



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

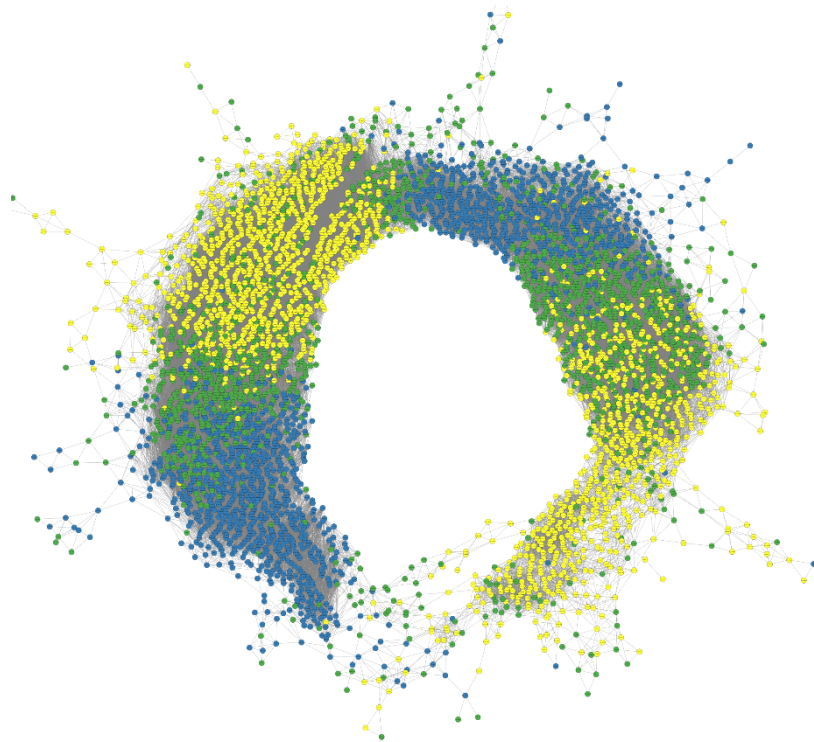


Evolución de la regulación transcripcional por luz y temperatura en plantas

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Valencia, Febrero de 2022



Realizado por:

Fernando Rodríguez Marín

Tutor: Bruno Catarino

Tutor UPV: José Gadea Vacas

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, agradecer a las personas que me han permitido realizar este trabajo y que, sin ellos, hubiera sido imposible. Primero, como no puede ser de otra forma, gracias a Bruno. Gracias no solo porque sin ti nada de esto hubiera sido posible, sino que también tengo que agradecer el esfuerzo que has realizado conmigo, la dedicación, todo lo que me has enseñado, el sentir que he formado parte de algo, parte de una investigación y, sobre todo, gracias por demostrar que, en ciencia, si el tutor es buena persona el alumno disfrutará y aprenderá por dos. Si llega el momento lo tendré muy en cuenta. Por supuesto, muchas gracias también a Miguel por acogerme en su grupo, por tantas ayudas cuando más estancado nos sentíamos y por tantas horas de reuniones en las que sacabas y me explicabas el sentido biológico de algunas figuras que yo no sabía ni por dónde empezar a mirarlas.

Muchísimas gracias por todas las pequeñas y no tan pequeñas ayudas a todo el laboratorio 2.07. Gracias a Cristina, Paula (aunque se equivocara con mi nombre meses después de conocerme), Anna, Maca... da gusto trabajar con gente así. También hay que extender el agradecimiento al 2.08 y al 2.05, al final, cada uno de vosotros me habéis ayudado a hacer este TFM. Gracias también a Javier Forment por ayudarme a manejar el servidor.

Al igual que para mi TFG, también tengo que agradecer para mi TFM al L4 del IBVF: Mercedes, Elena, Ana Belén y, también, por sus aportaciones en el trabajo, muchas gracias a Christina y a Fran. En definitiva, muchas gracias a todos por acogerme de nuevo y por hacerme sentir como si nunca me hubiera ido.

Por último, como siempre, muchas gracias a toda mi familia y amigos por estar y apoyarme siempre, tanto en las buenas como en las malas, en especial a mi madre, a mi padre y a mi hermano.

RESUMEN

Las plantas terrestres evolucionaron de las algas carófitas hace en torno a 580 millones de años. Por esta razón, estas algas y las plantas terrestres comparten ciertas características que pudieron ser importantes para la transición de hábitats acuáticos a hábitats terrestres, un evento crítico para la colonización de la tierra y la radiación de las plantas terrestres. Dos señales ambientales importantes que varían de forma considerable en ambientes terrestres respecto a ambientes acuáticos son la intensidad lumínica y la temperatura. Estos dos estímulos se encuentran integrados en un mismo circuito genético basado en las proteínas PHYTOCHROME B (PHYB), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) y ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), entre otros reguladores, en la planta vascular *Arabidopsis thaliana*.

Este trabajo se centra en estudiar el grado de conservación de esta sinergia entre luz y temperatura a lo largo del linaje verde a través del estudio comparativo de organismos representativos de los clados más importantes de dicho linaje: *Ostreococcus tauri* (algas clorófitas), *Mesotaenium endlicherianum* (algas carófitas), *Marchantia polymorpha* (briofitas) y *Arabidopsis thaliana* (plantas vasculares). Además, se busca establecer si el circuito genético en el que se basa esta integración en *A. thaliana* se encuentra también conservado en plantas terrestres.

Los resultados mostrados de este trabajo sugieren que el ancestro acuático de las plantas terrestres ya era capaz de integrar la información de luz y temperatura hace en torno a 580 millones de años a través de una compleja ruta regulatoria transcripcional. Por otro lado, la observación de que las proteínas HY5, PHY y PIF conservan un papel equivalente en la integración tanto en plantas vasculares como en briofitas sugiere que el ancestro común de las plantas terrestres empleó a dichas proteínas para establecer el mecanismo de integración.

Palabras claves: evolución de plantas; luz; temperatura; regulación génica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Filogenia del linaje verde.....	6
1.2. El papel de la luz y la temperatura en el linaje verde	8
1.3 Mecanismos genético regulatorio integrador de luz y temperatura en <i>A. thaliana</i>	10
1.4. Evolución de redes transcripcionales en plantas.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Análisis filogenético	16
3.2. Cultivo de plantas	17
3.3. Análisis fenotípico	18
3.4. Extracción de ARN.....	19
3.5. RNA-seq	19
3.6. Análisis de expresión génica diferencial y análisis subsecuentes.....	20
3.6.1. Análisis de expresión génica diferencial.....	20
3.6.2. Análisis de los DEGs.....	21
3.6.3. Agrupamiento jerárquico.....	21
3.6.4. Redes de co-expresión génica	21
3.6.5. Análisis de ortología.....	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Las señalizaciones por luz y la temperatura se integran para regular el crecimiento de estreptófitas, pero no de clorófitas	23
4.2. La luz y la temperatura co-regulan la expresión génica en todo el linaje verde..	25
4.3. Comportamientos transcripcionales sinérgicos en todos los clados del linaje verde	27

4.4. Compleja y diversa respuesta transcriptómica a la señalización por luz y temperatura en estreptófitas	29
4.5 La luz y la temperatura regulan genes ortólogos en todo el linaje verde.....	31
4.6. HY5, PHY y PIF están presentes en los genomas de plantas terrestres y algunas algas carófitas	33
4.7. HY5, PHY y PIF son necesarios para la integración de la luz y la temperatura en plantas terrestres	36
4.8. HY5, PHY y PIF comparten un gran número de dianas en las plantas terrestres	38
4.9. HY5, PHY y PIF actúan aguas arriba de la regulación sinérgica por luz y temperatura	40
4.10. Conservación de las dianas co-reguladas por HY5, PHY y PIF en plantas terrestres.....	42
5. DISCUSIÓN.....	45
6. CONCLUSIONES.....	51
7. BIBLIOGRAFÍA.....	52
8. ANEXO	58

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALC: Factor de transcripción ALCATRAZ

ampDAP-seq: Purificación y secuenciación de ADN amplificado por afinidad

ARN/RNA: Ácido ribonucleico

ASW: Agua marina artificial

At: Arabidopsis thaliana

bHLH: Basic helix-loop-helix

bZIP: Basic leucine zipper

COP1: CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1

DAP-seq: Purificación y secuenciación de ADN por afinidad

DEGs: Genes expresados diferencialmente

DNasa: Desoxirribonucleasa

FC: Fold-change

GRN: Red de regulación génica

HFR: LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED

HY5: Factor de transcripción ELONGATED HYPOCOTYL 5

MAM: Medio *Acaryochloris Marina*

Me: Mesotaenium endlicherianum

Mp: Marchantia polymorpha

Ot: Ostreococcus tauri

PAR1: PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED 1

PBS: Tampón fosfato salino

Pfr: Estado inactivo del fitocromo B

PHY: Fitocromo

PHYB: Fitocromo B

PIF: Factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR

Pr: Estado activo del fitocromo B

RNasa: Ribonucleasa

RNA-seq: secuenciación de ARN

SH-aLRT: test de ratio de verosimilitud aproximada similar a Shimodaira-Hasegawa

SPT: Factor de transcripción SPATULA

TPM: Transcritos por millón de kilobases

Z-score: Unidad tipificada

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Filogenia del linaje verde

La aparición de los organismos fotosintéticos eucariotas conllevó una gran cantidad de eventos globales que dieron forma a nuestro planeta, incluidos los cambios en el equilibrio entre el carbono y el oxígeno en la atmósfera, la modulación del albedo y el origen de complejos ecosistemas terrestres (Boyce & Lee, 2017). Estos organismos se han adaptado a multitud de hábitats a lo largo de la evolución, desde las frías aguas oceánicas hasta los áridos desiertos terrestres. Aunque todos estos organismos sean diferentes y se encuentren adaptados a climas tan dispares, provienen de un único ancestro en común (Yoon et al., 2004). La teoría más aceptada sobre el origen de los organismos eucariotas fotosintéticos es la teoría endosimbiótica (Archibald, 2015; McFadden, 2001). Esta teoría propone un único evento de simbiosis entre un organismo eucariota primitivo y una cianobacteria, en el cual se da la formación de un plastidio, dando lugar al ancestro común de todos los organismos fotosintéticos eucariotas (Archibald, 2015; McFadden, 2001). Este sería el origen de lo que conocemos hoy como el grupo taxonómico *Archaeplastida*, que apareció hace entre 1 y 1.6 mil millones de años atrás (Sánchez-Baracaldo et al., 2017; Yoon et al., 2004). Este grupo de organismos diversificó en tres ramas: *Glaucophyta* (glaucófitas), *Rhodophyta* (algas rojas) y *Chloroplastida* (linaje verde, que incluye algas verdes y plantas) (Adl et al., 2012).

Existen otros linajes como los heterocontos (donde se engloban a las algas pardas y las diatomeas), los dinoflagelados o las haptofitas, entre otros, que también contienen cloroplastos. Aun así, los cloroplastos de todos estos grupos tienen membranas adicionales, por lo que se propone que surgieron de endosimbiosis secundarias posteriores entre eucariotas (McFadden, 2001; Strasser et al., 2021). De hecho, diferentes investigaciones indican que todos los organismos de estos linajes provienen de endosimbiosis secundarias donde participan miembros de *Archaeplastida* (McFadden, 2001; Strasser et al., 2021).

Los análisis taxonómicos sugieren que el grupo *Chloroplastida* se puede dividir en dos clados que tuvieron una divergencia temprana: *Chlorophyta* (organismos clorófitos) y *Streptophyta* (organismos estreptófitos) (Adl et al., 2012; Leliaert et al., 2012). En el primer grupo se encuentran la mayoría de las especies de algas verdes que se conocen, abarcando desde los organismos eucariotas más pequeños a organismos multicelulares.

Se pueden encontrar fundamentalmente en ambientes acuáticos, tanto salado como dulce, y en ambientes terrestres (Fang et al., 2017; Leliaert et al., 2012). El segundo grupo está formado por las algas carófitas (*Charophyta*), algas de agua dulce y terrestres, y las plantas terrestres (Fürst-Jansen et al., 2020; Leliaert et al., 2012). Las algas carófitas forman un grupo parafilético compuesto, a su vez, por seis grupos taxonómicos diferentes. Estos seis grupos son, por orden de divergencia: *Mesostigmatophyceae*, *Chlorokybophyceae*, *Klebsormidiophyceae* (los cuales forman el clado KCM), *Charophyceae*, *Coleochaetophyceae*, y *Zygnematophyceae* (los cuales forman el clado ZCC). Los últimos análisis filogenéticos sitúan a *Zygnematophyceae* como el grupo filogenético más cercano a las plantas terrestres (Gitzendanner et al., 2018) (Figura 1). El ancestro común de este grupo taxonómico y las plantas terrestres se sitúa hace en torno a 580 millones de años (Cheng et al., 2019).

Las plantas terrestres forman un grupo monofilético que evolucionó a partir de un único

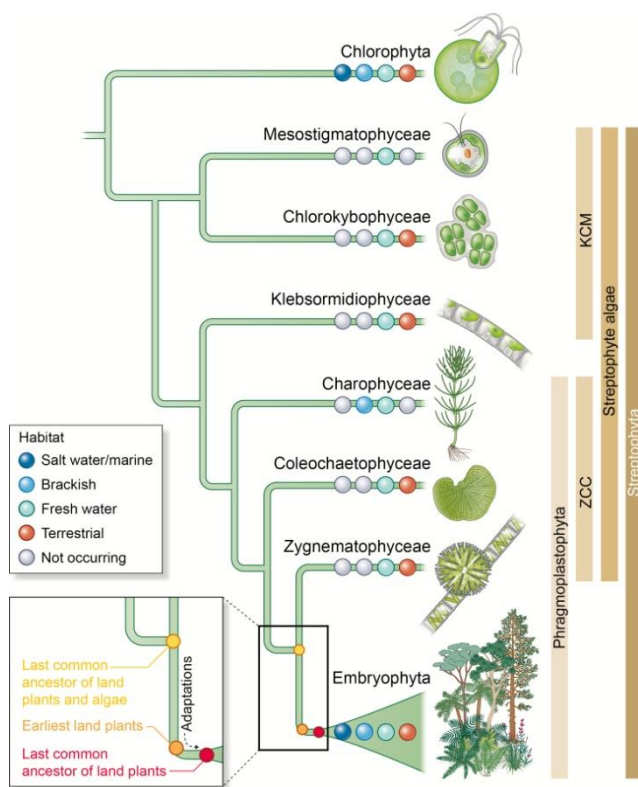


Figura 1. Árbol filogenético de los clados más importantes de *Chloroplastida*, obtenido de Fürst-Jansen et al. (2020). Los círculos representan los hábitats en los que se pueden encontrar organismos de cada clado. En amarillo el último ancestro común entre plantas terrestres y algas, en naranja la aparición de las primeras plantas terrestres y en rojo el último ancestro común de todas las plantas terrestres.

ancestro común hace en torno a 500 millones de años (Figura 1) (Cheng et al., 2019; Strasser et al., 2021). Dentro de las plantas terrestres se encuentran diferentes grupos taxonómicos, cuyas relaciones aún no se encuentran bien establecidas (Morris et al., 2018; Puttick et al., 2018). Aun así, la teoría más aceptada es que existen dos clados monofiléticos. El primer clado se trata de *Bryophyta*, que engloba a musgos, hepáticas y antoceros, es decir, las plantas sin vasculatura, mientras que el segundo es *Tracheophyta*, las plantas con vasculatura (Morris et al., 2018). Dentro de *Tracheophyta* se encuentran distintos grupos taxonómicos. Por un lado, las licófitas

forman el grupo que divergió más temprano y se separa de los helechos y de las plantas con semilla, los cuales comparten un único ancestro común. Dentro de las plantas con semillas se encuentran las gimnospermas y angiospermas, grupo en el que se engloba a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Morris et al., 2018).

Un hito dentro de la evolución del linaje verde fue la “terrestrialización” [del inglés “terrestrialization”], es decir, la colonización de hábitats terrestres. El ambiente terrestre supone un alto nivel de estrés para los organismos adaptados a ambientes acuáticos, incluyendo factores como la radiación ultravioleta o la sequía, además de un mayor rango de intensidades de luz y temperatura. Como se ha mencionado, las plantas terrestres comparten un ancestro común con las algas carófitas, las cuales habitan fundamentalmente en ambientes acuáticos dulces (Fürst-Jansen et al., 2020). Dentro de los organismos carófitos, existe una gran cantidad de especies que poseen características para poder tolerar ciertos estímulos ambientales de los hábitats terrestres, pero habitan en el agua dulce (Lewis & McCourt, 2004). Esto podría suponer la existencia de mecanismos pre-adaptativos a ciertos estímulos que, luego, fueron cruciales para la adaptación al medio terrestre, es decir, para la terrestrialización. Este mecanismo en el cual una regulación preexistente en el organismo pasa a ser fundamental para la adaptación a un nuevo medio es lo que se conoce como “pre-adaptación” (de Vries & Archibald, 2018).

Fürst-Jansen y sus colaboradores (2020) discuten sobre la importancia de elementos como los rizoides o la multicelularidad en la terrestrialización. Destacan que, de entre todas las pre-adaptaciones que se piensan fundamentales para la colonización de la tierra, una de las más importantes podría ser la tolerancia a altas irradiancias de luz por parte del cloroplasto (de Vries et al., 2016). Por tanto, parece que la luz fue uno de los principales estímulos, junto a otros como la temperatura, a los que se debió adaptar el ancestro común de todas las plantas terrestres para poder colonizar un nuevo ambiente como el terrestre. Aun así, aunque el acceso a hábitats terrestres ha supuesto la generación de situaciones de estrés por luz y temperatura, estas condiciones ambientales también proporcionan a las plantas una información mucho más amplia sobre su entorno, y en este trabajo nos ocupa el papel de la luz y la temperatura como señales ambientales, no como factores de estrés.

1.2. El papel de la luz y la temperatura en el linaje verde

Durante la terrestrialización muchos estímulos se vieron modificados debido al cambio de hábitat que sufrieron los organismos del linaje verde, pasando de un ambiente acuático a

un ambiente terrestre. Dos de los estímulos que se ven modificados en función del hábitat en el que nos encontremos son la luz y la temperatura (Speight & Henderson, 2013). Por tanto, los organismos eucariotas fotosintéticos se han tenido que adaptar a diferentes condiciones de luz y temperatura, dos señales ambientales que no son independientes, existiendo algunas combinaciones más probables que otras (Legris et al., 2017).

La luz, un estímulo de gran importancia debido a que es la fuente de energía de los organismos fotosintéticos, ve modificada tanto su cantidad como su calidad en ambientes acuáticos respecto a ambientes terrestres. Mientras que la luz azul casi no es absorbida por el agua, la luz roja apenas penetra unos metros en ella. Por tanto, los organismos que vivan en ambientes acuáticos apenas van a percibir este tipo de luz (Speight & Henderson, 2013). También se modifica el espectro luminoso en distintos hábitats acuáticos, siendo diferente en aguas abiertas oceánicas respecto a aguas de costa (Speight & Henderson, 2013). En cuanto a la temperatura, también se observa un cambio evidente de ambientes acuáticos a ambientes terrestres. Mientras que la temperatura del aire sufre fluctuaciones severas, la temperatura en el agua se encuentra tamponada, encontrando cambios de menor rango y temperaturas más constantes (Sowder & Steel, 2012). Por consiguiente, al adaptarse a ambientes terrestres, las plantas tuvieron que aclimatarse a nuevas condiciones de luz, tanto cuantitativa como cualitativamente (mayor importancia de la luz roja, luz ultravioleta u otras) y a mayores amplitudes de temperatura, entre otros cambios de estímulos.

Las algas clorófitas contienen ciertos receptores de luz como los de la familia de los criptocromos o el receptor de luz ultravioleta tipo B (Han et al., 2019). Este último posibilitó un ascenso desde aguas profundas a aguas más cercanas a la superficie, ya que permitió una mejor adaptación a ambientes con mayores dosis de una radiación dañina como la luz ultravioleta tipo B. A medida que se asciende hacia zonas más superficiales la luz roja, que es absorbida por el agua y no penetra a grandes profundidades, toma cada vez más importancia. El origen de un receptor de luz roja/luz roja lejana en las carófitas, el fitocromo (PHY), pudo ser crucial para la adaptación a este nuevo ambiente, cada vez más parecido a hábitats terrestres (Han et al., 2019).

La luz regula multitud de procesos biológicos, al igual que la temperatura. Se ha visto en diversos estudios que la luz puede regular procesos básicos como la división celular y el desarrollo sexual en organismos representativos de todos los clados del linaje verde como la clorófitas *Chlamydomonas reinhardtii* (Pan et al., 1997; Vítová et al., 2011), en la

carófito *Chara braunii* (M. Sato et al., 2014), la briofita *Marchantia polymorpha* (Kohchi et al., 2021) o la angiosperma *Arabidopsis thaliana* (Funkhauser & Chory, 1997). Además, la intensidad lumínica puede afectar a otros procesos biológicos como la activación de mecanismos de fotoprotección en diferentes organismos en todo el linaje verde (Allahverdiyeva et al., 2015).

Además de la luz, la temperatura también influye en procesos fundamentales conservados, tales como el tamaño y la morfología, dentro de todos los clados estudiados. En la clorófita *Dunaliella tertiolecta* un aumento de la temperatura conlleva a una disminución del tamaño, pero un aumento de la división celular y algunas especies de algas carófitas también ven modificado su tamaño en función de la temperatura (Ludwig et al., 2021). En *M. polymorpha* se modifica el tamaño de los talos y el ángulo de estos respecto a la superficie en función de la temperatura (Ludwig et al., 2021) y en la planta modelo *A. thaliana* la temperatura no solo afecta a la longitud del hipocotilo (como también lo hace la luz), sino que afecta también a procesos tan dispares como son la floración, la interacción planta-patógeno o la remodelación de la cromatina, entre otros procesos (Wigge, 2013).

Aunque estos dos estímulos varíen en diferentes hábitats, tanto acuáticos como terrestres, ambos regulan procesos biológicos básicos comunes en todos los clados mencionados como la diferenciación, la división celular o el desarrollo sexual. Además, afectan a otros procesos biológicos más concretos en cada uno de los organismos. Por tanto, tanto la luz como la temperatura son estímulos de gran importancia para la fisiología y el desarrollo de todos los organismos dentro del linaje verde.

1.3. Mecanismo genético regulatorio integrador de luz y temperatura en *A. thaliana*

En *A. thaliana* la luz y la temperatura actúan de forma sinérgica en varios procesos biológicos, como la elongación del hipocotilo. Ambos estímulos participan en este proceso, pero no lo hacen de forma independiente, sino que se integran en un mismo mecanismo genético regulatorio (Legris et al., 2017). El circuito genético que responde tanto a luz como a temperatura es el compuesto, principalmente, por el PHYTOCHROME B (*AtPHYB*), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (*AtPIF4*) y ELONGATED HYPOCOTYL 5 (*AtHY5*), además de otras proteínas como CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*AtCOP1*).

Los fitocromos forman una familia dentro de los fotorreceptores y son la principal familia de proteínas de respuesta a la luz roja y a la luz roja lejana. El primer fitocromo canónico vegetal apareció en el ancestro común de todas las estreptófitas (Inoue et al., 2017), aunque no son los únicos organismos que poseen este tipo de receptores, ya que se han encontrado también fitocromos no canónicos en bacterias y hongos (Rockwell & Lagarias, 2020). Los fitocromos canónicos vegetales tienen una estructura basada en tres dominios principales conservados. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio PAS, seguido del dominio GAF y el dominio PHY. Estos tres dominios juntos forman el módulo fotosensible. El dominio GAF se caracteriza por contener un residuo de cisteína al que está unido el cromóforo, la molécula encargada de reaccionar ante la luz. En el caso de los fitocromos canónicos de plantas este cromóforo es la fitocromobilina, un cromóforo tetrapirrólico lineal (F. W. Li & Mathews, 2016; Rockwell & Lagarias, 2020). En concreto, en *A. thaliana* existen 5 genes que codifican fitocromos (*AtPHYA* a *AtPHYE*).

AtPHYB pasa a su estado activo (Pfr) gracias a la luz roja y, por el contrario, pasa a su estado inactivo (Pr) absorbiendo luz roja lejana. Por tanto, los niveles de *AtPHYB* activo dependen directamente de la proporción entre luz roja y luz roja lejana. Curiosamente, este fotorreceptor no solo es capaz de pasar a su estado Pr absorbiendo luz roja lejana, sino que existe un mecanismo independiente de la luz, que se denomina reversión térmica u oscura (Legris et al., 2017). Esto lleva a la necesidad de una mayor irradiancia de luz roja a temperaturas más altas para mantener el mismo nivel de *AtPHYB* activo en comparación con temperaturas más bajas. En este punto, la señalización por luz y la señalización por temperatura se encuentran integradas en *A. thaliana* (Figura 2). Aguas abajo de la integración de estas dos señales por *AtPHYB* el circuito diverge en dos ramas antagónicas entre sí, una de ellas deriva en *AtHY5* y otra en *AtPIF4* (Figura 2).

La proteína *AtPIF4* pertenece a una subfamilia denominada grupo VII (a+b) dentro de la familia de los factores de transcripción basic helix-loop-helix (bHLH) (N. Pires & Dolan, 2010). *AtPIF4*, al igual que otros miembros de la subfamilia, contiene un dominio bHLH de interacción con el ADN y un dominio de unión a *AtPHYB* (APB), pudiendo interaccionar únicamente con la forma activa de este. La unión de *AtPIF4* y *AtPHYB* lleva a la fosforilación de *AtPIF4* y a la posterior degradación de este factor de transcripción (Legris et al., 2017).

El factor de transcripción AtHY5 pertenece a la familia de basic leucine zipper (bZIP) que contiene un dominio conservado entre todos los miembros de su familia, el dominio bZIP. Este dominio permite que la proteína se una al ADN a través de un motivo en

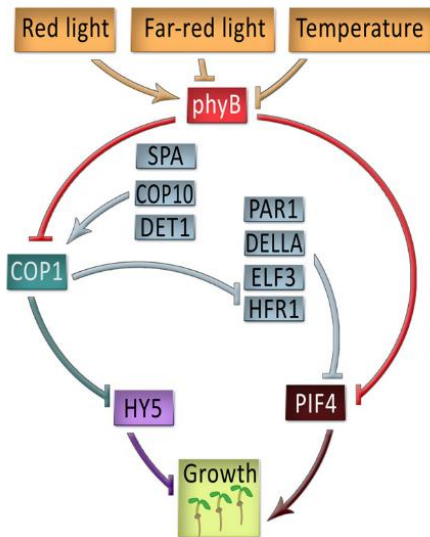


Figura 2. Esquema del núcleo de la red regulatoria por luz y temperatura en *A. thaliana* obtenido de Legris et al. (2017).

concreto y a otras proteínas a partir de un segundo motivo (Castro et al., 2017). El regulador negativo de esta proteína es AtCOP1, que ve reducida su actividad por fitocromos activados por luz (Sheerin et al., 2015) (Figura 2).

Estas dos ramas que derivan en AtPIF4 y AtHY5 aguas abajo de la señalización por AtPHYB están interconectadas en varios puntos. Por ejemplo, AtCOP1 es necesario para la degradación de AtHY5 y para la estabilización de AtPIF4, donde entran en juegos otros factores reguladores como LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED (HFR1) o PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED 1 (PAR1), ambos represores de AtPIF4. Por tanto,

existe una interconexión de las dos rutas principales de la señalización por AtPHYB y, por consiguiente, una compleja red de regulación que responde, sinérgicamente, tanto a luz como a temperatura. Este mecanismo integrador permite una ventaja adaptativa a la hora de percibir dos estímulos ambientales, permitiendo a las plantas adaptarse a multitud de hábitats (Casal & Qüesta, 2018).

1.4. Evolución de redes transcripcionales en plantas

La visión reduccionista de la biología ha aportado grandes éxitos, pero en los últimos años ha tomado mayor relevancia una visión holista de los sistemas biológicos a través de la biología de sistemas, ampliamente utilizada para estudiar redes complejas de regulación, tales como la red que integra las señalizaciones por luz y temperatura en *A. thaliana*. Los genes y las proteínas se han dejado de tomar como entidades que actúan independientemente para pasar a formar parte de “módulos” funcionales difícilmente entendibles si se estudian sus componentes por separado (Hartwell et al., 1999). Si se toman los genes que forman parte de un proceso como componentes de un módulo funcional que interactúan entre ellos se forma una red de regulación génica (GRN) (Karlach & Shamir, 2008). Una red formada por genes que se inducen o se reprimen

(co-expresan) ante un proceso biológico determinado se denomina red de co-expresión génica.

Ruprecht y sus colaboradores (2017) mostraron una correlación entre la antigüedad de los genes en la escala evolutiva y su conectividad a nivel de co-expresión. Los genes relacionados con procesos biológicos básicos presentes en todos los estratos del linaje verde como, por ejemplo, la fotosíntesis, se encuentran interconectados, mientras que otros genes más recientes en la escala evolutiva tendían a estar más ligados entre ellos, como genes relacionados con el metabolismo secundario. Por tanto, esto muestra una tendencia a una separación entre redes de co-expresión génicas ancestrales y redes más recientes. Aun así, esto no significa que las nuevas redes sean completamente independientes, pudiendo aparecer nuevas interconexiones entre estas y las redes de co-expresión génicas ancestrales (Ruprecht et al., 2017).

Se ha demostrado que ciertas características como la redundancia génica pueden aumentar la robustez de las GRN, además de aportar una mayor “evolucionabilidad” [del inglés “evolvability”] (Fares, 2015). Aun así, no solo la aparición de nuevos componentes puede modificar la GRN, sino que la aparición de nuevas conexiones entre los componentes puede dotar de ciertas características a la red como mayor interconectividad y jerarquía. Esto ocurre en la evolución de la GRN de los factores de transcripción de tipo bHLH ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE 1 y 2, siendo la GRN de *A. thaliana* más jerárquica e interconectada que la del musgo *Physcomitrium patens*. Sin embargo, el núcleo central de estas GRN, que controla el desarrollo de células con una función radicular, parece estar conservado entre estas dos especies (N. D. Pires et al., 2013). Las GRN tienden a tener un comportamiento jerárquico y, por ello, existen elementos centrales con una mayor interconectividad y sujetos a una menor evolucionabilidad, debido a que pequeños cambios en estos nodos centrales puede afectar de forma considerable a la red (Erwin & Davidson, 2009).

El análisis de GRN o de redes de co-expresión génica desde un punto de la biología de sistemas ha permitido identificar reguladores importantes conservados y determinar la organización de la red en distintos procesos biológicos. Un estudio transcriptómico y genómico mostró que ciertos factores de transcripción WRKY eran nodos centrales en la tolerancia a estrés salino y que, además, esta red jerárquica estaba conservada en plantas terrestres (Wu et al., 2021). También se demostró la conservación de mecanismos frente

a las inundaciones y se establecieron los elementos centrales de la red regulatoria ancestral en angiospermas utilizando técnicas ómicas (Reynoso et al., 2019).

En resumen, el uso de técnicas ómicas, como la transcriptómica o la genómica, permite, entre otras cosas, la generación de redes génicas regulatorias y redes de co-expresión génica, lo que puede ayudar a dilucidar la conservación de mecanismos regulatorios concretos. Esta visión holista de la biología, junto con análisis comparativos a varios niveles entre diferentes organismos de distintos clados, podría aportar información sobre la evolución a lo largo de todo el linaje verde de la regulación sinérgica que existe entre la luz y la temperatura en *A. thaliana* e inferir el estado ancestral de este mecanismo regulador.

2. OBJETIVOS

La luz y la temperatura son dos estímulos que regulan una gran cantidad de procesos y se encuentran integrados en *A. thaliana*, lo que ha proporcionado una percepción más precisa de estas señales ambientales y una mejor adaptación al entorno. Partiendo de este conocimiento y de la importancia de la terrestalización se hipotetiza que este mecanismo integrador fue importante para colonizar los ambientes terrestres desde ambientes acuáticos. De esta hipótesis nacen tres preguntas principales:

1. ¿Se encuentran integradas la luz y la temperatura para regular el desarrollo en distintos clados dentro del linaje verde?
2. ¿El mecanismo genético encargado de esta integración se encontraba activo durante la colonización de las superficies terrestres?
3. ¿Existe una conservación aguas abajo de esta red regulatoria a lo largo del linaje verde?

Teniendo en cuenta esta hipótesis y las preguntas que nacen de ella, los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Establecer el grado de integración entre luz y temperatura a través del linaje verde.
2. Investigar si la red molecular que regula conjuntamente la respuesta por luz y temperatura se encuentra conservada entre las plantas terrestres y cómo evolucionó dicha red.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Análisis filogenético

Se realizaron tres análisis filogenéticos para la comparación de las secuencias de proteínas de tres familias diferentes: HY5, PHY y grupo VII (a+b) de los bHLH, donde se engloban los PIFs. Las secuencias de las diferentes especies fueron extraídas usando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990). Se analizaron los genomas de las siguientes especies: *Anthoceros agrestis* (cepa Bonn) (F. W. Li et al., 2020), *Anthoceros punctatus* (F. W. Li et al., 2020), *Amborella trichopoda* (DePamphilis et al., 2013), *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (Berardini et al., 2015), *Azolla filiculoides* (F. W. Li et al., 2018), *Chara braunii* (Nishiyama et al., 2018), *Chlamydomonas reinhardtii* versión 5.5 (Grossman et al., 2003; Merchant et al., 2007), *Chlorokybus atmophyticus* (Wang et al., 2020), *Chondrus crispus* versión 2.0 (Collén et al., 2013), *Coccomyxa subellipsoidea* versión 2.0 (Blanc et al., 2012), *Cyanidioschyzon merolae* (Nozaki et al., 2007; Tanaka et al., 2004), *Cyanophora paradoxa* (Price et al., 2012), *Gnetum montanum* (Wan et al., 2018), *Klebsormidium nitens* (Hori et al., 2014), *Marchantia polymorpha* Tak-1 versión 5.1 (Bowman et al., 2017), *Mesostigma viride* (Wang et al., 2020), *Mesotaenium endlicherianum* (Cheng et al., 2019), *Oryza sativa* (Goff et al., 2002; Kawahara et al., 2013), *Ostreococcus tauri* versión 3.0 (Blanc-Mathieu et al., 2014; Palenik et al., 2007), *Penium margaritaceum* (Jiao et al., 2020), *Physcomitrium patens* versión 3.3 (Lang et al., 2018), *Pinus taeda* (Neale et al., 2014), *Salvinia cucullata* (F. W. Li et al., 2018), *Selaginella moellendorffii* (Banks et al., 2011), *Solanum lycopersicum* versión 4.1 (S. Sato et al., 2012), *Sphagnum fallax* (Shaw et al., 2016), *Spirogloea muscicola* (Cheng et al., 2019) y *Zostera marina* (Olsen et al., 2016).

Durante este trabajo se consiguió modificar manualmente la anotación de *M. endlicherianum* para añadir la proteína MePIF. La secuencia de dicha proteína se identificó en la base de datos de 1KP (Carpenter et al., 2019). Se consiguió clonar esta secuencia a partir de ADN complementario y se confirmó la presencia de este gen en el genoma de *M. endlicherianum* a través de secuenciación. Por tanto, la secuencia aminoacídica de MePIF fue añadida al análisis filogenético realizado para el grupo VII (a+b) de los bHLH.

Para los alineamientos de las secuencias proteicas de las diferentes especies se utilizó la herramienta online MAFFT (Rozewicki et al., 2019). La visualización y recortado de las

secuencias alineadas para excluir grandes espacios en el alineamiento se llevó a cabo con el software BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999). Estas secuencias depuradas fueron utilizadas para inferir los árboles filogenéticos mediante una estimación por máxima verosimilitud con el software IQ-TREE v.1.6.12 (Nguyen et al., 2015). Este software establece el mejor modelo para cada árbol filogenético, en el caso de HY5 el modelo usado fue LG+G, mientras que para PHY y PIF fue JTT+G. Los valores de soporte de las diferentes ramas fueron calculados a través del test de ratio de verosimilitud aproximada similar a Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT) (Guindon et al., 2010). El número de réplicas utilizados para SH-aLRT fue de 1000 para cada una de las tres familias proteicas analizadas. Para la visualización y la edición de los árboles filogenéticos se usó el software FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2007). El diagrama de puntos realizado para el análisis filogenético se representó utilizando el paquete de R ggplot2 (Wickham, 2016).

3.2. Cultivo de plantas

Se cultivaron semillas de *A. thaliana* del genotipo silvestre (Col-0) y los mutantes de pérdida de función *Athy5-2* (línea SALK_056405), *AphyB-9* (Reed et al., 1993) y *Atpif4-2* (Leivar et al., 2008), todos ellos mutantes del ecotipo Col-0. Las semillas de todos los genotipos estudiados de *A. thaliana* fueron esterilizadas tratando con etanol 70% y Tritón X-100 0.05% durante 10 minutos en rotación y, posteriormente, tratando con etanol 96% durante cinco minutos. Tras la esterilización, las semillas se cultivaron en placas con medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) con un 0.7% de agar. Las semillas se sometieron a un proceso de estratificación donde se cultivaron a 4 °C en oscuridad durante 3 días. Después, las placas fueron acondicionadas a 20 °C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 2 días. Finalmente, las semillas fueron transferidas a las condiciones de estudio y se cultivaron durante 5 días.

Los genotipos utilizados para *M. polymorpha* fueron el genotipo silvestre (Tak-1) y los mutantes de pérdida de función *Mphy5-1*, *Mpphy-1* y *Mppif-1*, todos ellos mutantes de Tak-1 que fueron generados previamente en el laboratorio. Las gemas de todos los genotipos de *M. polymorpha* se cultivaron en medio Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) con un 1% de agar durante 10 días en las condiciones de estudio. *Mesotaenium endlicherianum* fue cultivado en medio Gamborg B5 con un 1% de agar durante 10 días en las condiciones de estudio partiendo del mismo precultivo inicial. *Ostreococcus tauri* fue cultivado en matraces con 100 mL de medio MAM (Medio *Acaryochloris Marina*) durante 7 días en las diferentes condiciones de estudio partiendo del mismo precultivo.

Para obtener el medio MAM se necesitaron las siguientes soluciones: solución I (400 g/L de NaNO_3), solución II (2.8 g/L de Na_2HPO_4 , 10 g/L de K_2HPO_4), solución III (5.36 g/L de NH_4Cl , 10.4 g/L de Fe-EDTA, 74.4 g/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 46 mg/L de ZnSO_4 , 28 mg/L de CoSO_4 , 15.78 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L de CuSO_4 , 3.4 mg/L de H_2SeO_3 y 360 mg/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). y, por último, una solución de vitaminas (0.2 g/L de Tiamina-HCl, 1.5 mg/L de biotina y 1.5 mg/L de Vitamina B1). De cada una de estas soluciones, se tomó 1 mL, a excepción de la solución de vitaminas, de la cual se tomó 0.5 mL y se añadió a 1 L de agua marina artificial (ASW). El ASW se obtuvo como se indica en Kester et al. (1967).

3.3. Análisis fenotípico

Las condiciones de cultivo para el análisis fenotípico de *A. thaliana*, *M. polymorpha* y *M. endlicherianum* fueron 16 °C, 20 °C, 24 °C y 28 °C y, para cada una de las temperaturas, las condiciones de intensidades lumínicas fueron 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en luz continua. Para *A. thaliana* se midió la longitud del hipocotilo, para *M. polymorpha* el área de la superficie de los talos con la lupa Leica DMS 1000 y para *M. endlicherianum* el número de células con el microscopio Leica DM5000. Todas las mediciones fueron realizadas en ImageJ (Schneider et al., 2012). Estos datos de estas tres especies se generaron previamente en el laboratorio y fueron analizados para este trabajo.

Las condiciones de cultivo para el análisis fenotípico de *O. tauri* fueron 16 °C, 20 °C y 24 °C y, para cada una de las temperaturas, las condiciones de intensidades lumínicas fueron 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en luz continua. Los cultivos fueron analizados en un citómetro de flujo para estudiar el número de células. Para cada muestra se diluyó 1 mL de cultivo en 9 mL de tampón fosfato salino (PBS). De esta dilución se centrifugaron 2 mL a 4 °C, 8 minutos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 mL de etanol 100%. Esta suspensión se guardó a -20 °C hasta el análisis en el citómetro de flujo. Para la tinción de las muestras se añadió 2 μL de Vybrant® DyeCycle™ y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ System. El análisis de los datos brutos generados se realizó usando el software FlowJO™ v10.8.0 (Becton et al., 2021).

Para encontrar diferencias significativas entre las distintas comparaciones por parejas de cada una de las especies se realizaron distintos test ANOVA unifactorial seguido de un

test TukeyHSD con las funciones *aov* y *TukeyHSD*, respectivamente, del paquete stats de R (R Core Team, 2021).

3.4. Extracción de ARN

La extracción de ARN de las especies *A. thaliana*, *M. polymorpha* y *M. endlicherianum* se realizaron con el kit de extracción de ARN NucleoSpinTM RNA Plant Kit Macherey-Nagel según las indicaciones del fabricante. Durante la extracción se realizó una digestión de ADN mediante la DNasa proporcionada por el fabricante. Para la extracción de ARN de *O. tauri* se partió de 25 mL de cultivo. Tras centrifugar a 4 °C durante 10 minutos a máxima velocidad se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en 800 µL de tampón PBS. Tras volver a centrifugar bajo las mismas condiciones las muestras fueron congeladas a -80 °C hasta la extracción de ARN en sí.

La extracción de ARN de *O. tauri* comenzó resuspendiendo las muestras en 400 µL de tampón STET (8% Sacarosa, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.0). Tras la adición de 400 µL de una mezcla de formol:cloroformo 1:1 y de 100 µL de microperlas de vidrio de 0.3-0.4 mm de diámetro se procedió a alternar 1 minuto de vórtex con 1 minuto en hielo durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13000g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se transfirió la fase superior a 400 µL de formol:cloroformo 1:1 (segunda fenolización). Esta mezcla se agitó en el vórtex y se volvió a centrifugar a 13000g durante 5 minutos y a 4 °C. Se realizó una tercera fenolización igual que la segunda. La fase superior se mezcló con 400 µL de cloroformo y se centrifugó a 13000g durante 15 minutos a 4 °C. De nuevo, se extrajo la fase superior y se mezcló con 80 µL de LiCl 10 M y 550 µL de etanol 100%. Esta mezcla se incubó a -20 °C durante toda la noche. Tras la incubación se centrifugaron las muestras a 13000g durante 10 minutos a 4 °C y, tras eliminar el sobrenadante, se diluyó el precipitado en 23 µL de agua libre de RNasas. Para extraer el ARN de esta dilución se utilizó el kit de extracción ISOLATE II RNA Plant Kit BIOLINE, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. RNA-seq

Para el estudio de secuenciación de ARN (RNA-seq) las condiciones de cultivo para todos los organismos y genotipos mencionados fue de 16 °C y 24 °C a $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en luz continua para cada temperatura. Se cultivaron 4 réplicas para cada una de las condiciones. *M. endlicherianum* fue cultivada sobre una capa de celofán en

contacto con el medio Gamborg B5 para facilitar la recogida de muestras. Las muestras fueron recogidas, congeladas en nitrógeno líquido y machacadas para la extracción de ARN, la cual se llevó a cabo como se describe en el apartado *Extracción de ARN*. Las concentraciones y la calidad de las muestras de ARN fueron medidas en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Se seleccionaron las 3 réplicas con mayor calidad de cada condición para la secuenciación. La construcción de las librerías y la secuenciación de lecturas de tipo *pair-end* de 100 pares de bases de longitud fue realizada por la empresa BGI Genomics, Hong Kong. La plataforma de secuenciación utilizada fue DNBseq™ y la cobertura fue de unas 50 millones de lecturas por muestra.

La calidad de los datos brutos fue analizada mediante FastQC v.0.11.5 con los parámetros por defecto. Para la construcción de los índices de los genomas se utilizó HISAT2 v.2.1.0 (Kim et al., 2019) usando la función *hisat2-build* con los parámetros por defecto. El mapeado de las lecturas cortas en los índices de los genomas de referencia de las 4 especies se realizó con el mismo software usando la función *hisat2* con el parámetro *--data*. Los genomas de referencia y las anotaciones utilizadas para el mapeado de las lecturas cortas fueron los mismos que los usados en el apartado *Análisis filogenético*. Se modificó manualmente la anotación del genoma de *M. endlicherianum* para añadir MePIF en la región correspondiente del genoma. El procesamiento de los archivos en formato SAM hasta formato BAM se llevó a cabo con el software Samtools v.1.7 (H. Li et al., 2009) usando los parámetros por defecto, mientras que el ensamblaje de los transcritos se realizó con la herramienta StringTie v.2.1.5 (Pertea et al., 2015) (parámetros: *-G anotation.gtf*). La cuantificación de los niveles de expresión se llevó a cabo con el mismo software (parámetros *-e -B -G anotation.gtf -A gene_abun.tab*).

3.6. Análisis de expresión génica diferencial y análisis subsecuentes

3.6.1. Análisis de expresión génica diferencial

Para el análisis de expresión génica diferencial se utilizó el paquete de R DESeq2 v.3.14 (Love et al., 2014). Previamente, se utilizó el script prepDE.py proporcionado por StringTie para la conversión de los datos a una matriz de lecturas brutas compatible con DESeq2. Se hicieron un total de cuatro comparaciones: 24 °C frente a 16 °C a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24 °C frente a 16 °C a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (todos ellos genes regulados por temperatura), 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ frente a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 16 °C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ frente a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 24 °C (todos ellos genes regulados por intensidad lumínica) para cada

especie y genotipo. Además, se hicieron comparaciones enfrentando los mutantes de *A. thaliana* y *M. polymorpha* con las respectivas cepas silvestres para cada una de las condiciones analizadas (16 °C y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 °C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24 °C y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 24 °C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los genes regulados que fueron considerados genes expresados diferencialmente (DEGs) fueron aquellos cuyo *p*-valor ajustado fue menor que 0.01 y cuyo valor de log₂ fold-change (FC) fue mayor que 1 o menor que -1.

3.6.2. Análisis de los DEGs

Para el análisis de los DEGs de las diferentes especies y mutantes se realizaron diagramas de Venn proporcionales con el paquete de R *eulerr* (Larsson, 2021), diagramas de Venn de cinco sets con la herramienta online InteractiVenn (Heberle et al., 2015), mapas de calor con el paquete de R *pheatmap* (Kolde, 2019) y gráficos de puntos con el paquete de R *ggplot2* (Wickham, 2016).

3.6.3. Agrupamiento jerárquico

Los valores de expresión en transcritos por millón de kilobases (TPM) de los DEGs obtenidos tanto por temperatura como por intensidad lumínica fueron normalizados usando el método de unidad tipificada (*Z-scores*). Estos valores normalizados fueron agrupados en diferentes clústeres utilizando el método de agrupamiento jerárquico mediante la función *hclust* del paquete *stats* de R (R Core Team, 2021). Los distintos clústeres fueron representados utilizando el paquete de R *ggplot2* (Wickham, 2016).

3.6.4. Redes de co-expresión génica

Para la generación de las redes de co-expresión génica de las cuatro especies se realizó un matriz de correlación analizando el coeficiente de correlación de Pearson para los valores de expresión de cada par de genes usando la función *cor* del paquete *stats* de R (R Core Team, 2021). Se asumió una co-expresión génica cuando el coeficiente de correlación de Pearson entre dos genes fue mayor a 0.99. La generación de la red y su exportación en formato GML fueron realizadas con el paquete de R *igraph* (Csardi & Nepusz, 2006). Para la visualización, anotación y edición de las redes de co-expresión se utilizó el software Cytoscape v.3.9.0 (Shannon et al., 2003).

3.6.5. Análisis de ortología

Para el análisis de ortología se usó la herramienta OrthoFinder v.2.3.1 (Emms & Kelly, 2018). Esta herramienta bioinformática infiere la ortología de genes de distintas especies a través de árboles filogenéticos y agrupa distintos genes de diferentes especies en

ortogrupos (grupos de ortólogos) según su secuencia proteica. Para este análisis se realizó un estudio de la ortología de todos los genomas de todas las especies utilizadas en el apartado *Análisis filogenético* para obtener una mayor robustez.

Los scripts utilizados en el procesamiento de los datos brutos del RNA-seq, el análisis de expresión génica diferencial y los subsecuentes análisis, además de los scripts utilizados para la generación y análisis estadístico del análisis fenotípico y análisis filogenético se pueden encontrar en: https://github.com/fernandorguezm/TFM_Fernando_Rodriguez

4. RESULTADOS

4.1. Las señalizaciones por luz y temperatura se integran para regular el crecimiento de estreptófitas, pero no de clorófitas

Para conocer el grado de integración entre las señalizaciones por luz y temperatura a lo largo de la evolución del linaje verde se procedió a realizar un estudio fenotípico de organismos representativos de los clados más importantes de dicho linaje. En concreto, se analizaron cuatro especies: la microalga marina *Ostreococcus tauri*, representativa de los organismos clorófitos, la microalga *Mesotaenium endlicherianum*, representativa de los organismos carófitos, la hepática *Marchantia polymorpha* representativa de los briofitos y, por último, la angiosperma *Arabidopsis thaliana*, representativa de las plantas vasculares.

El análisis consistió en el estudio de diferentes aspectos fenotípicos de cada una de las especies a diferentes condiciones de temperatura (16 °C, 20 °C, 24 °C y 28 °C) en combinación con diferentes condiciones de intensidades lumínicas (1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), siendo en total 12 condiciones diferentes, a excepción de *O. tauri*. Para este organismo se eliminaron las condiciones de 28 °C y 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por su imposibilidad de crecer a dichos niveles de temperatura e intensidad lumínica. Estas condiciones se tratan de niveles moderadamente altos o bajos de temperatura e intensidad lumínica para los organismos estudiados.

Al analizar la longitud del hipocotilo en *A. thaliana* se observó que bajas intensidades lumínicas promovieron la elongación del hipocotilo y esta inducción se vio favorecida por temperaturas más altas (Figura 3A). Por otro lado, intensidades lumínicas más altas provocaron un crecimiento limitado del hipocotilo y el aumento de la longitud del hipocotilo mediado por altas temperaturas se vio también reducido a estas intensidades lumínicas, observándose un menor rango de respuestas a temperatura, respecto a intensidades lumínicas más bajas. Por tanto, el rango de respuestas a la temperatura varió en función de la intensidad lumínica y viceversa (Figura 3A). Esto sugiere que, en *A. thaliana*, la respuesta a la temperatura está influenciada por la intensidad lumínica y viceversa, lo que indica una integración de las dos señales ya descrita en la literatura (Legris et al., 2017).

El crecimiento del área del talo en *M. polymorpha* se vio favorecido a altas intensidades lumínicas. Dicho crecimiento también se vio impulsado por temperaturas más altas (Figura 3B). Mientras que a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el rango de respuestas a la temperatura fue amplio, este rango de respuesta en diferentes condiciones de temperatura fue mínimo a $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obteniéndose áreas de talos sin diferencias estadísticas en las distintas

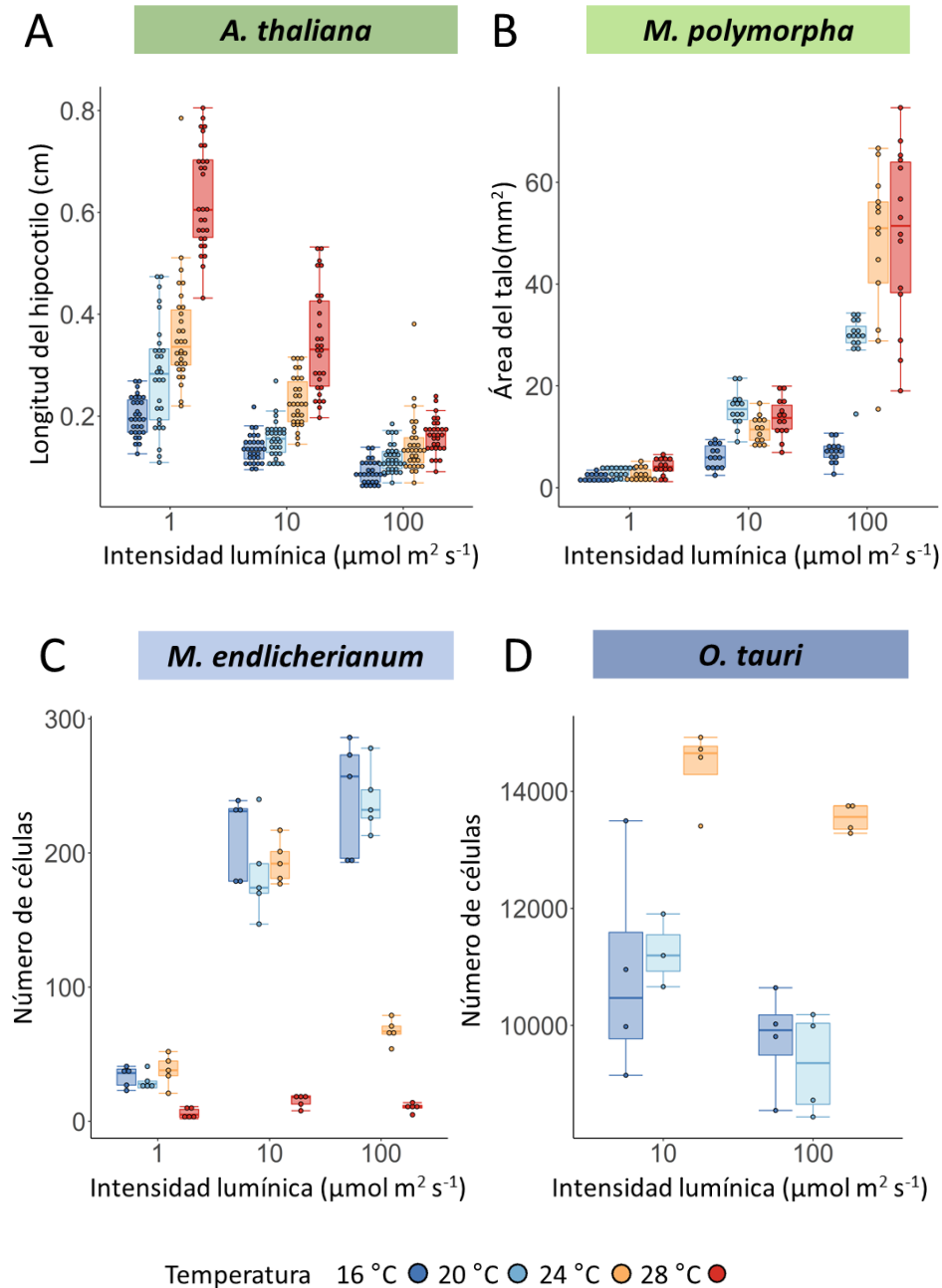


Figura 3. Análisis de diferentes parámetros fenotípicos de cada uno de los organismos estudiados en diferentes condiciones de intensidad lumínica y temperatura. **A.** Medida de la longitud del hipocotilo en *A. thaliana*. **B.** Medida del área del talo en *M. polymorpha*. **C.** Número de células en *M. endlicherianum*. **D.** Número de células en *O. tauri*. Los puntos representan cada individuo analizado en *A. thaliana* y en *M. polymorpha* y cada cultivo analizado en *M. endlicherianum* y *O. tauri*.

condiciones de temperatura (Figura 3B, Tabla suplementaria 1). Esta diferencia en el rango de respuestas a temperaturas según la intensidad lumínica sugiere una integración de estas dos señales en *M. polymorpha*, al igual que se ha observado en *A. thaliana*.

En cuanto a la carófito *M. endlicherianum*, mientras que a 16 °C no hubo diferencias significativas en el número de células entre 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 20 °C existió un aumento significativo en el número de células en función de la intensidad lumínica incluso a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3C, Tabla suplementaria 1). Además, se observó un comportamiento diferente respecto a la intensidad lumínica a 24 °C y 28 °C (Figura 3C). Estos distintos comportamientos en respuesta a la temperatura en función de la intensidad lumínica, y viceversa, indican una sinergia entre ambos estímulos en *M. endlicherianum*.

El número de células en *O. tauri* aumentó en función de la temperatura y en condiciones de intensidades lumínicas más bajas (Figura 3D). Tanto la intensidad lumínica como, en mayor medida, la temperatura, afectaron al número de células en esta microalga clorófito (Figura 3D). Sin embargo, el rango de respuestas a la temperatura no varió en función de la intensidad lumínica, es decir, las diferencias en el número de células entre las diferentes temperaturas fueron las mismas independientemente de la intensidad lumínica a la que se encontraba el organismo (Figura 3D, Tabla suplementaria 1). Por tanto, existe un comportamiento aditivo entre la luz y la temperatura en *O. tauri*, es decir, estos dos estímulos promueven la división celular a través de mecanismos regulatorios independientes. Todos estos resultados juntos sugieren que el ancestro común de todas las plantas terrestres y *M. endlicherianum* ya integraba la luz y la temperatura hace en torno a 580 millones de años, mientras que los organismos clorófitos parecen no tener la capacidad de integrar estos estímulos.

4.2. La luz y la temperatura co-regulan la expresión génica en todo el linaje verde

Para saber hasta qué punto el efecto de integración se extendía a otros procesos en estreptófitos, y para confirmar la ausencia de mecanismos integradores en clorófitos, procedimos a realizar un análisis transcriptómico mediante RNA-seq de los cuatro organismos estudiados en el análisis fenotípico. Las condiciones de estudio fueron 16 °C y 24 °C en combinación con 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estas condiciones fueron seleccionadas tras observar comportamientos fenotípicos diferentes en todas las especies.

Se tomaron como genes expresados diferencialmente (DEGs) de temperatura aquellos cuyo *p*-valor ajustado fue menor que 0.01 y cuyo valor de expresión fue dos veces mayor o menor (\log_2 FC mayor que 1 o menor que -1) en las comparaciones de 24 °C frente a 16 °C a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 24 °C frente a 16 °C a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otro lado, se tomaron como DEGs de intensidad lumínica aquellos que cumplían los mismos requisitos en las comparaciones de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ frente a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 16 °C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ frente a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 24 °C.

El análisis de la expresión génica diferencial mostró un número alto de DEGs regulados tanto por la intensidad lumínica como por la temperatura (Figura 4). En *A. thaliana* aparecieron 2785 DEGs de temperatura y 3187 DEGs de intensidad lumínica, siendo 1380 comunes entre ellos (Figura 4). En *M. polymorpha* se obtuvieron 2306 DEGs de temperatura y 1965 de intensidad lumínica de los cuales 1217 genes se compartían entre

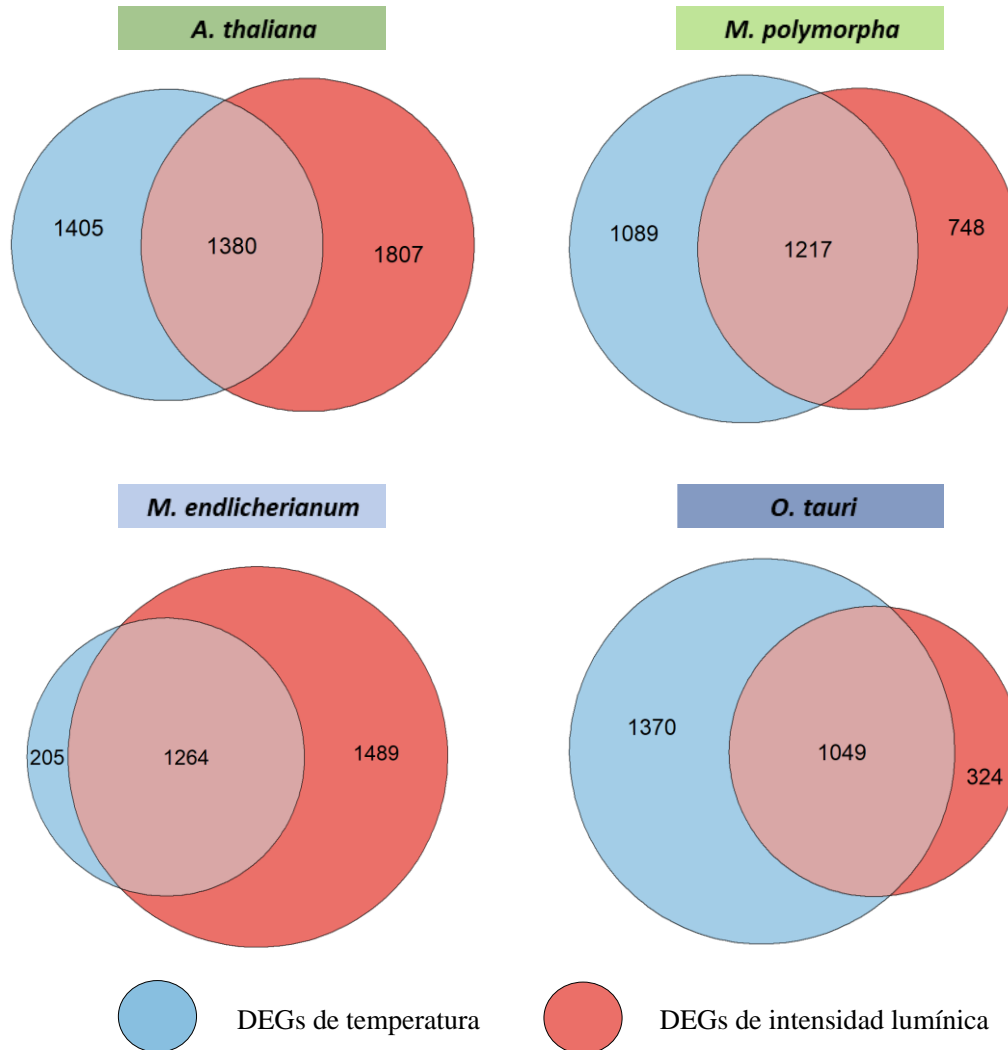


Figura 4. Diagramas de Venn proporcionales al número de DEGs de los DEGs de temperatura y los DEGs de intensidad lumínica para cada una de las especies analizadas.

los dos estímulos (Figura 4). Para *M. endlicherianum* se obtuvieron diferencias notables entre genes expresados diferencialmente por temperatura e intensidad lumínica, estableciéndose el número de DEGs de temperatura en 1469 y de intensidad lumínica en 2753, existiendo 1264 DEGs comunes (Figura 4). También se observaron diferencias entre ambos estímulos para *O. tauri*, encontrándose un mayor número de DEGs de temperatura (2419) respecto a la intensidad lumínica (1373), regulándose 1049 genes por ambos estímulos (Figura 4).

Los DEGs de temperatura y los DEGs de intensidad lumínica mostraron un solapamiento evidente entre las dos señales a nivel transcriptómico en todas las especies, incluidas *O. tauri* (Figura 4). Se observó un grado de solapamiento que abarca aproximadamente entre el 30% y el 43% de todos los DEGs observados en cada una de las especies. Estos datos sugieren que la luz y la temperatura co-regulan la expresión génica de un gran número de genes en todo el linaje verde, ya sea bien de forma aditiva o sinérgica.

4.3. Comportamientos transcripcionales sinérgicos en todos los clados del linaje verde

Para distinguir si el solapamiento de genes co-regulados por luz y por temperatura reflejaba un comportamiento integrativo/sinérgico o simplemente aditivo, realizamos un análisis de agrupamiento jerárquico de la expresión génica normalizada en *Z-score* en el cual se estableció el número de clústeres en 30 y, seleccionando los 10 clústeres diferentes con mayor número de DEGs, se observaron los distintos comportamientos transcripcionales más comunes de los DEGs en las cuatro especies estudiadas (Figura 5A).

Analizando los clústeres se observaron comportamientos sinérgicos en clústeres de *A. thaliana* (clústeres 3 y 4, entre otros), de *M. polymorpha* (clústeres 1 y 2, entre otros), de *M. endlicherianum* (clústeres 1 y 5, entre otros) e, incluso, de *O. tauri* (clústeres 1 y 8, entre otros) (Figura 5A). Este comportamiento sinérgico se observó, al igual que en el análisis fenotípico, al aparecer diferencias en el rango de respuestas a temperatura en función de la intensidad lumínica, y viceversa. Observar clústeres que siguen un comportamiento típico de una integración entre luz y temperatura en *O. tauri* sugiere que la integración de estas dos señales a nivel transcriptómico estaba ya presente en el ancestro común de todos los organismos del linaje verde. Aun así, se observó una mayor acumulación de clústeres en los que el rango de respuestas a temperatura no varió apenas

en función de la intensidad lumínica en *O. tauri* (clústeres 2, 3, 4, 6, entre otros) (Figura 5A). Estos clústeres no mostraron una fuerte sinergia entre luz y temperatura en *O. tauri*, sino que mostraron una dinámica más aditiva, con un fuerte efecto de la temperatura en comparación con la respuesta en los otros tres organismos, los cuales presentaron un gran número de clústeres con comportamientos integrativos. Por tanto, aunque la respuesta transcriptómica integrativa entre luz y temperatura parezca conservada, existe una clara

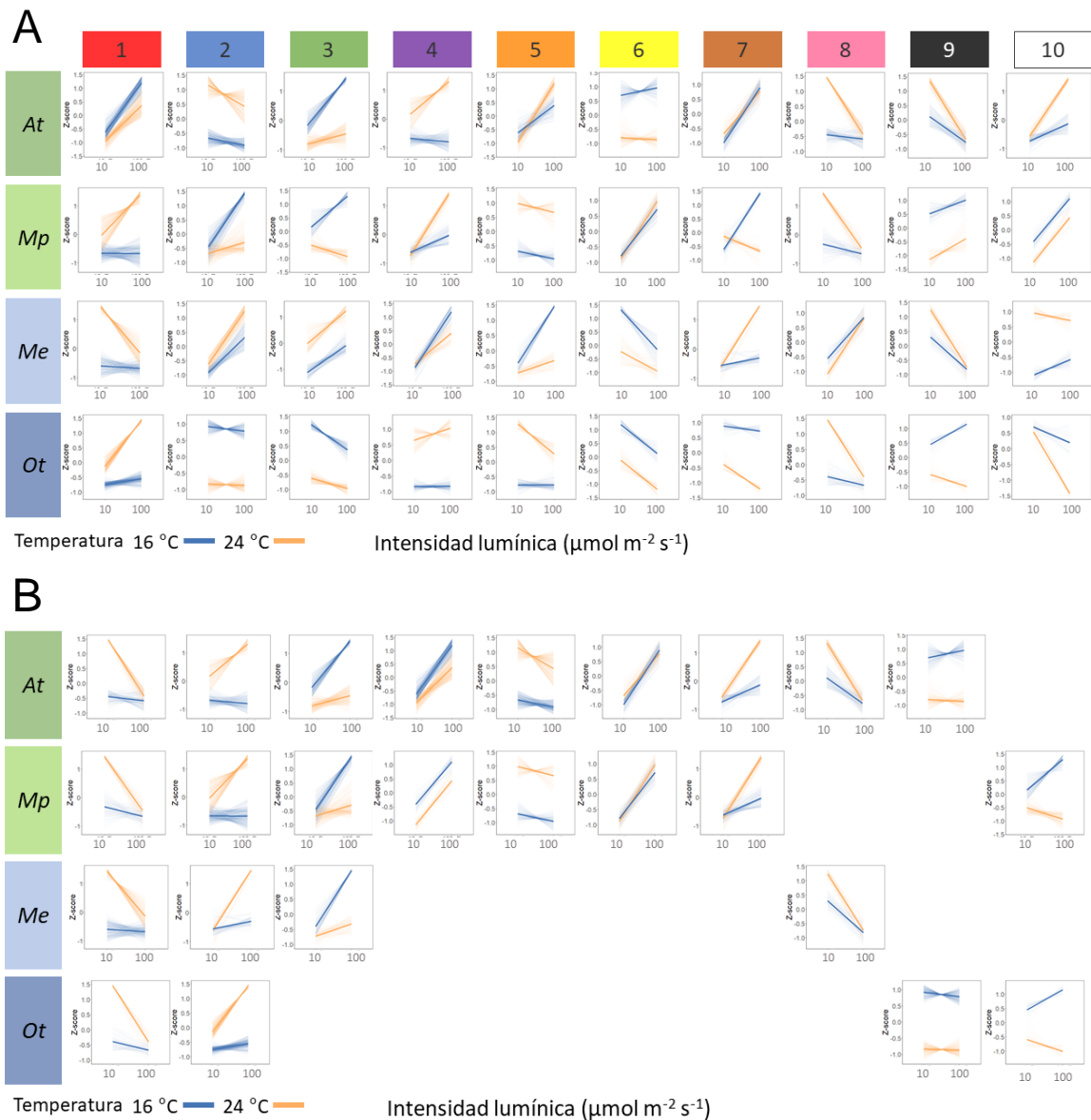


Figura 5. A. Expresión génica en las diferentes condiciones de los DEGs agrupados en los 10 clústeres diferentes más numerosos de un agrupamiento jerárquico de 30 clústeres ordenados del clúster con más DEGs al clúster con menos DEGs para cada una de las especies (*At*: *Arabidopsis thaliana*, *Mp*: *Marchantia polymorpha*, *Me*: *Mesotaenium endlicherianum*, *Ot*: *Ostreococcus tauri*). Se representa la expresión de cada uno de los genes en dos líneas de menor intensidad (expresión a 16 °C y 24 °C) y la expresión media de todos los genes del clúster en una línea con mayor intensidad. B. Clústeres que tienen similitud con al menos un clúster de otro organismo ordenados por número de similitudes.

diferencia entre los comportamientos transcripcionales más comunes de los distintos organismos. Estos resultados sugieren que el ancestro acuático estreptófito de todas las plantas terrestres contenía una compleja respuesta transcriptómica a los estímulos de luz y temperatura.

Aunque exista una diferencia considerable entre los comportamientos transcripcionales más comunes de los diferentes organismos, al comparar las plantas terrestres se observó una conservación en los comportamientos transcripcionales más comunes (Figura 5B). Siete de los diez clústeres más comunes de *A. thaliana* y *M. polymorpha* tuvieron un perfil de expresión prácticamente idéntico entre las dos especies. Esto sugiere que los comportamientos transcripcionales más comunes se encuentran conservados en plantas terrestres. Esta conservación en los comportamientos transcripcionales no se observa en *M. endlicherianum* o en *O. tauri*, que únicamente compartieron 4 clústeres con el resto de las especies. Todos estos datos juntos sugieren que, aunque existe un cierto grado de conservación general del efecto de la luz y la temperatura sobre la transcripción en todo el linaje verde, la conservación de comportamientos transcripcionales concretos se reduce solo a la comparación entre estreptófitas (es decir, plantas terrestres y algas carófitas) y, en especial, a la comparación entre plantas terrestres.

4.4. Compleja y diversa respuesta transcriptómica a la señalización por luz y temperatura en estreptófitas

Los organismos estreptófitos analizados mostraron una mayor diversidad en las respuestas transcriptómicas en relación con *O. tauri* (Figura 5A). Al analizar qué cantidad de todos los comportamientos transcripcionales de los DEGs de cada especie son explicados por los 10 clústeres más numerosos se observaron diferencias notables entre las especies estreptófitas y la especie clorófita. En *A. thaliana* los 10 clústeres más numerosos explicaron el 75.5% de todos los comportamientos transcripcionales de los DEGs, en *M. polymorpha* este porcentaje fue del 74.2%, en *M. endlicherianum* del 70.6%, mientras que en *O. tauri* fue del 90.5%. Estos datos indican que la gama de patrones de los comportamientos transcripcionales en *O. tauri* es mucho más limitada, ya que ni el 10% de los DEGs se pueden explicar por otros comportamientos transcripcionales no recogidos en los 10 clústeres más numerosos. Por el contrario, este porcentaje asciende al 25-30%, aproximadamente, en los organismos estreptófitos.

Tras el análisis de agrupamiento jerárquico se construyeron redes de co-expresión génica para analizar más en profundidad todos los posibles comportamientos transcriptómicos presentes en los distintos organismos. Estas redes de co-expresión génica se anotaron con los 10 clústeres más numerosos para cada una de las especies. La menor diversidad observada en *O. tauri* se manifestó en las redes de co-expresión a través de una diferencia notable en la topología de las redes (Figura 6). En las especies estreptófitas se observó una topología circular que no apareció en *O. tauri*. Una topología circular es indicativa de una mayor variación gradual de distintos comportamientos transcripcionales posibles.

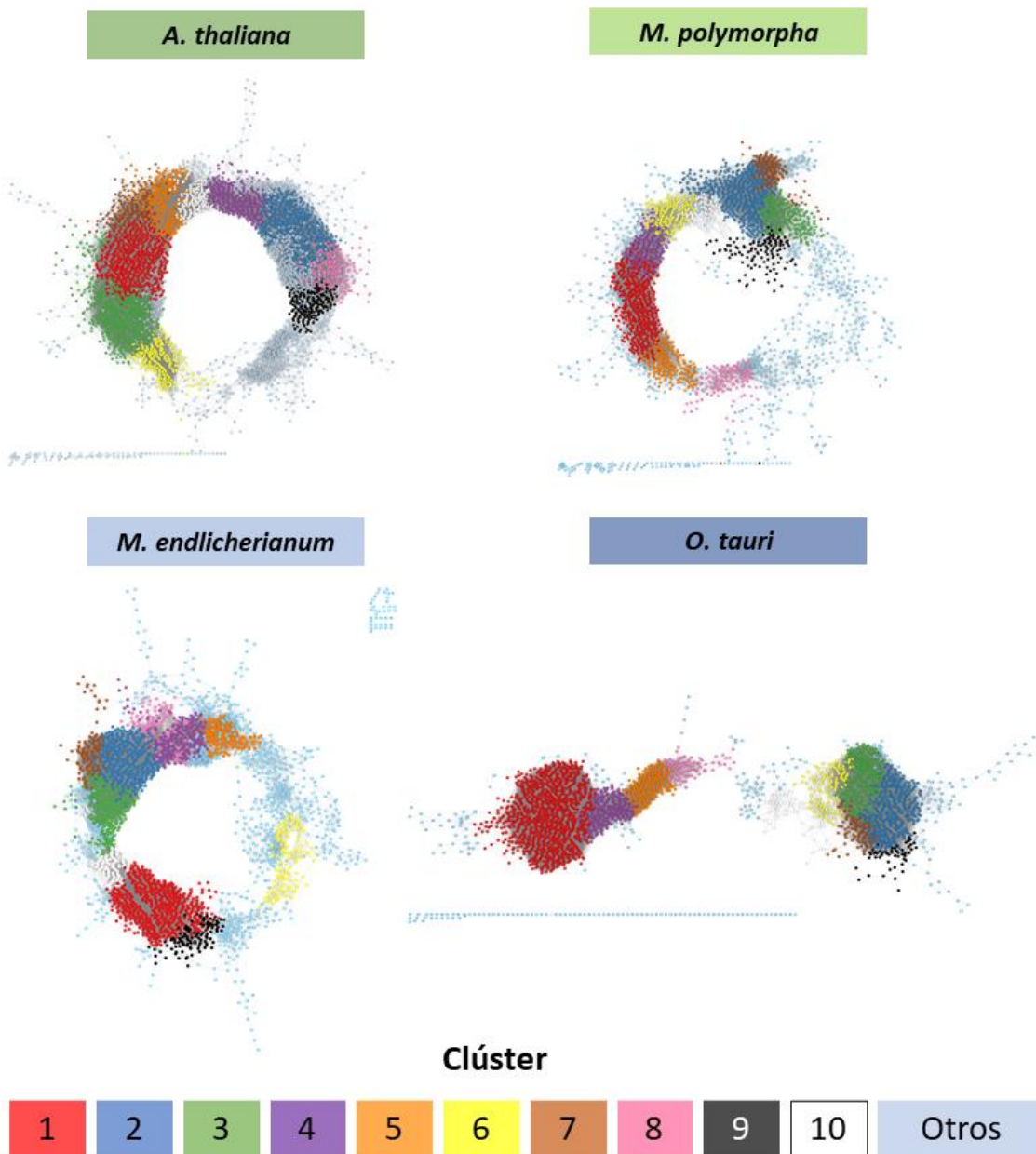


Figura 6. Redes de co-expresión génica de cada una de las especies. Cada color representa, según la leyenda, a cada uno de los clústeres más numerosos en el estudio de agrupamiento jerárquico (Figura 5).

Al existir un gran número de perfiles transcriptómicos lo suficientemente numerosos se forma un continuo en la red transcripcional, apareciendo una forma circular.

La topología de la red de co-expresión de *O. tauri* consiste en dos módulos principales que acogen a los DEGs inducidos (modulo izquierdo) y reprimidos (modulo derecho) por temperatura (Figura 6). La temperatura afectó más al transcriptoma de *O. tauri* que la luz (Figura 4), por lo que es este estímulo el que mejor explica la topología de la red de co-expresión génica en esta especie. En este caso no se apreció una red continua como en el resto de las especies, indicando probablemente un menor grado de integración entre luz y temperatura o, dicho de otra manera, una menor gama de comportamientos transcripcionales posibles, pudiéndose explicar la red casi exclusivamente por genes inducidos y reprimidos por temperatura. Esto es consistente con la hipótesis de que la intensidad lumínica y la temperatura tienen un bajo grado de sinergismo, como se observó en el análisis fenotípico (Figura 3D), para regular el desarrollo en *O. tauri*. Estos resultados sugieren que los organismos estreptófitos poseen una compleja y diversa respuesta transcripcional a la señalización por luz y temperatura en comparación con los organismos clorófitos.

4.5. La luz y la temperatura regulan genes ortólogos en todo el linaje verde

La conservación a nivel de complejidad y diversidad en la respuesta transcriptómica a luz y temperatura en los organismos estreptófitos plantea la pregunta de si los elementos regulados por estos estímulos se encuentran conservados también en dichos organismos. Es decir, si los DEGs regulados por intensidad lumínica, temperatura y ambos estímulos se encuentran conservados en las diferentes especies. Para estudiar la conservación de genes en distintos organismos se realizó un análisis de ortología génica usando la herramienta OrthoFinder (Emms & Kelly, 2018). Este análisis consistió en agrupar los genes de los distintos organismos en ortogrupos basándose en su secuencia proteica para luego establecer en qué ortogrupos se encuentran los distintos DEGs. De esta forma se pudo determinar hasta qué punto los DEGs de cada especie en cada condición pertenecen a los mismos ortogrupos en las otras especies.

Por un lado, se observó que existen DEGs de temperatura, de intensidad lumínica y de ambos estímulos que comparten ortogrupos en todas las especies (Figura 7). Esto indica que existe un grupo de genes que responden tanto a intensidad lumínica como a

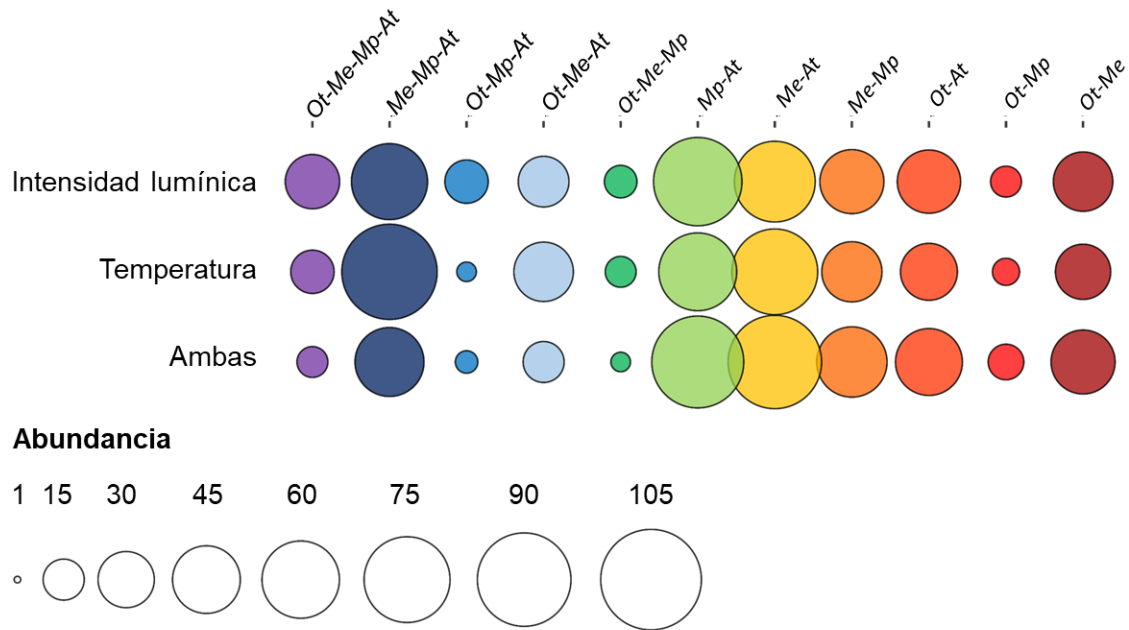


Figura 7. Gráfico de puntos que representa la abundancia de ortogrupos en común entre los DEGs de al menos dos especies. Estos ortogrupos analizados contienen DEGs tanto de intensidad lumínica como de temperatura en al menos dos especies, es decir, no se representan aquellos ortogrupos que comparten DEGs de temperatura en al menos dos especies, pero solo existe una especie representada en estos ortogrupos por los DEGs de intensidad lumínica y viceversa. Las especies fueron abreviadas de la siguiente forma: *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Mp*: *Marchantia polymorpha*, *Me*: *Mesotaenium endlicherianum*, *Ot*: *Ostreococcus tauri*.

temperatura en todos los organismos analizados. Por otro lado, aunque se apreció un alto número de DEGs compartidos mediante ortología entre *O. tauri* y los organismos estreptófitos individualmente (*Ot-Me*, *Ot-Mp* y *Ot-At*), se observó una mayor abundancia de ortogrupos compartidos entre los organismos estreptófitos (*Me-Mp*, *Me-At* y *Mp-At*) (Figura 7). Además, también se observó una mayor abundancia de ortogrupos compartidos entre las estreptófitas (*Me-Mp-At*) respecto a otras comparaciones que incluyen tres especies en las que se encuentra *O. tauri* (Figura 7).

Todos estos datos juntos sugieren que el ancestro común de todo el linaje verde contenía un set de genes regulados por luz, temperatura y ambos estímulos y que este set de genes se ha conservado a lo largo de la evolución. Además, el ancestro común de las plantas terrestres y *M. endlicherianum* pudo aumentar la complejidad de su red de regulación por luz y temperatura y estos elementos regulados se han podido conservar en estos organismos estreptófitos.

4.6. HY5, PHY y PIF están presentes en los genomas de plantas terrestres y algunas algas carófitas

Establecidos los diferentes grados de integración de luz y temperatura tanto a nivel fenotípico como transcriptómico de las diferentes especies se procedió a analizar la importancia de tres de los principales componentes para la integración de estos dos estímulos en *A. thaliana*: HY5, PHY y PIF. Se comenzó con un análisis filogenético para conocer el origen y la distribución de estos tres componentes a lo largo del linaje verde. Para dicho análisis se estudiaron un total de 28 genomas de especies representativas de distintos clados del grupo taxonómico *Archaeplastida*.

Como organismo representativo de las microalgas glaucófitas se seleccionó *C. paradoxa* y para las algas rodófitas *C. mieroiae* y *C. crispus*. Dentro del linaje verde se tomaron como organismos representativos de las microalgas clorófitas a *O. tauri*, *C. reinhardtii* y *C. subellipsoidea*. Dentro de las algas carófitas se encuentran seis grupos taxonómicos, todos ellos representados en el análisis filogenético, a excepción de *Coleochaetophyceae*: *Mesostigmatophyceae* con *M. viride*, *Chlorokybophyceae* con *C. atmophyticus*, *Klebsormidiophyceae* con *K. nitens*, *Charophyceae* con *C. braunii*, y *Zygnematophyceae* con *S. muscicola*, *P. margaritaceum* y *M. endlicherianum*. Dentro de las plantas terrestres, los tres grupos de las briofitas también se encuentran representados, los antoceros con *A. punctatus* y *A. agrestis*, las hepáticas con *M. polymorpha* y los musgos con *P. patens* y *S. fallax*. Por último dentro de las plantas vasculares se encuentran *S. moellendorffii* como representante de las licófitas, *A. filiculoides* y *S. cucullata* como representante de los helechos, *P. taeda* y *G. montanum* como gimnospermas, *A. trichopoda* como una angiosperma basal y, dentro de este último grupo *O. sativa* y *Z. marina* como monocotiledoneas y *S. licopersycum* y *A. thaliana* como dicotiledoneas.

Los análisis filogenéticos estimados por máxima verosimilitud de tres de los principales componentes de la regulación por luz y temperatura en *A. thaliana* mostraron una clara separación en distintos subgrupos en los fitocromos y en el grupo VII (a+b) de los bHLH, donde se engloba a los PIFs, mientras que los HY5s se organizaron en un único grupo (Figura 8A). Cada una de estas agrupaciones de proteínas tienen un alto valor de soporte (SH-aLRT) en la rama que los separa de los demás componentes, lo que refuerza la idea de que estas clases de proteínas forman subgrupos que divergieron de una única proteína ancestral (Figura 8A).

Respecto a los fitocromos se observaron tres grandes grupos: fitocromo A, fitocromo B/D/E y fitocromo C. Como *outgroup*, es decir, que no pertenecen a la familia de los fitocromos canónicos vegetales, se observan otros fitocromos no canónicos vegetales y los neocromos, lo que coincide con lo observado en la literatura (F. W. Li et al., 2015). En cuanto a las proteínas del grupo VII (a+b) de los factores de transcripción bHLH se observaron distintos grupos con un alto valor de soporte. Estos grupos fueron, fundamentalmente, distintos PIFs (PIF1, PIF3, PIF4/5, PIF7/8 y otros PIFs), aunque también aparecieron otro grupo de proteínas cercanas filogenéticamente a los factores de transcripción de *A. thaliana* SPATULA (SPT) y ALCATRAZ (ALC) (Figura 8A).

Se observó que el primer componente en originarse de los tres estudiados fue el factor de transcripción HY5 (Figura 8B). Este factor de transcripción está presente, incluso, en especies clorófitas, como *O. tauri*. Por tanto, es una proteína que se encuentra en organismos de todos los estratos filogenéticos dentro del linaje verde. Por el contrario, los homologos de PIF, miembros del grupo VII (a+b) de los factores de transcripción bHLH, fueron los últimos de los tres componentes en aparecer. Estos surgieron por primera vez en las algas carófitas, aunque no se encuentra presente en todas ellas, ya que organismos de los grupos taxonómicos más basales dentro de las estreptófitas como *Mesostigmatophyceae* y *Chlorokybophyceae* no contienen proteínas de esta familia (Figura 8B). Mientras que ciertos organismos dispersos por el linaje verde e, incluso, organismos de los grupos más cercanos filogenéticamente al linaje verde como las algas glaucófitas tienen fitocromos no canónicos, los fitocromos canónicos vegetales aparecieron en las algas carófitas, algo ya observado previamente (Legris et al., 2017). En este caso, los fitocromos están presentes en todos los organismos estreptófitos analizados, desde los grupos más basales de las algas carófitas hasta las plantas terrestres (Figura 8B).

Aunque los fitocromos y los miembros del grupo VII (a+b) de los bHLH se encuentren presentes en la mayoría de los grupos taxonómicos dentro de los organismos estreptófitos, estos sufrieron una diversificación con la aparición de las angiospermas y las gimnospermas. Los distintos subgrupos de fitocromos y miembros del grupo VII (a+b) de los bHLH analizados anteriormente aparecieron representados exclusivamente en estos dos grandes grupos de plantas terrestres. Esto sugiere que el ancestro común entre angiospermas y gimnospermas sufrió un proceso de duplicación y neofuncionalización

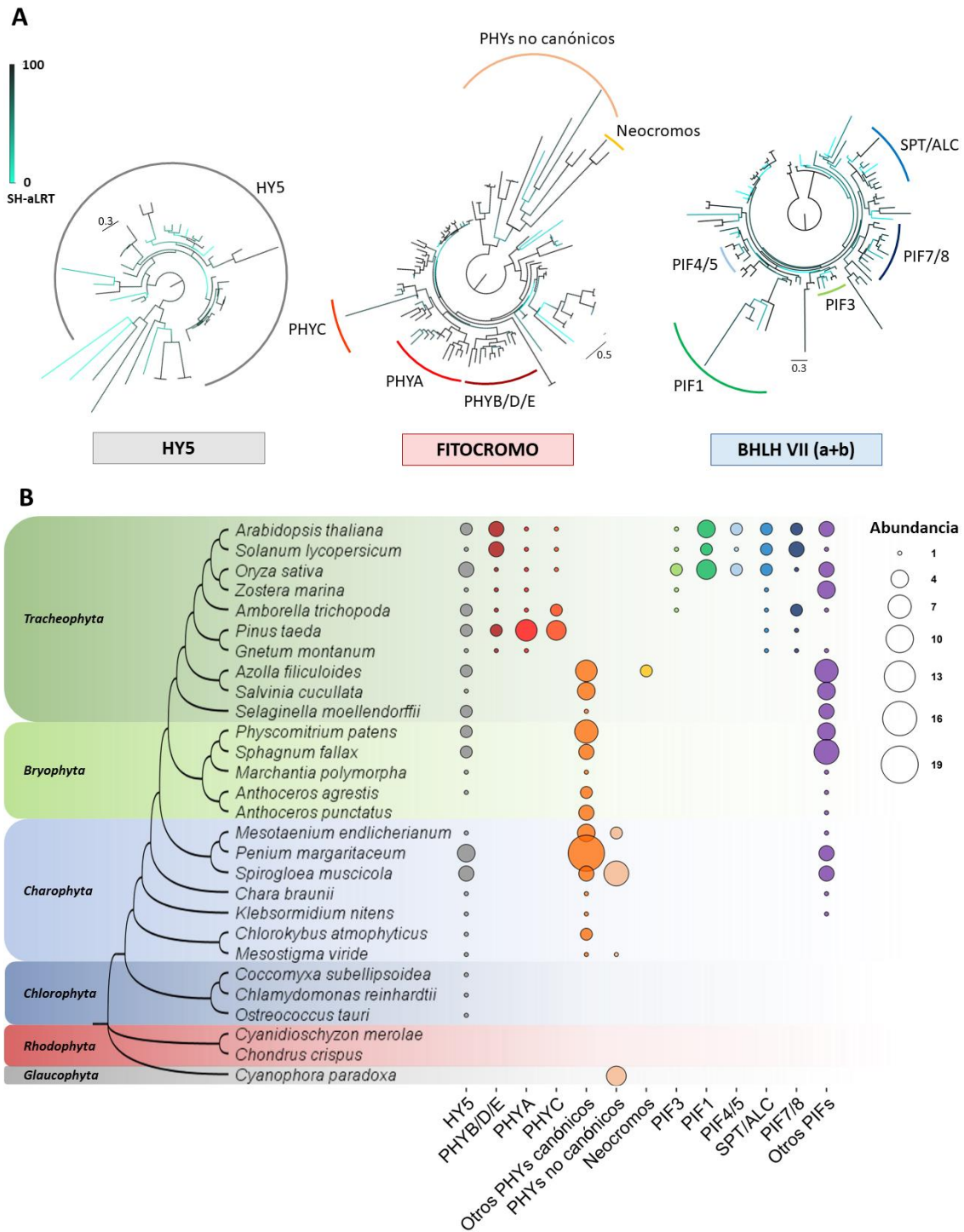


Figura 8. A. Árboles filogenéticos estimados por máxima verosimilitud de las familias de proteínas HY5, fitocromos y grupo VII (a+b) de los bHLH. El valor de soporte de cada rama se establece por el valor SH-aLRT que es representado en las ramas con un rango de colores desde el cian (0) hasta el negro (100). Las escalas (0.3 en HY5, 0.5 en PHYs y 0.3 en grupo VII (a+b) de los bHLH) representan la distancia evolutiva calculada entre cada secuencia **B.** Gráfico de puntos que representa la abundancia de cada una de las clases de componentes analizados en la Figura 8A en cada especie analizada del grupo taxonómico *Archaeplastida* subdividido en glaucófitas (*Glaucophyta*), rodófitas (*Rhodophyta*), dentro del linaje verde clorófitas (*Chlorophyta*) y estreptófitas, divididas en algas carófitas (*Charophyta*) y plantas terrestres entre las que se encuentran las plantas sin vasculatura (*Bryophyta*) y las plantas con vasculatura (*Tracheophyta*).

que permitió la aparición de los distintos subgrupos analizados en los árboles filogenéticos (Figura 8A y B).

La primera vez que aparecen los tres componentes estudiados dentro de las especies analizadas es en *Klebsormidium nitens*. Todos los organismos que diversificaron del ancestro en común con esta microalga filamentosa también contienen estos tres elementos que se saben fundamentales para la integración de la luz y la temperatura en *A. thaliana*. Todos estos datos juntos sugieren que tres clases importantes de componentes de la regulación por luz y temperatura en *A. thaliana* estaban presentes en el ancestro de algunas algas carófitas y en todas las plantas terrestres, en concreto en el ancestro en común del grupo taxonómico *Klebsormidiophyceae* y los linajes que divergieron posteriormente, lo que sugiere que estos componentes pudieron estar activos en el ancestro estreptófito de las plantas terrestres para regular la integración de la luz y la temperatura.

4.7. HY5, PHY y PIF son necesarios para la integración de la luz y la temperatura en plantas terrestres

El análisis fenotípico de mutantes puede ayudar a entender la importancia de HY5, PHY y PIF en las plantas terrestres estudiadas. Al igual que en el análisis fenotípico de las diferentes especies, se estudiaron la longitud del hipocotilo en *A. thaliana* y el área del talo en *M. polymorpha* para todos los genotipos a diferentes de temperatura (16 °C, 20 °C, 24 °C y 28 °C) en combinación con diferentes condiciones de intensidad lumínica (1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

El mutante *Athy5-2* presentó una mayor longitud del hipocotilo respecto a Col-0 en prácticamente todas las condiciones (Figura 9A) (Tabla suplementaria 2). Cabe destacar que, al igual que en la cepa silvestre, la longitud del hipocotilo fue mayor a intensidades lumínicas más bajas y que este crecimiento se vio incrementado a temperaturas altas. Sin embargo, en Col-0 a medida que aumentó la intensidad lumínica, el incremento por la temperatura fue menor, como ya se mostró previamente (Figura 3A), mientras que en el mutante *Athy5-2* se siguió manteniendo un amplio incremento por la temperatura incluso a intensidades lumínicas altas (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por consiguiente, el rango de respuestas a temperatura en función de la intensidad lumínica no varió en el mutante *Athy5-2*, al contrario que en la cepa silvestre (Figura 9A). Esto indica que el mutante *Athy5-2* no integra correctamente la luz y la temperatura. Por otro lado, el mutante *AtpHyB-9* presentó

una dinámica similar a *Athy5-2* (Figura 9A), por lo que AtPHYB, al igual que AtHY5, parece ser fundamental para que se dé una sinergia entre luz y temperatura en *A. thaliana*. En cuanto al mutante *Atpif4-2* se observó una dinámica contraria a los otros dos mutantes, siendo la longitud del hipocotilo menor en prácticamente todas las condiciones de estudio respecto a Col-0 (Figura 9A, Tabla suplementaria 2). El rango de respuesta a temperatura tuvo una menor variación entre las distintas intensidades lumínicas respecto a Col-0 (Figura 9A), lo que sugiere que, al igual que AtHY5 y AtPHYB, AtPIF4 es necesario para la correcta integración de luz y temperatura en *A. thaliana*.

Para entender si la función de estos tres reguladores se encuentra conservada en plantas terrestres se realizó un análisis fenotípico de los tres mutantes de pérdida de función en *M. polymorpha*. En el mutante *Mphy5-1* se observó un cambio en la respuesta a temperatura a $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respecto a Tak-1. Mientras que en la cepa silvestre se observó una diferencia significativa en el área del talo entre diferentes temperaturas a esta intensidad lumínica, en el mutante *Mphy5-1* no hubo diferencias significativas entre las diferentes temperaturas (Figura 9B, Tabla suplementaria 3). Algo similar se observó a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, existiendo diferencias significativas entre $16 \text{ }^\circ\text{C}$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$ en Tak-1,

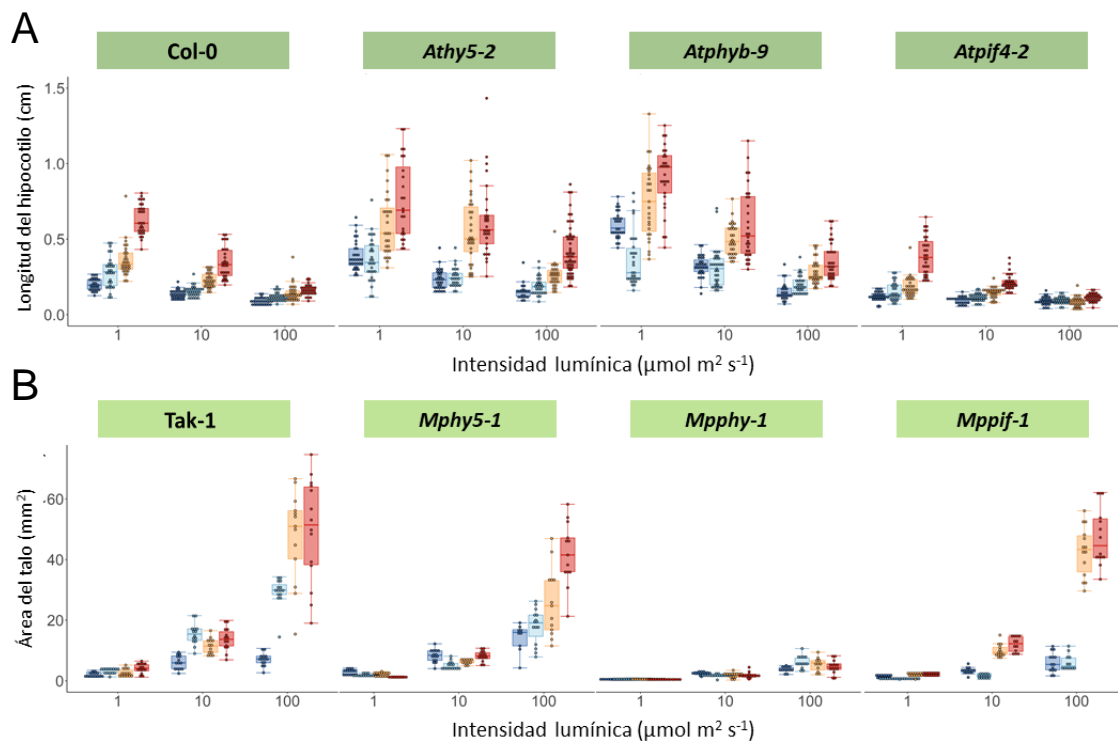


Figura 9. A. Análisis de la longitud del hipocotilo en diferentes condiciones de intensidad lumínica y temperatura en Col-0 y los mutantes de pérdida de función *Athy5-2*, *AtphyB-9* y *Atpif4-2*. B. Análisis del área del talo en diferentes condiciones de intensidad lumínica y temperatura en Tak-1 y los mutantes de pérdida de función *Mphy5-1*, *Mpphy-1* y *Mppif-1*.

mientras que estas diferencias no se observaron en *Mphy5-1* (Figura 9B, Tabla suplementaria 3). Esto indica que la integración por luz y temperatura que se observa en la cepa silvestre se encuentra alterada en el mutante *Mphy5-1*, al menos en condiciones concretas de intensidad lumínica y temperatura. El comportamiento ante la intensidad lumínica y la temperatura del mutante *Mpphy-1* se encontró claramente alterado. En este mutante no se presentaron diferencias significativas en el área del talo en las diferentes condiciones de luz y temperatura (Figura 9B, Tabla suplementaria 3). Esto sugiere un papel fundamental de este receptor en la regulación y la integración de estas dos señales. Por último, el mutante *Mppif-1* mostró deficiencias en la integración por luz y temperatura a temperaturas moderadamente bajas. Tanto a $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no se encontraron diferencias significativas a $16 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 9B, Tabla suplementaria 3). Sin embargo, sí se encontraron estas diferencias entre estas condiciones en Tak-1 (Figura 9B, Tabla suplementaria 3), lo que indica la necesidad de MpPIF para integrar luz y temperatura en condiciones de temperatura moderadamente bajas.

Los datos fenotípicos de los mutantes analizados sugieren que los tres componentes son fundamentales para la correcta integración de la señalización por luz y temperatura en ambas especies. Mientras que el efecto de la pérdida de alguno de los tres componentes se observa en prácticamente todas las condiciones de intensidad lumínica y temperatura en *A. thaliana*, también se observa dicho efecto en *M. polymorpha*, aunque a temperaturas e intensidades lumínicas más concretas. Todos estos resultados juntos sugieren que HY5, PHY y PIF regulaban la integración de las señalizaciones por luz y temperatura en el ancestro común de las plantas terrestres.

4.8. HY5, PHY y PIF comparten un gran número de dianas en las plantas terrestres

Una vez analizada la importancia de HY5, PHY y PIF en las plantas terrestres a través del análisis fenotípico de los mutantes se procedió a realizar un experimento de RNA-seq para conocer el efecto en el transcriptoma de cada uno de los mutantes en *A. thaliana* y *M. polymorpha*. Para ello se realizaron comparaciones de mutantes frente a cepa silvestre en cada una de las condiciones estudiadas ($16 \text{ }^\circ\text{C}$ y $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $16 \text{ }^\circ\text{C}$ y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $24 \text{ }^\circ\text{C}$ y $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $24 \text{ }^\circ\text{C}$ y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Este análisis transcriptómico de los distintos mutantes mostró un gran número de genes en común regulados, directa o indirectamente, por las tres proteínas estudiadas en *A.*

thaliana (Figura 10A) y en *M. polymorpha* (Figura 10B). Por ejemplo, el mutante *Atpif4-2* compartió un 85% de los DEGs con los otros dos mutantes, lo que sugiere una co-regulación génica entre estas tres proteínas. Esta co-regulación encaja con la idea de que, como se ha visto en la bibliografía, AtHY5, AtPHYB y AtPIF4 participan en el mismo circuito genético de regulación por luz y temperatura (Legris et al., 2017). En *M. polymorpha* se observó un gran solapamiento entre los DEGs de los distintos mutantes. El mutante *Mppif-1* comparte un 87% de los DEGs con los otros dos mutantes, mientras

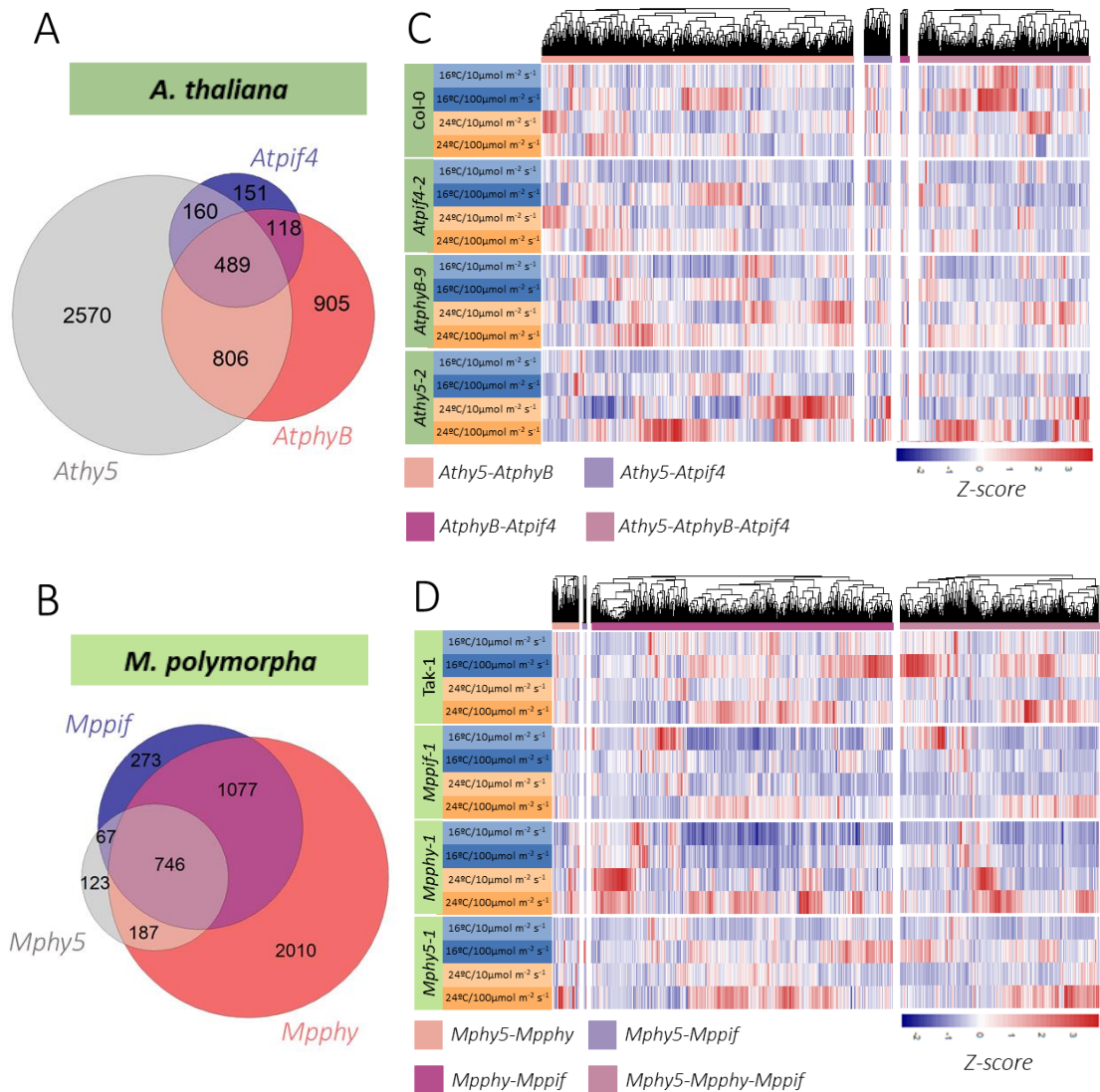


Figura 10. Diagrama de Venn proporcional al número de DEGs de *Athy5-2*, *AtphyB-9* y *Atpif4-2* (A) y *Mphy5-1*, *Mpphy-1* y *Mppif1* (B). Mapa de calor de la expresión génica normalizada en Z-score de los DEGs comunes de al menos dos mutantes entre *Athy5-2*, *AtphyB-9* y *Atpif4-2* (C) y *Mphy5-1*, *Mpphy-1* y *Mppif1* (D). Se muestra la expresión génica normalizada en Z-score de todos estos mutantes en todas las condiciones estudiadas (16 °C y 24 °C y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para cada temperatura). Los genes de cada uno de los solapamientos representados están ordenados mediante un agrupamiento jerárquico.

que *Mphy5-1* comparte un 88% (Figura 10B). Al igual que en *A. thaliana*, existe una co-regulación génica entre estas tres proteínas. Esto puede suponer que también actúen en un mismo circuito genético de integración de luz y temperatura, ya que, además, compartieron un número evidente de DEGs con los DEGs de intensidad lumínica y temperatura tanto en *A. thaliana* (Figura suplementaria 1A) como en *M. polymorpha* (Figura complementaria 1B).

Al desglosar la información de la expresión normalizada en cada condición de cada uno de los DEGs compartidos por al menos dos mutantes se pudo observar distintas co-regulaciones, tanto en *A. thaliana* (Figura 10C) como en *M. polymorpha* (Figura 10D). Por ejemplo, en los genes co-regulados por *Athy5-2* y *AtphyB-9* apareció un set de genes que siguieron un comportamiento parecido en ambos mutantes, como una inhibición de la transcripción a 24 °C y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero otros siguieron comportamientos diferentes, como una gran sobreexpresión en *Athy5-2* que no se observó en *AtphyB-9* en la misma condición (Figura 10C). Estos diferentes comportamientos se pudieron observar en el resto de DEGs compartidos por los mutantes y en el mismo análisis realizado para *M. polymorpha* (Figura 10D). Esto indica que la convergencia a nivel transcriptómico de estas tres proteínas influyen de forma diferente en la expresión génica tanto en *A. thaliana* como en *M. polymorpha*.

Estos análisis a nivel transcripcional de los distintos mutantes mostró un alto nivel de solapamiento de los genes regulados por las diferentes proteínas en *A. thaliana* y en *M. polymorpha*, lo que sugiere una gran convergencia en sus regulaciones transcripcionales, pudiéndose explicar por participar en un mismo circuito genético de regulación. Esto puede suponer la presencia de estos tres componentes en el núcleo de la red de regulación génica de la integración por luz y temperatura en el ancestro común de las plantas terrestres. Además, el comportamiento transcripcional de los distintos DEGs en común sugiere una red compleja, modulada por HY5, PHY y PIF, que regula la expresión de estos DEGs.

4.9. HY5, PHY y PIF actúan aguas arriba de la regulación sinérgica por luz y temperatura

Establecida la importancia de HY5, PHY y PIF en la integración de las señalizaciones por luz y temperatura en plantas terrestres, la co-regulación génica de estos tres elementos y su participación en una red compleja de regulación transcripcional, se trató de

comprender en qué tipo de regulación concreta actuaba cada una de las tres proteínas. Para ello, se analizaron los comportamientos transcripcionales de los DEGs de cada uno de los 10 clústeres analizados anteriormente en las cepas silvestres (Figuras 5 y 6) en los diferentes mutantes. En este caso, no se compararon mutantes frente a cepas silvestres, sino que se analizó cada uno de los mutantes independientemente para conocer cómo afecta a la regulación transcripcional de cada gen la ausencia de HY5, PHY o PIF en *A. thaliana* y *M. polymorpha*.

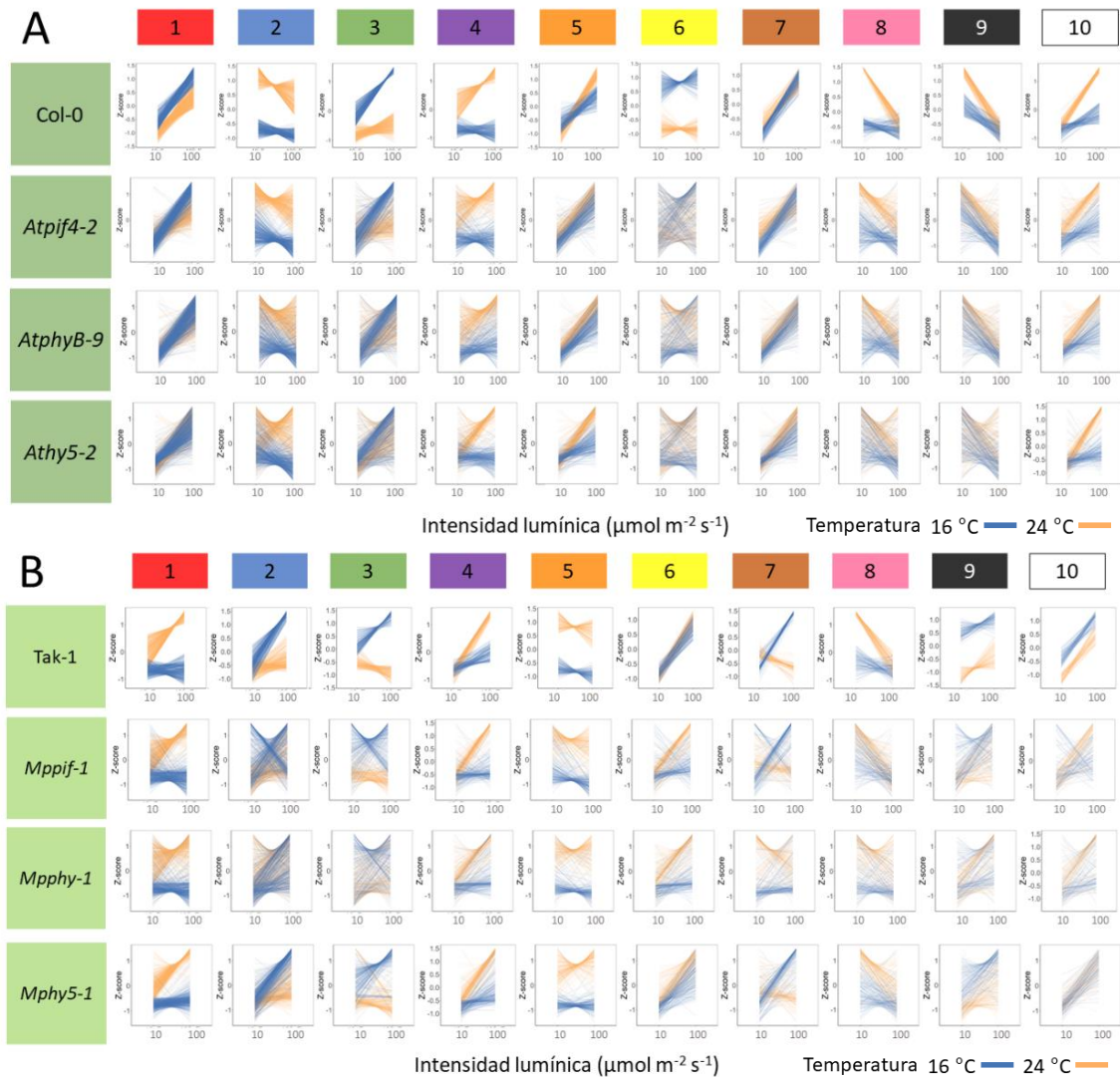


Figura 11. Expresión génica en las diferentes condiciones de los DEGs de Col-0 (A) y Tak-1 (B) agrupados en los 10 clústeres diferentes más numerosos de un agrupamiento jerárquico de 30 clústeres (ordenados de clúster más numeroso a menos numerosos) en cada uno de los genotipos estudiados de *A. thaliana* (Col-0, *Athy5-2*, *AtphyB-9* y *Atpif4-2*) (A) y cada uno de los genotipos estudiados de *M. polymorpha* (Tak-1, *Mphy5-1*, *Mpphy-1* y *Mppif-1*) (B). Se representa la expresión de cada uno de los genes en dos líneas de menor intensidad (expresión a 16 °C y 24 °C) y la expresión media de todos los genes del clúster en una línea con mayor intensidad.

Tanto en *A. thaliana* (Figura 11A) como en *M. polymorpha* (Figura 11B) se observó un claro cambio en la dinámica transcripcional de los DEGs agrupados en los 10 clústeres más numerosos de las respectivas cepas silvestres. Aunque hubo ciertos clústeres más afectados como el clúster 6 de *A. thaliana* o el clúster 9 de *M. polymorpha*, la desregulación fue generalizada en todos los clústeres y mutantes de ambas especies. Esto sugiere que HY5, PHY y PIF son importantes para mantener la dinámica transcripcional de la mayoría de los genes regulados tanto por luz como por temperatura. Por tanto, estas tres proteínas se podrían encontrar aguas arriba de la regulación transcripcional que integra las señalizaciones por luz y temperatura en las plantas terrestres, debido a que no afectan a pocos comportamientos transcripcionales concretos, sino que afectan a prácticamente todos los comportamientos transcripcionales más comunes en ambas especies. Juntos, estos resultados sugieren que HY5, PHY y PIF se encontraban activos en las primeras plantas terrestres, durante la colonización de hábitats terrestres, para integrar las señalizaciones por luz y temperatura.

4.10. Conservación de las dianas co-reguladas por HY5, PHY y PIF en plantas terrestres

Una vez estudiadas la conservación de la regulación por HY5, PHY y PIF en plantas terrestres, se analizó si existe también una conservación de los genes regulados, directa o indirectamente, aguas abajo de estos factores entre *A. thaliana* y *M. polymorpha*. Para ello se realizó un análisis para estudiar los ortogrupos comunes tanto de todos los DEGs de cada mutante frente a las cepas silvestres individualmente como de los DEGs comunes entre al menos dos mutantes frente a la cepa silvestre, es decir, los DEGs analizados en la Figura 10A y B.

Los DEGs de los mutantes *Athy5-2* y *Mphy5-1* se situaron en 1352 y 246 ortogrupos, respectivamente, siendo 163 comunes entre ellos, lo que supuso un 66% de todos los ortogrupos en los que se clasificaron los DEGs de *Mphy5-1* (Figura 12A). En cuanto a los mutantes *AthyB-9* y *Mpphy-1* los DEGs tanto de intensidad lumínica como de temperatura se distribuyeron en 771 y 948 ortogrupos, respectivamente. 315 de estos ortogrupos fueron comunes entre los dos mutantes, correspondiendo a casi el 41% de los ortogrupos representados por DEGs de *AthyB-9* (Figura 12A). Este porcentaje fue del 30% en el mutante *Atpif4-2*, el cual compartió 109 ortogrupos de un total de 357 con *Mppif-1*, cuyos DEGs se organizaron en 427 (Figura 12A). Estos datos mostraron un

solapamiento evidente de los ortogrupos que contienen DEGs de los mutantes de *A. thaliana* y de *M. polymorpha*.

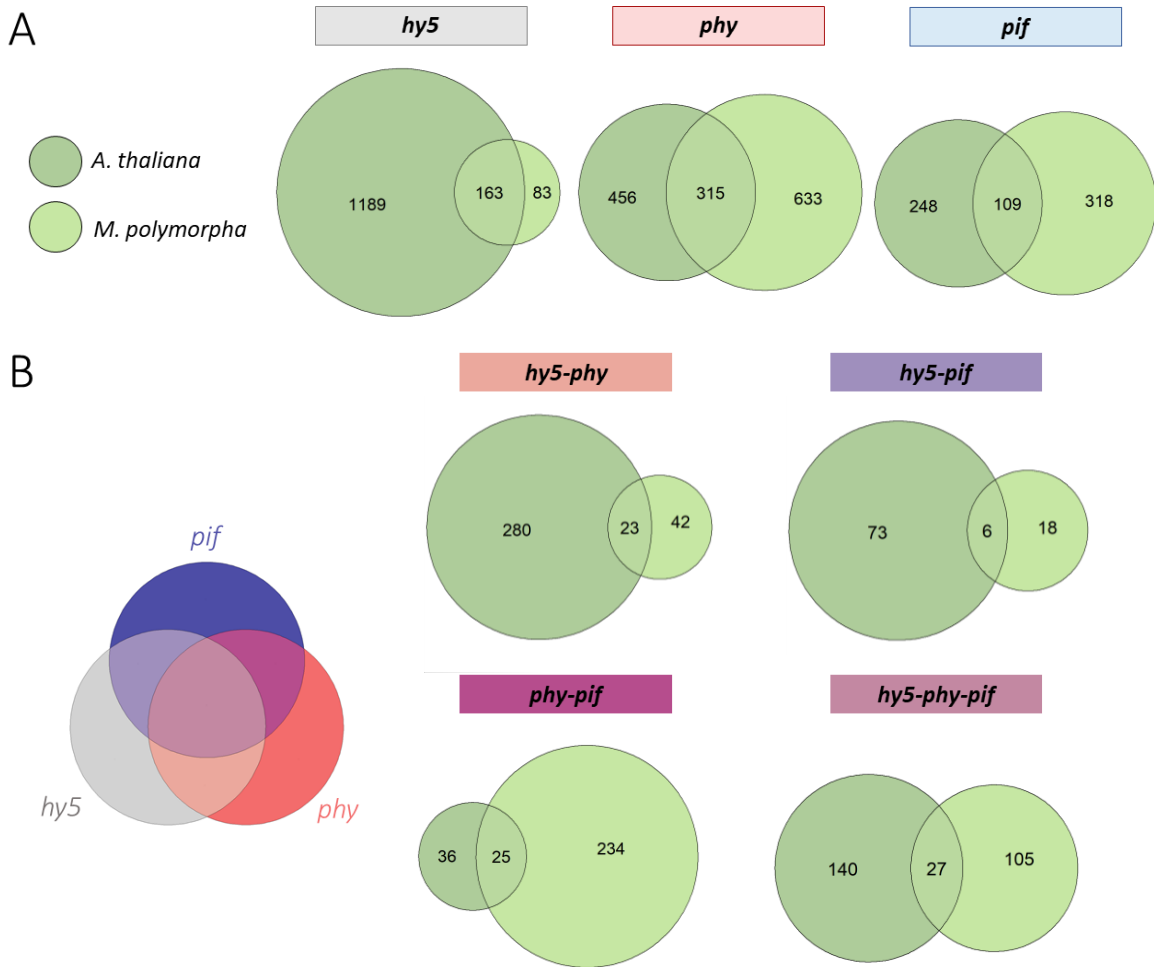


Figura 12. Diagramas de Venn proporcionales de ortogrupos en los que se organizan los distintos DEGs de los diferentes mutantes tanto de *A. thaliana* como de *M. polymorpha*. Se analizan tanto los DEGs de cada mutante individualmente (**A**) como los DEGs compartidos por dos mutantes o más (**B**).

No solo se observó una conservación a nivel individual de los genes regulados por los diferentes mutantes, sino que se encontraron ortogrupos comunes entre los genes regulados por al menos dos mutantes. En el caso de los DEGs compartidos por *Athy5-2* y *AthyB-9*, exclusivamente, se clasificaron en 303 ortogrupos, mientras que los DEGs compartidos por *Mphy5-1* y *Mpphy-1*, exclusivamente, se situaron en 65 ortogrupos, compartiendo 23 de ellos con los de los mutantes de *A. thaliana*, un 35% de su total (Figura 12B). En el mismo caso, pero teniendo en cuenta la combinación de los mutantes *hy5* y *pif*, exclusivamente, de ambas especies los diferentes DEGs se organizaron en 79 ortogrupos en *A. thaliana* y en 24 en *M. polymorpha*, de los cuales 6 eran comunes (25% del total respecto a *M. polymorpha*) (Figura 12B). Este porcentaje ascendió a un 42% en el caso de los DEGs comunes entre *phy* y *pif*, exclusivamente, de ambas especies. Se

compartieron 25 ortogrupos de 59 totales en *M. polymorpha* y 259 en *A. thaliana* (Figura 12B). Incluso, de entre los ortogrupos en los que se situaron los DEGs comunes de todos los mutantes en *A. thaliana* (167 ortogrupos) y los ortogrupos donde se encontraron los DEGs comunes de todos los mutantes de *M. polymorpha* (132 ortogrupos) se observaron 27 ortogrupos comunes (20% respecto a *M. polymorpha*) (Figura 12B).

Todos estos datos juntos sugieren que existe una conservación significativa de elementos regulados, directa o indirectamente, aguas abajo de la ruta de señalización que integra luz y temperatura mediada por HY5, PHY y PIF en plantas terrestres. Por tanto, el ancestro común de las plantas terrestres pudo haber contenido una cantidad importante de genes regulados por estos tres factores y, además, este grupo de genes se ha podido mantener conservado a lo largo de la evolución de las plantas terrestres.

5. DISCUSIÓN

La pregunta principal que guiaba este trabajo era la de averiguar en qué punto de la evolución pudo haber surgido la capacidad de integrar señales de luz y temperatura a través de un mismo circuito genético. La combinación de análisis fenotípicos y transcriptómicos muestra una clara diferencia entre organismos estreptófitos y organismos clorófitos. Mientras que los organismos estreptófitos presentan una respuesta compleja con interacciones mutuas entre el efecto de la luz y el de la temperatura, el alga clorófito *O. tauri* responde de forma poco sinérgica a cada una de las señales. Esta observación general sugiere que la complejidad de la red de regulación por luz y temperatura podría haberse reforzado en un ancestro común entre algas carófitas y plantas terrestres.

Esta diferencia en la complejidad de la regulación de la red se podría deber a la falta de regulación mediada por PHY y PIF en *O. tauri*, al demostrarse la ausencia de estos componentes en el análisis filogenético, los cuales son, junto a HY5, reguladores maestros de la integración de las señalizaciones por luz y temperatura en plantas terrestres. Estos resultados, junto con la conservación a nivel de genes regulados por luz y temperatura en estreptófitas y la conservación de los comportamientos transcripcionales y de las dianas de HY5, PHY y PIF en plantas terrestres, permiten inferir el nivel de regulación por luz y temperatura en el ancestro común de los diferentes organismos.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ancestro común de *M. endlicherianum* y las plantas terrestres ya integraba luz y temperatura hace en torno a 580 millones de años. Esto pudo suponer un antes y un después en la adaptación a nuevos hábitats con un mayor rango de intensidades lumínicas y temperaturas. La integración de la luz y la temperatura puede permitir, como discuten Casal y Qüesta (2018), la “desambiguación perceptual”, es decir, dar la información necesaria para que el organismo sepa distinguir en qué situación se encuentra sin ambigüedad, cuando un único estímulo no es capaz de hacerlo. Por tanto, la sinergia en la percepción de estos dos estímulos podría dotar al organismo de una mayor plasticidad en la respuesta, como se observa en las redes de co-expresión génica, y proporcionar una percepción más completa del entorno. Esta característica pudo facilitar la colonización de diferentes nichos ecológicos y, en concreto, posibilitar la transición de un ambiente acuático a un ambiente terrestre, es decir, posibilitar la terrenalización.

Los resultados presentados en este estudio muestran un alto grado de conservación entre la red regulatoria que integra luz y temperatura en plantas terrestres, además de una conservación a nivel de ortología de los genes regulados por estos factores ambientales. La conservación en esta GRN coincide con lo observado en otros estudios que analizan otras GRN (N. D. Pires et al., 2013; Sørensen et al., 2011; Wu et al., 2021), por lo que la existencia de un alto grado de conservación en las redes regulatorias de ciertos procesos parece ser una tendencia entre plantas terrestres. Aunque no es posible examinar de momento el comportamiento de mutantes en algas carófitas, el complejo comportamiento transcriptómico observado en *M. endlicherianum* sugiere que la GRN que regula la integración es suficientemente compleja como para proporcionar dicha respuesta integradora. La explicación más simple (pero no la única) es que dicha GRN existía ya en el ancestro acuático de las plantas terrestres, y que *A. thaliana*, *M. polymorpha* y *M. endlicherianum* presentan versiones conservadas de esa misma GRN. De ser así, el ancestro acuático de las plantas terrestres ya estaría pre-adaptado a integrar estas dos importantes señales ambientales.

En los últimos años muchos estudios se han centrado en tratar de dilucidar cómo se dio la terrenalización (de Vries et al., 2016; Delaux et al., 2015; Graham et al., 2012; Sørensen et al., 2011). Una de las características más llamativas de este proceso es que se trata de una singularidad, es decir, la conquista de la tierra por las plantas terrestres se dio una única vez y, a partir de ese momento, aparecieron todas las especies de plantas que hoy conocemos tras cientos de millones de años de evolución (Wickett et al., 2014). Conociendo que las algas carófitas son los parientes más cercanos a las plantas terrestres, muchos de estos estudios se han basado en determinar características de las algas carófitas que pudieron ayudar al proceso de terrenalización. Estas características que siguieron su curso evolutivo, pero que luego fueron fundamentales para la conquista de hábitats terrestres se conocen como pre-adaptaciones. Se han propuesto pre-adaptaciones fundamentales para la colonización de la tierra como el origen de una pared celular similar a la de las plantas terrestres (Sørensen et al., 2011), la tolerancia del cloroplasto a estrés por altas irradiancias o desecación (de Vries et al., 2016) o la asociación con microorganismos (Delaux et al., 2015). El escenario más probable es que no sea una única característica la que permitió que se diera dicha singularidad, sino que fuera una batería de adaptaciones y pre-adaptaciones lo que permitió la primera aparición de una planta terrestre, como también discuten de Vries y Archibald (2018).

En este trabajo no solo se ha mostrado una similitud entre las redes transcripcionales de integración de las señalizaciones por luz y temperatura de los organismos estreptófitos analizados, sino que también se ha mostrado una conservación de las dianas aguas abajo de esta red en plantas terrestres. Por tanto, es razonable pensar que el ancestro acuático de las plantas terrestres contenía este mecanismo integrador de luz y temperatura y, por consiguiente, se encontraba pre-adaptado para afrontar los rangos de intensidad lumínica y temperatura presentes en los ambientes terrestres. Por estas razones, a toda la batería de adaptaciones y pre-adaptaciones propuestas en la bibliografía habría que añadirle la analizada en este estudio: la integración de las señalizaciones por luz y temperatura. Esta característica, presente en, al menos, algunas algas carófitas, pudo ser importante para la colonización de los hábitats terrestres.

Además del establecimiento del grado de integración entre luz y temperatura en el linaje verde, la otra cuestión fundamental de este trabajo era conocer si la red molecular que regula dicha integración se encontraba conservada en plantas terrestres. Los resultados sugieren que esta red molecular basada en HY5, PHY y PIF ya estaba activa para integrar luz y temperatura en el ancestro común de las plantas terrestres y que, por tanto, estos componentes son fundamentales para dicha integración. Teniendo en cuenta esto y que los organismos estudiados en los que se encuentran HY5, PHY y PIF son los organismos capaces de integrar correctamente luz y temperatura, se puede plantear que quizás también sean fundamentales para la integración por luz y temperatura en *M. endlicherianum*. Todos los resultados juntos permiten hipotetizar que sin todos estos componentes presentes no es posible que se dé la integración de la luz y la temperatura en procesos de desarrollo, como ocurre en *O. tauri*.

Los resultados de este trabajo han planteado ciertas preguntas en las que ya se están trabajando para conocer sus respuestas. Una de las preguntas que surge de estas hipótesis es si el fitocromo de *M. endlicherianum* es el elemento que se encarga de integrar luz y temperatura en este organismo como parece ocurrir en las plantas terrestres. A falta de poder generar mutantes de esta especie, experimentos de complementación heteróloga de *MePHY* en el mutante *AtphyB-9* podría ayudar a responder a esta pregunta. A un nivel más amplio se podría preguntar si todos los fitocromos canónicos vegetales son capaces de responder tanto a luz como a temperatura. Por otro lado, al observar un nivel de dianas conservadas aguas abajo de HY5, PHY y PIF se plantea la pregunta de si estas dianas conservadas se encuentran regulando los mismos procesos biológicos, lo que podría

arrojar luz a la red de regulación del ancestro común de las plantas terrestres. Para ello se está desarrollando un algoritmo basado en ortología para poder conocer los términos de ontología génica en común. Conocer los motivos de unión, sus regulaciones epigenéticas y los genes potencialmente regulados por los factores de transcripción HY5 y PIF permitiría establecer de forma más robusta una GRN y posibilitaría seleccionar reguladores candidatos de la señalización por luz y temperatura aguas abajo de HY5 y PIF. Experimentos genómicos como DAP-seq y ampDAP-seq ayudaría a dilucidar de forma más clara esta GRN. Estos experimentos se realizaron para este trabajo, pero se encuentran actualmente en proceso de secuenciación, por lo que no han sido incluidos.

Además de estas preguntas en las que ya se está trabajando pueden surgir otras cuestiones más amplias. Como se ha visto, este trabajo permite conocer que la integración ya se daba en el ancestro común de *M. endlicherianum* y las plantas terrestres, pero ¿en qué momento apareció dicha integración?, ¿se encuentra presente en todos los clados de algas carófitas que contienen HY5, PHY y PIF? Lo que sí se puede sacar en claro de este trabajo es que la integración de la señalización por luz y temperatura podría haber sido importante para la adaptación al medio terrestre y allana el camino para investigaciones relacionadas que buscan responder la pregunta fundamental: ¿qué fue lo que permitió al ancestro común de las plantas terrestres colonizar la tierra con tanto éxito?

La terrenalización fue un evento crucial que suscita gran interés, pero cabe destacar que las plantas terrestres no solo colonizaron los hábitats terrestres en un momento en concreto, sino que han sobrevivido en el medio terrestre durante más de 500 millones de años (Cheng et al., 2019). Durante este periodo la tierra ha sufrido tanto cambios de intensidad lumínica (Hessen, 2008) como grandes fluctuaciones de temperatura (Scotese et al., 2021). Por tanto, es plausible hipotetizar que este mecanismo integrativo de luz y temperatura que se encuentra conservado en todas las plantas terrestres pudo facilitar una adaptación a los diferentes ambientes que se han dado en la Tierra a lo largo de los últimos 500 millones de años.

Si este mecanismo de integración pudo ayudar a las plantas terrestres a adaptarse a antiguas y cambiantes condiciones de luz y temperatura, ¿por qué no podría ayudar a las plantas terrestres a adaptarse a nuevas y cambiantes condiciones de estos dos estímulos? El cambio climático está provocando una modificación de ciertas señales ambientales como la temperatura, de la cual se espera un incremento mínimo de 2 °C para finales de siglo (Raftery et al., 2017; Thuiller, 2007). En este trabajo se ha hipotetizado sobre la

conservación del mecanismo integrativo de luz y temperatura en todas las plantas terrestres, lo que incluye todas las especies de plantas cultivables. Esto permite especular que la manipulación y optimización de los componentes más importantes de esta GRN a través de estrategias moleculares avanzadas podría llegar a permitir la generación de variedades más resilientes a cambios en la luz y la temperatura en diferentes especies cultivables. Esto podría ayudar a la aparición de una estrategia de seguridad alimentaria para sustentar a una población cada vez mayor (Murdoch et al., 2018) ante una subida constante de la temperatura en el planeta.

A modo de resumen, este trabajo ha permitido establecer el origen de tres familias de proteínas importantes para la regulación de la integración por luz y temperatura en *A. thaliana* (Figura 13), además de demostrar que estos componentes no solo son fundamentales en *A. thaliana*, sino posiblemente en todas las plantas terrestres. De esta forma se sitúa la aparición de una red de regulación basada en HY5, PHY y PIF para integrar luz y temperatura, como mínimo, antes del origen de las plantas terrestres, es decir, hace en torno a 500 millones de años (Figura 13) (Cheng et al., 2019; Strassert et al., 2021). También se discute sobre la importancia de una red transcripcional compleja, sinérgica y diversa de respuesta a luz y temperatura para poder apreciar integración de

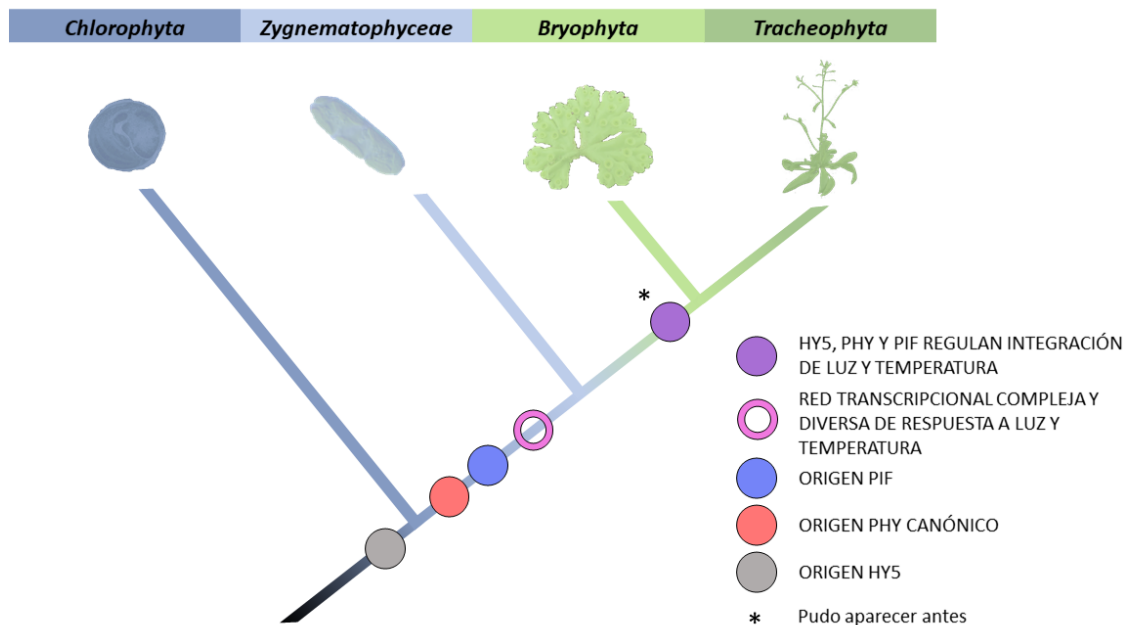


Figura 13. Modelo evolutivo final que resume lo visto en este trabajo. Cladograma que representa los linajes estudiados para este trabajo: *Chlorophyta* (*O. tauri*), *Charophyta/Zygnematophyceae* (*M. endlicherianum*), *Bryophyta* (*M. polymorpha*) y *Tracheophyta* (*A. thaliana*). Se establece el momento del origen de HY5, PHY y PIF, el momento en el que se originó una red transcripcional compleja y diversa de respuesta a luz y temperatura y el momento en el que, como mínimo, se estableció que HY5, PIF y PHY regulan la integración de las señalizaciones por luz y temperatura.

estos dos estímulos en procesos de desarrollo. El origen de esta compleja red transcripcional se establece antes de la diversificación del clado *Zygnematomyceae*, lo que sitúa dicho origen, como mínimo, hace en torno a 580 millones de años (Figura 13). Estas redes regulatorias pueden tratarse de pre-adaptaciones que pudieron facilitar uno de los eventos más estudiados en la evolución de plantas: la terrestalización.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se puede extraer de este trabajo son:

1. Las especies estreptófitas tienen una mayor variedad de respuestas que integran luz y temperatura que las clorófitas, lo que pudo ayudar a una mejor adaptación a nuevos hábitats como los terrestres.
2. La regulación transcripcional por luz y temperatura se encuentra conservada a lo largo de todo el linaje verde, siendo dicha conservación mayor en organismos estreptófitos.
3. HY5, PHY y PIF estaban presentes en el ancestro común de las plantas terrestres y de algunas carófitas, se encuentran aguas arriba de la ruta de señalización y son necesarios para una correcta integración de la señalización por luz y temperatura en plantas terrestres.
4. El módulo regulatorio compuesto por HY5, PHY y PIF regula, directa o indirectamente, un set conservado de genes en las plantas terrestres.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. Le, Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., ... Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *59*(5), 429–514. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Allahverdiyeva, Y., Suorsa, M., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2015). Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities. *Journal of Experimental Botany*, *66*(9), 2427–2436. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru463>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Archibald, J. M. (2015). Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, *25*(19), R911–R921. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
- Banks, J. A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J. L., Gribskov, M., DePamphilis, C., Albert, V. A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B. A., Ashton, N. W., Axtell, M. J., Barker, E., Barker, M. S., Bennetzen, J. L., Bonawitz, N. D., Chapple, C., Cheng, C., Correa, L. G. G., ... Grigoriev, I. V. (2011). The selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*, *332*(6032), 960–963. <https://doi.org/10.1126/science.1203810>
- Becton, Dickinson, & Company. (2021). *FlowJo™ Software for Windows Version 10.8.0*.
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis*, *53*(8), 474–485. <https://doi.org/10.1002/dvg.22877>
- Blanc-Mathieu, R., Verhelst, B., Derelle, E., Rombauts, S., Bouget, F. Y., Carré, I., Château, A., Eyre-Walker, A., Grimsley, N., Moreau, H., Piégu, B., Rivals, E., Schackwitz, W., Van de Peer, Y., & Piganeau, G. (2014). An improved genome of the model marine alga *Ostreococcus tauri* unfolds by assessing Illumina de novo assemblies. *BMC Genomics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1103>
- Blanc, G., Agarkova, I., Grimwood, J., Kuo, A., Bruggeman, A., Dunigan, D. D., Gurnon, J., Ladunga, I., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Pröschold, T., Salamov, A., Schmutz, J., Weeks, D., Yamada, T., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Claverie, J. M., ... Van Etten, J. L. (2012). The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biology*, *13*(5), R39. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-5-r39>
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S. S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M. A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C. R., ... Schmutz, J. (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*, *171*(2), 287–304.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>
- Boyce, C. K., & Lee, J. E. (2017). Plant Evolution and Climate over Geological Timescales. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, *45*(May), 61–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-015629>
- Carpenter, E. J., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Wu, S., Sun, J., Yu, J., Jimenez Vieira, F. R., Bowler, C., Dorrell, R. G., Gitzendanner, M. A., Li, L., Du, W., Ullrich, K., Wickett, N. J., Barkmann, T. J., Barker, M. S., Leebens-Mack, J. H., & Wong, G. K. S. (2019). Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). *GigaScience*, *8*(10), 1–7. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz126>
- Casal, J. J., & Qüesta, J. I. (2018). Light and temperature cues: multitasking receptors and transcriptional integrators. *New Phytologist*, *217*(3), 1029–1034. <https://doi.org/10.1111/nph.14890>
- Castro, P. H., Lilay, G. H., Munõz-Mérida, A., Schjoerring, J. K., Azevedo, H., & Assunção, A. G. L. (2017). Phylogenetic analysis of F-bZIP transcription factors indicates conservation of the zinc deficiency response across land plants. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03903-6>
- Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., Wittek, S., Reder, T., Günther, G., Gontcharov, A., Wang, S., Li, L., Liu, X., Wang, J., Yang, H., ... Melkonian, M. (2019). Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land Plant Evolution. *Cell*, *179*(5), 1057–1067. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.019>
- Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ball, S. G., Chaparro, C., Tonon, T., Barbeyron, T., Michel, G., Noel, B., Valentin, K., Elias, M., François Artiguenave, Arun, A., Aury, J. M., Barbosa-Neto, J. F., Bothwell, J. H., Bouget, F. Y., Brillet, L., Cabello-Hurtado, F., ... Boyen, C. (2013). Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proceedings of the National Academy*

- of *Sciences of the United States of America*, 110(13), 5247–5252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221259110>
- Csardi, G., & Nepusz, T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems, Complex Sy*(1695), 1695. <http://igraph.sf.net>
- de Vries, J., & Archibald, J. M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist*, 217(4), 1428–1434. <https://doi.org/10.1111/nph.14975>
- de Vries, J., Stanton, A., Archibald, J. M., & Gould, S. B. (2016). Streptophyte Terrestrialization in Light of Plastid Evolution. *Trends in Plant Science*, 21(6), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.021>
- Delaux, P. M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C. J., Sederoff, H. W., Stevenson, D. W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M. R., Dunand, C., Morris, R. J., Roux, C., ... Ane, J. M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- DePamphilis, C. W., Palmer, J. D., Rounsley, S., Sankoff, D., Schuster, S. C., Ammiraju, J. S. S., Barbazuk, W. B., Chamala, S., Chanderbali, A. S., Determann, R., Hong, M., Ralph, P., Talag, J., Tomsho, L., Walts, B., Wanke, S., Wing, R. A., Chang, T. H., Lan, T., ... Soltis, P. S. (2013). The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science*, 342(6165). <https://doi.org/10.1126/science.1241089>
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2018). OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *BioRxiv*, 1–14. <https://doi.org/10.1101/466201>
- Erwin, D. H., & Davidson, E. H. (2009). The evolution of hierarchical gene regulatory networks. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 141–148. <https://doi.org/10.1038/nrg2499>
- Fang, L., Leliaert, F., Zhang, Z. H., Penny, D., & Zhong, B. J. (2017). Evolution of the Chlorophyta: Insights from chloroplast phylogenomic analyses. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 322–332. <https://doi.org/10.1111/jse.12248>
- Fares, M. A. (2015). The origins of mutational robustness. *Trends in Genetics*, 31(7), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.04.008>
- Funkhauser, C., & Chory, J. (1997). Light control of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.203>
- Fürst-Jansen, J. M. R., De Vries, S., & De Vries, J. (2020). Evo-physio: On stress responses and the earliest land plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(11), 3254–3269. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa007>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gitzendanner, M. A., Soltis, P. S., Wong, G. K. S., Ruhfel, B. R., & Soltis, D. E. (2018). Plastid phylogenomic analysis of green plants: A billion years of evolutionary history. *American Journal of Botany*, 105(3), 291–301. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1048>
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., ... Briggs, S. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, 296(5565), 92–100. <https://doi.org/10.1126/science.1068275>
- Graham, L. E., Arancibia-Avila, P., Taylor, W. A., Strother, P. K., & Cook, M. E. (2012). Aero-terrestrial Coleochaete (Streptophyta, Coleochaetales) models early plant adaptation to land. *American Journal of Botany*, 99(1), 130–144. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100245>
- Grossman, A. R., Harris, E. E., Hauser, C., Lefebvre, P. A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C. D., Stern, D., Vallon, O., & Zhang, Z. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the Crossroads of Genomics. *Eukaryotic Cell*, 2(6), 1137–1150. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1137-1150.2003>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95–98.
- Han, X., Chang, X., Zhang, Z., Chen, H., He, H., Zhong, B., & Deng, X. W. (2019). Origin and Evolution of Core Components Responsible for Monitoring Light Environment Changes during Plant Terrestrialization. *Molecular Plant*, 12(6), 847–862. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.04.006>

- Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, *402*, C47–C52.
- Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Hessen, D. O. (2008). Solar radiation and the evolution of life. *Solar Radiation and Human Health*, 123–136. http://www.dnva.no/geomed/solarpdf/Nr_10_Hessen.pdf
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H., Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., ... Ohta, H. (2014). Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications*, *5*(May), 2–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms4978>
- Inoue, K., Nishihama, R., & Kohchi, T. (2017). Evolutionary origin of phytochrome responses and signaling in land plants. *Plant Cell and Environment*, *1*, 2502–2508. <https://doi.org/10.1111/pce.12908>
- Jiao, C., Sørensen, I., Sun, X., Sun, H., Behar, H., Alseekh, S., Philippe, G., Palacio Lopez, K., Sun, L., Reed, R., Jeon, S., Kiyonami, R., Zhang, S., Fernie, A. R., Brumer, H., Domozych, D. S., Fei, Z., & Rose, J. K. C. (2020). The Penium margaritaceum Genome: Hallmarks of the Origins of Land Plants. *Cell*, *181*(5), 1097–1111.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.019>
- Karlebach, G., & Shamir, R. (2008). Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(10), 770–780. <https://doi.org/10.1038/nrm2503>
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., Schwartz, D. C., Tanaka, T., Wu, J., Zhou, S., Childs, K. L., Davidson, R. M., Lin, H., Quesada-Ocampo, L., Vaillancourt, B., Sakai, H., Lee, S. S., Kim, J., Numa, H., ... Matsumoto, T. (2013). Improvement of the oryza sativa nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, *6*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-4>
- Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N., & Pytkowicz, R. M. (1967). Preparation of Artificial Seawater. *Limnology & Oceanography*, *12*(1), 176–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.1.0176>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kohchi, T., Yamato, K. T., Ishizaki, K., Yamaoka, S., & Nishihama, R. (2021). Development and Molecular Genetics of Marchantia polymorpha. *Annual Review of Plant Biology*, *72*, 677–702. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-082520-094256>
- Kolde, R. (2019). *pheatmap: Pretty heatmaps* (Version 1.0.12).
- Lang, D., Ullrich, K. K., Murat, F., Fuchs, J., Jenkins, J., Haas, F. B., Piednoel, M., Gundlach, H., Van Bel, M., Meyberg, R., Vives, C., Morata, J., Symeonidi, A., Hiss, M., Muchero, W., Kamisugi, Y., Saleh, O., Blanc, G., Decker, E. L., ... Rensing, S. A. (2018). The Physcomitrella patens chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant Journal*, *93*(3), 515–533. <https://doi.org/10.1111/tpj.13801>
- Larsson, J. (2021). *eulerr: Area-Proportional Euler and Venn Diagrams with Ellipses* (R package version 6.1.1). <https://cran.r-project.org/package=eulerr>.
- Legris, M., Nieto, C., Sellaro, R., Prat, S., & Casal, J. J. (2017). Perception and signalling of light and temperature cues in plants. *Plant Journal*, *90*(4), 683–697. <https://doi.org/10.1111/tpj.13467>
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Quail, P. H. (2008). The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell*, *20*(2), 337–352. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052142>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *31*(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, *91*(10), 1535–1556. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>
- Li, F. W., Brouwer, P., Carretero-Paulet, L., Cheng, S., De Vries, J., Delaux, P. M., Eily, A., Koppers, N., Kuo, L. Y., Li, Z., Simenc, M., Small, I., Wafula, E., Angarita, S., Barker, M. S., Bräutigam, A., Depamphilis, C., Gould, S., Hosmani, P. S., ... Pryer, K. M. (2018). Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. *Nature Plants*, *4*(7), 460–472. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0188-8>

- Li, F. W., & Mathews, S. (2016). Evolutionary aspects of plant photoreceptors. *Journal of Plant Research*, *129*(2), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0785-4>
- Li, F. W., Melkonian, M., Rothfels, C. J., Villarreal, J. C., Stevenson, D. W., Graham, S. W., Wong, G. K. S., Pryer, K. M., & Mathews, S. (2015). Phytochrome diversity in green plants and the origin of canonical plant phytochromes. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8852>
- Li, F. W., Nishiyama, T., Waller, M., Frangedakis, E., Keller, J., Li, Z., Fernandez-Pozo, N., Barker, M. S., Bennett, T., Blázquez, M. A., Cheng, S., Cuming, A. C., de Vries, J., de Vries, S., Delaux, P. M., Diop, I. S., Harrison, C. J., Hauser, D., Hernández-García, J., ... Szövényi, P. (2020). Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nature Plants*, *6*(3), 259–272. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0618-2>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ludwig, W., Hayes, S., Trenner, J., Delker, C., & Quint, M. (2021). On the evolution of plant thermomorphogenesis. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab310>
- McFadden, G. I. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology*, *37*(6), 951–959. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01126.x>
- Merchant, S. S., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Marechal-Drouard, L., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., & Karpowicz, S. J. (2007). The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, *318*(5848), 245–250.
- Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., & Donoghue, P. C. J. (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(10), E2274–E2283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719588115>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473–497.
- Murdoch, W. W., Chu, F. I., Stewart-Oaten, A., & Wilber, M. Q. (2018). Improving wellbeing and reducing future world population. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202851>
- Neale, D. B., Wegrzyn, J. L., Stevens, K. A., Zimin, A. V., Puiu, D., Crepeau, M. W., Cardeno, C., Koriabine, M., Holtz-Morris, A. E., Liechty, J. D., Martínez-García, P. J., Vasquez-Gross, H. A., Lin, B. Y., Zieve, J. J., Dougherty, W. M., Fuentes-Soriano, S., Wu, L. S., Gilbert, D., Marçais, G., ... Langley, C. H. (2014). Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biology*, *15*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r59>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nishiyama, T., Sakayama, H., de Vries, J., Buschmann, H., Saint-Marcoux, D., Ullrich, K. K., Haas, F. B., Vanderstraeten, L., Becker, D., Lang, D., Vosolsobě, S., Rombauts, S., Wilhelmsson, P. K. I., Janitza, P., Kern, R., Heyl, A., Rümpler, F., Villalobos, L. I. A. C., Clay, J. M., ... Rensing, S. A. (2018). The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell*, *174*(2), 448–464.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.033>
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S. J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., & Kuroiwa, T. (2007). A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga Cyanidioschyzon merolae. *BMC Biology*, *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-28>
- Olsen, J. L., Rouzé, P., Verhelst, B., Lin, Y. C., Bayer, T., Collen, J., Dattolo, E., De Paoli, E., Dittami, S., Maumus, F., Michel, G., Kersting, A., Lauritano, C., Lohaus, R., Töpel, M., Tonon, T., Vanneste, K., Amirebrahimi, M., Brakel, J., ... Van De Peer, Y. (2016). The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature*, *530*(7590), 331–335. <https://doi.org/10.1038/nature16548>
- Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otilar, R., Merchant, S. S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., ... Grigoriev, I. V. (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, 104(18), 7705–7710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611046104>

- Pan, J. M., Haring, M. A., & Beck, C. F. (1997). Characterization of blue light signal transduction chains that control development and maintenance of sexual competence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 115(3), 1241–1249. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.1241>
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
- Pires, N. D., Yi, K., Breuninger, H., Catarino, B., Menand, B., & Dolan, L. (2013). Recruitment and remodeling of an ancient gene regulatory network during land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), 9571–9576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305457110>
- Pires, N., & Dolan, L. (2010). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 27(4), 862–874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp288>
- Price, D. C., Chan, C. X., Yoon, H. S., Yang, E. C., Qiu, H., Weber, A. P. M., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N. A., Lane, C., Reyes-Prieto, A., Durnford, D. G., Neilson, J. A. D., Lang, B. F., Burger, G., Steiner, J. M., Löffelhardt, W., Meuser, J. E., Posewitz, M. C., ... Bhattacharya, D. (2012). Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science*, 335(6070), 843–847. <https://doi.org/10.1126/science.1213561>
- Puttick, M. N., Morris, J. L., Williams, T. A., Cox, C. J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Schneider, H., Pisani, D., & Donoghue, P. C. J. (2018). The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. *Current Biology*, 28(5), 733–745.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.063>
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*.
- Raftery, A. E., Zimmer, A., Frierson, D. M. W., Startz, R., & Liu, P. (2017). Less than 2 °C warming by 2100 unlikely. *Nature Climate Change*, 7(9), 637–641. <https://doi.org/10.1038/nclimate3352>
- Rambaut, A. (2007). *FigTree* (v. 1.4.4). Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M., & Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout arabidopsis development. *Plant Cell*, 5(2), 147–157. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.2.147>
- Reynoso, M. A., Kajala, K., Bajic, M., West, D. A., Pauluzzi, G., Yao, A. I., Hatch, K., Zumstein, K., Woodhouse, M., Rodriguez-Medina, J., Sinha, N., Brady, S. M., Deal, R. B., & Bailey-Serres, J. (2019). Evolutionary flexibility in flooding response circuitry in angiosperms. *Science*, 365(6459), 1291–1295. <https://doi.org/10.1126/science.aax8862>
- Rockwell, N. C., & Lagarias, J. C. (2020). Phytochrome evolution in 3D: deletion, duplication, and diversification. *New Phytologist*, 225(6), 2283–2300. <https://doi.org/10.1111/nph.16240>
- Rozewicki, J., Li, S., Amada, K. M., Standley, D. M., & Katoh, K. (2019). MAFFT-DASH: Integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W5–W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz342>
- Ruprecht, C., Proost, S., Hernandez-Coronado, M., Ortiz-Ramirez, C., Lang, D., Rensing, S. A., Becker, J. D., Vandepoele, K., & Mutwil, M. (2017). Phylogenomic analysis of gene co-expression networks reveals the evolution of functional modules. *Plant Journal*, 90(3), 447–465. <https://doi.org/10.1111/tpj.13502>
- Sánchez-Baracaldo, P., Raven, J. A., Pisani, D., & Knoll, A. H. (2017). Early photosynthetic eukaryotes inhabited low-salinity habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(37), E7737–E7745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620089114>
- Sato, M., Sakayama, H., Sato, M., Ito, M., & Sekimoto, H. (2014). Characterization of sexual reproductive processes in *Chara braunii* (Charales, Charophyceae). *Phycological Research*, 62(3), 214–221. <https://doi.org/10.1111/pre.12056>
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Shibata, D., Aoki, K., Egholm, M., Knight, J., Bogden, R., Li, C., Shuang, Y., Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Liu, X., ... Gianese, G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Scotese, C. R., Song, H., Mills, B. J. W., & van der Meer, D. G. (2021). Phanerozoic paleotemperatures: The earth's changing climate during the last 540 million years. *Earth-Science Reviews*, 215(September 2020), 103503.

<https://doi.org/10.1016/j.earscrev.2021.103503>

- Shannon, P., Andrew, M., Owen, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303.metabolite>
- Shaw, A. J., Schmutz, J., Devos, N., Shu, S., Carrell, A. A., & Weston, D. J. (2016). The Sphagnum Genome Project. A New Model for Ecological and Evolutionary Genomics. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 78). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.01.003>
- Sheerin, D. J., Menon, C., Oven-Krockhaus, S. Zur, Enderle, B., Zhu, L., Johnen, P., Schleifenbaum, F., Stierhof, Y. D., Huq, E., & Hiltbrunner, A. (2015). Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in arabidopsis by reorganizing the COP1/SPA complex. *Plant Cell*, 27(1), 189–201. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134775>
- Sørensen, I., Pettolino, F. A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M. A., Fei, Z., Rose, J. K. C., Domozych, D. S., & Willats, W. G. T. (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant Journal*, 68(2), 201–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04686.x>
- Sowder, C., & Steel, E. A. (2012). A note on the collection and cleaning of water temperature data. *Water*, 4, 597–606. <https://doi.org/10.3390/w4030597>
- Speight, M. R., & Henderson, P. A. (2013). *Marine ecology: concepts and applications* (John Wiley).
- Strassert, J. F. H., Irisarri, I., Williams, T. A., & Burki, F. (2021). A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22044-z>
- Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. (2004). Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*, 428, 653–657.
- Thuiller, W. (2007). Biodiversity: Climate change and the ecologist. *Nature*, 448(7153), 550–552. <https://doi.org/10.1038/448550a>
- Vítová, M., Bišová, K., Umysová, D., Hlavová, M., Kawano, S., Zachleder, V., & Čížková, M. (2011). *Chlamydomonas reinhardtii*: Duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity. *Planta*, 233(1), 75–86. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1282-y>
- Wan, T., Liu, Z. M., Li, L. F., Leitch, A. R., Leitch, I. J., Lohaus, R., Liu, Z. J., Xin, H. P., Gong, Y. B., Liu, Y., Wang, W. C., Chen, L. Y., Yang, Y., Kelly, L. J., Yang, J., Huang, J. L., Li, Z., Liu, P., Zhang, L., ... Wang, X. M. (2018). A genome for gnetophytes and early evolution of seed plants. *Nature Plants*, 4(2), 82–89. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0097-2>
- Wang, S., Li, L., Li, H., Sahu, S. K., Wang, H., Xu, Y., Xian, W., Song, B., Liang, H., Cheng, S., Chang, Y., Song, Y., Çebi, Z., Wittek, S., Reder, T., Peterson, M., Yang, H., Wang, J., Melkonian, B., ... Liu, X. (2020). Genomes of early-diverging streptophyte algae shed light on plant terrestrialization. *Nature Plants*, 6(2), 95–106. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0560-3>
- Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M. S., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., Ruhfel, B. R., Wafula, E., Der, J. P., Graham, S. W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Miles, N. W., ... Leebens-Mack, J. (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), E4859–E4868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323926111>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-V).
- Wigge, P. A. (2013). Ambient temperature signalling in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(5), 661–666. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.08.004>
- Wu, T. Y., Goh, H. Z., Azodi, C. B., Krishnamoorthi, S., Liu, M. J., & Urano, D. (2021). Evolutionarily conserved hierarchical gene regulatory networks for plant salt stress response. *Nature Plants*, 7(6), 787–799. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00929-7>
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 809–818. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh075>

8. ANEXO

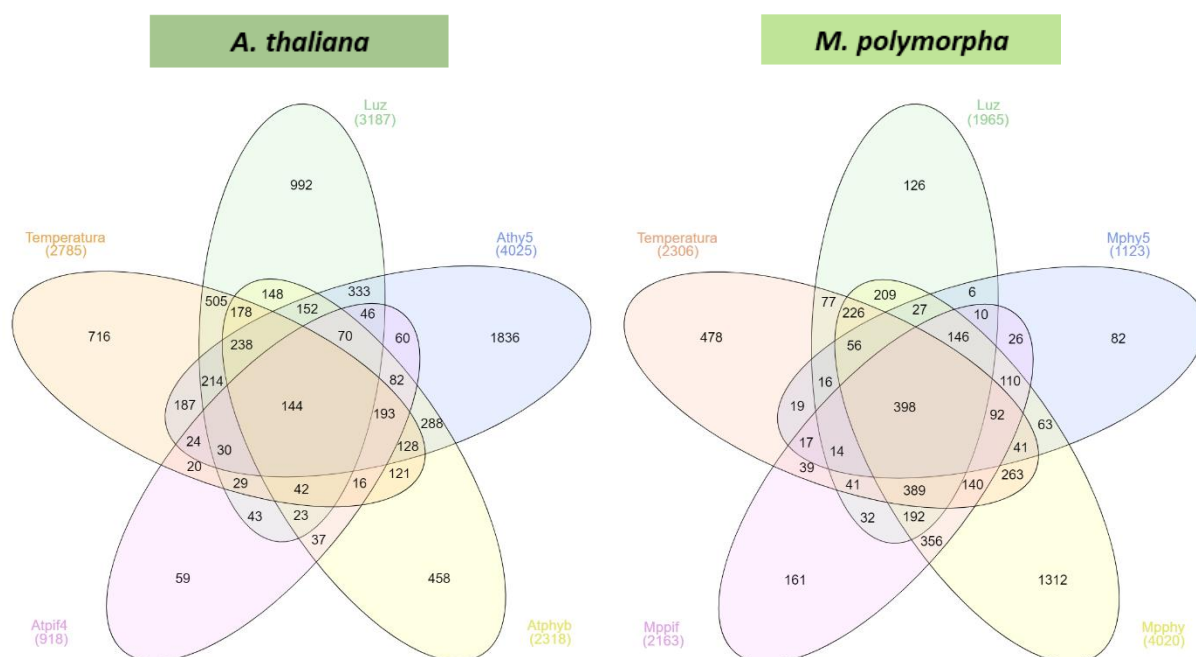


Figura suplementaria 1. Diagrama de Venn no proporcional al número de DEGs de cinco sets: DEGs de luz de la cepa silvestre, DEGs de temperatura de la cepa silvestre (Diagrama de Venn de la Figura 4), DEGs del mutante *hy5*, DEGs del mutante *phy*, DEGs del mutante *pif* (Diagrama de Venn de la Figura 10A y B) de *A. thaliana* (A) y *M. polymorpha* (B).

Tabla suplementaria 1. Análisis estadísticos independientes con test ANOVA unifactorial seguido de un test TukeyHSD para cada una de las especies. *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Mp*: *Marchantia polymorpha*, *Me*: *Mesotaenium endlicherianum*, *Ot*: *Ostreococcus tauri*. Letras iguales significa que no hay diferencia estadística entre esas condiciones.

	<i>At</i>	<i>Mp</i>	<i>Me</i>	<i>Ot</i>
16 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	df	a	de	
16 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ab	abc	abc	a
16 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	a	abcd	a	a
20 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	c	ab	de	
20 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	bd	d	b	ab
20 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ab	e	ac	a
24 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	e	ab	de	
24 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	cf	bcd	bc	c
24 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abd	f	d	bc
28 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	g	ab	e	
28 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	e	cd	e	
28 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	bd	f	e	

Tabla suplementaria 2. Análisis estadístico con test ANOVA unifactorial seguido de un test TukeyHSD incluyendo todos los genotipos estudiados de *Arabidopsis thaliana*. Letras iguales significa que no hay diferencia estadística entre esas condiciones.

	Col-0	<i>Athy5-2</i>	<i>AtphyB-9</i>	<i>Atpif4-2</i>
16 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abcfghi	kp	lm	ahi
16 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abhi	abcdefg	dejk	h
16 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	h	abcfhi	abchi	h
20 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	defgjk	jk	jk	abchi
20 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abchi	bcdefgj	degjk	hi
20 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	hi	abcfhi	abcdfghi	h
24 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	jk	lm	n	abcfhi
24 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abcdefgi	lm	mop	abchi
24 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abchi	cdefgj	defgjk	h
28 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	l	n	q	kop
28 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ejk	l	lm	abcdfghi
28 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abchi	lmo	jk	hi

Tabla suplementaria 3. Análisis estadístico con test ANOVA unifactorial seguido de un test TukeyHSD incluyendo todos los genotipos estudiados de *Marchantia polymorpha*. Letras iguales significa que no hay diferencia estadística entre esas condiciones.

	Tak1	<i>Mphy5</i>	<i>Mpphy</i>	<i>Mppif</i>
16 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ci	cdi	i	ci
16 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	bcdefi	abcdef	cdi	cdi
16 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abcdefi	abgh	cdi	cdefi
20 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	cdi	ci	i	i
20 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	gh	cdefi	ci	ci
20 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	j	g	bcdefi	bcdefi
24 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	cdi	ci	i	ci
24 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	abefgh	abcdefi	ci	abdefh
24 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	kl	j	cdefi	kl
28 °C/1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	cdfi	ci	i	ci
28 °C/10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	agh	abcdef	ci	abegh
28 °C/100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	l	k	cdefi	kl

