



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior D'enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

TRABAJO FINAL DE GRADO

# **Estudio del patrón de expresión génica de *MINIYO* en *Marchantia polymorpha***

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA 2019-2020

**Autora:** Cristina Escalante Ramírez

**Tutora académica:** M<sup>a</sup> Purificación Lisón Párraga

**Tutoras experimentales:** Sonia Boscá San José y Maite Sanmartín Artiñano

Valencia, Julio 2020



**Título:** Estudio del patrón de expresión génica de *MINIYO* en *Marchantia polymorpha*

**Resumen:** La diferenciación celular es un proceso fundamental y necesario para el desarrollo de las diferentes estructuras y órganos que componen los organismos multicelulares. Sin embargo, a pesar de su importancia, se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares que subyacen a la activación de la diferenciación celular. La caracterización del interruptor binario *MINIYO/RIMA* en *Arabidopsis thaliana* ha permitido comenzar a conocer cómo se inicia la activación de este proceso fundamental para el desarrollo y abre la posibilidad a estudiar si los mecanismos de diferenciación celular se han conservado evolutivamente en las plantas.

Estudios recientes han demostrado que la expresión de los genes *MINIYO* y *RIMA* en *Arabidopsis* está restringida a los meristemos apicales del tallo y de la raíz y a los primordios florales, nichos donde se localizan las células madre, pero se desconoce el patrón de expresión en otras especies, así como cuáles son los factores de transcripción que participan en el control de la expresión de estos dos genes. Un análisis filogenómico del promotor de *MINIYO* en plantas vasculares y hepáticas reveló la presencia de dos motivos *cis* conservados. Estos dos motivos están presentes en los promotores del gen *MINIYO* en *Arabidopsis* y *Marchantia polymorpha*, una hepática situada en la base de la escala evolutiva de las plantas terrestres y descendiente directa de las primeras plantas que colonizaron la tierra. Por ello, los factores de transcripción que se unen a estos motivos podrían participar en delimitar la expresión de *MINIYO* permitiendo que los nichos de expresión de estos genes estén conservados evolutivamente. Por tanto, es importante definir en primer lugar cómo y dónde se expresan estos genes en la hepática *M. polymorpha*.

El presente Trabajo Fin de Grado pretende realizar un estudio de distintas versiones del promotor de *MpMINIYO* (*MpIYO*) mediante el ensayo histoquímico GUS, con el fin de establecer su patrón de expresión que sirva de base para establecer el papel de los motivos conservados identificados en el estudio filogenómico. Asimismo, se quiere establecer un nuevo protocolo de transformación de *M. polymorpha*.

Los resultados obtenidos sugieren que todas las construcciones de la posible región promotora son capaces de dirigir la expresión de *MpIYO* en las plantas de *Marchantia*. Por otro lado, se obtuvo una mayor eficiencia de transformación de esta hepática con el nuevo protocolo empleado, presentándose como un método con grandes ventajas respecto al tradicionalmente utilizado.

**Palabras clave:** diferenciación celular, *MINIYO*, *RIMA*, meristemo, promotor, *Marchantia polymorpha*.

**Autora:** Cristina Escalante Ramírez

**Directora académica:** Dra. M<sup>a</sup> Purificación Lisón Párraga

**Directoras experimentales:** Dra. Sonia Boscá San José y Dra. Maite Sanmartín Artiñano

Valencia, Julio 2020

**Title:** Study of the expression profile of *MINIYO* in *Marchantia polymorpha*.

**Abstract:** Cell differentiation is a fundamental and necessary process for the development of the different structures and organs which define any multicellular organisms. However, despite its importance, the molecular mechanisms that underlie the activation of cell differentiation are barely known. The recent characterization of the binary switch *MINIYO/RIMA* in *Arabidopsis thaliana* has set light on how this essential process is activated and opens the possibility to study whether the mechanisms that activate cell differentiation are evolutionary conserved in plants.

In *Arabidopsis*, expression of *MINIYO* and *RIMA* is restricted to the shoot and root apical meristems and to the floral primordia, niches where stem cells are located. However, it is unknown how the expression patterns are established in other plant species or which transcription factors participate in the control of this expression. A phylogenomic analysis of the *MINIYO* promoter in vascular plants and liverworts showed the presence of two *cis* conserved motifs. These two motifs are present in the *MINIYO* promoters of *Arabidopsis* and *Marchantia polymorpha*, a liverwort which belongs to the most basal land plant group and is direct descendent from the first plants that colonized land. Thus, it is suggested that transcription factors which bind to these motifs could participate in delimiting *MINIYO* expression and that expression niches of these genes could be evolutionarily conserved. Therefore, it is necessary first to determine how and where these genes are expressed in *Marchantia*.

This project aims to study deleted versions of the *MpMINIYO* (*MpIYO*) promoter to establish their expression profiles as a first step to understand the role of the two conserved motifs identified in the phylogenomic analysis. Furthermore, another goal is to establish a new transformation protocol for *M. polymorpha*.

Results obtained suggest that the different versions of the possible promoter region, independently from the size, are able to drive *MpIYO* expression in *Marchantia* plants. Furthermore, in this study we observed a higher transformation efficiency using the G-agar protocol, indicating this method is more promising in comparison to the traditionally employed.

**Key words:** cell differentiation, *MINIYO*, *RIMA*, meristem, promoter, *Marchantia polymorpha*.

**Author:** Cristina Escalante Ramírez

**Academic supervisor:** Dra. M<sup>a</sup> Purificación Lisón Párraga

**Experimental supervisors:** Dra. Sonia Boscá San José and Dra. Maite Sanmartín Artiñano

July 2020, Valencia

A mí.



# ÍNDICE GENERAL

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>I.</b>   | <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.          | Diferenciación celular .....  | 1         |
| 1.1.        | Nichos de células madre en plantas.....   | 1         |
| 1.1.1.      | Meristemo apical caulinar.....  | 2         |
| 1.1.2.      | Meristemo apical radicular.....   | 3         |
| 2.          | Regulación génica de los meristemos .....   | 4         |
| 2.1.        | Regulación del meristemo apical caulinar.....                                     | 5         |
| 2.2.        | Regulación del meristemo apical radicular.....                                    | 6         |
| 3.          | Regulación hormonal de los meristemos.....  | 7         |
| 3.1.        | Regulación por citoquinas.....  | 7         |
| 3.2.        | Regulación por auxinas.....   | 9         |
| 4.          | Papel de <i>MINIYO</i> en la diferenciación celular.....                          | 10        |
| 4.1.        | Función de <i>MINIYO</i> en la regulación de la transcripción.....                | 12        |
| 4.2.        | Importancia de <i>RIMA</i> en la localización de <i>MINIYO</i> .....              | 13        |
| 5.          | Conservación evolutiva de la regulación de la diferenciación celular.....         | 14        |
| 5.1.        | <i>Marchantia polymorpha</i> .....  | 14        |
| 5.2.        | Ciclo vital.....  | 15        |
| 5.3.        | Señalización hormonal durante el desarrollo de <i>Marchantia polymorpha</i> ..... | 16        |
| 5.3.1.      | Papel de las citoquininas.....  | 16        |
| 5.3.2.      | Importancia de las auxinas.....   | 17        |
| <b>II.</b>  | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>III.</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>20</b> |
| 1.          | Material vegetal y condiciones de cultivo.....                                    | 20        |
| 2.          | Plásmidos y cepas bacterianas.....  | 20        |
| 3.          | Obtención de las construcciones del promotor de <i>MpMINIYO</i> .....             | 20        |
| 3.1.        | Reacción Gateway LR.....  | 20        |
| 3.2.        | Transformación de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico.....                 | 21        |
| 3.3.        | Extracción de ADN plasmídico.....   | 21        |
| 3.4.        | Digestión de las construcciones por enzimas de restricción.....                   | 21        |
| 3.5.        | Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....                                      | 22        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.         | Generación de líneas transgénicas de <i>Marchantia polymorpha</i> .....                        | 20        |
| 4.1.       | Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                                       | 20        |
| 4.2.       | Amplificación de fragmentos por PCR.....   | 21        |
| 4.3.       | Transformación de explantes mediante cultivo in vitro.....                                     | 21        |
| 4.4.       | Transformación de gemas en placa (G-AgarTrap).....   | 21        |
| 4.5.       | Extracción de ADN genómico.....  | 22        |
| 4.6.       | Genotipado mediante análisis por PCR.....  | 21        |
| 4.7.       | Ensayo histoquímico GUS.....   | 21        |
| 4.8.       | Microscopía.....   | 22        |
| <b>IV.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>26</b> |
| 1.         | Generación de las construcciones de la región promotora de <i>MpIYO</i> .....                  | 26        |
| 2.         | Análisis del genotipado mediante PCR.....  | 28        |
| 3.         | Análisis del patrón de expresión de <i>MpIYO</i> .....   | 29        |
| 4.         | Establecimiento del protocolo de transformación de gemas en <i>Marchantia polymorpha</i> ..... | 31        |
| <b>V.</b>  | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>VI.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>35</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Organización estructural y funcional del SAM.....  | 3  |
| Figura 2. Organización estructural y funcional del RAM.....  | 4  |
| Figura 3. Red de genes reguladora del SAM.....   | 6  |
| Figura 4. Red de genes reguladora del RAM.....   | 6  |
| Figura 5. Esquema de las rutas de señalización por citoquininas y auxinas en el SAM.....                       | 8  |
| Figura 6. Sistema de respuesta vegetal mediado por auxinas basado en el complejo SCF.....                      | 9  |
| Figura 7. Esquema de las rutas de señalización por auxinas y citoquininas en el RAM.....                       | 10 |
| Figura 8. Expresión de las regiones promotoras de <i>MINIYO</i> en el RAM de <i>Arabidopsis</i> .....          | 11 |
| Figura 9. Modelo de acción de la proteína RPAP1 en humanos.....  | 12 |
| Figura 10. Ciclo vital de <i>Marchantia polymorpha</i> .....   | 16 |
| Figura 11. Bucle de retroalimentación de la señalización de citoquininas en <i>Marchantia</i> .....            | 17 |
| Figura 12. Construcciones de <i>pMpiYO</i> en los vectores de expresión.....                                   | 26 |
| Figura 13. Análisis de las construcciones generadas mediante la reacción Gateway LR en <i>E. coli</i> .....    | 27 |
| Figura 14. Análisis de las construcciones amplificadas por PCR y transformadas en <i>Agrobacterium</i> .....   | 28 |
| Figura 15. Análisis del genotipado de las líneas transgénicas para la construcción <i>MpiYO-6II::GUS</i> ..... | 29 |
| Figura 16. Resultados del ensayo histoquímico GUS sin ferricianida/ferrocianida.....                           | 30 |
| Figura 17. Resultados del ensayo histoquímico GUS con ferricianida/ferrocianida.....                           | 31 |
| Figura 18. Resultado de la transformación de explantes de talos de <i>Marchantia</i> .....                     | 32 |
| Figura 19. Resultados de la transformación de gemas en placa de <i>Marchantia</i> .....                        | 33 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Oligonucleótidos empleados como cebadores para la PCR de <i>Agrobacterium</i> ..... | 23 |
|--|----|

# LISTADO DE ABREVIATURAS

**AHK:** *Arabidopsis* Histidine Kinase

**ARR:** *Arabidopsis* Response Regulator

**CK:** Citoquinina

**CKX:** Cytokinin Dehydrogenase

**CLV:** CLAVATA

**CRN:** CORYNE

**CZ:** Zona central

**DZ:** Zona de diferenciación

**EZ:** Zona de elongación

**GUS:**  $\beta$ -glucuronidasa

**IAA:** Ácido indol-3-acético

**IPT:** Isopentenyl Transferase

**IYO:** MINIYO

**KNOX:** KNOTTED1-like homeobox

**MZ:** Zona meristemática

**NLS:** Señal de localización nuclear

**OC:** Centro organizador

**PIN:** PINFORMED

**PLT:** PLETHORA

**PM:** Meristemo proximal

**PZ:** Zona periférica

**QC:** Centro quiescente

**RAM:** Meristemo apical radicular

**RC:** Caliptra

**RCM:** Meristemo de la caliptra

**RIMA:** RPAP2 IYO MATE

**RPAP:** RNA Polymerase Associated Protein

**RZ:** Zona medular

**SAM:** Meristemo apical caulinar

**STM:** SHOOTMERISTEMLESS

**WOX:** WUSCHEL-like homeobox

**WUS:** WUSCHEL

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Diferenciación celular

Los procesos de división y diferenciación celular son esenciales para la formación de un organismo multicelular, que en el caso de las plantas permite la obtención de nutrientes, facilita la reproducción y la capacidad de enfrentarse a los riesgos del ambiente donde se desarrolla, gracias a las estructuras que lo componen. La diferenciación celular es el proceso mediante el cual las células se especializan, adquiriendo nuevas capacidades y las características necesarias para desarrollar sus funciones en el tejido del que forman parte. Este proceso implica la decisión por parte de las células madre de dos posibles destinos. Por un lado, la progenie puede mantener la totipotencia y auto-renovarse, o bien iniciar la transición a células diferenciadas. Este último paso es crucial para el desarrollo del organismo, y específico para cada evento de diferenciación ya que dará lugar a nuevas funciones especializadas, estando, por tanto, altamente regulado (Iyer-Pascuzzi & Benfey, 2009). Durante las últimas décadas, estudios de genética molecular han identificado numerosos reguladores transcripcionales que activan o reprimen la expresión genética para así promover la diferenciación celular en el desarrollo de las plantas (Ikeuchi et al., 2015). Se han descrito las redes que determinan la progresión hacia los distintos destinos celulares tanto en plantas como en animales, así como muchos de los genes involucrados en la generación, percepción y transducción de señales hormonales, implicados en determinar la identidad celular y la formación de órganos específicos. Sin embargo, todavía se desconoce los mecanismos moleculares desencadenantes de la activación de la diferenciación de las células madre vegetales (Benfey, 2016).

A diferencia de los animales, en las plantas, el crecimiento y la organogénesis es principalmente post-embrionaria, lo que permite una gran plasticidad y la capacidad de modificar su crecimiento en respuesta a cambios en el ambiente. Esta capacidad de mantener y reponer las células madre durante el desarrollo está localizada en zonas concretas de la planta, denominadas meristemos, donde se mantiene una población reducida de células madre pluripotentes que se dividen para originar otras que se diferenciarán y generarán distintos tejidos (Gutiérrez, 2012). Gracias a la actividad de estas células, las plantas poseen una gran capacidad para regenerarse a lo largo del tiempo, y el hecho de mantener grupos de células parcialmente desdiferenciadas facilita que tras el daño mecánico o estímulo hormonal se regenere el tejido u órgano herido (Ikeuchi et al., 2015). Además de mantener el proceso de organogénesis durante toda la vida, la inmovilidad celular hace que sea posible seguir la progresión de las células que se dividen, ayudando así a detectar cambios en la diferenciación, lo que convierte a las plantas en sistemas modelo únicos para identificar y caracterizar los factores genéticos que determinan el inicio de la diferenciación celular (Sanmartín et al., 2011).

### 1.1. Nichos de células madre en plantas

Dentro de los meristemos, las células madre actúan como un reservorio de células indiferenciadas, que se renuevan continuamente para originar células cuyo destino es la diferenciación hacia un órgano o estructura de la planta en concreto (Dello Iorio et al., 2008). En *Arabidopsis*, los nichos de las células madre se localizan en los meristemos apicales, así como en otros meristemos presentes en órganos y tejidos de la planta adulta, como son el periciclo del polo xilemático y el cambium (Dello Iorio et al., 2008). Durante la embriogénesis, las angiospermas producen dos meristemos apicales, en el tallo (SAM) y en la raíz (RAM). El desarrollo y crecimiento post-embrionario en plantas se produce principalmente en el SAM y el

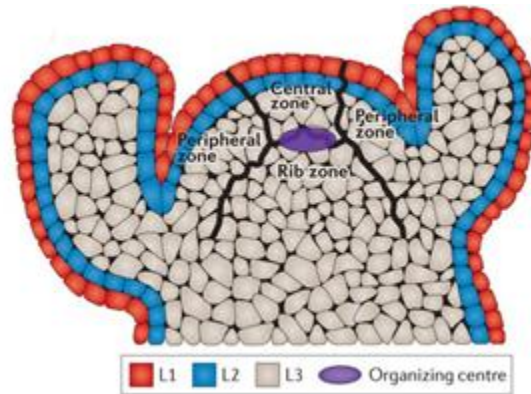
RAM (Dello Iorio et al., 2008), gracias a un proceso secuencial, a través del cual las células derivadas de células madre pluripotentes pierden de forma progresiva su capacidad plástica, para adquirir una morfología y propiedades concretas de cada órgano (Ikeuchi et al., 2015). El meristemo apical radicular origina las células que componen el sistema primario y lateral de la raíz, mientras que el meristemo apical del tallo o caulinar da lugar a las hojas, el tallo y las flores que constituyen la estructura aérea del vegetal (Fletcher, 2002).

### **1.1.1. Meristemo apical caulinar de *Arabidopsis***

El meristemo apical caulinar de *Arabidopsis* alberga en su zona central células madre rodeadas de otras células en rápida proliferación o en diferenciación. Estas células madre van dividiéndose para reponer las células que se diferencian, desplazándose hacia la periferia del meristemo, donde sufren este proceso para originar los órganos aéreos. Además, durante el desarrollo vegetativo, el SAM produce los primordios foliares y en su regulación participan factores ambientales y endógenos que regulan la transición al desarrollo reproductivo (Fletcher, 2002). En esta fase, el SAM se convierte en el meristemo de inflorescencia, donde se forman los meristemos florales que producen los órganos florales que dan lugar a la fruta (Durbak & Tax, 2011). El SAM es, por tanto, una importante fuente de células de donde derivan las hojas, los tallos y las flores a lo largo del desarrollo.

En función del patrón de división celular, el SAM se organiza en dos capas celulares: la túnica y el corpus. En *Arabidopsis* y otras dicotiledóneas, la túnica consiste en una capa epidérmica suprayacente denominada L1, precursora de la epidermis, y una subepidérmica o L2, que produce células mesodérmicas y las células germinales de los granos de polen y óvulos (Figura 1). Estas capas se caracterizan porque se dividen de manera anticlinal. Por el contrario, el corpus o capa L3 origina la vasculatura y la zona medular, y las células que la componen se dividen en todas las direcciones. Estas tres capas originan los distintos linajes celulares que contribuyen a la formación de los diferentes órganos de la planta (Fletcher, 2002; Gaillochet & Lohmann, 2015).

Por otro lado, atendiendo a su organización funcional, en el SAM se diferencian varias regiones (Figura 1). La zona central (CZ) es la que alberga las células madre, se dividen muy lentamente. La progenie de estas células se desplaza hacia la zona periférica (PZ), donde se activa la velocidad de división (Reddy et al., 2004), y conforme se van desplazando se inicia su diferenciación para dar lugar a la formación de los órganos laterales y el tallo (Gaillochet & Lohmann, 2015). En la CZ se encuentra una región encargada de la organización y el mantenimiento de la población de células madre, denominada centro organizador (OC). Por debajo de ella, se distingue la zona medular (RZ) a partir de la cual se originan los tejidos internos del tallo (Mayer et al., 1998; Somssich et al., 2016).

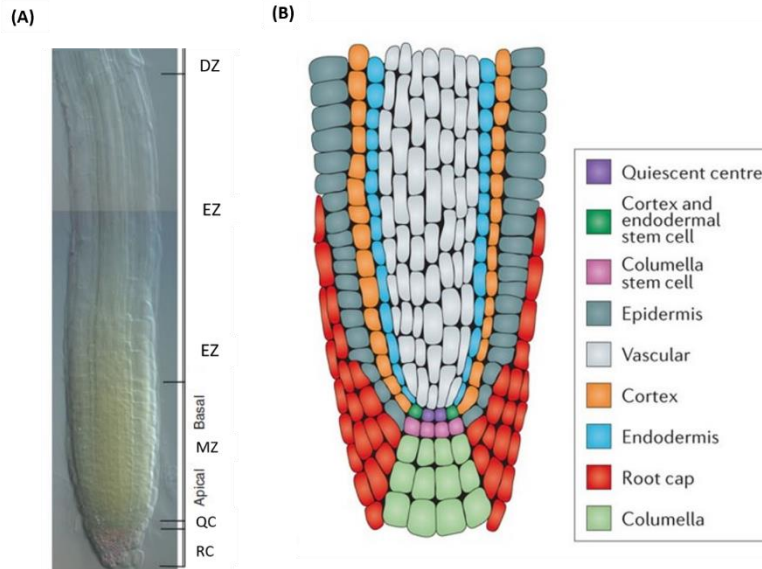


**Figura 1. Organización estructural y funcional del SAM.** En el SAM se diferencian tres capas celulares, de exterior a interior que reciben el nombre de L1, L2 y L3. A nivel funcional el meristemo caulinar se divide en tres regiones, la más externa que recibe el nombre de zona central (CZ), la más interna es la zona medular (RZ), y en medio se encuentra el centro organizador (OC), que controla la pluripotencia de las células madre. A ambos lados de la zona central se encuentran las zonas periféricas (PZ), hacia donde las células hijas son desplazadas para comenzar la diferenciación. Figura obtenida de Sparks et al., 2013.

### 1.1.2. Meristemo radicular de *Arabidopsis*

El meristemo apical de raíz (RAM) es un modelo experimental ampliamente utilizado para el estudio de la diferenciación en plantas (Benfey, 2016). En el RAM, en función del estado celular, se diferencian por un lado la zona meristemática (MZ), donde las células se encuentran en división; conforme la van abandonando, entran en la zona de elongación (EZ), donde experimentan un proceso de alargamiento celular (Figura 2A). A partir de esa zona, las células alcanzan la zona de diferenciación (DZ), caracterizada por la presencia de pelos radiculares y células vasculares con una pared celular secundaria (Bennett & Scheres, 2010). A su vez, en la MZ existen células madre con propiedades diferentes y que, por tanto, se regulan de manera distinta, lo que permite distinguir el meristemo de la caliptra (RCM) y el meristemo proximal (PM) (Bennett & Scheres, 2010).

Además, en la raíz principal se forman las raíces laterales que se originan a partir de divisiones de las células madre localizadas en la capa del periciclo del polo xilemático, lo que indica que estas células mantienen la capacidad totipotente (Bennett & Scheres, 2010; Smet et al., 2007). En el MZ basal, las células iniciales y las células meristemáticas derivadas de estas, son células pluripotentes con un mayor índice de proliferación celular que generan las capas celulares de la raíz, permitiendo tanto el crecimiento en longitud como la posterior formación de las raíces laterales (Benfey & Scheres, 2000; Santuari et al., 2016).



**Figura 2. Organización estructural y funcional del RAM.** (A) Organización funcional del RAM. Esquema de las partes diferenciadas en función del estado de las células. En el extremo inferior se localiza la caliptra (RC), seguida del llamado centro quiescente (QC) y la zona meristemática (MZ) apical y basal. A continuación, se encuentra la zona de elongación (EZ) y la zona de diferenciación (DZ). Figura modificada a partir de Bennett & Scheres, 2010. (B) Organización estructural del RAM. En el extremo de la raíz se halla la columela (verde claro), con la caliptra (rojo) a sus laterales. Por encima se encuentra el centro quiescente (morado) rodeado de las células madre del córtex y la endodermis (verde oscuro) y las capas de la endodermis (azul), el córtex (naranja) y la epidermis (gris). Figura obtenida de Sparks et al., 2013.

Atendiendo a la organización estructural del RAM (Figura 2B), se distinguen la cofia o caliptra (RC) en el extremo de la raíz, que comprende las células de la columela, en el centro de la estructura, y las células de la cofia lateral. Por encima de la columela se encuentra el centro quiescente (QC). El centro quiescente está formado por células madre que apenas se dividen y que funcionan como centro organizador para mantener la pluripotencia de las células iniciales circundantes (Figura 2B). El QC se encarga del continuo crecimiento de las raíces, permite el reemplazo de las células madre y el mantenimiento de la pluripotencia, y por tanto la regeneración del propio QC, por lo que actúa como el OC del SAM (Bennett & Scheres, 2010). Rodeando el QC se encuentran las células iniciales, que son células pluripotentes con un mayor índice de proliferación celular que generan las capas celulares de la raíz (Benfey & Scheres, 2000; Santuari et al., 2016). Entre estas capas se distinguen una más externa o epidermis, seguida del córtex, la endodermis y la estela, en el centro de la raíz (Figura 2B). La estela dará lugar a las células del periciclo y las vasculares, que se diferencian en las células del xilema y del floema (Bennett & Scheres, 2010).

## 2. Regulación génica de meristemas

Cada evento de diferenciación conlleva una serie de cambios en la expresión génica, por lo que los factores de transcripción juegan un importante papel en el control de la diferenciación y reprogramación celular (Ikeuchi et al., 2015). En los meristemas, el conjunto de células madre se mantiene gracias a una extensa red de genes reguladores y señales intercelulares. El correcto establecimiento y mantenimiento de los meristemas caulinar y radicular es esencial para el desarrollo de la planta y depende de la precisa expresión y regulación de distintos factores de transcripción en los distintos tejidos del meristemo.

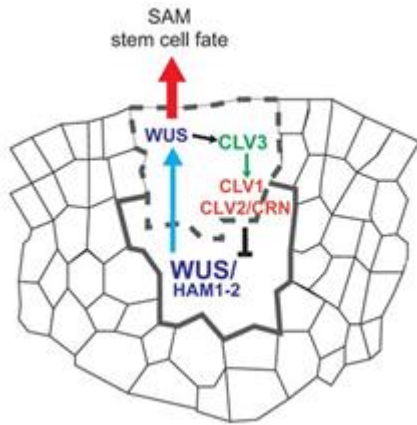
## 2.1. Regulación del meristemo apical caulinar

La regulación génica de la actividad del meristemo caulinar depende de un bucle de retroalimentación negativa entre los factores de transcripción *WUSCHEL* (*WUS*) y *CLAVATA3* (*CLV3*). *WUS* pertenece a la familia *WOX* (*WUSCHEL*-like homeobox) (Haecker et al., 2004; Somssich et al., 2016) y se expresa en el OC del SAM. *WUS*, junto con las proteínas *HAM1* y *HAM2* (Gaillochet & Lohmann, 2015), determina el destino celular en el SAM y activa la expresión de *CLV3* en las células madre, donde *CLV3*, a su vez, restringe la expresión de *WUS* (Brand et al., 2000; Yadav et al., 2011).

*CLV3* codifica un péptido que se secreta al espacio intercelular y que necesita al receptor quinasa *CLAVATA1* (*CLV1*) y al complejo de receptores *CLAVATA2* (*CLV2*)/*CORYNE* (*CRN*). *CLV1*, *CLV2* y *CLV3* interactúan para regular el tamaño del meristemo a lo largo del desarrollo. Su principal función es controlar la acumulación de las células madre regulando la velocidad a las que las células hijas abandonan la zona central para su transición hacia la diferenciación de primordios (Fletcher, 2002) y actúan en paralelo para mediar la comunicación desde la CZ al OC (Clark et al., 1997; Müller et al., 2008; Rojo et al., 2002). El gen *CLV1* codifica una proteína que tiene tres dominios: un dominio receptor, uno transmembrana y uno con actividad quinasa que se localiza intracelularmente (Clark et al., 1997). *CLV1* se encuentra en forma de homodímero y, cuando se une al péptido *CLV3*, da lugar a la autofosforilación de su dominio quinasa (Fletcher, 2002). Por su parte, *CLV2* es una proteína que actúa como receptor con dominios extracelular y transmembrana a través del cual interacciona con la pseudo-quinasa citoplasmática *CRN*. *CRN* requiere de una quinasa interactiva para fosforilarse y formar un complejo receptor-quinasa con *CLV2* destinado al mantenimiento de las células madre junto con la señal *CLV3*. Esta señal, entonces, puede ser transmitida por la vía de *CLV1*, y por una ruta independiente del heterodímero *CRN/CLV2* (Somssich et al., 2016). Adicionalmente, se ha observado que el complejo heteromérico *CLV1/CRN/CLV2*, puede anular a los receptores y bloquear la señalización por *CLV3*, controlando así el nivel de represión de *WUS*. Por otro lado, se propuso que el complejo de proteínas *CLV2/CRN* actúe como co-receptor de *CLV1* para aumentar el grado de especificidad con el ligando *CLV3* (Somssich et al., 2015). En suma, la señalización por *CLV3* se puede dar a través de varias rutas independientes que comienzan la transducción de la señal encargada de la represión de la transcripción del gen *WUS*.

En paralelo a este sistema regulatorio para mantener las células madre, las células se mantienen en estado desdiferenciado debido a la actividad del gen *SHOOTMERISTEMLES* (*STM*). *STM* es un factor de transcripción que pertenece a la familia *KNOX* (*Knotted1-like homeobox*) (Long et al., 1996). La actividad de *STM* se da en todo el meristemo permitiendo que las células desdiferenciadas y de rápida proliferación de la PZ y RZ mantengan su estado, y se dividan lo necesario antes de comenzar la organogénesis en los primordios (Lenhard et al., 2002). La delimitación de las distintas zonas de la periferia del SAM se establece gracias a la actividad de un doble bucle de retroalimentación negativo. En primer lugar, *STM* reprime la actividad de los genes reguladores de la diferenciación, *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) y *AS2* mientras estos a su vez, forman un dímero que reprime la expresión de los genes *KNOX* para promover la diferenciación celular (Byrne et al., 2002).

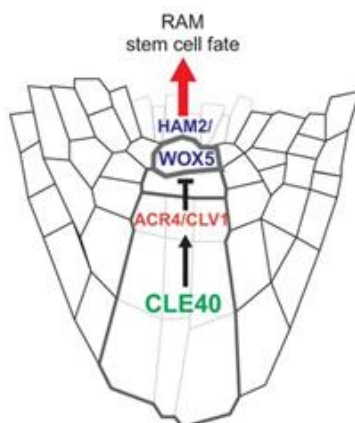




**Figura 3. Red de genes reguladora del SAM.** El gen *WUS* se expresa en el centro organizador (OC), y con *HAM1* y *HAM2* forma un complejo proteico para controlar el destino de las células madre. *WUS* se desplaza hacia la zona central (CZ) para determinar el destino celular. *WUS* promueve de manera directa o indirecta la expresión de *CLV3*, que desencadena una vía de señalización donde actúan *CLV1* y *CLV2/CRN* para limitar la expresión de *WUS* en las células del OC. Figura obtenida de Gaillochet & Lohmann, 2015.

## 2.2. Regulación del meristemo radicular

Los estudios llevados a cabo en los últimos años han permitido establecer que la regulación del RAM presenta ciertas similitudes con la regulación del SAM. Así, en la raíz, destaca el papel del factor de transcripción *WOX5*, parálogo a *WUS*, cuya principal función es mantener las células madre desdiferenciadas (Dello Iorio et al., 2007). Por otro lado, en el RAM también se requiere la función de péptidos para el mantenimiento de su actividad, que son homólogos de *CLV3*, denominados *CLAVATA3/ESR 19 (CLE19)* y *CLE40*. La expresión de estos péptidos se cree que está relacionada con la función de los genes *SUPPRESSOR OF LLP1 1 (SOL1)* y *SOL2*. El primero codifica la enzima zinc-carboxipeptidasa y se cree que participa en el procesamiento de los ligandos *CLV/CLE* (Casamitjana-Martínez et al., 2003). Por su parte, se ha observado que *SOL2* es equivalente a *CRN* (Miwa et al., 2008). Como se ha mencionado previamente, *CRN* y *CLV2* actúan como un complejo de señalización en el SAM, y además, también perciben las señales de los ligandos *CLE* en el RAM (Miwa et al., 2008; Müller et al., 2008). Por ello, se propone una vía de señalización similar a la ruta *CLV/WUS* del SAM, pero en el meristemo radicular. *CLE40* interactúa con el complejo del receptor quinasa *Arabidopsis Crinkly (ACR4)/CLV1* y regula positivamente su presencia (Figura 4). De esta manera, se restringe la expresión de *WOX5*, y se promueve la diferenciación celular de las células madre manteniéndose el balance de las células iniciales de la columela. Sin embargo, aún se desconoce la totalidad del funcionamiento de esta ruta *CLE40/ACR4* aunque se ha propuesto que esta vía de señalización supone una innovación a la red reguladora *CLV/WUS* (Bennet & Scheres, 2010).



**Figura 4. Red génica de reguladores que establece el meristemo radicular.** El factor de transcripción *WOX5* se expresa en el centro quiescente (QC) e interactúa con *HAM2* para indicar el destino celular a las células madre. El péptido *CLE40* junto con el complejo receptor *CLV1/ACR4* bloquea la expresión de *WOX5*. Figura obtenida de Gaillochet & Lohmann, 2015.

### 3. Regulación hormonal en los meristemos caulinar y radicular

El mantenimiento de los meristemos depende del correcto funcionamiento y cooperación entre distintos factores de transcripción y la señalización hormonal (Su et al., 2011). Según la presencia o ausencia de estas hormonas, se promueve o se restringe la expresión de distintos factores de transcripción que regulan el mantenimiento de los meristemos (Blázquez et al., 2020). En los mecanismos de señalización por hormonas en los meristemos destacan la función de las auxinas y las citoquininas, pero en los últimos años se ha descrito el papel de otras fitohormonas como el ácido jasmónico, las giberelinas y las estrigolactonas.

Las auxinas regulan una gran cantidad de procesos a lo largo de la vida de la planta como la división, el crecimiento y la diferenciación celular. El mecanismo molecular de su señalización es similar al del ácido jasmónico, que interviene en la defensa vegetal, pero también en el desarrollo vegetal. En cuanto a las giberelinas, se ha observado su papel en el control del tamaño de la planta, promoviendo la división y expansión celular, así como actúan en la germinación de las semillas y la entrada a la fase reproductiva, entre otros. Por su parte, las estrigolactonas regulan el crecimiento de los brotes axilares, la senescencia de las hojas y el crecimiento secundario, así como la arquitectura radicular (Blázquez et al., 2020). Adicionalmente, se ha descrito el papel de los brasinoesteroides (BRs) en el correcto crecimiento de la raíz. Así, las auxinas promueven de manera positiva la expresión del gen *BREVIS RADIX (BRX)*, que a su vez es necesario para la síntesis de BRs y éstos regulan negativamente *BRX* (Bennett & Scheres, 2010).

Aparte de las auxinas, son bien conocidas las citoquininas (CKs), con un importante papel en la división celular para el mantenimiento de la población de células madre en los meristemos. Las auxinas y las citoquininas pueden actuar de forma conjunta o bien de manera antagónica. De este modo, controlan grandes aspectos del desarrollo vegetal tales como el establecimiento y mantenimiento de los meristemos (Su et al., 2011). Diversos estudios han demostrado la relación entre la actividad de factores de transcripción del tipo *KNOX-1* y *WUS* y las hormonas CKs, giberelinas y auxinas en el SAM para fomentar el crecimiento de órganos laterales. Así, *KNOXI* y *WUS* facilitan la actividad de las citoquininas en el SAM, promoviendo la proliferación celular, mientras que un elevado nivel de giberelinas y auxinas promueve la diferenciación celular (Shani et al., 2006). Aunque se sabe muy poco acerca de la activación de la transición, es fundamental el papel de las CKs y las auxinas, por lo que, debido a su importancia en el mantenimiento de los meristemos, centraremos la atención en ellas.

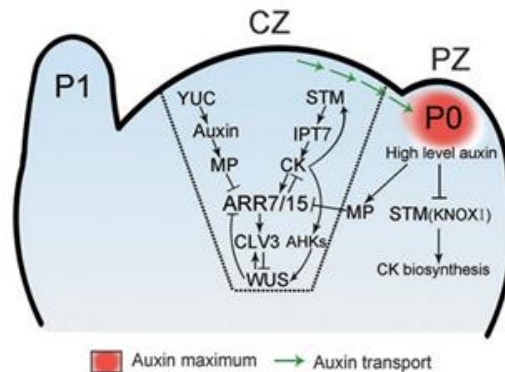
#### 3.1. Regulación por citoquininas

Las citoquininas son hormonas vegetales imprescindibles para el crecimiento y el desarrollo de la planta, siendo su principal función la de promover la división celular (Kyoizuka, 2007). En el caso del RAM, las CKs promueven la diferenciación celular (Kyoizuka, 2007), mientras en el SAM, estas hormonas participan tanto en el crecimiento como en el mantenimiento del meristemo, mediante la vía de señalización CLV/*WUS*, promoviendo la expresión de *WUS*. En mutantes de los genes *CLV*, se ha observado la correcta expresión de *WUS* tras un tratamiento con CKs, indicando la existencia de una vía independiente de CLV (Gordon et al., 2009).

Las citoquininas son necesarias en el SAM ya que una baja concentración provoca la reducción del tamaño del meristemo (Shani et al., 2006). Para la biosíntesis de CKs es necesaria la actividad de las familias de genes *ISOPENTENYL TRANSFERASE (IPT)*. Por otro lado, la degradación de las CKs es controlada por las oxidasas Cytokinin Dehydrogenase (CKX) *CKX3* y *CKX5* (Gaillochet & Lohmann, 2015). Además, los niveles

de estas hormonas se encuentran regulados positivamente por STM, ya que este factor de transcripción promueve la expresión de *IPT7* e induce la actividad de los genes *Arabidopsis Response Regulator* de tipo A (*ARR*) 7 y *ARR15*, reguladores negativos de la señalización por CKs (Figura 5). *ARR7/15* y las CKs a su vez promueven la expresión de *STM*. Por tanto, hay una relación entre *STM* y la cantidad de CKs y su biosíntesis para inducir la proliferación celular y por tanto, mantener la población de células madre en el SAM. Esto, junto con la regulación de las demás hormonas, giberelinas y auxinas, a través de *KNOX-1*, hacen que *STM* tenga un importante papel en el control de los niveles hormonales del meristemo (Yanai et al., 2005).

Por otro lado, se ha descrito que las CKs regulan los niveles de *WUS* mediante un bucle de retroalimentación en el que también intervienen *ARR7* y *ARR15*, reguladores negativos de la señalización por CKs. Estos reguladores intervienen en la expresión de *CLV3*, necesario para limitar la expresión de *WUS*, por lo que *ARR7* y *ARR15* reprimen la transcripción de *WUS* y este a su vez controla la expresión de dichos reguladores (Leibfried et al., 2005).



**Figura 5. Esquema de las rutas de señalización por citoquininas y auxinas en el SAM.** En la CZ, las rutas de señalización por citoquininas y auxinas desembocan en *ARR7/15*. Las auxinas bloquean su expresión y de manera contraria, las CKs la estimulan a través de la regulación por *STM*, que activa la expresión de *IPT7*, promoviendo así la biosíntesis de CKs. Por su lado, las auxinas a través del factor de transcripción de tipo ARF MONOPTEROS (MP) modula la actividad de las células madre. Las CKs reprimen la transcripción de *WUS* mediante la expresión de *ARR7* y *ARR15*, manteniendo el estado indiferenciado de las células madre. Para el desarrollo de los órganos laterales, se da un alto nivel de auxinas desde la CZ a la PZ (P0, primordio de órganos) que bloquea la síntesis de CKs mediante la represión de *KNOX1*. Figura obtenida de Su et al., 2011.

A diferencia del SAM, en el RAM las citoquininas no inducen la proliferación de las células meristemáticas. De hecho, las CKs controlan el tamaño del RAM regulando la velocidad de diferenciación en sus células (Dello Ioio et al., 2007; Kozuka, 2007). En el RAM, las CKs tienen como receptores las proteínas *Arabidopsis* Histidine Kinase (*AHK2*, *AHK3* y *AHK4/CRE1*) (Hwang & Sheen, 2001; Inoue et al., 2001; Riefler et al., 2006; To & Kieber, 2008), las cuales se activan mediante autofosforilación y transmiten la señal al núcleo, donde se fosforilan los factores de transcripción de tipo *ARR-B* y *ARR-A* (Su et al., 2011). Concretamente, estas proteínas intervienen en el control del tamaño del RAM en la TZ mediante las vías de señalización *AHK3/ARR1* y *AHK3/ARR12*. Estas proteínas se componen de un dominio CHASE extracelular de unión a las CKs, un dominio histidina citoplasmático quinasa y un dominio de tipo receptor. Las CKs se unen a *AHK2*, *AHK3* y *AHK4/CRE1* y activan la autofosforilación de la histidina en el dominio quinasa, la cual transfiere el grupo fosforilo al dominio receptor y de ahí a una proteína *Arabidopsis* His Phosphotransfer. Estas proteínas se translocan al núcleo para transmitir el grupo fosforilo a los dominios receptores de factores de transcripción *ARR-A* o *ARR-B* (To & Kieber, 2008). De esta manera, se permite

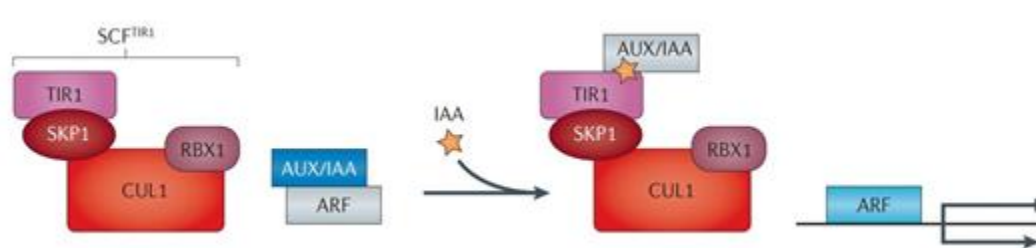
establecer un equilibrio entre la división y la diferenciación celular para regular el desarrollo del meristemo radicular hasta alcanzar su tamaño final (Dello Iorio et al., 2007).

Gracias a la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* en los genes *IPT3*, *IPT5* e *IPT7*, se sabe que el crecimiento de la raíz es inversamente proporcional a la concentración de CKs en sus células, mostrando un aumento del tamaño del meristemo radicular, lo que permite un crecimiento más rápido de raíces y de mayor longitud (Dello Iorio et al., 2007). En el RAM, la señalización de CKs es inhibida a su vez por la expresión de *ARR7* y *ARR15* promovida por las auxinas, manteniéndose así la población de células madre del meristemo. De este modo, se crea un bucle de retroalimentación donde las CKs y las auxinas se autorregulan en función del estado de desarrollo de la planta (Chapman & Estelle, 2009).

### 3.2. Regulación por auxinas

En *Arabidopsis*, los procesos como la especificación del nicho de células madre, la división y la elongación celular se encuentran conectados mediante una ruta compleja de auxinas. En esta red de auxinas intervienen gran cantidad de señales, conformando así un conjunto en el que estímulos tanto ambientales como relacionados con el desarrollo pueden integrarse y regular el crecimiento radicular (Bennett & Scheres, 2010). Las auxinas son esenciales para el mantenimiento de las células madre en los meristemas, pues el bloqueo de su transporte hacia el MZ provoca una notable disminución de la población de células madre (Bennett & Scheres, 2010; Blilou et al., 2005).

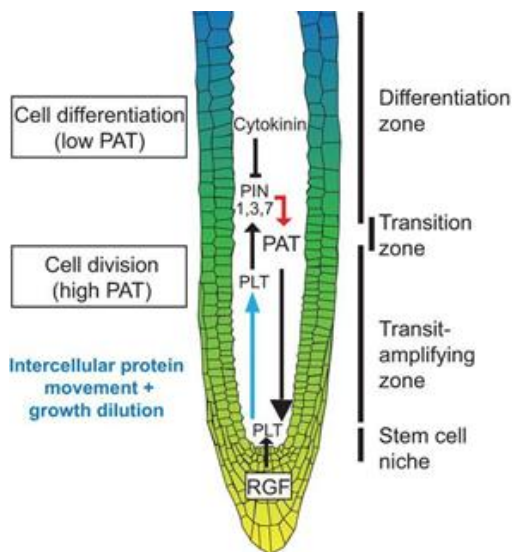
La señalización por auxinas se encuentra controlada principalmente por dos tipos de reguladores transcripcionales, las proteínas Auxin/Indole-3-acetic Acid (Aux/IAA), represoras de la señalización, y Auxin Response Factor (ARF), activadoras o represoras de la regulación de auxinas. La señalización de auxinas ocurre mediante un sistema de respuesta basado en Skp1/Cullin/F-box (SCF). El complejo SCF consiste en el adaptador proteico S Phase Kinase-Associated Protein 1 (SKP1), la proteína de soporte Cullin1 (CUL1), una proteína F-box denominada Transport Inhibitor Response (TIR1) y una proteína Ring-box (RBX) que interactúa con la enzima conjugadora de la ubiquitina E3 (Figura 6). De esta manera, en presencia de las auxinas, AUX/IAA se une a TIR1, marcando el complejo para la degradación por el proteasoma lo que permite la transcripción de los genes *ARF* (Blázquez et al., 2020; Gaillochet & Lohmann, 2015).



**Figura 6. Sistema de respuesta vegetal mediado por auxinas basado en el complejo SCF.** En ausencia de auxina, el factor de transcripción ARF se encuentra formando un heterodímero con la proteína de tipo Aux/IAA. En presencia del ácido indol-3-acético (IAA), la forma predominante de auxinas (Sparks et al., 2013), Aux/IAA se une al complejo SCF/TIR1, liberando a los ARF y permitiendo su correcta función para actuar como activadores o represores. Figura obtenida de Sparks et al., 2013.

Los niveles de auxinas son regulados por numerosos procesos como la biosíntesis, el transporte, la percepción y la señalización. Para la correcta formación del patrón de desarrollo en plantas, es esencial

que se establezca un gradiente de auxinas a lo largo de ellas, por lo que el transporte de estas hormonas es muy importante. En condiciones normales, se crea una distribución de auxinas a lo largo de los tejidos de la planta que se encuentran en distintas etapas de desarrollo (Su et al., 2011). Una de las familias que interviene en su distribución son los transportadores de tipo Pinformed (PIN). Una vez que se alcanza el pico de señalización por auxinas en el QC, se promueve la expresión de los factores de transcripción Plethora (PLT), que controlan la transcripción de los genes *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* (Blilou et al., 2005; Gaillochet & Lohmann, 2015), afectando de esta manera a la distribución de auxinas (Figura 7). Consecuentemente, éstas promueven la división celular y regulan el tamaño de MZ mediante su influencia en la expresión de los genes *PLT* (Bennett & Scheres, 2010). Por otro lado, los genes *PLT* se encuentran regulados por la familia Root Growth Factor (RGF), que codifica péptidos de tipo tirosina-sulfato, que a su vez regulan los niveles de expresión de los genes de la biosíntesis de auxinas (Matsuzaki et al., 2010; Zhou et al., 2010). De esta manera, las auxinas definen el nicho de células madre del RAM, y por otro lado, también contribuyen a la diferenciación celular en la columela mediante la regulación positiva de *ARF10* y *ARF16*, que a su vez reprimen *WOX5* (Ding & Friml, 2010). Niveles bajos de auxinas provocan la activación de los reguladores negativos de citoquininas, *ARR7* y *ARR15* (Zhao, 2010). Se ha sugerido que las citoquininas regulan negativamente los genes que codifican los transportadores de auxinas PIN en el MZ, alterando así la distribución de auxinas en el RAM (Bennett & Scheres, 2010).



**Figura 7. Esquema de las rutas de señalización por auxinas y citoquininas en el RAM.** El transporte de auxinas polarizado (PAT) se encuentra modulado por los genes *PINFORMED*: *PIN1*, *PIN3* y *PIN7*. Estos a su vez son regulados por los genes *PLETHORA* (*PLT*), cuya expresión es promovida por la familia Root Growth Factor (*RGF*). Las citoquininas limitan la expresión de los transportadores PIN, disminuyendo el nivel de PAT y promoviendo la entrada de las células al proceso de diferenciación celular. Figura obtenida de Gaillochet & Lohmann, 2015.

#### 4. Papel de *MINIYO* en la diferenciación celular

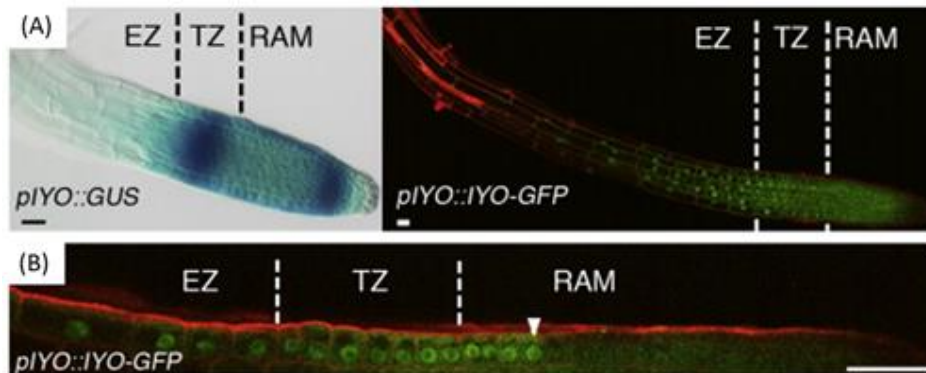
En la diferenciación celular de *Arabidopsis thaliana* es esencial la actuación del gen *MINIYO* (*IYO*). Este papel se comprendió gracias a la caracterización del mutante *iy0-1* de *Arabidopsis*, que tiene una mutación puntual que provoca un cambio de aminoácido de glicina (G) a ácido glutámico (E) en la posición 963 (Sanmartín et al., 2011). El alelo mutante *iy0-1* presentan un aumento en el tamaño del SAM y un retraso en la organogénesis, causado probablemente por defectos en la entrada de las células a la diferenciación celular, mientras los alelos fuertes *iy0-2* y *iy0-3* presentaron un bloqueo del desarrollo del embrión. Además, en los mutantes *iy0*, la ausencia de *IYO* afecta al desarrollo del meristemo de la raíz de *Arabidopsis*, provocando un retraso en la entrada en la diferenciación celular del RAM. Asimismo, se ha observado el efecto de la pérdida de función de *IYO* en otros meristemas de la planta, como el



procambium y la protodermis, donde se ha observado un retraso en la entrada en diferenciación (Sanmartín et al., 2011). Por el contrario, la sobreexpresión de este gen conlleva una diferenciación celular prematura dando lugar a que los meristemas adquieran un fenotipo terminado, por lo que se ha visto su importancia para el correcto desarrollo de los meristemas de las raíces y los tallos. Por tanto, *IYO* es necesario para el inicio de la diferenciación y participa en esta primera etapa del proceso en todos los meristemas de la planta, así como durante el desarrollo del embrión (Sanmartín et al., 2011).

Se ha estudiado la actividad de *IYO* en relación a dos importantes genes reguladores de la formación del SAM: *CLV3* y *STM*. Por un lado, el cruzamiento de los mutantes *clv3-2*, con una gran proliferación de células madre, e *iyo-1*, mostró como resultado aditivo de ambos mutantes, por lo que se infiere que *IYO* y *CLV3* participan en rutas independientes en el SAM. Por otro, *STM* se expresa en células meristemáticas y es necesario para evitar la diferenciación y mantener el nicho de células madre. Mediante el cruzamiento de *iyo-1* con el mutante *stm-6* que ocasiona una diferenciación prematura y la terminación del SAM, se observa un crecimiento indeterminado del SAM (Sanmartín et al., 2011). Con ello, se sugiere que *IYO* es necesario para la diferenciación prematura en *stm-6* y que *IYO* y *STM* son epistáticos (Sanmartín et al., 2011) ya que *IYO* podría ser responsable en la función de *STM* dejando de actuar cuando las células inician la diferenciación en la periferia del SAM (Long et al., 1996). De este modo, *IYO* juega un papel importante en el paso hacia la diferenciación celular en *Arabidopsis*.

En *Arabidopsis*, *IYO* se expresa mayoritariamente en los meristemas y los primordios, mientras que su expresión es baja en tejidos maduros diferenciados. Se ha propuesto que estas células meristemáticas requieren una baja concentración de *IYO* para permanecer indiferenciadas mientras es necesaria una elevada expresión de *IYO* en las células que inician la diferenciación celular (Sanmartín et al., 2011). Además, la distribución subcelular de *IYO* varía en función de la región en la que se encuentren las células. Así, *IYO* se localiza en el núcleo en las células localizadas en la periferia del RAM que inician la diferenciación (Figura 8), a diferencia de lo que ocurre en las células madre del meristemo, donde la localización es citosólica. Por tanto, para que se inicie el proceso de diferenciación, se debe dar el desplazamiento de *IYO* desde el citosol hacia el núcleo de las células localizadas en la periferia del meristemo (Muñoz et al., 2017).

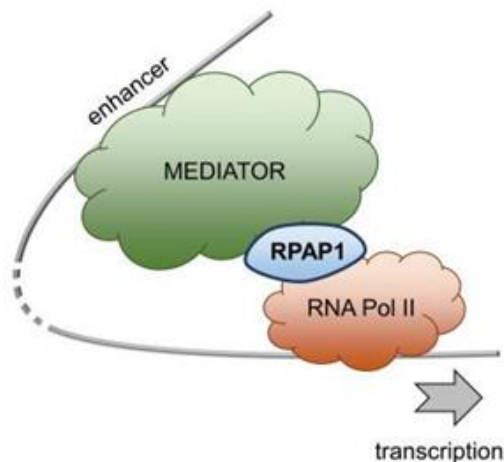


**Figura 8. Expresión de las regiones promotoras de *MINIYO* en el RAM de *Arabidopsis*.** (A) Tinción GUS e imagen confocal de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que portan la construcción *pIYO::GUS* y *pIYO::IYO-GFP*. La distribución de ambas construcciones a lo largo del meristemo muestra una mayor expresión de *IYO* en la zona de transición (TZ), donde comienza el proceso de diferenciación. (B) Detalle de la localización subcelular de *IYO*. La proteína *IYO* se localiza mayoritariamente en el núcleo conforme las células entran en la TZ. Figura obtenida a partir de Sanmartín et al., 2011.

En diferentes estudios se ha observado que en *Arabidopsis* el mecanismo de iniciación de la diferenciación celular comienza con el transporte de *IYO* desde el citosol hacia el núcleo de las células en la TZ (Sanmartín et al., 2011; Sanmartín et al., 2012; Muñoz et al., 2017). El análisis de la proteína *IYO* ha permitido identificar dominios responsables de la localización nuclear y se ha visto que el motivo RGG es importante para la función pro-diferenciadora (Sanmartín et al., 2011). Asimismo, en *Arabidopsis* *IYO* posee dos dominios con señales de localización nuclear (NLS), uno en el extremo N-terminal y otro en el C-terminal, los cuales tienen un papel importante en el transporte de la proteína al núcleo, ya que mutaciones en esos dominios afectan a la acumulación nuclear de *IYO*. De esta manera, *IYO* interactúa mediante los NLSs con el receptor IMPA4 para su importación al núcleo. Asimismo, *IYO* es ortóloga a la proteína RNA Polymerase Associated Protein-1 (RPAP1) (Lynch et al., 2018), que contiene un dominio de unión a la ARN polimerasa II y modula su transporte al núcleo celular (Jeronimo et al., 2007; Gibney et al., 2008; Forget et al., 2010, 2013). *IYO* además interacciona con la GTPasas GPN1, que tiene un papel importante en el transporte nuclear de la ARN polimerasa II, y se ha observado que GPN1 se une a *IYO* en el citoplasma para su importe al núcleo, donde además se requiere de los dominios NLS (Contreras et al., 2019).

#### 4.1. Función de *MINIYO* en la regulación de la transcripción

*IYO* presenta un 24% de similitud con la proteína RPAP1 de mamíferos (Jeronimo et al., 2004). La RPAP1 es una proteína multidominio de gran tamaño que se encuentra altamente conservada en todo el reino animal. La secuencia de RPAP1 muestra una alta similitud con proteínas de función desconocida de *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, y del insecto *Drosophila melanogaster* (Jeronimo et al., 2004; Lynch et al., 2018). De manera similar a lo observado en *Arabidopsis*, RPAP1 se define como un importante elemento en la diferenciación celular que desempeña un papel crucial en la expresión de genes del desarrollo (Lynch et al., 2018; Muñoz et al., 2017; Sanmartín et al., 2011).



**Figura 9. Modelo de acción de la proteína RPAP1 en humanos.** RPAP1 interacciona con el complejo de la ARN Pol II y sirve de enlace entre este y el complejo Mediador, lo que facilita el reclutamiento del complejo a “enhancers” que están unidos a activadores transcripcionales que facilitan la transcripción de genes implicados en la identidad celular y de diferenciación. Figura obtenida de Lynch et al., 2018.

La caracterización de *IYO* y sus ortólogos en levaduras, RBA50/YDR527W y mamíferos ha revelado que interacciona con las subunidades RPB3 y RPB11 del complejo ARN Pol II (Sanmartín et al., 2011; Lynch et al., 2018). Además, en levaduras y humanos se ha identificado también la interacción con la subunidad RPB2. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la falta de la proteína RBA50/YDR527 causa alteraciones en la expresión génica, similares a los observados con la ausencia de la subunidad RPB11 (Jeronimo et al., 2004). En mamíferos se ha descrito que RPAP1 actúa regulando la transcripción de la ARN Pol II (Lynch et al., 2018). Así, el papel de RPAP1 es crucial en el proceso de diferenciación ya que permitiría el ensamblaje

de los factores reguladores necesarios para que se active esta fase, entre ellos, la proteína RPAP2, la ARN Pol II y el complejo Mediador (Figura 9). Asimismo, junto a RPAP2, las proteínas RPAP3 y RPAP4 actúan de manera esencial como chaperonas en el transporte hacia el núcleo para el complejo ARN Pol II (Jeronimo et al., 2004).

En este reclutamiento de la ARN Pol II interviene el complejo promotor TBP (TATA-binding protein), que se asocia al factor de transcripción TFIIF, compuesto por las subunidades RAP74 y RAP30, y se asocia directamente a la ARN Pol II para reclutar esta enzima al promotor. De esta manera, TFIIF propicia la envoltura del ADN sobre la ARN Pol II en la fase de pre-iniciación de la formación del complejo. En este proceso también participan otros factores de transcripción como TFIIE y TFIIH, donde el primero promueve las actividades de TFIIH helicasa, con la que abre el promotor, y la quinasa, para fosforilar el dominio carboxi-terminal (CTD) de Rpb1 para el inicio de la elongación transcripcional. Para el reclutamiento de la ARN Pol II en el promotor de ADN, ésta debe tener su dominio CTD fosforilado. En la fase de pre-iniciación, la fosfatasa Fcp1 de CTD puede desfosforilar a Rpb1 para reciclar la ARN Pol II (Jeronimo et al., 2004). En cuanto a su regulación, los factores de transcripción TFIIF y TFIIB pueden unirse a Fcp1 para estimular o inhibir su actividad fosfatasa, respectivamente (Chambers et al., 1995). Por tanto, TFIIB, TFIIF y Fcp1 participan de manera importante en la regulación durante la transcripción de ARN Pol II.

Además de interactuar junto con la ARN Pol II, IYO interacciona con ELO3, una proteína con actividad histona acetil-transferasa que forma parte del complejo de elongación (Nelissen et al., 2010). De este modo, IYO podría actuar como un regulador positivo en la elongación transcripcional, una fase esencial para comenzar la diferenciación celular en los tejidos meristemáticos (Sanmartín et al., 2011). Sin embargo, se desconocen los mecanismos subyacentes a este proceso, aunque se ha propuesto que los cambios en la localización subcelular de IYO podrían actuar como uno de los puntos de regulación del proceso.

#### **4.2. Importancia de *RIMA* en la localización de *MINIYO***

En ensayos de purificación de la ARN Pol II en mamíferos, se han identificado cuatro proteínas, denominadas (RPAP) (Jeronimo et al., 2007), preferencialmente unidas al complejo, y conservadas en levaduras, plantas y animales. Se ha propuesto que estas proteínas son necesarias para el correcto ensamblaje de la ARN Pol II en el citoplasma y para su importe al núcleo, ya que su ausencia causa defectos en la acumulación o en la actividad enzimática de la ARN Pol II en el núcleo (Jeronimo et al., 2004; Sanmartín et al., 2011; Staresinic et al., 2011; Muñoz et al., 2017).

Dentro de este grupo de proteínas, se encuentra RPAP2, cuyo homólogo en plantas, RPAP2 IYO MATE (*RIMA*), interacciona con IYO (Muñoz et al., 2017). *RIMA* se expresa mayoritariamente en el SAM, en los primordios foliares y en la inflorescencia, así como en óvulos y embriones en desarrollo. A su vez, la expresión de *RIMA* en el RAM se concentra en la zona de transición y en los primordios de las raíces laterales (Muñoz et al., 2017). Por lo tanto, los transcritos de *RIMA* se expresan y acumulan en las mismas zonas de la planta que los de *IYO*.

La ausencia de *RIMA* en *Arabidopsis* provoca un retraso en el inicio de la diferenciación celular, lo que provoca alteraciones en el desarrollo normal de la planta, de manera similar a lo observado en los mutantes de *IYO* (Sanmartín et al., 2011, Muñoz et al., 2017). Se ha descrito que *IYO* y *RIMA* interactúan físicamente y *RIMA* es necesario para que *IYO* se transporte al núcleo (Muñoz et al., 2017). Inicialmente,



en la célula, la proteína RIMA se encuentra alojada en el citosol y una vez que se une a IYO, el complejo se traslada hacia el núcleo donde IYO se acumula para actuar. Por ello, el transporte mediado por RIMA es esencial para la correcta función de IYO, y la consecuente activación de la diferenciación en las células madre en los meristemos (Muñoz et al., 2017). Además, RIMA e IYO podrían actuar juntas para promover la elongación transcripcional de genes implicados en la diferenciación (Muñoz et al., 2017).

## 5. Conservación evolutiva de la regulación de la diferenciación celular

La conservación funcional de IYO y RPAP1 como factores pro-diferenciación a través de la división planta-animal sugiere que esta función es anterior a la separación de los dos reinos y por lo tanto estaba presente en el antepasado de todas las plantas. Los análisis filogenéticos colocan a las hepáticas como el linaje divergente más antiguo de las plantas terrestres existentes (Qiu et al., 2006), por lo que las investigaciones con las hepáticas son de particular interés debido a su posición evolutiva crítica.

Los tres primeros linajes de plantas terrestres existentes fueron las briófitas formadas por las hepáticas, los musgos y las antocerotas (Bowman et al., 2017). Las plantas denominadas antocerotas comparten su tamaño pequeño, un gametófito independiente y dominante y un esporófito dependiente, con los musgos y las hepáticas, y se habían considerado en una misma división. Sin embargo, las antocerotas son consideradas hoy en día, por la mayoría de expertos como una división aparte, la Anthocerotophyta (Shaw & Renzaglia, 2004). Lo mismo ocurre con las hepáticas que constituyen una división aparte, denominándose Marchantiophyta (Glime, 2017). Por tanto, se ha consensuado que para referirse a estas divisiones se pueden tratar como un único conjunto, al que se les denomina "*Bryophyta sensu lato*", donde se incluirían las hepáticas y las antocerotas, además del grupo monofilético de los musgos, que pueden ser referidos como "*Bryophyta sensu stricto*". En el mundo vegetal, las briófitas constituyen el segundo grupo más numeroso después de las angiospermas. Las briófitas se caracterizan por carecer de tejidos vasculares, estomas y raíces propiamente dichas, en su lugar poseen rizoides unicelulares. A diferencia de las plantas vasculares, las briófitas poseen un gametófito dominante con dotación cromosómica haploide, sobre el que se forma el esporófito diploide (Bowman et al., 2017; Glime, 2017).

### 5.1. *Marchantia polymorpha*

Dentro de la división hepática, se encuentra el grupo Marchantiopsida, al cual pertenece la especie *Marchantia polymorpha*, un organismo modelo emergente para realizar estudios evolutivos, a nivel molecular, de procesos de desarrollo complejos. Sin embargo, *M. polymorpha* se ha empleado durante más de 200 años para realizar estudios acerca de las respuestas morfológicas y fisiológicas ante distintos factores ambientales, y es una especie vegetal muy utilizada para describir el desarrollo de sus estructuras (Shimamura, 2015).

*Marchantia* presenta una gran variabilidad morfológica que ha sido estudiada por taxonomistas a lo largo de la historia y ha llevado a la descripción de hasta 50 especies y taxones infraespecíficos, principalmente a finales del siglo XVIII y a principios del XIX. Mediante cruzamientos, Burgeff (1943) observó una infertilidad restringida entre tres variedades europeas y las relacionó con los nombres de taxones infraespecíficos descritos por Nees en 1838, como *M. polymorpha* L. (*sensu stricto*), *M. aquatica* (Nees) Burgeff y *M. alpestris* (Nees) Burgeff. Esta taxonomía de Burgeff ha sido la más empleada por la mayoría de botánicos europeos (Bischler-Causse & Boisselier-Dubayle, 1991; Shimamura, 2015). En función de los

caracteres morfológicos, patrones isoenzimáticos y preferencias ecológicas, se reconocen tres subespecies de *M. polymorpha* L., siendo *M. polymorpha* L. subsp. *polymorpha*, la que se corresponden con la previamente conocida como *M. aquatica*; *M. polymorpha* L. subsp. *montivagans* Bischl. & Boisselier-Dubayle, denominada anteriormente como *M. alpestris*; y *M. polymorpha* L. subsp. *ruderalis* Bischl. & Boisselier-Dubayle, conocida como *M. polymorpha (sensu stricto)* (Shimamura, 2015).

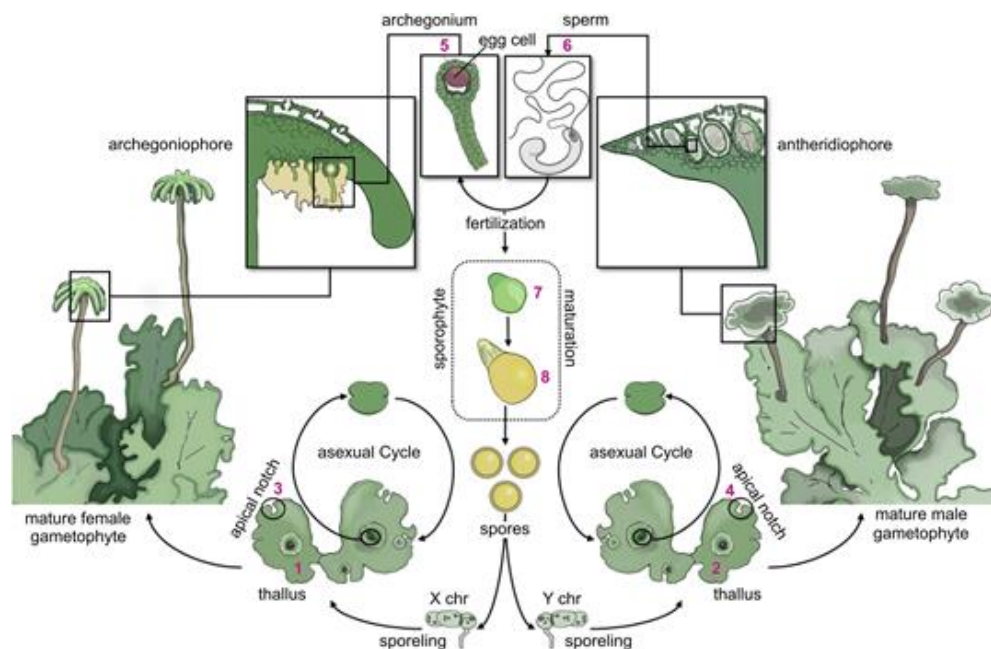
Las hepáticas (Marchantiophyta) suponen una importante clasificación en la filogenia vegetal, por lo que su estudio es de gran utilidad para la investigación de la diversidad de distintos fenómenos biológicos bajo una perspectiva evolutiva. *M. polymorpha* ofrece una serie de ventajas como planta modelo: un ciclo de vida corto, facilidad de propagación, alta frecuencia de transformación y un tamaño de genoma pequeño, de aproximadamente 280 Mb. Además, en esta planta las redes genéticas implicadas en distintos procesos biológicos se encuentran conservadas de una manera más sencilla que en otras plantas terrestres (Shimamura, 2015). Por ello, *M. polymorpha* constituye un sencillo e interesante modelo de estudio y para ello se han aislado para secuenciar el genoma las accesiones masculina y femenina Takaragaike-1 (Tak-1) y Takaragaike-2 (Tak-2), respectivamente, de *M. polymorpha* (Ishizaki et al., 2015).

El género *Marchantia* consta de un ciclo de vida haplo-diplonte, con una fase haploide multicelular de generación de gametófitos, y una fase diploide multicelular, donde se originan esporófitos (Figura 10). La primera generación domina su ciclo vital y origina la parte principal del cuerpo de la planta, el talo (Shimamura, 2015). En *M. polymorpha*, esta primera fase haploide comienza con una espora unicelular generada por meiosis (meiospora) a partir de espora madre que se localiza en el esporófito. Tras la germinación de la meiospora, esta sufre procesos de mitosis hasta llegar a la estructura denominada esporolina que origina el talo (Ishizaki et al., 2015).

*Marchantia polymorpha* es una especie dioica, que contiene órganos tanto femeninos como masculinos albergados en diferentes talos (Bowman et al., 2017; Shimamura, 2015). El talo de la planta se origina a partir de numerosas divisiones altamente reguladas de la célula que se localiza en el ápice del talo y se considera una zona meristemática. Sobre la parte dorsal del talo se forman unas estructuras en forma de copas (*gemma cups*) que albergan gran cantidad de clones multicelulares llamados gemas. La parte ventral se encuentra ocupada por células tubulares que reciben el nombre de rizoides y se encargan de absorber agua y nutrientes del suelo (Shimamura, 2015).

## 5.2. Ciclo vital

En *Marchantia*, se puede dar la reproducción sexual o asexual. Para la reproducción de tipo asexual, en la parte dorsal del talo maduro se producen unas estructuras denominadas copas donde se localizan numerosas gemas multicelulares, a través de las cuales la planta se reproduce individualmente. Estas copas de gemas se localizan normalmente en cada bifurcación del talo (Shimamura, 2015). La reproducción sexual se produce mediante la interacción del gametangio femenino, denominado arquegonio, y el masculino, conocido como anteridio, que se originan, respectivamente, en las ramas de los talos femenino y masculino (Figura 10). En el arquegonio se encuentra una cavidad donde se forma el óvulo mientras que el anteridio genera gran cantidad de gametos masculinos, conocidos como anterozoides. Gracias a las gotas del agua del ambiente donde se desarrollan los talos, la célula masculina llega al óvulo y consigue fertilizarlo. De esta manera, el cigoto se desarrolla en un esporófito en el interior del arquegonio, protegido por una estructura llamada caliptra. Tras numerosas divisiones meióticas, las esporas son liberadas y darán lugar a nuevos talos (Shimamura, 2015).



**Figura 10. Ciclo vital de *Marchantia polymorpha*.** En la reproducción asexual la planta puede reproducirse individualmente a través de gemas localizadas dentro de las copas de los talos. El ciclo sexual comienza con una espora germinada que dará lugar a un talo, si es el masculino libera el gameto, denominado anterozoide o espermatozoide, el cual entra en contacto con el óvulo dentro del arquegonio. Así, se genera un cigoto que crece hasta originar una meiosis que se desarrolla hasta un talo maduro. Figura obtenida de Schmid et al., 2018.

### 5.3. Señalización hormonal durante el desarrollo de *Marchantia polymorpha*

*Marchantia polymorpha* está emergiendo como un organismo modelo con el que estudiar procesos específicos de desarrollo a nivel molecular y celular, debido a su fase gametofítica haploide dominante y su baja redundancia genética que facilita el análisis genético. El genoma de esta hepática ha dado lugar a grandes avances en el estudio de las hormonas durante el desarrollo de las plantas. *M. polymorpha* codifica un conjunto mínimo, pero completo, de las moléculas de señalización en las plantas terrestres (Bowman et al., 2017; Blázquez et al., 2020).

#### 5.3.1. Papel de las citoquininas en el desarrollo de *Marchantia*

En *M. polymorpha*, los tejidos del talo se originan a partir de cuatro merófitos, grupos de células originadas a partir de la misma célula inicial, denominados dorsal, ventral y dos laterales, los cuales surgen de una única célula localizada en el ápice del talo. Se ha descrito que la señalización de las CKs actúa controlando a las células precursoras originadas por los merófitos, coordinando así el desarrollo de los órganos a lo largo del crecimiento del talo (Aki et al., 2019b), de una manera análoga a lo que se ha descrito en plantas vasculares. De hecho, se ha observado una gran similitud entre los componentes de la ruta de señalización de las CKs en *Marchantia* y en *Arabidopsis*.

La señalización por citoquininas se basa en un sistema de fosforilación en cadena o *fosfo-relay* (Kieber and Schaller 2014). En *Arabidopsis*, está formado por receptores con dominio CHASE de tipo histidina-quinasa (CHKs), proteínas fosfo-transferasa que contienen histidina (HTPs) y reguladores de respuesta (RRs). Los CHKs perciben la señal de CKs, se autofosforilan y transmiten un fosfato a las HTPs, que promueve el movimiento de estas proteínas hacia el núcleo. En el núcleo, las HTPs proporcionan el fosfato a los RRs de tipo B, los cuales se activan y regulan, como factores de transcripción, la expresión de distintos genes. En *M. polymorpha* se encuentran conservados todos los factores necesarios para la señalización por CKs. Dentro de su genoma se han identificado dos MpCHKs, una MpHPT, y los reguladores MpRRR y MpRRB (Bowman et al., 2017; Aki, et al., 2019a). Sin embargo, todavía se desconoce en gran parte cómo las CKs regulan la proliferación celular (Aki, et al., 2019a).

La disminución de los niveles de CKs en *Marchantia*, provocados por la sobreexpresión de la CK oxidasa 2 (*MpCKX2*), encargada de la degradación de CKs o del regulador negativo de CKs *MpRRR*, conlleva una disminución en el tamaño del talo, la formación de pocas copas de gemas y un mayor crecimiento de los rizoides en la parte ventral (Aki et al., 2019a). Por tanto, *Marchantia* requiere la presencia de CKs para el crecimiento del talo, así como para la formación de las copas donde se encuentran las gemas (Aki et al., 2019a). Además, el silenciamiento de los reguladores *MpRRB* y la sobreexpresión de *MpRRR* ocasiona alteraciones en el desarrollo del talo y una menor cantidad de copas de gemas (Flores-Sandoval et al., 2015). Estos datos indican que el nivel de CKs influye en el desarrollo controlando la formación de las copas y los rizoides, así como regulando el crecimiento del talo mediante la vía mediada por *MpRRB*, un regulador esencial para la organogénesis de la planta. *MpRRR* y *MpRRB* se expresan en los talos maduros, aunque la expresión de *MpRRR* se localiza en la nervadura a lo largo del crecimiento del talo y en las copas de las gemas en fase de desarrollo. Por su lado, *MpRRB* se expresa en un alto nivel durante la fase reproductiva de la planta (Aki et al., 2019a). Sin embargo, el patrón de respuesta de *Marchantia polymorpha* frente a la señalización por CKs y la influencia de estas fitohormonas en la generación de los órganos reproductores y cómo se encuentra regulada todavía está por elucidar completamente.

Se ha visto que la expresión de *MpRRR* se encuentra regulada de manera positiva por la señalización de *MpRRB*, que se encuentra a su vez mediada por CKs. Se trata de un bucle retroalimentativo, similar al descrito en plantas vasculares (Figura 11), dado que *MpRRR* regula de manera negativa la señalización por CKs mediada por *MpRRB*.



**Figura 11. Bucle de retroalimentación de la señalización de citoquininas en *Marchantia polymorpha*.** *MpRRB* regula de manera positiva la señalización de CKs para controlar el crecimiento del talo, el número de copas donde se localizan las gemas y de los rizoides de *Marchantia* y activa la expresión de *MpRRR*. *MpRRR* regula a su vez negativamente la señalización por CKs, actuando de manera antagonista a *MpRRB* y permitiendo el control de la señalización de CKs.

### 5.3.2. Importancia de las auxinas en *Marchantia*

En *Arabidopsis*, la acumulación de auxinas promueve el crecimiento y la diferenciación de los tejidos, comportándose como un desencadenante morfo-genético. En *M. polymorpha*, las auxinas actúan a lo largo de las distintas etapas del crecimiento y su acción es esencial tanto en la propagación vegetativa como durante el desarrollo del esporofito tras la fertilización (Ishizaki et al., 2012). Además, la presencia de auxinas promueve la formación de los rizoides y altera la formación de las copas de gemas (Flores-Sandoval et al., 2015). En *Marchantia*, las auxinas son también necesarias para la transición de las distintas fases durante el desarrollo gametofítico, desde el estado de esporolina, estructura desorganizada, hasta protalo, que presenta una estructura bidimensional, así como en el desarrollo del talo, donde se adquiere una estructura tridimensional (Flores-Sandoval et al., 2015). La fertilización podría activar la biosíntesis de auxinas y/o su transporte para su acumulación y se ha propuesto que cambios en la distribución de auxinas controlarían el desarrollo del esporófito (Ishizaki et al., 2012). A lo largo del crecimiento de la planta, las auxinas se acumulan en altos niveles durante el desarrollo de las copas y las gemas de su interior. En función de la concentración de auxinas y el tejido donde se localicen, se estimula o inhibe la elongación celular, por lo que la distribución de auxinas a lo largo de los órganos de la planta ocasiona alteraciones en la morfología de los mismos.

En *Marchantia* se han identificado los ortólogos a las proteínas Topless (MpTPL), Aux/IAA (MplAA) y los parálogos MpARF1, MpARF2 y MpARF3. Se ha observado que MpIAA, MpARF1 y MpARF2 regulan la activación de la expresión génica derivada de la actividad de auxinas. Por su lado, MpARF3 no interacciona con MpARF1 o MplAA, por lo que se sugiere un papel independiente de auxinas en la regulación génica (Flores-Sandoval et al., 2015).

Se ha observado que las líneas de *Marchantia* carentes de MpIAA crecidas en medio con auxinas poseen un tamaño mucho menor que las plantas silvestres. Además, el aporte de análogos sintéticos de auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el ácido naftaleno-1-acético en *Marchantia*, ocasiona la iniciación y elongación de los rizoides, disminuye el tamaño del talo, inhibe el crecimiento de gemas hacia el estado de talo y promueve la regeneración a partir de un explante de este. Todo ello sugiere que el silenciamiento de MpIAA provoca una hipersensibilidad a la presencia de auxinas que indica que MpIAA reprime la ruta de señalización de auxinas en *M. polymorpha* (Flores-Sandoval et al., 2015; Ishizaki et al., 2012). A pesar de lo que se ha descrito hasta ahora, queda mucho por investigar acerca de las bases moleculares en la señalización por auxinas en las briófitas.

## II. OBJETIVOS

Estudios recientes sugieren que los genes *IYO* y *RIMA* son los componentes principales del interruptor molecular que activa la diferenciación celular y se han identificado homólogos en todas las plantas existentes y también en animales y hongos multicelulares (Sanmartín et al., 2011, 2012; Muñoz et al., 2017), por lo que la comparación de la función del interruptor *IYO/RIMA* en plantas distantes podría ayudar a revelar mecanismos conservados implicados en la iniciación de la diferenciación en todas las plantas.

El objetivo final, por tanto, de este trabajo es el estudio de la expresión de gen *MINIYO* en *Marchantia polymorpha* para comprender su implicación en la diferenciación celular, establecer su patrón de expresión y definir si está restringido a nichos donde se localizan las células madre de manera similar a lo que ocurre en *Arabidopsis thaliana*. Para ello, los objetivos específicos son los siguientes:

- Generación de tres construcciones con la posible región promotora de *MpIYO* fusionadas a los genes reporteros GUS, citrina y luciferasa. Por un lado, una región 4 kb aguas arriba del codón de iniciación del gen *MpIYO*, y dos versiones delecionadas de dicha región promotora, de 2 kb y 600 bp aguas arriba, que contienen los motivos reguladores *cis* conservados identificados en el estudio filogenómico. Con ello se pretende definir la secuencia mínima necesaria para mantener la expresión de *MpIYO* así como establecer a nivel tisular el patrón de expresión de *MpIYO* en *Marchantia*.
- Transformación de *Marchantia polymorpha* con las construcciones generadas mediante la infección por *Agrobacterium tumefaciens*. Asimismo, se pretende establecer un nuevo protocolo de transformación de esta hepática.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para la realización del presente trabajo, se ha empleado la accesión masculina Takaragaike-1 (Tak-1) de *Marchantia polymorpha* (Ishizaki et al. 2008). Los talos de *M. polymorpha* se crecieron en medio de cultivo Gamborg B5 al 1% de agar, pH 5.5 y en placas Petri (90 mm de diámetro), bajo un fotoperiodo de día largo (16h luz/8h oscuridad) a 22°C y humedad relativa entre el 50% y el 70%. Se utilizó la propagación asexual mediante el uso de gemas, que se desarrollan en un talo maduro en 2-3 semanas, para conservar las líneas transformadas y el ecotipo silvestre.

#### 2. Plásmidos y cepas bacterianas

En este trabajo de Fin de Grado, se empleó la cepa de *Escherichia coli* DH5α para las manipulaciones rutinarias de ADN. Para ello, las bacterias se crecieron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/L de bactopectona, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, pH 7.4) suplementado con 15 g/L de agar para su crecimiento en sólido, y con los antibióticos necesarios según el tipo de plásmido, para la selección de los transformantes. Para la transformación de *Marchantia polymorpha*, se emplearon las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para la transformación de los talos de la planta y la cepa EHA101 para la transformación de gemas. Se crecieron en medio LB a 28°C.

Los plásmidos empleados en este trabajo fueron pGWB435 que porta el gen de la luciferasa, pMpGWB104 que contiene el gen *GUS*, pMpGWB107 para las construcciones de la región promotora con citrina y pMpGWB108 para generar la construcción *pEF::MpRIMA-Citrina*.

#### 3. Obtención de las construcciones del promotor de *MpMINIYO*

##### 3.1. Reacción Gateway LR

Para la obtención de las construcciones que portar la región promotora del gen *MpIYO* fusionadas a los genes reporteros que codifican las proteínas luciferasa y el fluoróforo citrina se utilizó la tecnología Gateway (Invitrogen). Mediante esta técnica se produce la recombinación entre los denominados plásmidos de entrada que contienen las secuencias de interés, en nuestro caso las regiones promotoras del gen *MpIYO*, y los plásmidos destino, que contienen los genes reporteros. Se partió de los vectores de entrada pMpIYO-4A, que contienen la región genómica 4 kb aguas arriba del codón de inicio del gen *MpIYO*, y el vector *pMpIYO-4II*, que contiene esta región más el primer exón, el primer intrón y 12 pb del segundo exón del gen *MpIYO*, y los vectores destino pMpGWB107, que contenía el gen reportero de la citrina (*Cit*), y pGWB435, con el gen de la luciferasa (*LUC*), ya disponibles en el laboratorio. Se realizó la reacción Gateway LR para obtener los plásmidos binarios finales *pMpIYO-4A::LUC*, *pMpIYO4A::Cit*, *pMpIYO-4II::LUC* y *pMpIYO-4II::Cit*. La reacción se realizó en un volumen final de 5 µl, añadiendo 1 µl del Mix LR y, para las construcciones con citrina, se emplearon 2 µl de plásmido pMpGWB107 y aquellas con la luciferasa 1 µl de plásmido pGWB435. Para las reacciones con *pMpIYO-4A::Cit* se empleó 1 µl de plásmido de entrada y, para los demás casos 2 µl.

Las muestras se incubaron a 22°C durante toda la noche. Posteriormente, se añadió 1 µl de la Proteínasa K para inactivar la reacción, y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Las construcciones se transformaron en células de *Escherichia coli* DH5α y se seleccionaron colonias positivas gracias a su crecimiento en medio selectivo.

### **3.2. Transformación de *Escherichia coli* por choque térmico**

La transformación de células competentes en *E. coli* se realizó por choque térmico (Sambrook et al., 1989). Las alícuotas de las células competentes guardadas a -80°C se descongelaron en hielo y, tras añadir 4 µl del plásmido de interés, se incubaron en hielo durante 20-30 min. Posteriormente, se sometieron a un choque térmico de 90 segundos a 42°C, y se pasaron rápidamente a hielo durante 2 minutos. Después, se añadió 1 ml de medio LB y se incubó alrededor de una hora a 37°C. Finalmente, se sembraron en medio LB sólido con los antibióticos necesarios, según el tipo de plásmido, para la selección de los transformantes y se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente, se picaron colonias de *E. coli* de las placas y se cultivaron en agitación durante 1 día para su posterior comprobación.

### **3.3. Extracción de ADN plasmídico**

Para el aislamiento a pequeña escala de plásmidos de *E. coli* y *A. tumefaciens* se utilizó el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se crecieron colonias positivas de cada transformación de *E. coli* en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de espectinomicina en agitación durante 1 día. Para la extracción, los 5 ml se dividieron en tubos de 2 ml y se centrifugaron durante 1 minuto a 12000 *g*, se descartó el sobrenadante y se añadieron de nuevo 2 ml hasta completar el cultivo. Posteriormente, se añadieron 200 µl de solución de resuspensión para resuspender el precipitado. Para lisar las células se añadieron 200 µl de tampón de lisis y se mezcló cuidadosamente 6-8 veces hasta que la disolución tomó un aspecto claro y viscoso. Posteriormente, se añadieron 350 µl de tampón de neutralización y se invirtieron los tubos 4-6 veces. Se centrifugaron durante 10 minutos a máxima velocidad, paso en el que los restos celulares formaron un precipitado. Por otro lado, se prepararon las columnas para la purificación, añadiendo 500 µl de la solución de preparación de columna y centrifugando durante 1 minuto a 12000 *g*. Se descartó el sobrenadante y a estas columnas se le añadió el lisado limpio correspondiente obtenido en el paso anterior. Se centrifugaron a 12000 *g* durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante de cada columna. Se añadieron 500 µl de solución de lavado 1, se centrifugó de nuevo a 12000 *g* durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Después, se añadieron 750 µl de solución de lavado 2, se centrifugó en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. Se centrifugó de nuevo para eliminar el exceso de etanol y se transfirieron las columnas a nuevos tubos. A las columnas, se les añadieron 100 µl de solución de elución y se centrifugaron en las mismas condiciones.

### **3.4. Digestión de las construcciones mediante enzimas de restricción**

Para la comprobación de las construcciones *pMpiYO-4A::LUC*, *pMpiYO-4A::Cit*, *pMpiYO-4II::LUC* y *pMpiYO-4II::Cit*, se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Para ello, primero se midieron las concentraciones de ADN de las muestras en el NanoDrop, para así igualar las concentraciones de ADN



y calcular la cantidad de enzima necesaria en la reacción. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, donde se emplearon 2 µl del tampón *EcoRI* 10x, 1 unidad de enzima *EcoRI* y 17,5 µl de ADN. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 2 horas y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

### 3.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para la observación de los fragmentos resultantes de la restricción enzimática por *EcoRI* se llevó a cabo una electroforesis. Se empleó un gel de agarosa al 1% (p/v) fundida en tampón de electroforesis 1X TBE (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M ácido bórico, 2 mM EDTA) a la que se añadió la tinción RedSafe (concentración final 1X) para visualizar el ADN. Se añadió a cada muestra 3 µl del tampón de carga. Para determinar el tamaño de las bandas, se cargó el marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III (NZYTech). Una vez cargado el gel, se dejó correr a 100 voltios y posteriormente se visualizaron las bandas de ADN bajo un iluminador de luz ultravioleta.

## 4. Generación de líneas transgénicas de *Marchantia polymorpha*

### 4.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación y multiplicación de los plásmidos que portan las secuencias promotoras del gen *MpIYO* fusionadas al gen reportero *GUS* se llevó a cabo en las cepas bacteriana *GV3101* (para la transformación de explantes) y de la construcción *pEF::MpRIMA-Citrina* en la cepa *EHA101* (para la transformación de gemas) de *Agrobacterium tumefaciens*. Para llevar a cabo la transformación de las células competentes de *Agrobacterium* se siguió el método descrito en Höfgen y Willmitzer, 1988. Para ello, se descongeló una alícuota de células competentes en hielo y se añadió el ADN de interés y se incubó 5 minutos en hielo. A continuación, las células se pasaron a nitrógeno líquido durante 5 minutos, posteriormente se trasladaron a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente, se le añadió 1 ml de medio LB a cada tubo y se incubaron a 28°C durante 2-4 horas en agitación, para recuperar las células y que expresen los genes de resistencia a los antibióticos, y se plaquearon en medio LB con los antibióticos de selección correspondientes, que para las construcciones transformadas en la cepa *GV3101* fueron 100 µg/ml de espectinomicina y 50 µg/ml de rifampicina, y para las transformadas mientras para la cepa *EHA101* se utilizaron 50 µg/ml de rifampicina, 100 µg/ml de espectinomicina y 25 µg/ml de kanamicina. Se plaquearon en LB sólido y se incubaron durante 2 días a 28°C. Una vez que se obtuvieron colonias, se extrajo el ADN plasmídico con el método anteriormente descrito y se comprobaron las construcciones mediante PCR.

### 4.2. Amplificación de fragmentos por PCR

Para la comprobación de las construcciones *pMpiYO-4A::LUC*, *pMpiYO-4A::Cit*, *pMpiYO-4II::LUC* y *pMpiYO-4II::Cit* transformadas en *Agrobacterium*, se realizó la extracción de ADN plasmídico, seguida de un análisis de la presencia y correcta orientación de los promotores de *MINIYO* mediante PCR. Los cebadores utilizados para detectar las construcciones se encuentran reflejados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR de *Agrobacterium*.

| Secuencia génica amplificada                         | Cebador         | Secuencia del cebador  |
|--|-----------------|--|
| <i>pMplYO-4A::LUC</i><br>y<br><i>pMplYO-4II::LUC</i> | BP-proMplYO-616 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGCGCCAGTGCCAGTTCTGACATG-3' |
|  | LUC-REV         | 5'-CCAGGGCGTATCTCTTCATAG-3'                                  |
| <i>pMplYO-4A::Cit</i><br>y<br><i>pMplYO-4II::Cit</i> | BP-proMplYO-616 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGCGCCAGTGCCAGTTCTGACATG-3' |
|  | GFP 5'REV       | 5'-GCCGGTGGTGACAGTGAAC-3'                                    |
| <i>pMplYO-2II::LUC</i>                               | BP-proMplYO-616 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGCGCCAGTGCCAGTTCTGACATG-3' |
|  | LUC-REV         | 5'-CCAGGGCGTATCTCTTCATAG-3'                                  |
| <i>pMplYO-2II::Cit</i>                               | BP-proMplYO-616 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGCGCCAGTGCCAGTTCTGACATG-3' |
|  | GFP 5'REV       | 5'-GCCGGTGGTGACAGTGAAC-3'                                    |

Para amplificar las construcciones se preparó para cada muestra un mix compuesto por 2 µl de buffer 10x, 1 µl del cebador directo, 1 µl del cebador reverso, 1'6 µl de dNTPs (2'5 mM), 0'1 µl de ADN polimerasa Taq (Biotools), 11'3 µl de H<sub>2</sub>O miliQ y 3 µl de la muestra correspondiente. Las condiciones de la PCR consistieron en una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, que consistían en una fase de desnaturalización (10 segundos a 94°C), una fase de unión de los cebadores al molde (30 segundos a 60°C) y una fase de extensión (56 segundos a 72°C). Una vez finalizados los ciclos, la temperatura de 72°C se mantuvo durante 5 minutos más para la extensión final.

#### 4.3. Transformación de explantes mediante cultivo in vitro

La transformación de los explantes de *Marchantia* se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Kubota et al. 2013; Ishizaki et al., 2008). Para ello, se crecieron gemas en medio Gamborg B5 durante 15 días. Una vez se desarrollaron los talos, estos se cortaron dividiendo la planta en cuatro explantes y eliminando la parte apical y se transfirieron a placas con medio Gamborg B5 al 1% de sacarosa y crecieron bajo condiciones de luz durante 3 días. En paralelo, para el cultivo del *Agrobacterium* que contenían los vectores de interés, en este caso *pMplYO4A::GUS*, *pMplYO-4II::GUS* y *pMplYO-2II::GUS*, se realizó una estría en medio LB sólido con 50 µg/ml de rifampicina y 100 µg/ml de espectinomicina y se creció durante 2 días a 28°C. Posteriormente, se picó una colonia de cada placa y se crecieron en 5 ml de medio LB con los antibióticos adecuados durante 2 días a 28°C. Tras este periodo, se extrajeron 4 ml saturados del cultivo y se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 g. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se añadieron 5 ml de medio OM51C (100 ml/L de stock 10x OM51C, 20 g/L de sacarosa, 0'3 g/L de L-glutamina y 1 g/L de ácidos casaminoácidos, pH 5.5) con 100 µM de acetosiringona, se resuspendieron las células y se cultivaron durante unas 5-6 horas a 28°C en agitación.

Se transfirieron los explantes a matraces con 50 ml de medio OM15C al 2% de sacarosa y con 100 µM de acetosiringona y se añade 1 ml de la suspensión de *Agrobacterium* con la construcción correspondiente y se crecieron en agitación durante 3 días a 22°C en condiciones de luz. Tras este periodo, se llevó a cabo el lavado de los explantes para eliminar el exceso de bacteria. Para ello, se transfirió cada co-cultivo a un tubo Falcon de 50 ml eliminándose al máximo el medio remanente y se añadieron 30 ml de agua estéril agitando los explantes mediante vórtex durante 30 segundos y se descartó el líquido. Este proceso se repitió 5 veces. Tras los lavados, se añadió a cada Falcon 30 ml de agua estéril con 1 mg/ml de cefotaxima (claforan) y se incubó en agitación durante 30 minutos. Los explantes lavados se transfirieron a placas Petri de 90 mm con medio Gamborg B5 y 100 µg/ml de higromicina y 1 mg/ml de claforan. Estos explantes

se crecieron en condiciones de luz a 22°C hasta que comenzaron a observarse las transformantes pasadas 3-4 semanas.

#### 4.4. Transformación de gemas en placa (G-AgarTrap)

Se puso a punto la transformación de gemas en placa, mediante el método denominado AgarTrap (*Agar-utilized transformation with pouring solutions*) que consiste en el cultivo de este tejido en un único medio sólido tratado con distintas soluciones (Tsuboyama et al., 2018). Para ello, se crecieron 50-60 gemas de *Marchantia* del ecotipo Tak-1 en placas Petri pequeñas (6 cm diámetro), que contenían medio Gamborg B5 suplementado al 1% de sacarosa, en condiciones de luz durante 2 días a 22°C. De manera paralela, se realizó una estría de la cepa de *A. tumefaciens EHA101* que portaba la construcción de interés en una placa Petri con medio LB con 50 µg/ml de rifampicina, 100 µg/ml de espectinomicina y 25 µg/ml de kanamicina y se creció durante 2 días a 28°C.

Posteriormente, se tomó una parte de la estría y se resuspendió en 1 ml de tampón de transformación (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES-NaOH, 150 µM de acetosiringona, pH 5.7). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nanómetros y se realizó la dilución para obtener una densidad óptica final de 0,5, a la que se añadió Tween-20 a una concentración final de 0,01%. Posteriormente, se añade 1 ml por cada placa eliminando el exceso al cabo de un minuto para evitar el sobrecrecimiento del *Agrobacterium*. Las placas se sellaron con Parafilm y se dejaron en co-cultivo durante 2 días en la oscuridad. Tras este periodo, se realizaron los lavados con 4 ml de agua miliQ estéril por placa, repitiendo el proceso dos veces en cada placa. Por último, se añadió a cada placa 1 ml del tampón de selección (Gamborg líquido suplementado con 100 µg/ml de higromicina B y 1 mg/ml de claforan) y se sellaron las placas con cinta Micropore. Las placas se crecieron durante 2-3 semanas en condiciones de luz a 22°C. Tras este periodo, las plantas transformadas empiezan a crecer y se transfirieron a placas Gamborg B5 con 10 µl/ml de higromicina y 100 µl/ml de claforan.

#### 4.5. Extracción de ADN genómico

La preparación de ADN genómico de *Marchantia* se llevó a cabo a partir de gemas de tres días. El tejido congelado en nitrógeno líquido se homogeneizó en frío hasta que se formó un polvo fino. Seguidamente, se añadieron 400 µl del tampón de extracción (200 mM de Tris-HCl pH 8, 250 mM de NaCl, 25 mM EDTA y 0,5% de SDS) y se homogeneizó de nuevo durante 5 segundos. Tras 10 minutos de centrifugación a 14000 g, se recuperaron 300 µl de sobrenadante y se añadió un volumen de isopropanol y se dejó 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 14000 g y se eliminó el sobrenadante. Tras un lavado con etanol al 70%, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 50 µl de tampón TE (1 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl pH 8).

#### 4.6. Genotipado mediante análisis por PCR

Para la comprobación de las líneas transgénicas con las construcciones *pMpiYO-4II::GUS*, *pMpiYO-2II::GUS* y *pMpiYO-6II::GUS* se realizó un genotipado. El genotipado consistió en realizar una amplificación de fragmentos por PCR con el ADN genómico extraído previamente, y una posterior electroforesis en gel de

agarosa. Para esta PCR se emplearon los cebadores BP-proMpiYO-616, 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGCGCCAGTGCCAGTTCTGACATG-3' y GUS\_PCR, 5'-TCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTCA-3'.

Para la PCR se preparó para cada muestra un mix compuesto por 1 µl de buffer 10x, 1 µl del cebador directo (10 µM), 1 µl del cebador reverso (10 µM), 2 µl de dNTPs (2'5 mM), 0'2 de ADN polimerasa Taq (Biotools), 12'8 µl de H<sub>2</sub>O miliQ y 2 µl de la muestra correspondiente. Las condiciones de la PCR consistieron en una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, que consistían en una fase de desnaturalización (10 segundos a 94°C), una fase de unión de los cebadores al molde (30 segundos a 60°C) y una fase de extensión (84 segundos a 72°C). Una vez finalizados los ciclos, la temperatura de 72°C se mantuvo durante 5 minutos más para la extensión final.

Posterior a la PCR, se realizó una electroforesis siguiendo los mismos pasos que en la electroforesis para el análisis la digestión enzimática.

#### 4.7. Ensayo histoquímico GUS

El estudio del patrón de expresión de *MINIYO* en las plantas de *Marchantia* se realizó mediante el ensayo histoquímico GUS. Las plantas se transformaron con el promotor del gen *MINIYO*, unido al gen reportero β-Glucuronidasa (GUS). Este experimento permite observar la expresión de *MINIYO* en los tejidos gracias a la señal emitida por la actividad enzimática de GUS.

Para el ensayo histoquímico se analizaron las líneas positivas 3 y 11 de *pMpiYO-2II::GUS*, 5 y 11 de *pMpiYO-4II::GUS*, la línea 2 de *pMpiYO-6II::GUS*, Tak-1 como control negativo y la línea *proMpDELLA::GUS* de *Marchantia* (donada por el laboratorio del Prof. Blázquez del IBMCP) como control positivo. Se crecieron 3 gemas de cada línea en una placa con medio Gamborg B5 durante 5-6 días.

Las gemas se transfirieron del medio Gamborg a una placa multipocillo y se incubaron en 700 µl de 90% de acetona durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron dos lavados con H<sub>2</sub>O miliQ y se añadió finalmente, 800 µl de solución GUS (tampón fosfato pH 7.2 (50 mM), Tritón x100 (0.1 %), ferrocianida de potasio (1 mM), ferricianida de potasio (1 mM), y X-Glu (1 mM, diluido en 1 ml de dimetil-formamida). Una vez añadida la solución GUS, se aplicó vacío 2 veces durante 5 minutos. Seguidamente, la placa se tapó con papel de aluminio y se incubó a 37°C durante toda la noche. La reacción se paró cambiando la solución GUS por etanol al 70%.

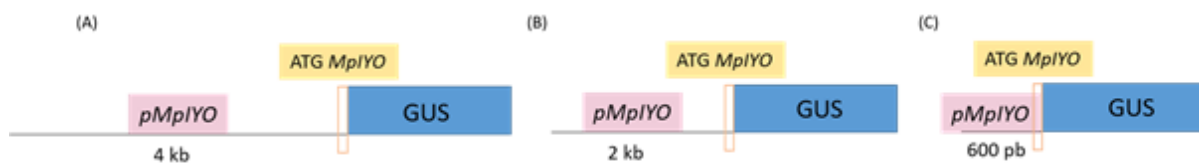
#### 4.8. Microscopía

Las plantas del ensayo GUS y las plantas obtenidas de la transformación G-AGAR, se fotografiaron en el microscopio LEICA DMS 1000, con un objetivo ACHRO de 0.5X y se empleó un aumento de 0,6.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Generación de las construcciones de la región promotora de *MpiYO*

Para conocer cómo y dónde se expresa el gen *MINIYO* en la hepática *Marchantia*, se estudió la expresión del promotor de *MpiYO* seguido de distintos genes reporteros. Las regiones promotoras empleadas en las construcciones de los vectores de expresión consistieron en la región promotora completa de *MpiYO*, que comprende una región de 4 kb aguas arriba del codón de iniciación ATG (Figura 12A). La segunda construcción consistió en una versión deletada de la primera, de 2 kb de longitud aguas arriba del codón de inicio de *IYO* (Figura 12B). La tercera y última construcción consistió en una región del *pMpiYO* de 600 pb aguas arriba del ATG de *MpiYO* (Figura 12C), que contenía unos motivos conservados en *Arabidopsis* y *Marchantia*. Cada una de las construcciones se fusionó al gen reportero *GUS*, que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa y emite una señal de color azul observable a simple vista. De esta manera, mediante el análisis de las tres versiones se quiso concretar la región estrictamente necesaria para la correcta actividad del gen *MINIYO*.



**Figura 12. Construcciones de *pMpiYO* en los vectores de expresión.** Distintas versiones de regiones promotoras *pMpiYO* fusionadas al gen reportero *GUS* (A) Región promotora de 4 kb aguas arriba del codón ATG de *MpiYO*. (B) Región promotora de 2 kb aguas arriba del codón ATG de *MpiYO*. (C) Región promotora de 600 pb aguas arriba del codón ATG de *MpiYO*.

Asimismo, en las construcciones también se añadieron dos secuencias que se corresponden con el primer intrón y el segundo exón de *MpiYO*, pues los resultados preliminares del estudio llevado a cabo en *Arabidopsis* revelaron la importancia de dicho intrón y exón en la delimitación del patrón de expresión de *AtIYO*, por lo que se incluyeron en este estudio. Por lo tanto, las distintas regiones promotoras empleadas se denominaron *pMpiYO-4II*, *pMpiYO-2II* y *pMpiYO-6II*, por la presencia del primer intrón y segundo exón (II) y *pMpiYO-4A*, *pMpiYO-2A* y *pMpiYO-6A* dada su ausencia (A).

En el presente trabajo se obtuvieron, las regiones promotoras *pMpiYO-4A* y *pMpiYO-4II* fusionadas a los genes reporteros de la *Citrina* (*Cit*) y la *Luciferasa* (*LUC*). Sin embargo, para un primer análisis de la expresión de *MpiYO*, a lo largo del estudio se emplearon las construcciones fusionadas al gen reportero *GUS*, obtenidas a través del mismo método Gateway y ya disponibles en el laboratorio. Respecto a las regiones con *Cit* y *LUC*, se emplearán posteriormente con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de *MpiYO* in vivo.

Para comprobar las construcciones obtenidas, *pMpiYO-4II::LUC*, *pMpiYO-4II::Cit*, *pMpiYO-4A::LUC* y *pMpiYO-4A::Cit*, se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI*. Los patrones de digestión esperados para las distintas construcciones son los siguientes: 8900 pb, 3370 pb, 1763 pb, 492 pb y 348 pb para la construcción *pMpiYO-4A::LUC*; 10 kb, 2437 pb, 2146 pb, 492 pb y 348 pb para la construcción *pMpiYO-4A::Cit*; 8900 pb, 2226 pb, 1763 pb, 1565 pb, 492 pb y 348 pb para la construcción *pMpiYO-4II::LUC* y finalmente, 10kb, 2146 pb, 1565 pb, 1293 pb, 492 pb y 348 pb para la construcción *pMpiYO-4II::Cit*. Como se puede observar en la Figura 13, las tres muestras analizadas de cada construcción presentan el patrón

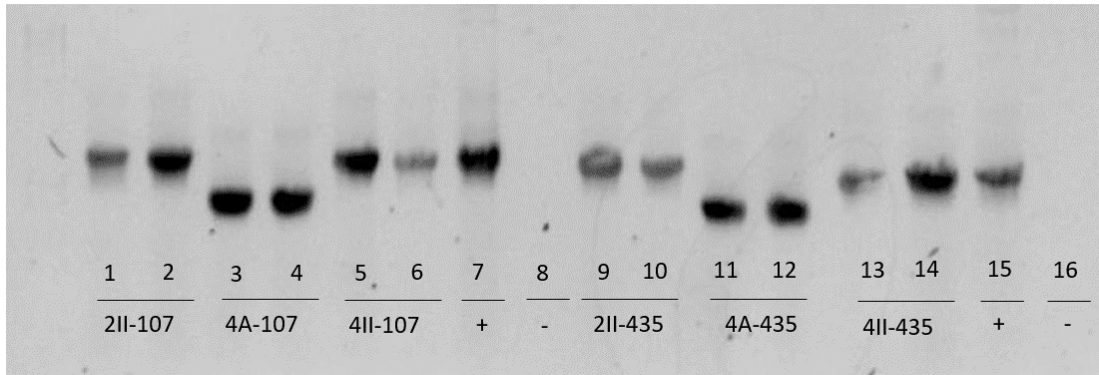
de digestión esperado, indicando que la digestión fue completa y las construcciones son correctas. Al cargar las muestras en el gel hubo un error y las muestras 1 y 9 fueron intercambiadas.



**Figura 13. Análisis de las construcciones generadas mediante la reacción Gateway LR en *E. coli*.** Muestras 2, 3 y 9 se corresponden con el plásmido de expresión con promotor 4A de *MplYO* fusionado al gen reportero de *Citrina*, *pMplYO-4A::Cit* (4A-107). Muestras 4, 5 y 6 se corresponden con el plásmido de expresión con promotor 4II de *MplYO* fusionado al gen reportero de la *Luciferasa*, *pMplYO-4A::LUC* (4A-435). Muestras 1, 7 y 8 se corresponden con el plásmido de expresión con promotor 4II de *IYO* de *MplYO* fusionado al gen reportero de *Citrina*, *pMplYO-4II::Cit* (4II-107). Muestras 10, 11 y 12 se corresponden con el plásmido de expresión con promotor 4II de de *MplYO* fusionado al gen reportero de *Luciferasa*, *pMplYO-4II::LUC* (4II-435).

Una vez comprobadas las construcciones, las muestras 2, 5, 8 y 11 se seleccionaron para ser transformadas en *Agrobacterium*.

Para comprobar las colonias obtenidas en *Agrobacterium*, se realizó una PCR del ADN plasmídico, donde los fragmentos esperados eran de 821 pb (*pMplYO-4A::Cit*), 1242 pb (*pMplYO-4II::Cit*), 771 pb (*pMplYO-4A::LUC*) y 1192 pb (*pMplYO-4II::LUC*). En la Figura 14 se muestran las bandas obtenidas, aunque el marcador no se puede ver claramente, los tamaños de las bandas son los esperados, dado que se conoce el tamaño de los productos de PCR de las muestras usadas como control positivo así como de las construcciones previamente generadas en el laboratorio *pMplYO-2II::Cit*, *pMplYO-2II::LUC*.



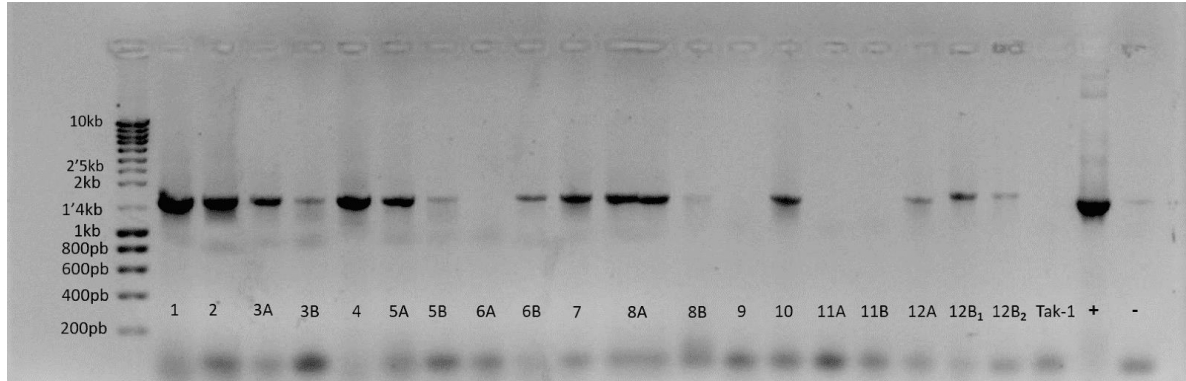
**Figura 14. Análisis de las construcciones amplificadas por PCR y transformadas en *Agrobacterium*.** Muestras 1 y 2 se corresponden a la construcción *pMplYO-2II::Cit* (2II-107). Muestras 3 y 4 se corresponden a la construcción *pMplYO-4A::Cit* (4A-107), muestras 5 y 6 a la construcción *pMplYO-4II::Cit* (4II-107), muestra 7, control positivo, muestra 8 negativo (H<sub>2</sub>O), muestras 9 y 10 se corresponden a la construcción *pMplYO-2II::LUC* (2II-435). Muestras 11 y 12 se corresponden a la construcción *pMplYO-4A::LUC* (4A-435), muestras 13 y 14 se corresponden a la construcción *pMplYO-4II::LUC* (4II-435). Muestra 15 se corresponde con el control positivo y la muestra 16 con el control negativo (H<sub>2</sub>O).

En paralelo, en el laboratorio, se obtuvieron el resto de las construcciones con las regiones promotoras, 2kb y 600 pb, fusionadas tanto a los genes reportadores Citrina y Luciferasa, como al gen reportero GUS con todas las regiones promotoras.

## 2. Análisis del genotipado mediante PCR

Para el genotipado de las construcciones *pMplYO-4II::GUS*, *pMplYO-2II::GUS* y *pMplYO-6II::GUS* se inició su análisis mediante ensayos por PCR, que no se han podido completar dada la situación. En la Figura 15 se describen los resultados obtenidos del análisis de las líneas obtenidas en la transformación de las plantas con la construcción *pMplYO-6II::GUS*. En este análisis se extrajo el ADN genómico de 18 líneas regeneradas en los distintos explantes. En los casos en que se regeneraron dos líneas distantes dentro del mismo explante, se denominaron A y B (explantes 3, 5, 6, 8, 11). Del explante 12, se aislaron dos líneas muy próximas que se denominaron B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, dado que podían provenir del mismo talo.

Del total de líneas analizadas, 14 mostraron ser positivas para la presencia de la construcción *pMplYO-6II::GUS*. Sin embargo, algunas líneas se descartaron por presentar una intensidad en el producto de PCR similar a la observada en el control negativo (H<sub>2</sub>O). Esta señal pudo haber sido debida a una posible contaminación por parte de la muestra del pocillo del control positivo. En resumen, se seleccionaron las líneas 1, 2, 3A, 4, 5A, 6B, 7, 8A, 10 y 12B<sub>1</sub> para su posterior estudio.

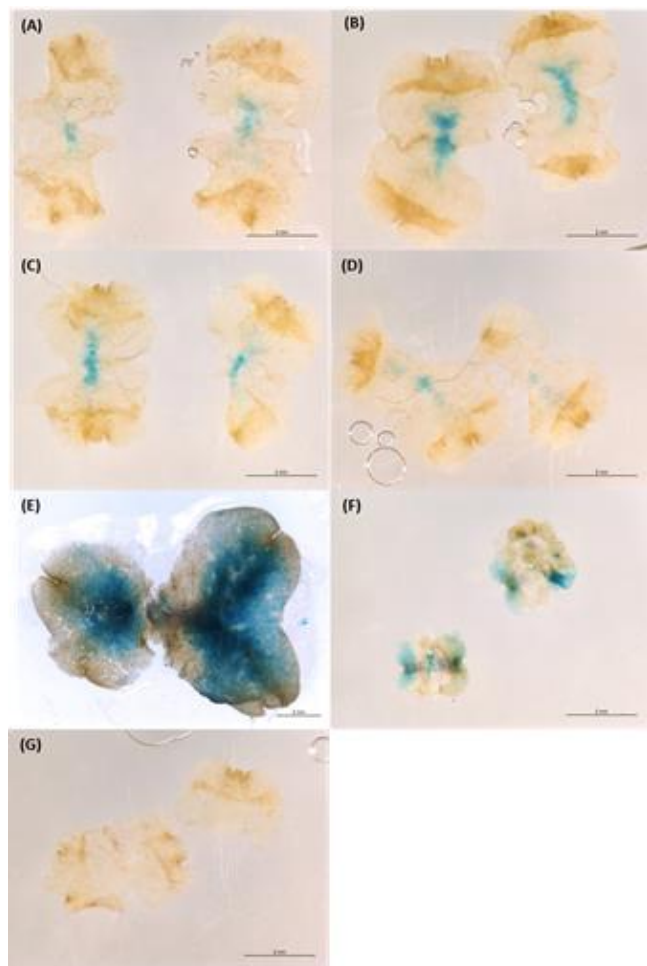


**Figura 15. Genotipado mediante PCR de las líneas transgénicas que portan la construcción *MpiYO-6II::GUS*.** Se analizaron 18 líneas en total. Control positivo se corresponde con el plásmido *proMpiYO-6II::GUS*. Control negativo, H<sub>2</sub>O.

### 3. Análisis del patrón de expresión de *MpiYO*

Para estudiar el patrón de expresión de *MpiYO*, se analizaron las construcciones *pMpiYO-4II::GUS*, *pMpiYO-2II::GUS* y *pMpiYO-6II::GUS*. Para la tinción GUS, se realizaron dos ensayos, en el primero no se añadió ferricianida/ferrocianida a la solución GUS (Figura 17), y en un segundo ensayo, sí que se añadieron los dos compuestos (Figura 18). La presencia de ferricianida y ferrocianida debería evitar el movimiento de GUS entre las células, mostrando una expresión más exacta de la expresión de *MpiYO*. Como se puede observar en la Figura 17, todas las construcciones muestran un patrón de expresión similar con la señal limitada a la zona central de la gema, excepto en el caso del promotor *pMpiYO-6II*. Debido a que esta construcción se analizó en un ensayo distinto, usando talos de mayor edad como material, no es totalmente comparable. De todas formas, podemos ver que tanto el promotor *pMpiYO-4II::GUS* y *pMpiYO-2II::GUS* muestran exactamente el mismo patrón.

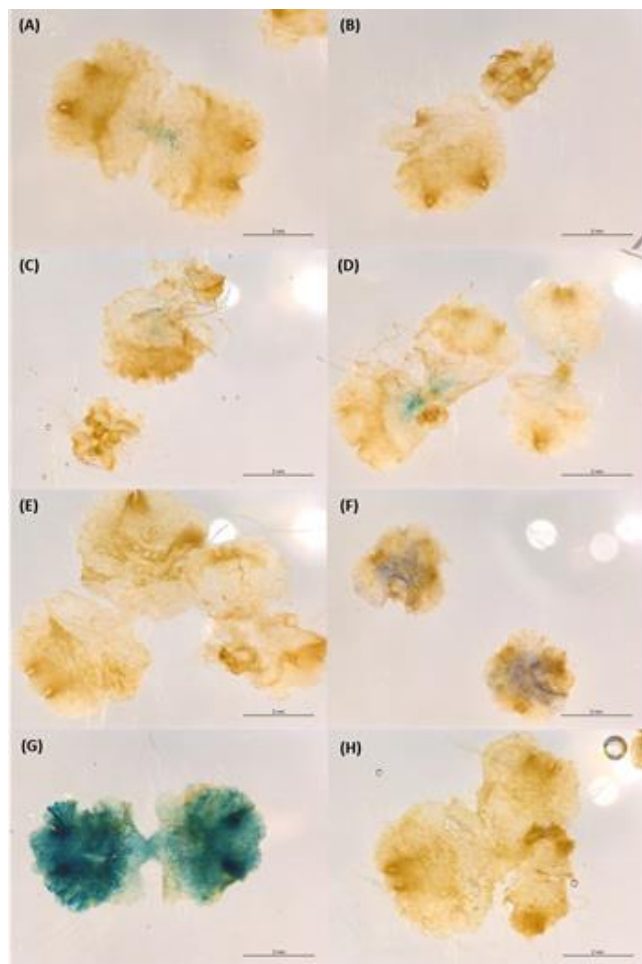




**Figura 16. Resultados del ensayo histoquímico GUS sin ferricianida/ferrocianida.** Cada planta corresponde a una línea positiva de las distintas construcciones. (A) *pMplYO-2II-3::GUS*. (B) *pMplYO-2II-11::GUS*. (C) *pMplYO-4II-5::GUS*. (D) *pMplYO-4II-11::GUS*. (E) *pMplYO-6II-2::GUS*. (F) Control positivo, *proMpDELLA::GUS*. (G) Control negativo, Tak-1.

En el segundo ensayo, en el que la ferricianida y ferrocianida están presentes, la expresión de los promotores es más variable: se mantiene en la zona central pero menos intensa (Figura 18 A y D) o en muy pocas células, o está casi ausente (Figura 18 B, C y E). Aunque no podemos sacar conclusiones debido a que se analizaron pocas plantas, algunas de las explicaciones para este resultado podrían ser las siguientes: podría deberse a que la solución no ha penetrado bien en dichas plantas, el tiempo de incubación debería haber sido más extenso o bien debido a la acción de los compuestos ferrocianida y ferricianida.

Para poder sacar conclusiones, este experimento se debería haber repetido, pero debido a la situación actual sólo se pudieron realizar dos ensayos histoquímicos. Por ello habrá que continuar realizando repeticiones para dar con afirmaciones certeras.



**Figura 17. Resultados del ensayo histoquímico GUS con ferricianida/ferrocianida.** Cada planta corresponde a una línea positiva de las distintas construcciones. (A) *pMplYO-2II-3::GUS*. (B) *pMplYO-2II-11::GUS*. (C) *pMplYO-4II-5::GUS*. (D) *pMplYO-4II-11::GUS*. (E) *pMplYO-6II-2::GUS*. (F) Control positivo, *proMpDELLA::GUS*. (G) Control positivo adicional, *pMplYO-4A::4GUS*. (H) Control negativo, Tak-1.

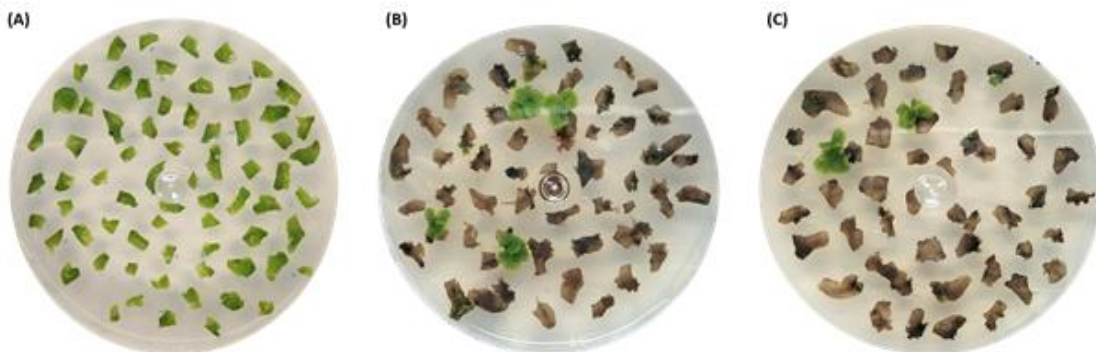
#### 4. Establecimiento del protocolo de transformación de gemas en *Marchantia polymorpha*

Existen distintos métodos para transformar *Marchantia polymorpha* dependiendo del tejido utilizado. Se pueden transformar células en suspensión (Chiyoda et al., 2007), de esporolinas (Chiyoda et al., 2014), talos (Kubota et al., 2013; Ishizaki et al., 2008) y gemas (Tsuboyama et al., 2018). En el laboratorio donde se ha desarrollado el presente trabajo, normalmente se lleva a cabo la transformación de talos, no solo por su facilidad a la hora de transformar el material vegetal, sino también por el número frecuentemente elevado, de transformantes obtenidos. Sin embargo, se quiso llevar a cabo el establecimiento del método de transformación de gemas en placa con el objetivo de reducir considerablemente el tiempo requerido para la transformación de material vegetal y aumentar el número de transformantes, de acuerdo con los resultados obtenidos por Tsuboyama et al. (2018).

Para poner a punto el método para transformar gemas en placa se siguió el método denominado AgarTrap. En comparación con la transformación de explantes, la transformación de gemas requiere menos tiempo y trabajo ya que, por un lado, las gemas se transforman directamente sin tener que esperar 15 días a que se formen los talos, y por otro, no hay que cortar talos. Además, supone un ahorro de material, puesto que la transformación de gemas se realiza en un único medio sólido, mientras que en los

explantos han de ser transformados en medio líquido y después de dos días, transferirlos a medio sólido con el medio de selección correspondiente.

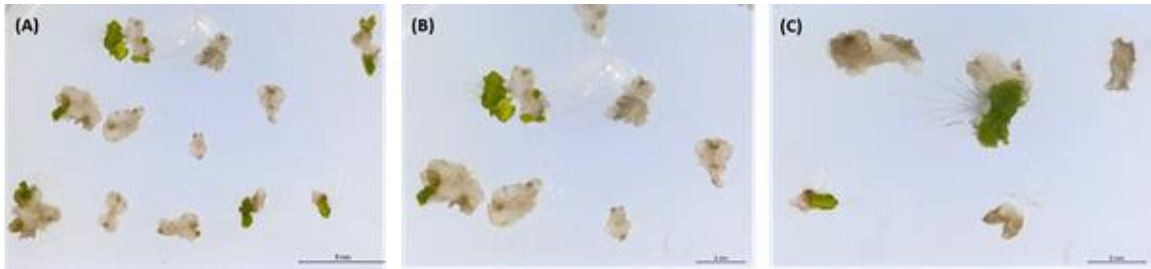
En la transformación de explantes, los talos crecidos durante dos semanas se cortaron y se transformaron en un matraz con medio líquido con las construcciones *pMpiYO-4II::GUS* y *pMpiYO-4II::GUS* (Figura 11A). Después de 3-4 semanas de selección en placa con antibióticos, las plantas transformantes comenzaron a observarse (Figuras 11B-C). De los 150 explantes totales transformados con *pMpiYO-2II::GUS*, se obtuvieron 22 transformantes, mientras que de los 140 explantes transformados con *pMpiYO-4II::GUS*, se obtuvieron 18 transformantes. Las plantas transformantes se transfirieron a una placa individual para continuar con su análisis.



**Figura 18. Transformación de explantes de talos de *Marchantia*.** (A) Explantes obtenidos de talos de 15 días utilizados para la transformación. (B) Explantes transformados con la construcción *pMpiYO-2II::GUS*. (C) Explantes transformados con la construcción *pMpiYO-4II::GUS*.

Para establecer el protocolo de transformación de gemas se siguieron las condiciones establecidas en el método AgarTrap, sin embargo, algunos aspectos se modificaron en las distintas pruebas realizadas para comprobar la eficacia del protocolo en las condiciones de nuestro laboratorio. En esta transformación se utilizó la construcción *pEF:MpRIMA::Citrina* (RIMA-108), que estaba disponible en ese momento en el laboratorio. En la primera transformación, las gemas se crecieron en placas de 90 mm, en vez de 60 mm como indica el protocolo, y como tampón de selección se utilizó agua miliQ estéril suplementada con los antibióticos correspondientes. Después de 2-3 semanas, de un total de 100 gemas, no se obtuvo ninguna transformante. Se hizo una segunda transformación donde se utilizaron placas de 60 mm y como tampón de selección se empleó medio Gamborg B5 suplementado con los antibióticos correspondientes. Después de 2-3 semanas ya se pudieron observar las plantas transformantes (Figura 16). En esta segunda transformación, de un total de 100 gemas se obtuvieron 24 transformantes. Las 24 plantas transformantes obtenidas se transfirieron a placas individuales en condiciones de selección y sólo 10 de ellas continuaron creciendo.

Posteriormente, se realizó una tercera transformación, donde se repitieron las mismas condiciones y de un total de 100 gemas, se obtuvieron 2 transformantes. En la cuarta transformación, se añadió una nueva construcción, *pMpiYO-2A::GUS*, para comprobar si el bajo número de transformantes se debía a la construcción utilizada, al estar expresando el gen *MpRIMA* de forma constitutiva. Además, se aumentó la concentración de Tween-20 en el tampón de transformación, de 0,01 a 0,02%, para intentar mejorar la transformación, ya que según Tsuboyama et al. 2018, ambas concentraciones permiten obtener un alto número de transformantes. Sin embargo, debido a la situación actual, esta transformación no pudo ser analizada.



**Figura 19. Resultados de la transformación de gemas en placa. (A)** Gemas transformadas con la construcción *pEF::MpRIMA::Citrina*(RIMA-108), **(B)** y **(C)** Detalle de los posibles transformantes de la figura 16A.

Aunque los datos son preliminares, los resultados obtenidos muestran que se obtuvo un mayor número de transformantes con el método de transformación de gemas que con el de explantes. En el caso de las gemas, se obtuvieron 24 de un total de 100, mientras que con los explantes se obtuvieron 22 y 18 transformantes de un total de 100 para *pMpiYO-4II::GUS* y *pMpiYO-2II::GUS*, respectivamente. Se debe mencionar que ambas transformaciones no son realmente comparables al no haber utilizado las mismas construcciones. De hecho, en la transformación de gemas, se utilizó la construcción *pEF::MpRIMA::Citrina* (RIMA-108) que expresa el gen *MpRIMA* constitutivamente en la planta, lo cual podría tener un efecto negativo. Sin embargo, aun pudiendo tener ese efecto, se obtuvieron más transformantes que utilizando dos construcciones de dos promotores de *MpiYO*, las cuales no deberían tener ningún efecto en la planta.

Lo que sí se puede concluir es que la transformación de gemas reduce considerablemente el tiempo necesario para la obtención de transformantes; mientras que en la transformación de explantes se tardaron unas 5-6 semanas, en la transformación de gemas fueron unas 3-4 semanas. Esta importante mejora es una de las principales razones para seguir intentando establecer el método en el laboratorio.

## V. CONCLUSIONES

Aunque para llegar a unas conclusiones fidedignas se debería haber realizado más ensayos para reforzar los resultados obtenidos, del presente trabajo se infiere lo siguiente:

- La posible región promotora de 600 pb es igual de funcional que las de 2 kb y 4 kb para la transcripción de la construcción *pMpIYO*.
- La expresión de *MpIYO* se da a lo largo de las nervaduras de los talos de *Marchantia polymorpha*.
- La transformación de gemas mediante el método AgarTrap supone grandes ventajas y resulta en una mayor eficiencia de plantas transgénicas frente al método de transformación de explantes de *Marchantia*.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- AKI, S. S.; MIKAMI, T.; NARAMOTO, S.; NISHIHAMA, R.; ISHIZAKI, K.; KOJIMA, M.; TAKEBAYASHI, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J.; KOHCHI, T., & UMEDA, M. (2019).** Cytokinin Signaling Is Essential for Organ Formation in *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology*, *60*(8), 1842-1854. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz100>
- AKI, S. S.; NISHIHAMA, R.; KOHCHI, T., & UMEDA, M. (2019).** Cytokinin signaling coordinates development of diverse organs in *Marchantia polymorpha*. *Plant Signaling & Behavior*, *14*(11), 1668232. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1668232>
- BENFEY, P. N. (2016).** Chapter Three—Defining the Path from Stem Cells to Differentiated Tissue. En P. M. Wassarman (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 116, pp. 35-43). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.12.002>
- BENFEY, P. N., & SCHERES, B. (2000).** Root development. *Current Biology*, *10*(22), R813-R815. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00814-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00814-9)
- BENNETT, T., & SCHERES, B. (2010).** Chapter Three—Root Development—Two Meristems for the Price of One? En M. C. P. Timmermans (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 91, pp. 67-102). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91003-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91003-X)
- BISCHLER-CAUSSE, H., & BOISSELIER-DUBAYLE, M. C. (1991).** Lectotypification of *Marchantia polymorpha* L. *Journal of Bryology*, *16*(3), 361-365.
- BLÁZQUEZ, M. A.; NELSON, D. C., & WEIJERS, D. (2020).** Evolution of Plant Hormone Response Pathways. *Annual Review of Plant Biology*, *71*(1), 327-353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100309>
- BLECKMANN, A.; WEIDTKAMP-PETERS, S.; SEIDEL, C. A. M., & SIMON, R. (2009).** Stem Cell Signaling in *Arabidopsis* Requires CRN to Localize CLV2 to the Plasma Membrane. *Plant Physiology*, *152*(1), 166-176. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149930>
- BLILOU, I.; XU, J.; WILDWATER, M.; WILLEMSSEN, V.; PAPONOV, I.; FRIML, J.; HEIDSTRA, R.; AIDA, M.; PALME, K., & SCHERES, B. (2005).** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, *433*(7021), 39-44. <https://doi.org/10.1038/nature03184>
- 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.; BALASUBRMANIAN, 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>
- BRAND, U., FLETCHER, J. C., HOBE, M., MEYEROWITZ, E. M., & SIMON, R. (2000).** Dependence of Stem Cell Fate in *Arabidopsis* on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. *Science*, *289*(5479), 617-619. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.617>
- BURGEFF, H. E. N. (1943).** Genetic studies on *Marchantia*; introduction of a new plant family to genetic knowledge.
- BYRNE, M. E.; SIMOROWSKI, J., & MARTIENSSSEN, R. A. (2002).** ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development*, *129*(8), 1957-1965.
- CASAMITJANA-MARTÍNEZ, E.; HOFHUIS, H. F.; XU, J.; LIU, C.-M.; HEIDSTRA, R., & SCHERES, B. (2003).** Root-Specific CLE19 Overexpression and the sol1/2 Suppressors Implicate a CLV-like Pathway in the Control of *Arabidopsis* Root Meristem Maintenance. *Current Biology*, *13*(16), 1435-1441. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00533-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00533-5)
- CHAMBERS, R. S.; WANG, B. Q.; BURTON, Z. F., & DAHMUS, M. E. (1995).** The Activity of COOH-terminal Domain Phosphatase Is Regulated by a Docking Site on RNA Polymerase II and by the General Transcription Factors IIF and IIB. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(25), 14962-14969. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.14962>

- CHAPMAN, E., & ESTELLE, M. (2009).** Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual review of genetics*, 43, 265-285. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134148>
- CHIYODA, S.; LINLEY, P. J.; YAMATO, K. T.; FUKUZAWA, H.; YOKOTA, A., & KOHCHI, T. (2007).** Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Research*, 16(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9027-1>
- CHIYODA, S.; YAMATO, K. T., & KOHCHI, T. (2014).** Plastid Transformation of Sporelings and Suspension-Cultured Cells from the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. En P. Maliga (Ed.), *Chloroplast Biotechnology: Methods and Protocols* (pp. 439-447). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6_30)
- CLARK, S. E.; WILLIAMS, R. W., & MEYEROWITZ, E. M. (1997).** The CLAVATA1 Gene Encodes a Putative Receptor Kinase That Controls Shoot and Floral Meristem Size in Arabidopsis. *Cell*, 89(4), 575-585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80239-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80239-1)
- CONTRERAS, R.; KALLEMI, P.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. P.; LAZAROVA, A.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; SANMARTÍN, M., & ROJO, E. (2019).** Identification of Domains and Factors Involved in MINIYO Nuclear Import. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01044>
- DELLO IOIO, R.; LINHARES, F. S., & SABATINI, S. (2008).** Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(1), 23-27. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.006>
- DELLO IOIO, R.; LINHARES, F. S.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEIDSTRA, R.; COSTANTINO, P., & SABATINI, S. (2007).** Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology*, 17(8), 678-682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- DING, Z., & FRIML, J. (2010).** Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 12046-12051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000672107>
- DURBAK, A. R., & TAX, F. E. (2011).** CLAVATA Signaling Pathway Receptors of Arabidopsis Regulate Cell Proliferation in Fruit Organ Formation as well as in Meristems. *Genetics*, 189(1), 177-194. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130930>
- FORGET, D.; LACOMBE, A.-A.; CLOUTIER, P.; AL-KHOURY, R.; BOUCHARD, A.; LAVALLÉE-ADAM, M.; FAUBERT, D.; JERONIMO, C.; BLANCHETTE, M., & COULOMBE, B. (2010).** The Protein Interaction Network of the Human Transcription Machinery Reveals a Role for the Conserved GTPase RPAP4/GPN1 and Microtubule Assembly in Nuclear Import and Biogenesis of RNA Polymerase II. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(12), 2827-2839. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.003616>
- FORGET, D.; LACOMBE, A.-A.; CLOUTIER, P.; LAVALLÉE-ADAM, M.; BLANCHETTE, M., & COULOMBE, B. (2013).** Nuclear import of RNA polymerase II is coupled with nucleocytoplasmic shuttling of the RNA polymerase II-associated protein 2. *Nucleic Acids Research*, 41(14), 6881-6891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt455>
- FLETCHER, J. C. (2002).** SHOOT AND FLORAL MERISTEM MAINTENANCE IN ARABIDOPSIS. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.092701.143332>
- FLORES-SANDOVAL, E.; EKLUND, D. M., & BOWMAN, J. L. (2015).** A Simple Auxin Transcriptional Response System Regulates Multiple Morphogenetic Processes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLOS Genetics*, 11(5), e1005207. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005207>
- GAILLOCHET, C., & LOHMANN, J. U. (2015).** The never-ending story: From pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*, 142(13), 2237-2249. <https://doi.org/10.1242/dev.117614>
- GIBNEY, P. A.; FRIES, T.; BAILER, S. M., & MORANO, K. A. (2008).** Rtr1 Is the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of a Novel Family of RNA Polymerase II-Binding Proteins. *Eukaryotic Cell*, 7(6), 938-948. <https://doi.org/10.1128/EC.00042-08>
- GLIME, JANICE M. (2017).** Chapter 2 – Life Cycles and Morphology. *Bryophyte Ecology Volume 1: Physiological Ecology*. 1. <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology1/1>

- GORDON, S. P.; CHICKARMANE, V. S.; OHNO, C., & MEYEROWITZ, E. M. (2009).** Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16529-16534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908122106>
- GUTIÉRREZ, C. (2012).** Células madre vegetales. *Investigación y Ciencia*, 431, 56-65. <https://www.investigacionyciencia.es/files/7627.pdf>
- KIEBER, J. J., & SCHALLER, G. E. (2014).** Cytokinins. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 12. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- 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, advpub*. <https://doi.org/10.1271/bbb.120700>
- HAECKER, A.; GROSS-HARDT, R.; GEIGES, B.; SARKAR, A.; BREUNINGER, H.; HERRMANN, M., & LAUX, T. (2004).** Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development*, 131(3), 657-668. <https://doi.org/10.1242/dev.00963>
- HEIDSTRA, R., & SABATINI, S. (2014).** Plant and animal stem cells: Similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(5), 301-312. <https://doi.org/10.1038/nrm3790>
- HÖFGEN, R., & WILLMITZER, L. (1988).** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9877
- HWANG, I., & SHEEN, J. (2001).** Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*, 413(6854), 383-389. <https://doi.org/10.1038/35096500>
- IKEUCHI, M.; IWASE, A., & SUGIMOTO, K. (2015).** Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.004>
- INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K., & KAKIMOTO, T. (2001).** Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, 409(6823), 1060-1063. <https://doi.org/10.1038/35059117>
- ISHIZAKI, K.; CHIYODA, S.; YAMATO, K. T., & KOHCHI, T. (2008).** *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Haploid Liverwort *Marchantia polymorpha* L., an Emerging Model for Plant Biology. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1084-1091. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn085>
- ISHIZAKI, K.; NISHIHAMA, R.; YAMATO, K. T., & KOHCHI, T. (2015).** Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 262-270. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv097>
- ISHIZAKI, K.; NONOMURA, M.; KATO, H.; YAMATO, K. T., & KOHCHI, T. (2012).** Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Journal of Plant Research*, 125(5), 643-651. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0477-7>
- IYER-PASCUZZI, A. S., & BENFEY, P. N. (2009).** Transcriptional networks in root cell fate specification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(4), 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.09.006>
- JERONIMO, C.; FORGET, D.; BOUCHARD, A.; LI, Q.; CHUA, G.; POITRAS, C.; THÉRIEN, C.; BERGERON, D.; BOURASSA, S.; GREENBLATT, J.; CHABOT, B.; POIRIER, G. G.; HUGHES, T. R.; BLANCHETTE, M.; PRICE, D. H., & COULOMBE, B. (2007).** Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Molecular Cell*, 27(2), 262-274. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.027>
- JERONIMO, C.; LANGELIER, M.-F.; ZEGHOUF, M.; COJOCARU, M.; BERGERON, D.; BAALI, D.; FORGET, D.; MNAIMNEH, S.; DAVIERWALA, A. P.; POOTOOLAL, J.; CHANDY, M.; CANADIEN, V.; BEATTIE, B. K.; RICHARDS, D. P.; WORKMAN, J. L.; HUGHES, T. R.; GREENBLATT, J., & COULOMBE, B. (2004).** RPAP1, a Novel Human RNA Polymerase II-Associated Protein Affinity Purified with Recombinant Wild-Type



- and Mutated Polymerase Subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7043. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7043-7058.2004>
- KYOZUKA, J. (2007).** Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 442-446. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.010>
- LAUX, T.; MAYER, K. F.; BERGER, J., & JURGENS, G. (1996).** The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*, 122(1), 87-96.
- LEIBFRIED, A.; TO, J. P. C.; BUSCH, W.; STEHLING, S.; KEHLE, A.; DEMAR, M.; KIEBER, J. J., & LOHMANN, J. U. (2005).** WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438(7071), 1172-1175. <https://doi.org/10.1038/nature04270>
- LENHARD, M.; JÜRGENS, G., & LAUX, T. (2002).** The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development*, 129(13), 3195.
- LONG, J. A.; MOAN, E. I.; MEDFORD, J. I., & BARTON, M. K. (1996).** A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature*, 379(6560), 66-69. <https://doi.org/10.1038/379066a0>
- LYNCH, C. J.; BERNAD, R.; CALVO, I.; NÓBREGA-PEREIRA, S.; RUIZ, S.; IBARZ, N.; MARTINEZ-VAL, A.; GRAÑA-CASTRO, O.; GÓMEZ-LÓPEZ, G.; ANDRÉS-LEÓN, E.; ESPINOSA ANGARICA, V.; DEL SOL, A.; ORTEGA, S.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O.; ROJO, E.; MUNOZ, J., & SERRANO, M. (2018).** The RNA Polymerase II Factor RPAP1 Is Critical for Mediator-Driven Transcription and Cell Identity. *Cell Reports*, 22(2), 396-410. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.062>
- MATSUZAKI, Y.; OGAWA-OHNISHI, M.; MORI, A., & MATSUBAYASHI, Y. (2010).** Secreted Peptide Signals Required for Maintenance of Root Stem Cell Niche in Arabidopsis. *Science*, 329(5995), 1065-1067. <https://doi.org/10.1126/science.1191132>
- MAYER, K. F. X.; SCHOOF, H.; HAECKER, A.; LENHARD, M.; JÜRGENS, G., & LAUX, T. (1998).** Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell*, 95(6), 805-815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81703-1)
- MIWA, H.; BETSUYAKU, S.; IWAMOTO, K.; KINOSHITA, A.; FUKUDA, H., & SAWA, S. (2008).** The Receptor-Like Kinase SOL2 Mediates CLE Signaling in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), 1752-1757. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn148>
- MÜLLER, B., & SHEEN, J. (2008).** Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453(7198), 1094-1097. <https://doi.org/10.1038/nature06943>
- MUÑOZ, A.; MANGANO, S.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. P.; CONTRERAS, R.; SAUER, M.; RYBEL, B. D.; WEIJERS, D.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; SANMARTÍN, M., & ROJO, E. (2017).** RIMA-Dependent Nuclear Accumulation of IYO Triggers Auxin-Irreversible Cell Differentiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 29(3), 575-588. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00791>
- NEES, C. G. (1838).** Naturgeschichte der europäischen Lebermoose. Grass, Barth & Comp, Breslau.
- NELISSEN, H.; DE GROEVE, S.; FLEURY, D.; NEYT, P.; BRUNO, L.; BITONTI, M. B.; VANDENBUSSCHE, F.; VAN DER STRAETEN, D.; YAMAGUCHI, T.; TSUKAYA, H.; WITTERS, E.; DE JAEGER, G.; HOUBEN, A., & VAN LIJSEBETTENS, M. (2010).** Plant Elongator regulates auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1678. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913559107>
- QIU, Y.-L.; LI, L.; WANG, B.; CHEN, Z.; KNOOP, V.; GROTH-MALONEK, M.; DOMBROVSKA, O.; LEE, J.; KENT, L.; REST, J.; ESTABROOK, G. F.; HENDRY, T. A.; TAYLOR, D. W.; TESTA, C. M.; AMBROS, M.; CRANDALL-STOTLER, B.; DUFF, R. J.; STECH, M.; FREY, W.; QUANDT, D., & DAVIS, C. C. (2006).** The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15511-15516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603335103>
- REDDY, G. V.; HEISLER, M. G.; EHRHARDT, D. W., & MEYEROWITZ, E. M. (2004).** Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Development*, 131(17), 4225-4237. <https://doi.org/10.1242/dev.01261>

- RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M., & SCHMÜLLING, T. (2006).** Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. *The Plant Cell*, 18(1), 40-54. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037796>
- ROJO, E.; SHARMA, V. K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N. V., & FLETCHER, J. C. (2002).** CLV3 Is Localized to the Extracellular Space, Where It Activates the Arabidopsis CLAVATA Stem Cell Signaling Pathway. *The Plant Cell*, 14(5), 969-977. <https://doi.org/10.1105/tpc.002196>
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. (1989).** Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANMARTÍN, M.; SAUER, M.; MUÑOZ, A., & ROJO, E. (2012).** MINIYO and transcriptional elongation: Lifting the roadblock to differentiation. *Transcription*, 3(1), 25-28. <https://doi.org/10.4161/trns.3.1.19303>
- SANMARTÍN, M.; SAUER, M.; MUÑOZ, A.; ZOUHAR, J.; ORDÓÑEZ, A.; VAN DE VEN, W. T. G.; CARO, E.; DE LA PAZ SÁNCHEZ, M.; RAIKHEL, N. V.; GUTIÉRREZ, C.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J., & ROJO, E. (2011).** A Molecular Switch for Initiating Cell Differentiation in Arabidopsis. *Current Biology*, 21(12), 999-1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.041>
- SANTUARI, L.; SANCHEZ-PEREZ, G. F.; LUIJTEN, M.; RUTJENS, B.; TERPSTRA, I.; BERKE, L.; GORTE, M.; PRASAD, K.; BAO, D.; TIMMERMANS-HEREIJGERS, J. L. P. M.; MAEO, K.; NAKAMURA, K.; SHIMOTOHNO, A.; PENCIK, A.; NOVAK, O.; LJUNG, K.; HEESCH, S. VAN; BRUIJN, E. DE; CUPPEN, E.; WILLEMSSEN, V.; MÄHÖNEN, A. P.; LUKOWITZ, W.; SNEL, B.; RIDDER, D. DE; SCHERES, B.; HEIDSTRA, R. (2016).** The PLETHORA Gene Regulatory Network Guides Growth and Cell Differentiation in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell*, 28(12), 2937-2951. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00656>
- SCHMID, M. W.; GIRALDO-FONSECA, A.; RÖVEKAMP, M.; SMETANIN, D.; BOWMAN, J. L., & GROSSNIKLAKUS, U. (2018).** Extensive epigenetic reprogramming during the life cycle of Marchantia polymorpha. *Genome Biology*, 19(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1383-z>
- SPARKS, E.; WACHSMAN, G., & BENFEY, P. N. (2013).** Spatiotemporal signalling in plant development. *Nature Reviews Genetics*, 14(9), 631-644. <https://doi.org/10.1038/nrg3541>
- SHANI, E.; YANAI, O., & ORI, N. (2006).** The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 484-489. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.008>
- SHIMAMURA, M. (2015).** Marchantia polymorpha: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 230-256. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv192>
- SMET, I. D.; TETSUMURA, T.; RYBEL, B. D.; FREY, N. F. DIT; LAPLAZE, L.; CASIMIRO, I.; SWARUP, R.; NAUDTS, M.; VANNESTE, S.; AUDENAERT, D.; INZÉ, D.; BENNETT, M. J., & BEECKMAN, T. (2007).** Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*, 134(4), 681-690. <https://doi.org/10.1242/dev.02753>
- SOMSSICH, M.; MA, Q.; WEIDTKAMP-PETERS, S.; STAHL, Y.; FELEKYAN, S.; BLECKMANN, A.; SEIDEL, C. A. M., & SIMON, R. (2015).** Real-time dynamics of peptide ligand-dependent receptor complex formation in planta. *Science Signaling*, 8(388), ra76-ra76. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab0598>
- SOMSSICH, M.; JE, B. I.; SIMON, R., & JACKSON, D. (2016).** CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143(18), 3238-3248. <https://doi.org/10.1242/dev.133645>
- SPARKS, E.; WACHSMAN, G., & BENFEY, P. N. (2013).** Spatiotemporal signalling in plant development. *Nature Reviews Genetics*, 14(9), 631-644. <https://doi.org/10.1038/nrg3541>
- STARESINCIC, L.; WALKER, J.; DIRAC-SVEJSTRUP, A. B.; MITTER, R., & SVEJSTRUP, J. Q. (2011).** GTP-dependent Binding and Nuclear Transport of RNA Polymerase II by Npa3 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35553-35561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286161>
- SU, Y.-H.; LIU, Y.-B., & ZHANG, X.-S. (2011).** Auxin-Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Molecular Plant*, 4(4), 616-625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp007>
- TO, J. P. C., & KIEBER, J. J. (2008).** Cytokinin signaling: Two-components and more. *Trends in Plant Science*, 13(2), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.005>

- TSUBOYAMA, S.; NONAKA, S.; EZURA, H., & KODAMA, Y. (2018).** Improved G-AgarTrap: A highly efficient transformation method for intact gemmalings of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Scientific Reports*, 8(1), 10800. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28947-0>
- VAN DEN BERG, C.; WILLEMSSEN, V.; HENDRIKS, G.; WEISBEEK, P., & SCHERES, B. (1997).** Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, 390(6657), 287-289. <https://doi.org/10.1038/36856>
- YADAV, R. K.; PERALES, M.; GRUEL, J.; GIRKE, T.; JÖNSSON, H., & REDDY, G. V. (2011).** WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes & Development*, 25(19), 2025-2030. <https://doi.org/10.1101/gad.17258511>
- YANAI, O.; SHANI, E.; DOLEZAL, K.; TARKOWSKI, P.; SABLowski, R.; SANDBERG, G.; SAMACH, A., & ORI, N. (2005).** Arabidopsis KNOXI Proteins Activate Cytokinin Biosynthesis. *Current Biology*, 15(17), 1566-1571. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.060>
- ZHAO, Y. (2010).** Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 49-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>
- ZHOU, W.; WEI, L.; XU, J.; ZHAI, Q.; JIANG, H.; CHEN, R.; CHEN, Q.; SUN, J.; CHU, J.; ZHU, L.; LIU, C.-M., & LI, C. (2010).** Arabidopsis Tyrosylprotein Sulfotransferase Acts in the Auxin/PLETHORA Pathway in Regulating Postembryonic Maintenance of the Root Stem Cell Niche. *The Plant Cell*, 22(11), 3692-3709.