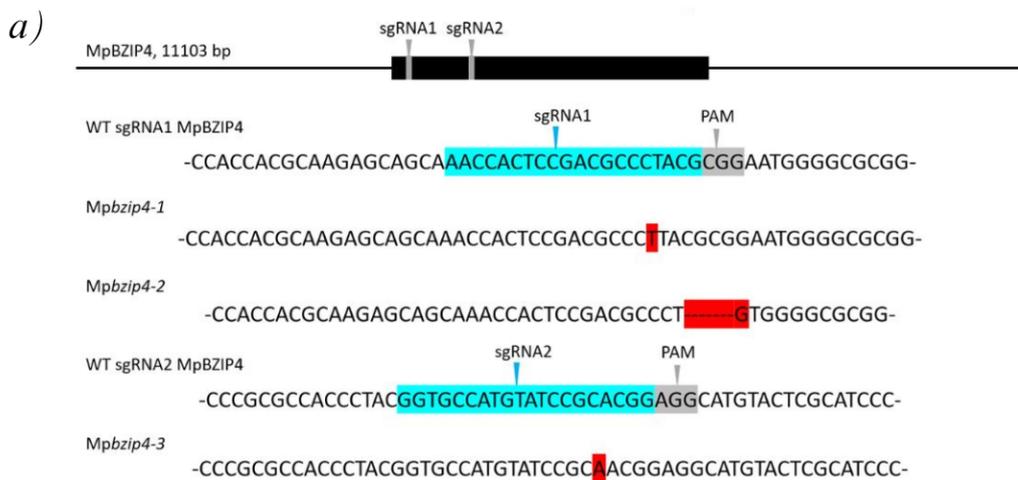
Temperatura 16 °C ● 24 °C ●

**Figura 5:** Regulación del tamaño del talo de *M. polymorpha* mediado por MpGATA2 aguas abajo de luz y temperatura. a) Modelo genético de MpGATA2. b) Proteína WT y proteína esperada de cada mutante. c) y d) Gráficos de caja donde se comparan las superficies de los talos del genotipo mutante y el genotipo silvestre a diferentes condiciones de crecimiento siendo c) *Mpgata2-1* y d) *Mpgata2-2*.

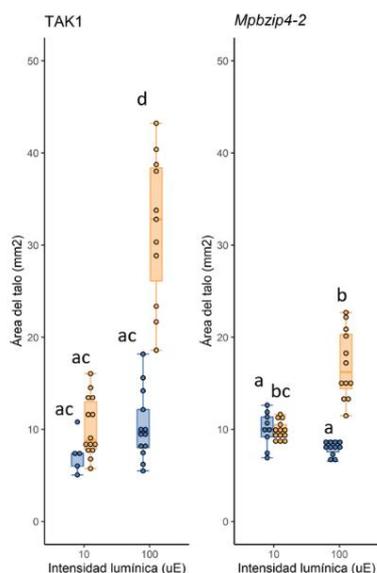
De estos resultados obtenidos, no se puede pues concluir que el gen MpGATA2 tenga una función en la correcta respuesta integrativa de luz y temperatura en el desarrollo del talo de la planta.

El último gen de *M. polymorpha* analizado fue MpBZIP4, del cual se obtuvieron 3 alelos, generados a partir de dos guías diferentes. El primer alelo, *Mpbzip4-1*, presenta una inserción de una timina, el segundo, *Mpbzip4-2* presenta una delección de 7 pb seguida de un cambio de base de una adenina por una guanosina y finalmente, *Mpbzip4-3* presenta una inserción de una adenosina (Figura 6a).

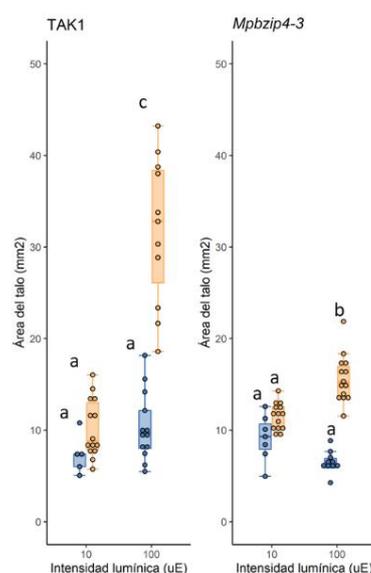
El primer alelo, *Mpbzip4-1*, presenta diferencias significativas respecto al genotipo silvestre a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 6b), además presenta un índice de integración considerablemente mayor al del genotipo silvestre (Tabla 3). El segundo alelo, *Mpbzip4-2*, presenta diferencia significativa en la misma condición que el primer alelo, a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 6c), aunque en este alelo, su índice de



d)



e)



Temperatura 16 °C ● 24 °C ●

**Figura 6:** Regulación del tamaño del talo de *M. polymorpha* mediado por MpBZIP4 aguas abajo de luz y temperatura. a) Modelo genético de MpBZIP4. b) Proteína WT y proteína esperada de cada mutante. c), d) y e) Gráficos de caja donde se comparan las superficies de los talos del genotipo mutante y el genotipo silvestre a diferentes condiciones de crecimiento siendo c) *Mpbzip4-1*, d) *Mpbzip4-2* y e) *Mpbzip4-3*

integración no es tan notorio como en los alelos *Mpbzip4-1* y *Mpbzip4-3* en los que esta diferencia respecto al genotipo silvestre es más sustancial (Tabla 3). Por último, al igual que los otros alelos, *Mpbzip4-3* presenta diferencias significativas respecto al genotipo silvestre a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 6d) además de, como ya se ha mencionado anteriormente, presentar un índice de integración considerablemente mayor al del genotipo silvestre. Este mutante, *Mpbzip4* es el que presenta resultados más llamativos en la especie *M. polymorpha* ya que todos sus alelos presentan diferencias significativas respecto el genotipo silvestre en la misma condición, a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Además, todos ellos presentan un índice de integración mayor al genotipo silvestre, aunque esto no sea tan notorio en el segundo alelo. Por lo que, observando los resultados obtenidos, parece que el gen MpBZIP4 es necesario para la correcta respuesta integrativa de luz y temperatura en el desarrollo del talo de la especie briófito *M. polymorpha*.

**Tabla 3:** Índices de integración de cada uno de los genotipos analizados para la especie *M. polymorpha* y sus errores

Genotipo	Índice de integración ( $\alpha$ )	Error del índice de integración ( $\epsilon\alpha$ )
TAK1	21,14	$\pm 0.70$
<i>Mpwrky10-1</i>	32,31	$\pm 1,03$
<i>Mpwrky10-2</i>	9,61	$\pm 1.36$
<i>Mpgata2-1</i>	32,56	$\pm 0,57$
<i>Mpgata2-2</i>	25,65	$\pm 0,42$
<i>Mpbzip4-1</i>	35,31	$\pm 0,52$
<i>Mpbzip4-2</i>	25,69	$\pm 5,14$
<i>Mpbzip4-3</i>	38,54	$\pm 3.49$

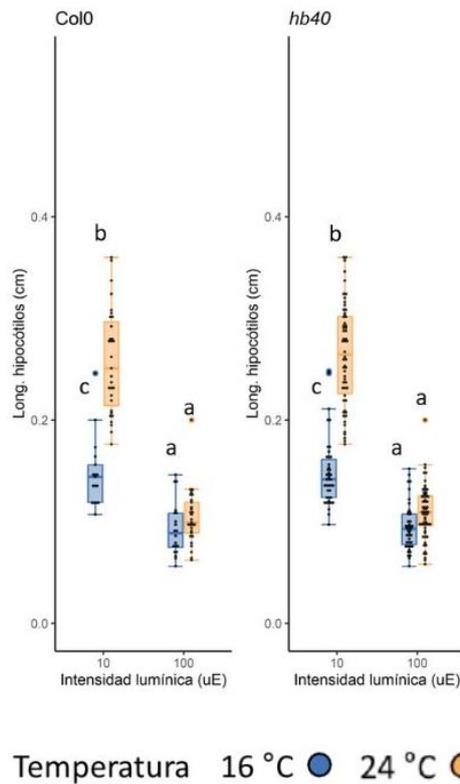
De estos análisis realizados en la planta briófito *M. polymorpha*, podemos decir que para los FT *MpWRKY10* y *MpGATA2* los resultados obtenidos no son concluyentes para decir que estos tienen un papel en la integración de luz y temperatura en la planta para regular el crecimiento del talo. En cambio, los resultados del FT *MpBZIP4* indican que es muy posible que este FT sea necesario para dicha integración de luz y temperatura en el crecimiento de la planta.

#### 4.3 Factores de transcripción que pueden tener un papel en la integración de luz y temperatura en *A. thaliana*.

Las mismas condiciones se utilizaron para los análisis fenotípicos de los diferentes genotipos de *A. thaliana*. Con el objetivo de observar si los FTs obtenidos por el análisis bioinformático realmente tenían un papel en la integración de luz y temperatura en el desarrollo de la planta, se realizaron dos ensayos diferentes para esta especie, en el primero se analizaba el crecimiento de los hipocótilos de cada uno de los genotipos en las diferentes condiciones mencionadas anteriormente, para demostrar si alguno de los mutantes tenía una respuesta diferencial. En el segundo análisis, se pretende dilucidar si cada uno de estos genes tiene una función en la integración de luz y temperatura en el crecimiento radicular de la planta. Para ello, se realizaba el mismo análisis fenotípico, en el que se medían las raíces de las plantas.

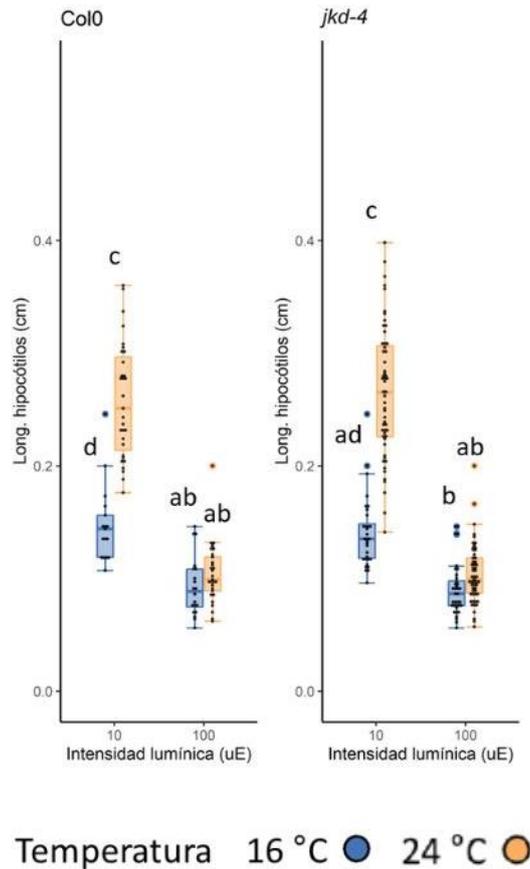
En el análisis fenotípico de los hipocótilos, el mutante *hb40* no mostró ninguna diferencia significativa respecto al genotipo silvestre (Figura 7), tampoco el valor de su índice de integración distaba mucho del obtenido para el genotipo silvestre Col-0, aunque en este ensayo fenotípico los errores del índice son tan elevados que ningún resultado de los obtenidos muestra datos que sean concluyentes (Tabla 4).

Por lo que, en este caso, los resultados obtenidos no son concluyentes, aunque todo hace indicar que este FT no participa en la integración de luz y temperatura en el desarrollo del hipocótilo.



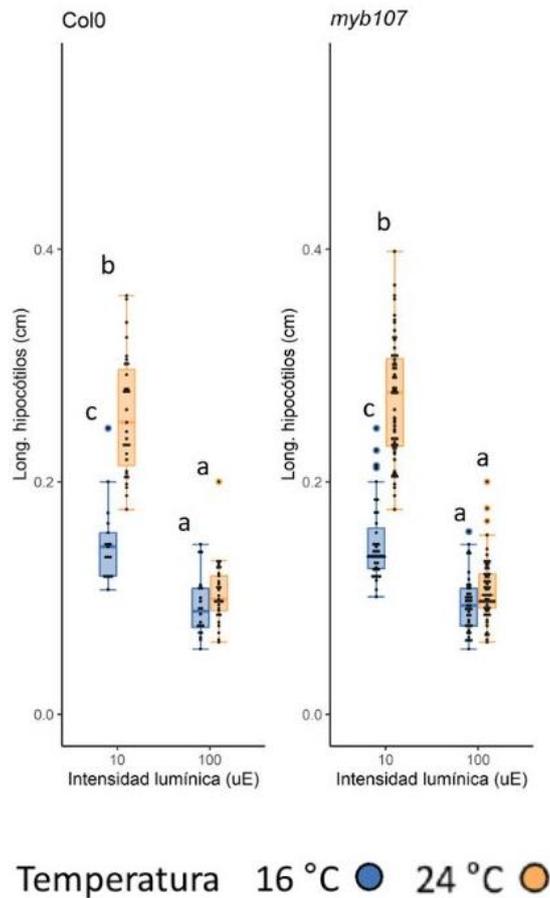
**Figura 7:** Regulación del tamaño del hipocótilo de *A. thaliana* mediado por *HB40* aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de los hipocótilos a diferentes condiciones de estudio del genotipo mutante *hb40* contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C.

Lo mismo ocurre con el mutante *jdk-4*, este no presenta diferencia alguna en el análisis fenotípico (Figura 8), y además posee un índice de integración y su error similar al de *hb40* (Tabla 4), por lo que este resultado no es concluyente, aunque como en el caso anterior, todo hace indicar que *JKD* no tiene participación en la integración de luz y temperatura en el crecimiento del hipocótilo.



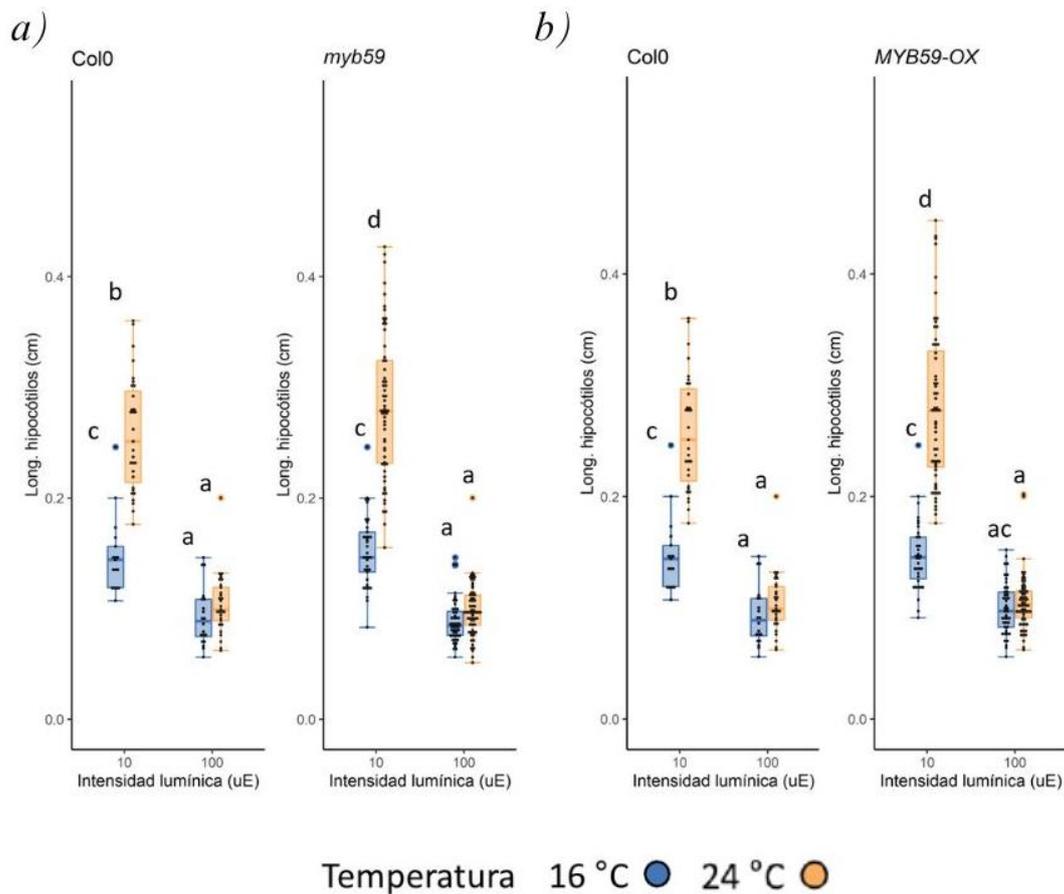
**Figura 8:** Regulación del tamaño del hipocótilo de *A. thaliana* mediado por JKD aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de los hipocótilos a diferentes condiciones de estudio del genotipo mutante *jkd-4* contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C.

El mutante *myb107*, tampoco presenta diferencias significativas respecto al genotipo silvestre (Figura 9), aunque en este caso presenta un índice de integración sustancialmente mayor al del genotipo silvestre, pero como también hemos visto en los casos anteriores, el tamaño del error no permite obtener resultados concluyentes, por lo que este análisis no permite dilucidar si *MYB107* tiene una función en la integración de luz y temperatura para el crecimiento del hipocótilo.



**Figura 9:** Regulación del tamaño del hipocótilo de *A. thaliana* mediado por MYB107 aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de los hipocótilos a diferentes condiciones de estudio del genotipo mutante *myb107* contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C

El último de los mutantes de pérdida de función, *myb59*, es el único de ellos que sí presenta diferencias significativas en el análisis fenotípico a 24°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 10), aunque el índice de integración de este mutante y su error es el más bajo de todos (Tabla 4). De este gen también se obtuvo su línea sobreexpresora, MYB59-OX, esta línea, al igual que el mutante de pérdida de función presentaba diferencias significativas respecto al genotipo silvestre en la misma condición, 24°C y 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aunque en este caso el índice de integración obtenido es notablemente mayor que en el caso del mutante *myb59*.

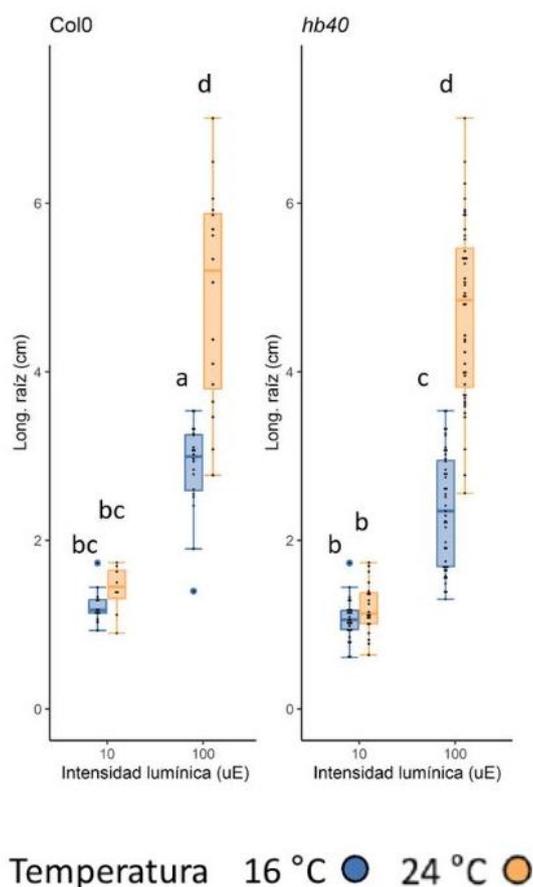


**Figura 10:** Regulación del tamaño del hipocótilo de *A. thaliana* mediado por MYB59 aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de los hipocótilos a diferentes condiciones de estudio del a) genotipo mutante *myb59* y b) el genotipo sobreexpresor de MYB59 contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C

Observando los resultados en conjunto obtenidos tanto para el mutante de pérdida de función como la línea sobreexpresora del FT MYB59, se observa como a pesar de que ambas líneas presenten diferencias significativas en el análisis fenotípico, los resultados obtenidos en su índice de integración no son concluyentes como para afirmar que este FT juega un papel en la integración de luz y temperatura en el desarrollo del hipocótilo en la planta angiosperma *A. thaliana*.

Tabla 4: Índices de integración de cada uno de los genotipos analizados para la especie <i>A. thaliana</i> y sus errores en el ensayo de hipocótilos		
Genotipo	Índice de integración ( $\alpha$ )	Error del índice de integración ( $\epsilon\alpha$ )
Col-0	27,63	$\pm 15,57$
<i>jdk-4</i>	35,05	$\pm 14,87$
<i>hb40</i>	34,80	$\pm 13,16$
<i>myb107</i>	40,02	$\pm 13,93$
<i>myb59</i>	25,35	$\pm 10,48$
MYB59-OX	40,75	$\pm 15,12$

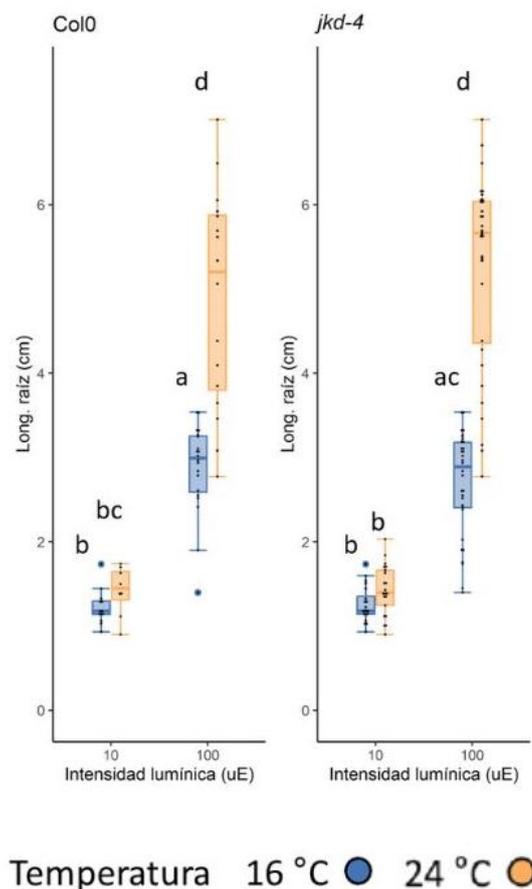
Del análisis fenotípico de los hipocótilos de la especie angiosperma *A. thaliana*, podemos extraer que estos resultados no son concluyentes para saber si los FTs que se han analizado tienen participación en la integración de luz y temperatura en el crecimiento del hipocótilo, no obstante, tanto el mutante *myb59*, como su línea sobreexpresora presentan diferencias significativas respecto al genotipo silvestre, por lo que serían necesarios más estudios para tratar de dilucidar si este FT tiene participación en dicha integración multisensorial.



**Figura 11:** Regulación del tamaño de la raíz de *A. thaliana* mediado por *HB40* aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de las raíces a diferentes condiciones de estudio del genotipo mutante *hb40* contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C

Se analizó también si estos FTs resultantes del análisis bioinformático tenían algún papel importante en la integración de luz y temperatura, además de en el desarrollo de hipocótilos, en el desarrollo del sistema radicular de la planta *A. thaliana*. Para ello, se realizó un análisis del fenotipo de las raíces de cada una de las líneas de *A. thaliana* con el objetivo de observar si estas mutaciones causan un efecto en la longitud de las mismas. Las condiciones de estudio son idénticas a las utilizadas en los otros análisis fenotípicos.

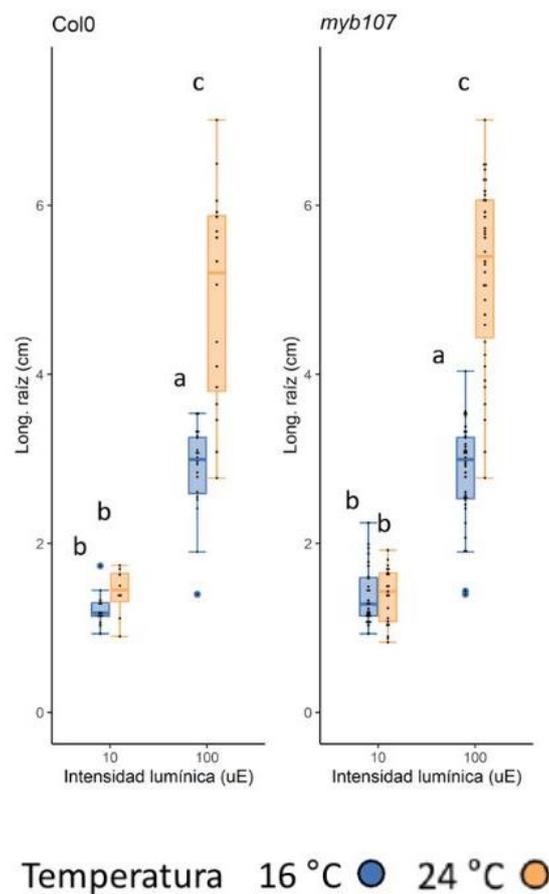
En el análisis fenotípico del genotipo mutante *hb40*, se identificaron diferencias significativas respecto el genotipo silvestre a 16°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 11), estas diferencias respecto el genotipo silvestre también tienen un efecto en el índice de integración de este genotipo, el cual es más de 2,5 veces mayor que el del genotipo silvestre y con un error notablemente bajo (Tabla 5). Por lo que, en conjunto, estos resultados pueden indicar que el FT HB40 de la planta *A. thaliana* tiene un papel en la correcta integración de luz y temperatura en su crecimiento radicular.



**Figura 12:** Regulación del tamaño de la raíz de *A. thaliana* mediado por JKD aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de las raíces a diferentes condiciones de estudio del genotipo mutante *jkd-4* contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones de estudio a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C.

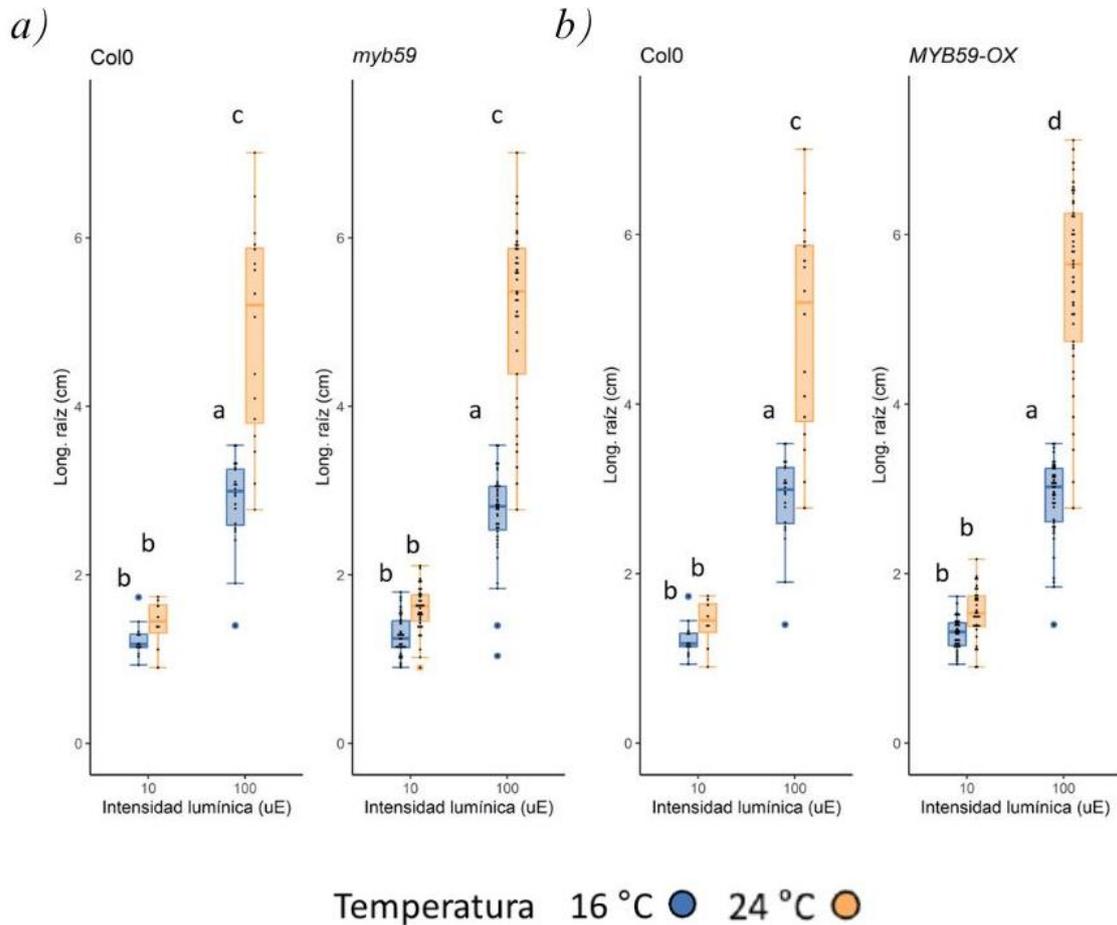
Diferente es el caso del genotipo mutante *jdk-4*, el cual no presenta diferencias significativas respecto del genotipo silvestre en el análisis fenotípico (Figura 12), pero en cambio su índice de integración es el doble que el del genotipo silvestre (Tabla 5). Por lo que estos resultados podrían indicar que, aunque la pérdida de función de este FT no tenga unas consecuencias fenotípicas tan severas como en el anterior caso, este FT sí que tiene participación en la integración de luz y temperatura en el crecimiento de la raíz de la planta *A. thaliana*.

En el caso del genotipo mutante *myb107*, este no presenta diferencia alguna con el genotipo silvestre en el análisis fenotípico (Figura 13), además, aunque su índice de integración es mayor al del genotipo silvestre (Tabla 5), estas diferencias no son tan sustanciales como en los casos anteriores. Por lo que, con los resultados obtenidos, no se puede concluir si el FT *myb107* tiene un papel en la integración de luz y temperatura en el crecimiento de las raíces de *A. thaliana*.



**Figura 13:** Regulación del tamaño de la raíz de *A. thaliana* mediado por MYB107 aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de las raíces a diferentes condiciones de estudio del genotipo mutante *myb107* contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C.

El último FT analizado en este ensayo fenotípico fue el MYB59, tanto la línea de pérdida de función *myb59* como la línea sobreexpresora MYB59-OX. La línea de pérdida de función no presentaba diferencias significativas en el análisis fenotípico



**Figura 14:** Regulación del tamaño de la raíz de *A. thaliana* mediado por MYB59 aguas abajo de luz y temperatura. Gráficos de cajas donde se comparan las longitudes de las raíces a diferentes condiciones de estudio del a) genotipo mutante *myb59* y b) el genotipo sobreexpresor de MYB59 contra el genotipo silvestre. En naranja se representan las mediciones a 24°C mientras que en azul se representan las medidas a 16°C.

(Figura 13a), además de presentar un índice de integración ligeramente superior al del genotipo silvestre (Tabla 5). Por lo que respecta a la línea sobreexpresora, esta sí que presentaba diferencias significativas a 24°C y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 13b), aunque estas diferencias no se reflejan en el índice de integración, el cual es muy similar al obtenido para el genotipo silvestre.

Con los resultados obtenidos tanto del análisis fenotípico de ambos genotipos, así como de sus respectivos índices de integración, no se puede concluir que el FT MYB59 participe en la integración de luz y temperatura en el crecimiento radicular de *A. thaliana*.

De este análisis fenotípico de raíces podemos decir que los resultados de los FTs, MYB107 y MYB59 indican que estos FTs no tienen participación en la integración

multisensorial de luz y temperatura en el crecimiento radicular de la planta *A. thaliana*. Respecto al FT *JKD*, los resultados no son concluyentes para determinar su participación en esta integración, pues sus análisis fenotípicos no presentan diferencias significativas respecto el genotipo silvestre, aunque en cambio, posee un índice de integración bastante notable. Por último, los resultados obtenidos para el FT *HB40*, indican que este sí participa en la integración multisensorial, pues presenta tanto diferencias en el análisis fenotípico como diferencias en su índice de integración.

**Tabla 5:** Índices de integración de cada uno de los genotipos analizados para la especie *A. thaliana* y sus errores en el ensayo de raíces

Genotipo	Índice de integración ( $\alpha$ )	Error del índice de integración ( $\epsilon\alpha$ )
Col-0	13.86	$\pm 3.85$
<i>jdk-4</i>	27.38	$\pm 2.17$
<i>hb40</i>	36.08	$\pm 3.15$
<i>myb107</i>	20.79	$\pm 1.58$
<i>myb59</i>	20.37	$\pm 2.21$
MYB59-OX	17.22	$\pm 1.55$

## 5. DISCUSIÓN

---

La principal razón que motivó este trabajo fue la de identificar posibles nuevos factores de transcripción aguas abajo de la integración multisensorial de luz y temperatura en dos linajes divergentes de embriofitas, como lo son las angiospermas y las briófitas, cuyo ancestro común fueron las primeras plantas terrestres. Resultados previos en el laboratorio indicaban que esta segunda línea de integración, es decir que actúa aguas abajo de la red de integración de luz y temperatura, en plantas incluye elementos específicos de linaje. Aunque no se abordó este tema en profundidad, en ambas listas obtenidas del análisis bioinformático, aparecen genes homólogos como *PIF-1*, 4 y 5 de *A. thaliana* y *MpPIF* de *M. polymorpha*, aunque estas listas no se deberían comparar, pues no se han realizado con los mismos requisitos. Para poder descubrir si los FTs que actúan aguas debajo de la integración de luz y temperatura son específicos de linaje, habría que analizar cada uno de los FTs y sus homólogos en otros linajes para poder afirmarlo.

Del análisis informático realizado se obtuvo una lista de posibles FTs para la especie angiosperma *A. thaliana* y otra lista de FTs para la especie briófita *M. polymorpha*. De la primera lista, es decir de los resultados obtenidos para la especie angiosperma, se escogieron 4 FTs para realizar análisis fenotípicos. Estos FTs escogidos fueron HB40, JKD, MYB107 y MYB59. Los resultados obtenidos del FT HB40, indican que éste participa en la integración de luz y temperatura en el crecimiento radicular, pero los resultados no son concluyentes en el crecimiento del hipocótilo, por lo que en este caso existe una respuesta transcripcional multisensorial distinta en diferentes órganos de la planta, en consecuencia, HB40 se trataría de un FT específico de tejido. En la literatura ya se describe como este FT, a través de la modulación de la división celular y la distribución de auxinas en la punta de la raíz es capaz de alterar la longitud de la raíz primaria y el gravitropismo de la planta (Mora et al., 2022), además también se ha descrito su función en otros procesos como la respuesta a estrés alcalino o la detención de la floración a través de acumulación de ABA (Cao et al., 2017; Sánchez-Gerschon et al., n.d.). Los demás FTs analizados fenotípicamente para la especie *A. thaliana*, no demostraron su participación en la integración de luz y temperatura ni en el crecimiento del hipocótilo ni en el crecimiento radicular. Esto no quiere decir que no participen en dicha integración, pues pueden regular otro conjunto de genes que nada tienen que ver

con estos aspectos del desarrollo de la planta. Otra opción sería la redundancia génica, pues estos genes podrían tener parálogos que cubriesen su función en la integración multisensorial de modo que no se observen consecuencias de esta pérdida del FT en la planta, como podía ocurrir por ejemplo con el parálogo de MYB107, MYB48 (Bowman et al., 2017).

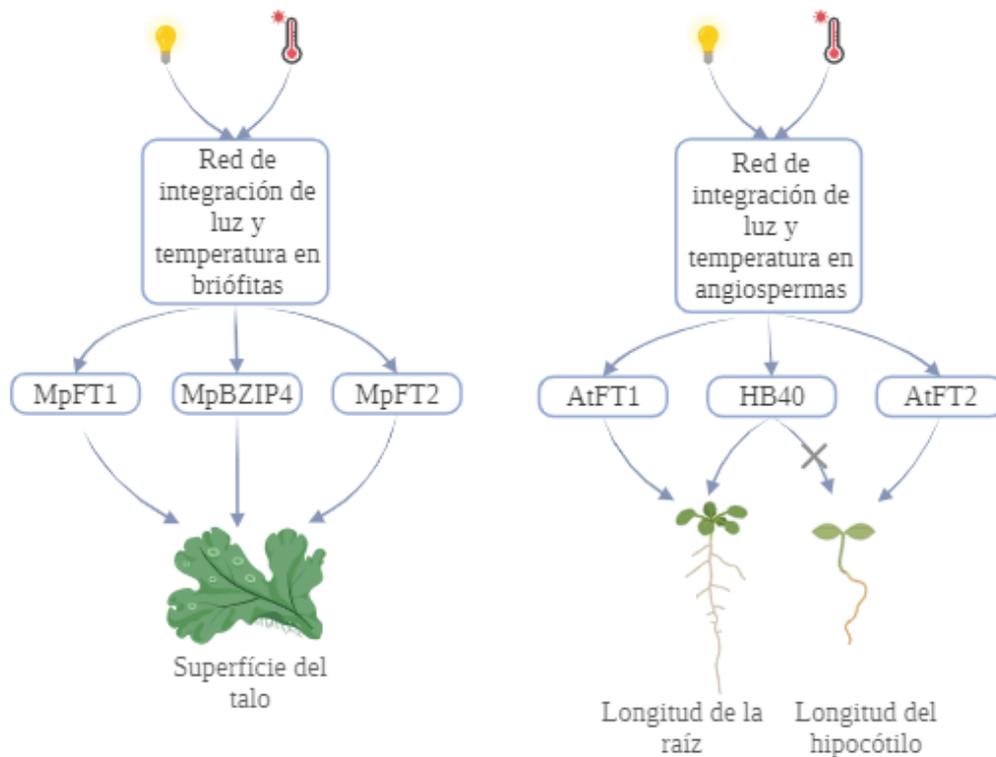
De la lista de FTs de la especie briófito *M. polymorpha*, se seleccionaron 3 FTs para realizar los análisis fenotípicos, estos fueron MpWRKY10, MpGATA2 y MpBZIP4. El único FT del que se demostró su participación en la integración multisensorial de luz y temperatura en el crecimiento del talo fue MpBZIP4, pues de sus tres alelos, todos muestran diferencias fenotípicas respecto al genotipo silvestre además de tener índices de integración mayores que el del genotipo silvestre. Esta sería la primera demostración de que el FT MpBZIP4 participa en la integración de luz y temperatura en *M. polymorpha*, pues no existe en la literatura referencias previas a este hecho, ya que es un FT del que se tiene muy poca información. No obstante, sí se describe en la literatura que su ortólogo en trigo (*Triticum aestivum*), TaGBF1, y también el ortólogo en *A. thaliana*, AtGBF1, están involucrados en la respuesta a luz azul (Mallappa et al., 2006; Sun et al., 2015). Esto supondría que este FT no es específico de linaje en la integración de luz y temperatura. De los demás FTs analizados en *M. polymorpha* ninguno de ellos demostró su participación en la integración de luz y temperatura en el crecimiento del talo de la planta, aunque esto podría deberse a las causas anteriormente mencionadas.

Con los resultados obtenidos, podemos observar que la inferencia de FTs que participan en esta integración multisensorial ha sido exitosa, pues además de los FTs que nos han salido que ya se habían descrito que participaban, se ha logrado reportar dos nuevos FTs, uno para cada especie que se ha estudiado, que participan en este proceso de integración de luz y temperatura.

Las futuras perspectivas del trabajo tratarán de, además de todos los análisis fenotípicos realizados, repetir estos análisis fenotípicos hasta un total de 3 repeticiones, a partir de las cuales se pueda llegar a establecer diferencias significativas en los índices de integración de cada uno de los genotipos mutantes y el genotipo silvestre. Además, otro análisis interesante sería realizar RNA-seq en los mutantes, pues así se podría esclarecer si los mutantes que no actúan en la integración de luz y temperatura en el crecimiento de la planta es porque estos interactúan con otro grupo de genes, por ejemplo en la ruta de biosíntesis de algún compuesto, o en cambio, estos no tienen ninguna participación en

dicha integración multisensorial. Para algunos de los FTs, sobretodo para la especie *A. thaliana*, también sería conveniente hacer análisis de homología, es decir, analizar si estos FTs poseen parálogos, pues puede haber fenómenos de redundancia génica que impiden observar efectos fenotípicos en la planta, aunque estos genes estén participando en la integración de luz y temperatura en el crecimiento de la planta.

A modo resumen (Figura 15), este trabajo ha permitido descubrir que el papel del FT HB40 en la elongación de la raíz de la especie angiosperma *A. thaliana* es dependiente de las condiciones de luz/temperatura y es necesario para la correcta integración de estas dos señales en el desarrollo de la planta. Además, también se ha descubierto el papel del FT MpBZIP4 en la integración de luz y temperatura en el crecimiento del talo de la especie briófito *M. polymorpha*. Esto implica que las redes transcripcionales que operan aguas abajo del circuito de integración de luz y temperatura poseen diferente extensión y complejidad en los diferentes linajes de plantas, y futuros análisis podrán elucidar si dichas redes transcripcionales son específicas de cada linaje.



**Figura 15:** Esquema de los nuevos reguladores de la respuesta integradora de luz y temperatura en plantas terrestres. Los MpFT y AtFT indican que los FTs encontrados (HB40 en *At* y MpZIP4 en *Mp*) no son los únicos que participan en esta integración multisensorial.

## 6. CONCLUSIONES

---

Las conclusiones que se extraen de este trabajo son:

1. El FT HB40 participa en la integración de luz y temperatura en crecimiento de la raíz en la especie angiosperma *A. thaliana* de manera específica de tejido ya que esto no ocurre en el crecimiento del hipocótilo.
2. El FT MpBZIP4 participa en la integración de luz y temperatura en el crecimiento del talo de la especie briófito *M. polymorpha*.
3. Los resultados obtenidos presuponen que las redes transcripcionales aguas abajo del mecanismo de integración de luz y temperatura presentan diferencias entre ambos linajes aunque análisis más profundos son necesarios para elucidar si estas redes son específicas de linaje.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Berens, M. L., Berry, H. M., Mine, A., Argueso, C. T., & Tsuda, K. (2017). *Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516>
- Bhatnagar, A., Singh, S., Khurana, J. P., & Burman, N. (2020). HY5-COP1: the central module of light signaling pathway. In *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 29, Issue 4, pp. 590–610). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00623-3>
- Bian, Y., Chu, L., Lin, H., Qi, Y., Fang, Z., & Xu, D. (2022). PIFs- and COP1-HY5-mediated temperature signaling in higher plants. In *Stress Biology* (Vol. 2, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00059-w>
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S. S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M. A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C. R., ... Schmutz, J. (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*, *171*(2), 287-304.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>
- Budke, J. M., Bernard, E. C., Gray, D. J., Huttunen, S., Piechulla, B., & Trigiano, R. N. (2018). Introduction to the Special Issue on Bryophytes. In *Critical Reviews in Plant Sciences* (Vol. 37, Issues 2–3, pp. 102–112). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1482396>
- Burgie, E. S., Li, H., Gannam, Z. T. K., McLoughlin, K. E., Vierstra, R. D., & Li, H. (2023). The structure of *Arabidopsis* phytochrome A reveals topological and functional diversification among the plant photoreceptor isoforms. *Nature Plants*, *9*(7), 1116–1129. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01435-8>
- Bustillo-Avenidaño, E., Ibáñez, S., Sanz, O., Barros, J. A. S., Gude, I., Perianez-Rodríguez, J., Micol, J. L., del Pozo, J. C., Moreno-Risueno, M. A., & Pérez-Pérez, J. M. (2018). Regulation of hormonal control, cell reprogramming, and patterning during de novo root organogenesis. *Plant Physiology*, *176*(2), 1709–1727. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00980>
- Cao, L., Yu, Y., Ding, X., Zhu, D., Yang, F., Liu, B., Sun, X., Duan, X., Yin, K., & Zhu, Y. (2017). The Glycine soja NAC transcription factor GsNAC019 mediates the regulation of plant alkaline tolerance and ABA sensitivity. *Plant Molecular Biology*, *95*(3), 253–268. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0643-3>
- Casal, J. J., & Qüesta, J. I. (2018). Light and temperature cues: multitasking receptors and transcriptional integrators. In *New Phytologist* (Vol. 217, Issue 3, pp. 1029–1034). <https://doi.org/10.1111/nph.14890>
- Clayton, W. A., Albert, N. W., Thrimawithana, A. H., McGhie, T. K., Derolles, S. C., Schwinn, K. E., Warren, B. A., McLachlan, A. R. G., Bowman, J. L., Jordan, B. R., & Davies, K. M. (2018). UVR8-mediated induction of flavonoid biosynthesis

- for UVB tolerance is conserved between the liverwort *Marchantia polymorpha* and flowering plants. *Plant Journal*, 96(3), 503–517. <https://doi.org/10.1111/tpj.14044>
- Dahl, T. W., & Arens, S. K. M. (2020). The impacts of land plant evolution on Earth's climate and oxygenation state – An interdisciplinary review. *Chemical Geology*, 547. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119665>
- De La Torre, A. R., Piot, A., Liu, B., Wilhite, B., Weiss, M., & Porth, I. (2020). Functional and morphological evolution in gymnosperms: A portrait of implicated gene families. In *Evolutionary Applications* (Vol. 13, Issue 1, pp. 210–227). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/eva.12839>
- de Vries, J., & Archibald, J. M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist*, 217(4), 1428–1434. <https://doi.org/10.1111/nph.14975>
- De Vries, J., Curtis, B. A., Gould, S. B., & Archibald, J. M. (2018). Embryophyte stress signaling evolved in the algal progenitors of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), E3471–E3480. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719230115>
- Donoghue, P. C. J., Harrison, C. J., Paps, J., & Schneider, H. (2021a). The evolutionary emergence of land plants. In *Current Biology* (Vol. 31, Issue 19, pp. R1281–R1298). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.038>
- Donoghue, P. C. J., Harrison, C. J., Paps, J., & Schneider, H. (2021b). The evolutionary emergence of land plants. In *Current Biology* (Vol. 31, Issue 19, pp. R1281–R1298). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.038>
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (n.d.). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 19, Issue 6).
- Fang, L., Leliaert, F., Zhang, Z. H., Penny, D., & Zhong, B. J. (2017). Evolution of the Chlorophyta: Insights from chloroplast phylogenomic analyses. In *Journal of Systematics and Evolution* (Vol. 55, Issue 4, pp. 322–332). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1111/jse.12248>
- Fang, Y., Qin, X., Liao, Q., Du, R., Luo, X., Zhou, Q., Li, Z., Chen, H., Jin, W., Yuan, Y., Sun, P., Zhang, R., Zhang, J., Wang, L., Cheng, S., Yang, X., Yan, Y., Zhang, X., Zhang, Z., ... Yan, J. (2022). The genome of homosporous maidenhair fern sheds light on the euphyllophyte evolution and defences. *Nature Plants*. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01222-x>
- Fasani, E., DalCorso, G., Costa, A., Zenoni, S., & Furini, A. (2019). The *Arabidopsis thaliana* transcription factor MYB59 regulates calcium signalling during plant growth and stress response. *Plant Molecular Biology*, 99(6), 517–534. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00833-x>
- Fernández, H. (2018). Current advances in fern research. In *Current Advances in Fern Research*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0>

- Fürst-Jansen, J. M. R., De Vries, S., De Vries, J., & De Vries, J. (2020). Evo-physio: On stress responses and the earliest land plants. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Issue 11, pp. 3254–3269). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa007>
- Gamborg, L., Miller, R. A., & OJIMA, K. (n.d.). *NUTRIENT REQUIREMENTS OF SUSPENSION CULTURES OF SOYBEAN ROOT CELLS*.
- Gangappa, S. N., Berriri, S., & Kumar, S. V. (2017). PIF4 Coordinates Thermosensory Growth and Immunity in Arabidopsis. *Current Biology*, 27(2), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.012>
- Golonka, D., Fischbach, P., Jena, S. G., Kleeberg, J. R. W., Essen, L. O., Toettcher, J. E., Zurbriggen, M. D., & Möglich, A. (2019). Deconstructing and repurposing the light-regulated interplay between Arabidopsis phytochromes and interacting factors. *Communications Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0687-9>
- Gonzalez-Grandio, E., Pajoro, A., Franco-Zorrilla, J. M., Tarancon, C., Immink, R. G. H., & Cubas, P. (2017). Abscisic acid signaling is controlled by a BRANCHED1/HD-ZIP i cascade in Arabidopsis axillary buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(2), E245–E254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613199114>
- Gou, M., Hou, G., Yang, H., Zhang, X., Cai, Y., Kai, G., & Liu, C. J. (2017). The MYB107 transcription factor positively regulates suberin biosynthesis. *Plant Physiology*, 173(2), 1045–1058. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01614>
- Honkanen, S., Thamm, A., Arteaga-Vazquez, M. A., & Dolan, L. (2018). *Negative regulation of conserved RSL class I bHLH transcription factors evolved independently among land plants*. <https://doi.org/10.7554/eLife.38529.001>
- Horn, A., Pascal, A., Lončarević, I., Volpato Marques, R., Lu, Y., Miguel, S., Bourgaud, F., Thorsteinsdóttir, M., Cronberg, N., Becker, J. D., Reski, R., & Simonsen, H. T. (2021). Natural Products from Bryophytes: From Basic Biology to Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(3), 191–217. <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1911034>
- Inoue, K., Nishihama, R., Araki, T., & Kohchi, T. (2019). Reproductive induction is a far-red high irradiance response that is mediated by phytochrome and phytochrome interacting factor in marchantia polymorpha. *Plant and Cell Physiology*, 60(5), 1136–1145. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz029>
- Inoue, K., Nishihama, R., Kataoka, H., Hosaka, M., Manabe, R., Nomoto, M., Tada, Y., Ishizaki, K., & Kohchi, T. (2016). Phytochrome signaling is mediated by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in the liverwort Marchantia polymorpha. *Plant Cell*, 28(6), 1406–1421. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.01063>
- Inoue, K., Nishihama, R., & Kohchi, T. (2019). Phytochrome and Light Signaling in Marchantia. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2026, pp. 215–223). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9612-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9612-4_18)

- Jill Harrison, C. (2017). Development and genetics in the evolution of land plant body plans. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 372, Issue 1713). Royal Society of London.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0490>
- Jung, J. H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A. K., Box, M. S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J. C. W., Schäfer, E., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science*, *354*(6314), 886–889.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf6005>
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., & Kohchi, T. (2013). Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *77*(1), 167–172.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.120700>
- Legris, M., Ince, Y. Ç., & Fankhauser, C. (2019). Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. In *Nature Communications* (Vol. 10, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13045-0>
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E. S., Rojas, C. C., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P. A., Schäfer, E., Vierstra, R. D., & Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science*, *354*(6314), 897–900.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf5656>
- Legris, M., Nieto, C., Sellaro, R., Prat, S., & Casal, J. J. (2017). Perception and signalling of light and temperature cues in plants. *Plant Journal*, *90*(4), 683–697.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13467>
- Liu, G. Q., Lian, L., & Wang, W. (2022). The Molecular Phylogeny of Land Plants: Progress and Future Prospects. In *Diversity* (Vol. 14, Issue 10). MDPI.  
<https://doi.org/10.3390/d14100782>
- Mallappa, C., Yadav, V., Negi, P., & Chattopadhyay, S. (2006). A basic leucine zipper transcription factor, G-box-binding factor 1, regulates blue light-mediated photomorphogenic growth in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 22190–22199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601172200>
- Marchant, D. B., Chen, G., Cai, S., Chen, F., Schafran, P., Jenkins, J., Shu, S., Plott, C., Webber, J., Lovell, J. T., He, G., Sandor, L., Williams, M., Rajasekar, S., Healey, A., Barry, K., Zhang, Y., Sessa, E., Dhakal, R. R., ... Chen, Z. H. (2021). Dynamic genome evolution in a model fern. *Nature Plants*, *8*(9), 1038–1051.  
<https://doi.org/10.1038/s41477-022-01226-7>
- Martin, F. M., Uroz, S., & Barker, D. G. (2017). Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. In *Science* (Vol. 356, Issue 6340). American Association for the Advancement of Science.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad4501>
- Mora, C. C., Perotti, M. F., González-Grandío, E., Ribone, P. A., Cubas, P., & Chan, R. L. (2022). AtHB40 modulates primary root length and gravitropism involving

- CYCLINB and auxin transporters. *Plant Science*, 324.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111421>
- Mu, R. L., Cao, Y. R., Liu, Y. F., Lei, G., Zou, H. F., Liao, Y., Wang, H. W., Zhang, W. K., Ma, B., Du, J. Z., Yuan, M., Zhang, J. S., & Chen, S. Y. (2009). An R2R3-type transcription factor gene AtMYB59 regulates root growth and cell cycle progression in Arabidopsis. *Cell Research*, 19(11), 1291–1304.  
<https://doi.org/10.1038/cr.2009.83>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S., & Leitch, I. J. (2018). Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. In *Genes* (Vol. 9, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9020088>
- Ponce de León, I., & Montesano, M. (2017). Adaptation mechanisms in the evolution of moss defenses to microbes. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00366>
- Ponnu, J., & Hoecker, U. (2021). Illuminating the COP1/SPA Ubiquitin Ligase: Fresh Insights Into Its Structure and Functions During Plant Photomorphogenesis. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.662793>
- Puttick, M. N., Morris, J. L., Williams, T. A., Cox, C. J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Schneider, H., Pisani, D., & Donoghue, P. C. J. (2018). The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. *Current Biology*, 28(5), 733–745.e2.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.063>
- Qi, L., Shi, Y., Terzaghi, W., Yang, S., & Li, J. (2022). Integration of light and temperature signaling pathways in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 393–411. <https://doi.org/10.1111/jipb.13216>
- Rodríguez Marín, F. (2022). *Evolución de la regulación transcripcional por luz y temperatura en plantas*. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/181677>
- Romani, F., Sauret-Güeto, S., Rebmann, M., Annese, D., Tomaselli, M., Dierschke, T., Delmans, M., Frangedakis, E., Rever, J., Bowman, J. L., Romani, I., & Haseloff, J. (n.d.). *Mapping the landscape of transcription factor promoter 1 activity during vegetative development in Marchantia 2 3*.  
<https://doi.org/10.1101/2023.06.17.545419>
- Sánchez-Gerschon, V., Ferrándiz, C., & Balanzà, V. (n.d.). *HB21/40/53 promote inflorescence arrest through ABA accumulation at the end of flowering*.  
<https://doi.org/10.1101/2023.04.20.537726>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 671–675).  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Spencer, V., Nemeček, Z., & Harrison, C. J. (2021). What can lycophytes teach us about plant evolution and development? Modern perspectives on an ancient lineage. In *Evolution and Development* (Vol. 23, Issue 3, pp. 174–196). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/ede.12350>
- Streubel, S., Deiber, S., Rötzer, J., Mosiolek, M., Jandrasits, K., & Dolan, L. (2023). Meristem dormancy in *Marchantia polymorpha* is regulated by a liverwort-specific miRNA and a clade III SPL gene. *Current Biology*, 33(4), 660–674.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.062>
- Sun, Y., Xu, W., Jia, Y., Wang, M., & Xia, G. (2015). The wheat TaGBF1 gene is involved in the blue-light response and salt tolerance. *Plant Journal*, 84(6), 1219–1230. <https://doi.org/10.1111/tpj.13082>
- Vermeij, G. J. (2017). How the Land Became the Locus of Major Evolutionary Innovations. *Current Biology*, 27(20), 3178–3182.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.076>
- Wan, T., Liu, Z. M., Li, L. F., Leitch, A. R., Leitch, I. J., Lohaus, R., Liu, Z. J., Xin, H. P., Gong, Y. B., Liu, Y., Wang, W. C., Chen, L. Y., Yang, Y., Kelly, L. J., Yang, J., Huang, J. L., Li, Z., Liu, P., Zhang, L., ... Wang, X. M. (2018). A genome for gymnosperms and early evolution of seed plants. *Nature Plants*, 4(2), 82–89. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0097-2>
- Xu, D. (2020). COP1 and BBXs-HY5-mediated light signal transduction in plants. In *New Phytologist* (Vol. 228, Issue 6, pp. 1748–1753). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.16296>
- Xu, T., Yuan, J., & Hiltbrunner, A. (2020). PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS in the moss *Physcomitrella patens* regulate light-controlled gene expression. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 467–479. <https://doi.org/10.1111/ppl.13140>
- Xu, Y., & Zhu, Z. (2021). Pif4 and pif4-interacting proteins: At the nexus of plant light, temperature and hormone signal integrations. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms221910304>
- Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K., Koketsu, E., Mitani, R., Kawamura, M., Ishiguro, S., Tada, Y., Ohme-Takagi, M., Matsuoka, M., & Ueguchi-Tanaka, M. (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7861–7866. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321669111>
- Zhao, C., Wang, Y., Chan, K. X., Marchant, D. B., Franks, P. J., Randall, D., Tee, E. E., Chen, G., Ramesh, S., Phua, S. Y., Zhang, B., Hills, A., Dai, F., Xue, D., Gilliam, M., Tyerman, S., Nevo, E., Wu, F., Zhang, G., ... Chen, Z. H. (2019). Evolution of chloroplast retrograde signaling facilitates green plant adaptation to land. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(11), 5015–5020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812092116>

Zhou, H., & Von Schwartzberg, K. (2020). Zygnematophyceae: From living algae collections to the establishment of future models. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Issue 11, pp. 3296–3304). Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa091>