



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Caracterización de la evolución de la señalización
sistémica en respuesta a las heridas en plantas

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Sanchez-Tembleque Sosa, Claudia

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Cotutor/a externo: Brito Gutiérrez, Pavel

Director/a Experimental: Sanmartin Artiñano, Maite

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Caracterización de la evolución de la señalización
sistémica en respuesta a las heridas en plantas

Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

Autora: Sánchez-Tembleque Sosa, Claudia

Tutora: Sanmartín Artiñano, Maite

Director experimental: Brito Gutiérrez, Pavel

Tutora UPV: Porcel Roldán, Rosa Caridad

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Resumen

Las plantas han desarrollado rutas de señalización complejas para responder a ataques externos y garantizar su supervivencia. En plantas vasculares, estas respuestas no solo se activan localmente, sino también en tejidos distales, facilitando la defensa frente a amenazas futuras. Para establecer respuestas sistémicas, se ha demostrado que los cambios en los potenciales de membrana, el aumento en los niveles de calcio y la producción de hormonas son esenciales. La transmisión de estas señales sistémicas depende, en parte, de la actividad de los Receptores de Glutamato (GLR), que se expresan en los tejidos vasculares, y modulan la activación de redes génicas en los tejidos sistémicos en respuesta al daño.

Resultados del laboratorio utilizando la hepática *Marchantia polymorpha*, una especie no vascular modelo, muestra que tras la herida se generan señales eléctricas y aumentos en los niveles de calcio que se propagan desde los tejidos dañados a los no dañados, como ocurre en plantas vasculares. El análisis del único GLR presente en el genoma de *Marchantia* (MpGLR) reveló que este canal es clave para modular los cambios en los niveles de calcio. Comprender la regulación de los canales GLR es esencial para entender su papel en la señalización celular y la respuesta adaptativa de las plantas a estímulos externos.

Los resultados de este trabajo indican que los canales MpGLR en *M. polymorpha* son fundamentales para la señalización de calcio mediada por aminoácidos como el L-glutamato, el principal activador de estos canales. Además, la aplicación exógena de otros aminoácidos que actúan como agonistas de los GLR también induce la señalización de calcio. Sin embargo, las respuestas al estrés abiótico, como la salinidad y el estrés osmótico, no dependen de los canales GLR, sugiriendo la existencia de vías alternativas en la adaptación a estos estreses. En conjunto, estos hallazgos resaltan la complejidad de la señalización en especies no vasculares, aportando nuevos conocimientos sobre sus mecanismos de respuesta y adaptación.

Palabras clave: calcio; GLR; glutamato; *Marchantia Polymorpha*; agonista; ondas de calcio; herida.

Abstract

Plants have developed complex signaling pathways to respond to external attacks and ensure their survival. In vascular plants, these responses are activated not only locally but also in distal tissues, facilitating defense against future threats. To establish systemic responses, it has been demonstrated that changes in membrane potentials, increases in calcium levels, and hormone production are essential. The transmission of these systemic signals partially depends on the activity of Glutamate Receptors (GLRs), which are expressed in vascular tissues and modulate the activation of gene networks in systemic tissues in response to damage.

Results from laboratory studies using the liverwort *Marchantia polymorpha*, a model non-vascular species, show that after wounding, electrical signals and increases in calcium levels are generated and propagate from damaged tissues to undamaged ones, similar to what occurs in vascular plants. Analysis of the sole GLR present in the *Marchantia* genome (MpGLR) revealed that this channel is key for modulating changes in calcium levels. Understanding the regulation of GLR channels is essential for elucidating their role in cellular signaling and the adaptive response of plants to external stimuli.

The results of this work indicate that MpGLR channels in *M. polymorpha* are fundamental for calcium signaling mediated by amino acids such as L-glutamate, the primary activator of these channels. Additionally, the exogenous application of other amino acids that act as GLR agonists also induces calcium signaling. However, responses to abiotic stress, such as salinity and osmotic stress, do not depend on GLR channels, suggesting the existence of alternative pathways for adaptation to these stresses. Taken together, these findings highlight the complexity of signaling in non-vascular species, providing new insights into their response and adaptation mechanisms.

Keywords: calcium; GLR; glutamate; *Marchantia Polymorpha*; agonist; calcium signaling; wounding.

Anexo I. Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030

El Trabajo de Fin de Máster tiene como objetivo generar conocimiento fundamental sobre los mecanismos que regulan la actividad de los canales GLR en las plantas, los cuales desempeñan un papel clave en los procesos de señalización celular. En particular, este estudio contribuye a identificar los factores que regulan la actividad de los canales GLR, con especial énfasis en su influencia sobre la señalización por calcio y su efecto en la adaptación de las plantas frente al estrés abiótico. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas para futuras investigaciones en el campo de la biotecnología vegetal, con el potencial de desarrollar estrategias innovadoras para mejorar la resistencia de las plantas a condiciones adversas.

Aunque este trabajo se centra en la investigación molecular, un área que no requiere un análisis detallado desde una perspectiva de género, el laboratorio en el que se llevó a cabo promueve la integración y participación de todos sus miembros; lo que asegura un entorno de trabajo inclusivo y respetuoso, favoreciendo el desarrollo profesional de cada integrante. Asimismo, este Trabajo de Fin de Máster ha sido supervisado por una investigadora y un investigador que han mantenido un firme compromiso con la igualdad de género, en línea con los objetivos del ODS 5 de la Agenda 2030, orientados a fomentar la igualdad.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				✓
ODS 2. Hambre cero.				✓
ODS 3. Salud y bienestar.		✓		
ODS 4. Educación de calidad.				✓
ODS 5. Igualdad de género.		✓		
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				✓
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				✓
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.			✓	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.			✓	
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				✓
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				✓
ODS 12. Producción y consumo responsables.			✓	
ODS 13. Acción por el clima.		✓		
ODS 14. Vida submarina.				✓
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		✓		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				✓
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				✓

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores, Pavel y Maite, por su paciencia, dedicación y generosidad al compartir su conocimiento a lo largo de este proceso. He aprendido mucho de ambos, y estoy muy agradecida.

A mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional, su cariño y por ser siempre mi mayor fuente de motivación.

A mis amigas, Claudia y Daniela, por su compañía y amistad incondicional. Gracias por estar ahí siempre, escuchándome y animándome.

A todos vosotros, gracias por formar parte de este proceso y por haber contribuido de manera tan especial a que pudiera alcanzar este objetivo.

Listado de abreviaturas

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato

APs: Potenciales de acción

ATD: Dominio amino-terminal

ATP: Adenosín trifosfato

Ca²⁺_{cyt}: Calcio citosólico

CaM: Calmodulina

CaSR: Receptor sensor de calcio

CBL: Proteínas similares a calcineurina

CDPK: Quinasas dependientes de calcio

CML: Proteínas similares a la calmodulina

CNGCs: Canales nucleótidos cíclicos

CTD: Dominio carboxilo-terminal

GB5: Gamborg's B5

GFP: Proteína verde fluorescente

GLR: Proteína similar al receptor de glutamato

GUS: Ensayo de β-glucuronidasa

iGluR: Receptor de glutamato ionotrópico de animales

LBD: Dominio de unión al ligando

M1-M4: Dominios transmembrana 1-4

OSCA: Canales de aumento de hipersensibilidad a la salinidad

PEG: Polietilenglicol

PMCA: ATPasa de calcio de membrana plasmática

ROS: Especies reactivas de oxígeno

S1 y S2: Segmentos del dominio de unión al ligando

Tak-1: Takaragaike-1

TMD: Dominio transmembrana

TPC: Canales de dos poros

TRP: Canales receptores potenciales transitorios

UV: radiación ultravioleta

VGCC: Canales de calcio dependientes de voltaje

Índice

1. Introducción.....	8
1.1 Señalización mediada por calcio en plantas.....	8
1.2 Receptores de tipo glutamato (GLR).....	11
1.3 Importancia de estudios evolutivos en la señalización mediada por calcio.....	14
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y métodos.....	18
3.1 Material Vegetal.....	18
3.2 Visualización y cuantificación de $[Ca^{2+}]_{cyt}$	18
3.3 Tratamientos con aminoácidos.....	19
3.4 Ensayos de estrés abiótico.....	19
3.4.1 Tratamientos con polietilenglicol.....	19
3.4.2 Tratamientos de estrés salino.....	20
3.5 Determinación del crecimiento.....	20
3.6 Ensayo de β -glucuronidasa histoquímico.....	20
4. Resultados.....	21
4.1 La aplicación exógena de 20 aminoácidos proteinogénicos y ACC induce la activación de la señalización de calcio en <i>M. polymorpha</i>	21
4.2 La unión de diferentes ligandos de MpGLR provoca respuestas fisiológicas en <i>M. polymorpha</i>	26
4.3 El estrés abiótico altera el crecimiento de <i>M. polymorpha</i>	30
5. Discusión.....	33
6. Conclusiones.....	37
7. Referencias bibliográficas.....	38

Índice de figuras

Figura 1. La señalización mediada por Ca^{2+} es esencial en las respuestas a condiciones de estrés	9
Figura 2. Estructura de los receptores de glutamato en plantas (GLR) y sus determinantes estructurales en el dominio de unión a ligandos (LBD).....	13
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Marchantia polymorpha</i>	15
Figura 4. Esquema de cuantificación de la fluorescencia.....	19
Figura 5. Plantas de la sección correspondiente al genotipo L47 tratadas con 100 μM de L-glutamato.....	20
Figura 6. La aplicación exógena de L-glutamato desencadena la transmisión sistémica de ondas de Ca^{2+}	22
Figura 7. Efecto de los 20 aminoácidos proteínogénicos y ACC en la señalización de Ca^{2+} en <i>Marchantia polymorpha</i>	23
Figura 8. La aplicación exógena de L-glutamato y L-metionina sobre plantas mutantes no desencadena la transmisión de ondas de Ca^{2+}	25
Figura 9. La aplicación exógena de L-glutamato y L-metionina sobre plantas mutantes no desencadena la transmisión de ondas de Ca^{2+}	26
Figura 10. Efecto de posibles ligandos de MpGLR sobre el crecimiento de <i>Marchantia</i>	28
Figura 11. Regulación de la expresión de MpGLR por la aplicación exógena de ligandos putativos.....	29
Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de sal sobre el crecimiento de <i>Marchantia</i>	31
Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG) sobre el crecimiento de <i>Marchantia</i>	32

1. Introducción

Las respuestas celulares a cambios en el entorno son mecanismos fundamentales para la adaptación y el mantenimiento de la homeostasis en los organismos vivos. Estas respuestas permiten a las células captar y responder a estímulos internos y externos, promoviendo la regulación eficiente de procesos celulares mediante el control y la organización de señales (Petersen, 2002). En este contexto, la señalización mediada por calcio es un proceso esencial que utiliza iones de calcio (Ca^{2+}) como señales intracelulares, y que contribuye a la regulación de procesos vitales como la contracción muscular, la transmisión de impulsos nerviosos, la secreción de hormonas y la activación de factores de transcripción (Pikor *et al.*, 2024). En animales, alteraciones en este mecanismo de señalización puede provocar enfermedades neurodegenerativas, hipertensión, problemas musculares y osteoporosis (Alvarez *et al.*, 1999; Petersen, 2002). La señalización por calcio actúa, en general, como un segundo mensajero (Pikor *et al.*, 2024), facilitando la transmisión de señales desde el exterior de la célula hacia su interior o entre compartimentos celulares. Para ello, se activa la entrada controlada de Ca^{2+} al citoplasma desde el exterior o desde reservas intracelulares, como el retículo endoplásmico, activando proteínas que actúan como sensores y median respuestas celulares específicas. Además, la recaptura y expulsión de Ca^{2+} a través de bombas y transportadores mantiene la homeostasis celular y contribuye también a la regulación de procesos como la apoptosis (Petersen, 2002; Pikor *et al.*, 2024).

En humanos, los principales transportadores de calcio incluyen las bombas de calcio (ATPasa de Ca^{2+}), localizadas en la membrana plasmática (PMCA) o en el retículo endoplasmático (SERCA), que utilizan energía derivada del adenosín trifosfato (ATP) para expulsar calcio hacia el exterior de la célula o almacenarlo en el retículo endoplasmático, manteniendo de esta manera niveles bajos en la concentración intracelular de calcio en reposo (Boczek *et al.*, 2021; Pikor *et al.*, 2024). Además, en la homeostasis del calcio intracelular participan, entre otros, los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que ayudan a regular los niveles de calcio en el citoplasma y los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), importantes en el control de células excitables, como neuronas y células musculares (Boczek *et al.*, 2021; Petersen *et al.*, 2017).

1.1 Señalización mediada por calcio en plantas

En plantas, la señalización mediada por calcio participa también en la regulación de procesos esenciales, modulando funciones vitales como el crecimiento y la defensa frente a distintos tipos de estrés (Bellandi *et al.*, 2022). La variación en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático libre ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), es uno de los primeros eventos que ocurren tras la percepción de cambios ambientales, ya sea por estrés abiótico, como la salinidad, la sequía, los cambios en temperatura o luz,

o por estrés biótico, como el ataque de patógenos o herbívoros (Yu *et al.*, 2022). Al detectar estos estímulos, los iones de calcio se liberan de compartimentos celulares como el retículo endoplásmico y las vacuolas, y/o se activa la entrada de calcio desde el apoplasto a través de canales de calcio localizados en la membrana plasmática (Wuddick *et al.*, 2018a). La señalización por calcio en plantas es altamente compleja debido a su interacción con otras vías de señalización, incluidas las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las rutas de transducción de ciertas hormonas vegetales (Aldon *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022). Esta integración de señales permite a las plantas procesar múltiples estímulos de manera precisa, ajustando sus respuestas de forma eficiente (Bellandi *et al.*, 2022; Toyota *et al.*, 2018). La conversión de estas variaciones de Ca^{2+} en respuestas biológicas, requiere de la acción de sensores específicos que permiten a las plantas decodificar las señales de Ca^{2+} y generar respuestas adaptativas (Figura 1; Aldon *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022).

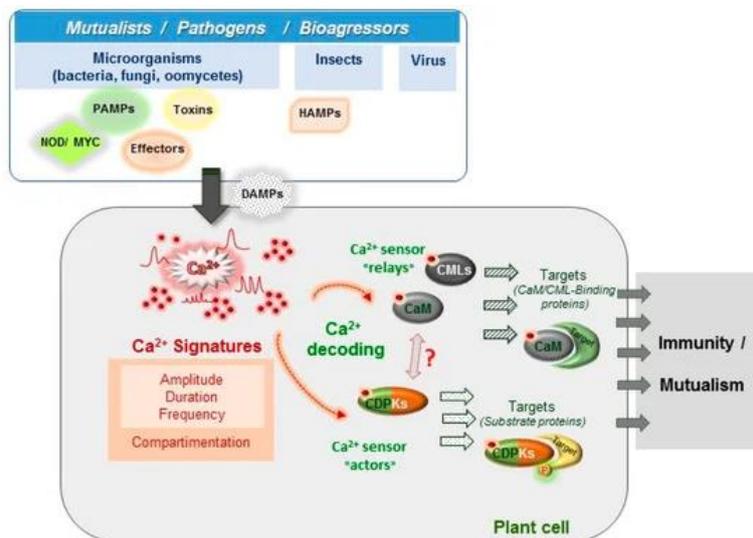


Figura 1. La señalización mediada por Ca^{2+} es esencial en las respuestas a condiciones de estrés. Las variaciones de Ca^{2+} en respuesta a diferentes condiciones de estrés y el ataque por microorganismos, plagas o virus, provoca la activación de sensores de unión a Ca^{2+} (CaM, CML, CBL y CDPK) que permiten a las plantas decodificar las señales de Ca^{2+} y generar respuestas adaptativas (adaptado de Aldon *et al.*, 2018).

La mayoría de las proteínas de unión a Ca^{2+} contienen una región específica en su estructura, el motivo *EF-hand*, que les permite interactuar con este ion de manera eficiente (Bhar *et al.*, 2023). En la especie modelo *Arabidopsis thaliana* se han identificado al menos 250 proteínas que contienen este motivo (Aldon *et al.*, 2018), aunque no todas las proteínas que contienen un motivo *EF-hand* funcionan como sensores de Ca^{2+} . Entre las proteínas que actúan como sensores se pueden diferenciar cuatro grupos: la calmodulina (CaM), las proteínas similares a la calmodulina (CML), las proteínas similares a calcineurina B (CBL) y las quinasas dependientes de calcio (CDPK) (Aldon *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022). Aunque las funciones de muchas de estas proteínas todavía se desconocen, se ha identificado el papel esencial de algunos de estos sensores en procesos fisiológicos específicos (Aldon *et al.*, 2018). Las CaM y las CML

desempeñan un papel importante en la interpretación de fluctuaciones transitorias de Ca^{2+} en el citoplasma, permitiendo la activación de respuestas rápidas como la apertura y el cierre estomático, procesos esenciales para regular la transpiración y la fotosíntesis (Poovaiah *et al.*, 2015; Valmonte *et al.*, 2013). Por otro lado, las CDPK son cruciales en la respuesta al estrés abiótico, como la sequía y la salinidad, además de participar en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas (Romeis and Herde, 2014; Shi *et al.*, 2018).

Para un funcionamiento eficiente de la señalización de calcio en plantas es fundamental la actividad de sistemas de transporte que regulen los niveles de Ca^{2+} en los diferentes compartimentos celulares. Estos sistemas se pueden clasificar según la dirección del transporte de calcio en mecanismos de entrada o de salida de calcio. La entrada de calcio al citoplasma ocurre principalmente a través de canales que permiten la entrada de este ion desde el exterior de la célula o desde compartimentos internos (Park and Shin, 2022). Entre ellos destaca el papel de los receptores de glutamato o GLRs, implicados en el control del flujo de calcio en respuesta a estímulos ambientales y en la respuesta a las heridas (Xu *et al.*, 2022; Mousavi *et al.*, 2013); los canales nucleótidos cíclicos (CNGCs), que participan en la señalización del calcio, regulando el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al estrés abiótico como sequía y salinidad, e intervienen en la inmunidad de las plantas, ayudando a la resistencia frente a patógenos (DeFalco and Zipfel, 2021; Dietrich *et al.*, 2020); los canales de aumento de hipersensibilidad a la salinidad (OSCA), asociados con la entrada de calcio en respuesta a señales de estrés osmótico como la salinidad (Hou *et al.*, 2014); los canales de dos poros (TPC), responsables de liberar calcio almacenado desde compartimentos intracelulares, como las vacuolas, hacia el citosol, en respuesta a cambios en el entorno, contribuyendo a la señalización celular relacionada con el estrés y el metabolismo (Demidchik *et al.*, 2018; Park and Shin, 2022); y las anexinas (ANN) que participan en el transporte de calcio en la defensa frente a patógenos (Demidchik *et al.*, 2018).

Por otro lado, para recobrar la homeostasis del calcio, es necesario eliminarlo del citoplasma hacia el exterior de la célula o almacenarlo de nuevo en compartimentos internos para mantener un bajo nivel de calcio en el citoplasma (Zhu *et al.*, 2010). Entre los transportadores de salida, cabe destacar el papel de las bombas de calcio tipo P (P-ATPasa), que utilizan ATP para trasladar el calcio hacia el exterior de la célula o almacenarlo en compartimentos como la vacuola y el retículo endoplásmico. De manera similar, los intercambiadores calcio-protones de tipo CAX, transportan el calcio hacia el interior de las vacuolas, un proceso crucial para amortiguar los aumentos temporales de calcio en el citosol durante situaciones de estrés, como la sequía o el ataque de patógenos (Bose *et al.*, 2011; Demidchik *et al.*, 2018; Park and Shin, 2022).

1.2 Receptores de tipo glutamato (GLR)

Los receptores de glutamato o GLRs son proteínas similares a los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) presentes en animales (Grenzi *et al.*, 2020), que actúan en la comunicación neuronal y están regulados por ligandos, principalmente glutamato y sus co-agonistas glicina y D-serina, que actúan como neurotransmisores (Wudick *et al.*, 2018a). Los GLRs son canales iónicos esenciales para la señalización celular y la adaptación frente al estrés en plantas (Green *et al.*, 2021). Estos canales participan en la defensa contra patógenos y en las respuestas frente al estrés abiótico (sequía, salinidad o temperatura), contribuyendo a la homeostasis celular. Además, facilitan los procesos de fertilización (De Bortoli *et al.*, 2016) y regulan el transporte de calcio hacia el citoplasma, manteniendo niveles óptimos de este ion y modulando respuestas defensivas frente a infecciones (Wudick *et al.*, 2018a; Green *et al.*, 2021). En este contexto, se ha descrito que el transporte de calcio mediado por los GLRs está asociado con la rápida propagación de señales eléctricas. Estas señales se generan en respuesta a estímulos como el daño mecánico o el ataque de herbívoros (Toyota *et al.*, 2018), lo que desencadena respuestas locales y/o sistémicas. Esto ocurre a través de cambios en los potenciales de membrana que van acompañados por un flujo de calcio hacia el citoplasma (Green *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2018; Shao *et al.*, 2020; Vincent *et al.*, 2017).

En plantas vasculares, los GLRs están codificados por familias multigénicas, con un número variable de genes según la especie, y pueden presentar diferentes localizaciones subcelulares que influyen en su función (Ahmed *et al.*, 2023). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica 20 GLRs que se agrupan en tres clados diferentes (Chiu *et al.*, 2002). El clado III incluye secuencias de plantas terrestres tempranas, mientras que los clados I y II son específicos de angiospermas. El genoma del arroz es el más complejo y contiene 24 GLRs agrupados en cuatro clados, con el cuarto clado ausente en *Arabidopsis* (Singh *et al.*, 2013). En la especie modelo *Arabidopsis* destacan varios GLRs de los diferentes clados por su función en la señalización del calcio, el estrés ambiental y la fisiología celular. Dentro del clado I, los GLRs GLR1.2 y GLR1.3 se localizan principalmente en la membrana plasmática y están asociados con la señalización del calcio en respuesta a estímulos abióticos como la tolerancia al frío (Zheng *et al.*, 2018). Estos GLRs participan en la regulación de procesos como el crecimiento de raíces y la resistencia a la sequía (Ahmed *et al.*, 2023). En el clado II, los GLRs GLR2.1 y GLR2.3 se localizan en el tonoplasto y desempeñan roles clave en el crecimiento celular, particularmente en el desarrollo de raíces y la homeostasis de calcio dentro del vacuoma (Wudick *et al.*, 2018b). Por otro lado, el clado III incluye GLRs como GLR3.1, GLR3.3, GLR3.4, GLR3.6 y GLR3.7, los cuales se localizan en la membrana plasmática, y los cloroplastos (Teardo *et al.*, 2011). Estos GLRs participan en la propagación de señales eléctricas sistémicas en respuesta al daño mecánico, y regulan el flujo de calcio desde los organelos

hacia el citosol. El GLR3.3, por ejemplo, es fundamental en la señalización del calcio en respuesta al estrés y las heridas (Mousavi *et al.*, 2013), mientras que el GLR3.4 juega un papel crucial en el metabolismo del calcio en cloroplastos (Teardo *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que GLR3.3 y GLR3.6 se expresan en el tejido vascular y actúan sinérgicamente en la transmisión de señales eléctricas a través de la vasculatura (Mousavi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2018; Toyota *et al.*, 2018). Los GLR3.5, GLR3.6 y GLR3.7 también están involucrados en la liberación de calcio de compartimentos internos, regulando los flujos de calcio entre diferentes compartimentos celulares (Nguyen *et al.*, 2018; Teardo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019).

La estructura de los GLR presenta un diseño modular compuesto por 4 dominios estructurales y funcionales de la proteína (Figura 2; Ahmed *et al.*, 2023; Alfieri *et al.*, 2019; Simon *et al.*, 2023). El dominio extracelular de unión a ligandos (LBD), formado por los segmentos S1 y S2, es clave para la interacción con distintos aminoácidos que se proponen como moduladores de la actividad del canal (De Bortoli *et al.*, 2016; Grenzi *et al.*, 2020). Este dominio es análogo al de los iGluRs en animales, lo que sugiere un origen evolutivo común (Price *et al.*, 2012; Wudick *et al.*, 2018a). Además, los GLR poseen un dominio N-terminal adicional (ATD), que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína y contribuye a la estructura general del receptor. Los GLR están anclados a la membrana a través de una estructura compuesta por cuatro hélices transmembranales (TM1-TM4), que forman el poro iónico, permitiendo el paso selectivo de cationes (De Bortoli *et al.*, 2016). El filtro selectivo entre las TM3 y TM4 determina la especificidad de los iones que pueden atravesar el canal. Finalmente, el dominio C-terminal citosólico (CTD) regula la actividad del canal mediante interacciones con señales intracelulares y proteínas accesorias, controlando así su función en el entorno celular (Alfieri *et al.*, 2019; Wudick *et al.*, 2018a). Aunque los dominios transmembrana de las GLRs están relativamente conservados entre diferentes grupos, las principales diferencias se encuentran en las regiones extracelulares (LBD y ATD), lo que podría explicar las variaciones en la unión a ligandos (Simon *et al.*, 2023). Además, los GLRs son capaces de ensamblarse formando heterodímeros o incluso heterotrímeros (Ahmed *et al.*, 2023). En estas configuraciones, las diferentes subunidades se combinan para formar un canal tetramérico (Ahmed *et al.*, 2023), lo que promueve tanto la diversidad funcional como la especificidad por ciertos ligandos (Grenzi *et al.*, 2020; Price *et al.*, 2012).

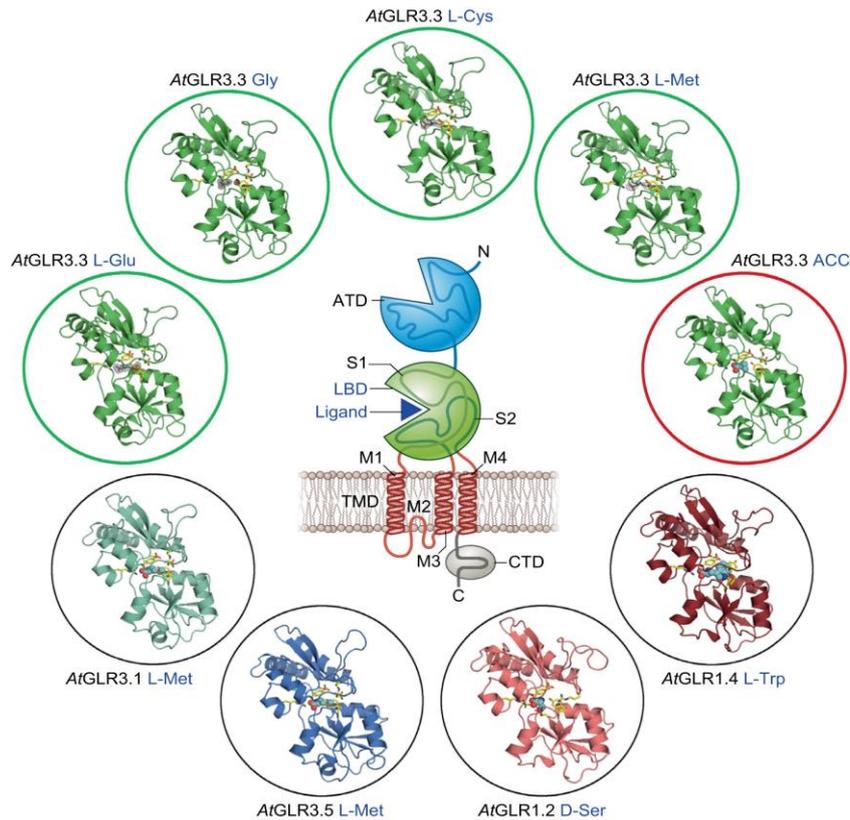


Figura 2. Estructura de los receptores de glutamato en plantas (GLR) y sus determinantes estructurales en el dominio de unión a ligandos (LBD). Se identifican los siguientes dominios en los GLRs: el dominio amino-terminal (ATD) y el dominio de unión a ligandos (LBD), compuesto por los segmentos S1 y S2, en el lado extracelular; los cuatro dominios transmembrana (TMD; M1 a M4); y el dominio carboxilo-terminal (CTD) en la región intracelular (Wudick et al., 2018a). En la parte superior, se muestran representaciones de la estructura de AtGLR3.3-LBD unida a diferentes ligandos como L-Ácido glutámico (L-Glu), Glicina (Gly), L-Cisteína (L-Cys) y L-Metionina (L-Met); además, se observa como la estructura AtGLR3.3-LBD también puede unirse al ACC (1-aminociclopropano-1-carboxílico). En la parte inferior, se presentan modelos homólogos basados en la estructura de AtGLR3.3-LBD para diferentes isoformas de GLR que muestran preferencia por distintos ligandos: L-metionina (L-Met) para AtGLR3.1 y AtGLR3.5, D-Serina (D-Ser) para AtGLR1.2, y triptófano (L-Trp) para AtGLR1.4 (Alfieri et al., 2020; Grenzi et al., 2020). Adaptado de Grenzi et al., 2020.

La actividad de los GLRs en plantas está regulada principalmente por la unión con aminoácidos que actúan como ligandos (Simon *et al.*, 2023), siendo el glutamato (L-Glu) el activador más estudiado. Sin embargo, otros aminoácidos, como la glicina y la serina (Figura 2), también activan estos receptores (Wudick *et al.*, 2018a). La interacción de un ligando con el dominio LBD genera un cambio conformacional que abre el canal y permite el flujo de iones, particularmente Ca^{2+} , hacia el citoplasma (Ahmed *et al.*, 2023; Grenzi *et al.*, 2020). A diferencia de los iGLRs animales, los GLRs de plantas presentan una amplia gama de agonistas. Por ejemplo, GLR1.4 es activado por al menos siete aminoácidos, entre ellos la metionina (L-Met), el triptófano (L-Trp), la fenilalanina (L-Phe) y la leucina (L-Leu), siendo la metionina el más potente (Tapken *et al.*, 2013). Por su parte, GLR3.3 responde a seis aminoácidos, como el glutamato, la glicina, la alanina, la serina, la asparagina y la cisteína, además de responder al glutatión (Qi *et al.*, 2006). En GLR3.4, estudios en células HEK (*Human Embryonic Kidney*) han identificado que la asparagina, la serina y la glicina son los agonistas más efectivos para inducir el flujo de iones a través de la membrana plasmática

(Vincill *et al.*, 2012). Entre las isoformas, GLR3.3 destaca por su capacidad para interactuar con una amplia variedad de ligandos, en comparación con otras isoformas que presentan una selectividad más restringida (Grenzi *et al.*, 2020). Por ejemplo, GLR1.2 presenta afinidad por la serina, GLR1.4 por el triptófano y GLR3.5 tiene una alta afinidad por la metionina (Figura 2; Grenzi *et al.*, 2020). Además, se ha visto que el aminoácido no proteico 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del etileno, actúa como ligando potencial de GLR3.3 (Grenzi *et al.*, 2020; Mou *et al.*, 2020). Estas observaciones muestran cómo la diversidad estructural y funcional de los canales GLR permite a las plantas ajustar sus respuestas frente a factores de estrés (Wudick *et al.*, 2018a).

El análisis de mutantes de pérdida de función de los GLR ha proporcionado información adicional sobre su función. Así, los mutantes simples *glr3.1* y *glr3.6* de *Arabidopsis* permitieron observar que las ondas de calcio se propagan de célula a célula generando una respuesta local. En cambio, en *glr3.3*, las ondas no se extienden más allá del área cercana a la herida, lo que destaca su importancia en la propagación sistémica de estas señales (Bellandi *et al.*, 2022; Mousavi *et al.*, 2013). En el doble mutante *glr3.3 glr3.6* la propagación se inhibió completamente, y la reintroducción de GLR3.6 restauró la respuesta, confirmando su papel clave en el aumento de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Mousavi *et al.*, 2013; Toyota *et al.*, 2018). Por otro lado, estudios con estímulos láser en hojas distales de mutantes simples *glr3.1*, *glr3.2*, *glr3.3* y *glr3.6* mostraron que estas mutaciones reducen la duración de los potenciales eléctricos en comparación con plantas silvestres. En mutantes dobles como *glr3.1 glr3.3* y *glr3.3 glr3.6*, las despolarizaciones inducidas por láser desaparecieron por completo, lo que sugiere que los GLR son esenciales para la transmisión de potenciales de membrana frente a estímulos externos (Toyota *et al.*, 2018). Adicionalmente, en un experimento con larvas de *Spodoptera littoralis*, las plantas mutantes *glr3.3* y *glr3.3 glr3.6* favorecieron un mayor aumento de peso en los insectos, lo que destaca la función defensiva de los GLR en la respuesta frente a herbívoros (Nguyen *et al.*, 2018).

1.3 Importancia de estudios evolutivos en la señalización mediada por calcio

La colonización de los ambientes terrestres por las plantas, hace aproximadamente 450 millones de años, marcó un evento evolutivo clave que impulsó el desarrollo de mecanismos para enfrentar factores de estrés ambientales (Bowman, 2013), como ciclos de deshidratación y rehidratación (Oliver *et al.*, 2005), altas intensidades de luz, radiación ultravioleta (UV) y un entorno con mayor disponibilidad de oxígeno (Dahl *et al.*, 2010; Kenrick and Crane, 1997). En este contexto, los briófitos, como *Physcomitrella patens* y *Marchantia polymorpha*, divergieron de las plantas vasculares y se convirtieron en modelos útiles para comprender las primeras adaptaciones de las plantas terrestres (Rensing *et al.*, 2008). Los estudios moleculares comparativos

recientes han destacado el uso de estas especies para entender cómo las redes de señalización se activan frente a factores de estrés (Bowman *et al.*, 2022; Wudick *et al.*, 2018a), y qué las ha llevado a desarrollar estrategias únicas para enfrentar factores como radiación UV, ozono, heridas y cambios en la disponibilidad de agua, asociados con un aumento en la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gilroy *et al.*, 2016; Rensing *et al.*, 2008; Tucker *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2024).

Marchantia polymorpha, una hepática del filo *Marchantiophyta*, se considera uno de los linajes más antiguos entre las plantas terrestres (Bowman *et al.*, 2022). Su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales diversas se basa en una estrategia reproductiva flexible que incluye reproducción sexual mediante gametos y reproducción asexual a través de gemas (Kato *et al.*, 2020; Yamaoka *et al.*, 2021). Con un ciclo de vida corto y una baja redundancia genética, *M. polymorpha* se ha establecido como un modelo ideal para estudiar procesos genéticos, adaptaciones evolutivas y respuestas al estrés en plantas terrestres (Bowman *et al.*, 2022). A pesar de su simplicidad genética en comparación con las plantas vasculares, esta especie conserva genes esenciales asociados con rutas de señalización fundamentales que también están presentes en linajes más complejos (Bowman *et al.*, 2022).

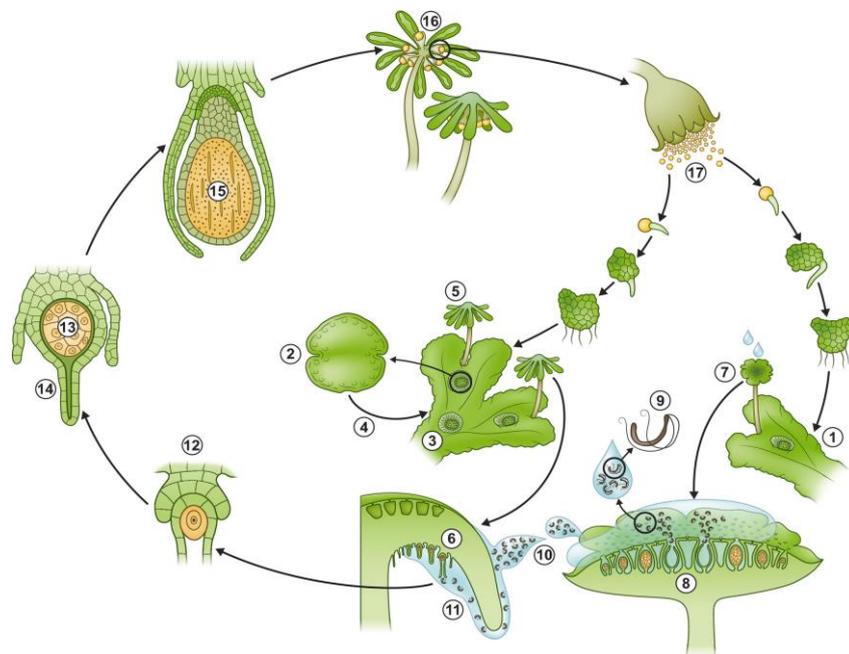


Figura 3. Ciclo de vida de *Marchantia polymorpha*. En la fase haploide predominante, una estructura laminar llamada talo (1) produce gemas (2) dentro de copas de gemación (3), unas estructuras multicelulares que desarrollan nuevos talos (4), completando el ciclo asexual. En el ciclo sexual, sobre el talo se desarrollan los arquegonióforos (5) con arquegonios (6) o los anteridióforos (7) con anteridios (8), que producen espermatozoides móviles (9). Estos viajan mediante gotas de agua (10) hacia los arquegonios (11) para fecundar los óvulos (12). El embrión resultante (13) se desarrolla dentro de una caliptra (14), dando lugar a un esporofito. Tras la meiosis, las esporas (15) son liberadas (17) desde los esporangios (16) y germinan, formando nuevos talos y completando el ciclo sexual (Adaptado de Aguilar-Cruz *et al.*, 2019).

La señalización mediada por calcio desempeña un papel fundamental en la respuesta de *Marchantia* a factores de estrés, como la herida, al igual que en *Physcomitrella* (Bowman *et al.*, 2022; Wudick *et al.*, 2018a). En *Physcomitrella*, las ondas de Ca^{2+} están reguladas por canales GLR, que constan de dos miembros y participan en respuestas fisiológicas frente al estrés hídrico, la salinidad y las variaciones lumínicas (De Bortoli *et al.*, 2016; Edel and Kudla, 2015; Watanabe *et al.*, 2024). A diferencia de *Arabidopsis thaliana*, donde el calcio viaja a través del tejido vascular, en *Physcomitrella* la propagación es más lenta debido a la ausencia de este sistema (Storti *et al.*, 2018).

Estudios recientes han demostrado que en *Physcomitrella patens* la aplicación de glutamato provoca un aumento localizado de $[\text{Ca}^{2+}]$ en el sitio tratado, mientras que los potenciales de acción (APs) se transmiten a células distantes (Koselski *et al.*, 2020). Este comportamiento difiere de otras plantas vasculares, donde los APs y las ondas de Ca^{2+} están interrelacionados y se propagan conjuntamente (Choi *et al.*, 2017; Gilroy *et al.*, 2016; Scherzer *et al.*, 2022). Gracias a su genoma completamente secuenciado (Rensing *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2018), *Physcomitrella* ha emergido como una planta modelo para estudios sobre mecanismos de defensa frente al estrés ambiental (Frank *et al.*, 2005; Koselski *et al.*, 2019). La generación de APs en respuesta a estímulos como la luz, el enfriamiento y el tratamiento con Glu resalta el papel central de los flujos de calcio en estos procesos (Koselski *et al.*, 2008).

Asimismo, *Marchantia polymorpha*, considerada uno de los linajes más antiguos de plantas terrestres (Bowman *et al.*, 2022), ha contribuido al entendimiento de las redes de señalización relacionadas con el calcio. En esta hepática, las señales eléctricas y las ondas de Ca^{2+} inducidas por heridas se propagan hacia tejidos no dañados de manera rápida y sistémica, a pesar de la ausencia de un sistema vascular, alcanzando velocidades similares a las observadas en plantas vasculares (Sanmartín *et al.*, 2024; Watanabe *et al.*, 2024). El canal GLR, codificado por un único gen en *Marchantia* (MpGLR), es esencial para esta propagación y demuestra una notable conservación evolutiva de los mecanismos de señalización entre plantas vasculares y no vasculares (Sanmartín *et al.*, 2024; Watanabe *et al.*, 2024). Todo esto subraya la importancia del calcio como mensajero clave en la señalización celular en plantas no vasculares como *Marchantia* y *Physcomitrella*, y proporciona nuevas perspectivas sobre la evolución de los mecanismos de señalización en plantas terrestres.

2. Objetivos

Conocer cómo se regula la actividad de los canales GLR en las plantas es fundamental para entender su papel en los procesos de señalización celular y su contribución en la respuesta adaptativa de las plantas frente a estímulos externos, como el estrés abiótico, así como en la transducción de las señales intracelulares. Por tanto, el objetivo general del presente Trabajo de Fin de Máster es contribuir a elucidar los factores que regulan la actividad de los canales GLR y que influyan en la señalización por calcio, además de su efecto en la adaptación de plantas frente al estrés abiótico. Para la consecución del mismo, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Investigar cómo responde la señalización por calcio al tratamiento con posibles agonistas de los receptores de glutamato (GLR) y determinar su efecto en mutantes de pérdida de función del receptor MpGLR.
- 2.- Determinar el patrón de expresión de MpGLR en respuesta a los posibles agonistas.
- 3.- Examinar la respuesta de *Marchantia* frente al estrés abiótico y el papel de MpGLR en estos mecanismos de adaptación.

3. Materiales y métodos

3.1 Material Vegetal

Para este estudio se ha utilizado la accesión Takaragaike-1 (Tak-1; talo masculino) de *Marchantia polymorpha* como genotipo silvestre (*wild-type*), dos líneas transgénicas que expresan el sensor de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) GCaMP3 (L47 y L48) en fondo genético Tak-1 y los mutantes *Mpglr-7* y *Mpglr-9*, en fondos genéticos L47 y L48 respectivamente, disponibles en el laboratorio (Sanmartín *et al.*, 2024).

Las plantas se crecieron en medio 0,5X Gamborg's B5 sólido (GB5; Gamborg *et al.*, 1968) con un 1% agar y pH 5.5, bajo un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una temperatura constante de 22°C, y una humedad relativa entre el 50% y 70%. Se ha utilizado la propagación asexual mediante gemas de *Marchantia* para mantener las distintas líneas empleadas en el trabajo.

3.2 Visualización y cuantificación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

Las plantas de *Marchantia* de 21 días que expresan el sensor de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ GCaMP3 se visualizaron con una Lupa de fluorescencia MacroFluo (MZ16F Leica) equipada con un conjunto de filtros de emisión/excitación eGFP.

Para determinar la inducción del sensor, se evaluó la respuesta a los 20 L-aminoácidos y al ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico o ACC. Para ello, se preparó una solución *stock* 100 mM de cada aminoácido en agua ultrapura, excepto para la L-isooleucina, L-tirosina, y el ACC para los cuales se utilizaron soluciones saturadas 50 mM, 10 mM y 1 mM, respectivamente. Cada disolución *stock* se diluyó a una concentración final de 10 mM en agua ultrapura y Triton X-100 al 0.02%. En cada ensayo se aplicaron 12 μl de cada solución sobre la superficie del talo, cerca de los nichos apicales.

Para cuantificar el nivel de fluorescencia, se seleccionó una región de interés (ROI) con un área de 33 píxeles en tres regiones del talo y se midió la fluorescencia en la respuesta local y sistémica (proximal y distal), así como sus respectivos *backgrounds*, a tres tiempos diferentes (0, 30 y 60 segundos) con el programa *ImageJ* (como se muestra en la Figura 4). El incremento relativo en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ se calculó como $F_n - F_0 / F_0$ donde F_0 es el valor para la ROI a tiempo 0 y F_n es el valor de fluorescencia en el punto de tiempo n segundos. Como dato adicional, se midió el pH de cada uno de los 20 aminoácidos en solución acuosa. En general, el pH osciló entre 6 y 7, con excepción de la arginina, cuyo pH fue de 9, el aspartato, cuyo pH estuvo entre 4 y 5, y el control, que presentó un pH entre 5 y 6.

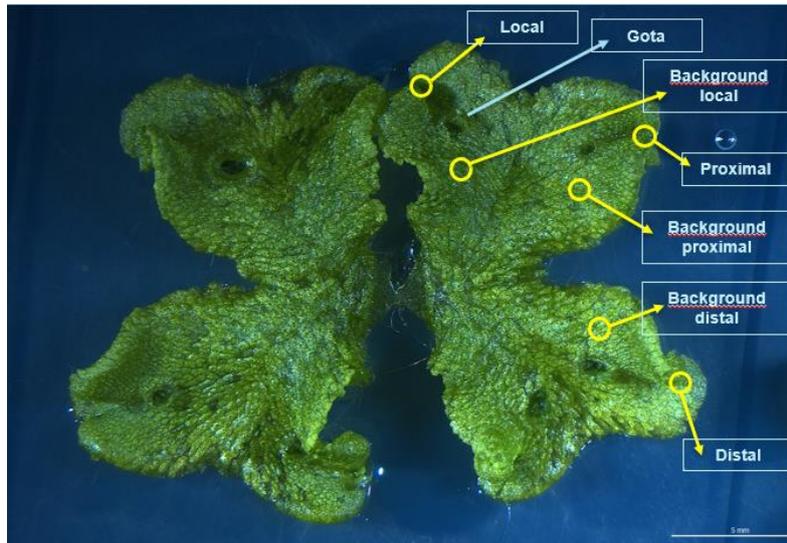


Figura 4. Esquema de cuantificación de la fluorescencia. Regiones de interés (ROIs) medidas en el talo derecho utilizando un contorno amarillo de 33 píxeles, que corresponden a las tres respuestas posibles, con sus respectivos *backgrounds* dentro de la planta; y lugar de aplicación de la gota para el tratamiento.

3.3 Tratamientos con aminoácidos

Se crecieron plantas de 4 días en medio Gamborg's B5 sólido y se transfirieron a placas de medio GB5 sólido suplementado con diferentes concentraciones de los aminoácidos: ACC (50 μ M), L-metionina (1 mM), L-glutamato (100 μ M y 1 mM) y control. Cada placa se dividió en cuatro secciones para sembrar cinco plantas de los distintos genotipos: L47, L48, *Mpplr-7* y *Mpplr-9*. Se realizaron cuatro réplicas con dos placas de cada tratamiento por ensayo.

3.4 Ensayos de estrés abiótico

3.4.1 Tratamientos con polietilenglicol

Se crecieron plantas de 4 días en medio Gamborg's B5 sólido y se transfirieron a placas de medio GB5 sólido con diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG): 0% (control), 5%, 10%, 15%, 20% y 25%. Para ello, se prepararon placas con 20 mL de medio Gamborg y se realizaron las soluciones de PEG de manera independiente, disolviendo la cantidad de PEG para cada concentración en 20 mL de Gamborg líquido. Estas soluciones se filtraron con un filtro de 0.22 μ m y se añadieron a las placas con medio Gamborg. Las placas se mantuvieron en la cabina de flujo durante un mínimo de 12 horas, permitiendo que el PEG se homogeneizara con el medio. En las placas se crecieron seis plantas para el primer ensayo; y diez plantas para el segundo y tercer ensayo. Los ensayos se realizaron con tres genotipos de *Marchantia*: Tak-1, L47 y *Mpplr-7*. Para realizar este experimento se llevaron a cabo un total de 3 ensayos: el primero con el genotipo Tak-1; el segundo con los genotipos Tak-1, L47 y *Mpplr-7*; y el tercer ensayo con los genotipos L47 y *Mpplr-7*.

3.4.2 Tratamientos de estrés salino

Se sembraron plantas de 0 y 4 días en medio Gamborg's B5 sólido y se transfirieron a placas de medio GB5 sólido con diferentes concentraciones de sal (NaCl): 40 mM, 70 mM, 100 mM y un control. Para ello, se prepararon placas con medio GB5: se tomó un volumen inicial de Gamborg para preparar n placas y a cada volumen de Gamborg se le añadió una solución salina en la concentración deseada. El volumen de la solución salina se calculó en función de la concentración final requerida en las placas. En las placas se sembraron seis plantas de 0 y 4 días para el primer ensayo; y diez plantas de 4 días para el segundo y tercer ensayo. Los ensayos se realizaron con tres genotipos de *Marchantia*: Tak-1, L47 y *Mpgrl-7*. Para realizar este experimento se llevaron a cabo un total de 3 ensayos: el primero con los genotipos Tak-1 y L47; y el segundo y tercer ensayo con los genotipos Tak-1, L47 y *Mpgrl-7*.

3.5 Determinación del crecimiento

Tras 7 días de tratamiento, se determinó el área de las plantas crecidas en las diferentes concentraciones de aminoácidos, NaCl y PEG. Para ello, se tomaron imágenes utilizando una cámara Nikon D3500 o un macroscopio Leica DMS 1000 equipado con iluminación diascópica. Se midieron las áreas de cada una de las plantas con el programa *ImageJ* como se muestra en la Figura 5.

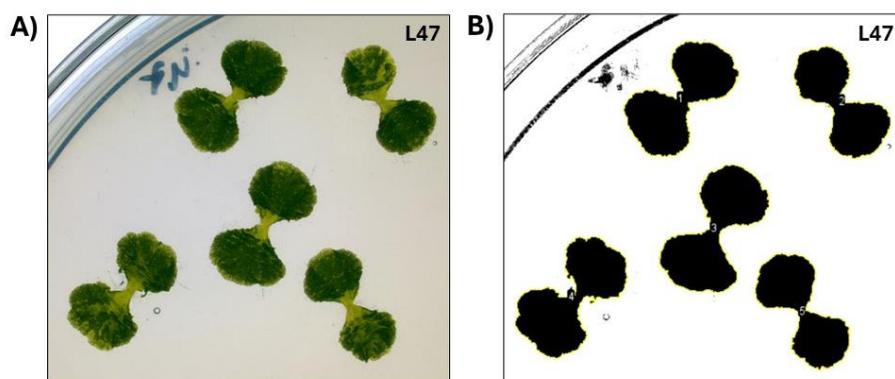


Figura 5. Plantas de la sección correspondiente al genotipo L47 tratadas con 100 μ M de L-glutamato. A) Plantas crecidas en medio GB5 suplementado con 100 μ M de L-glutamato. B) Áreas medidas de la región de interés correspondiente a cada una de las plantas.

3.6 Ensayo de β -glucuronidasa histoquímico

Para el ensayo de β -glucuronidasa (GUS), el material vegetal se fijó en acetona 90% durante 20 minutos. Posteriormente, se lavó con un tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.2 y se añadió la solución de tinción GUS (tampón de fosfato de sodio 100 mM pH 7.2, 0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1 % Triton X-100 y 1 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d -glucurónico. Por último, se aplicó vacío 2 veces durante 10 minutos y se incubó a 37°C en oscuridad. La reacción se paró con etanol 70% al detectar señal.

4. Resultados

4.1 La aplicación exógena de 20 aminoácidos proteínogénicos y ACC induce la activación de la señalización de calcio en *M. polymorpha*

Numerosos estudios han demostrado que el calcio (Ca^{2+}) actúa como un mensajero intracelular clave en plantas, modulando procesos esenciales como el crecimiento, la defensa frente a estreses bióticos y abióticos, y la respuesta a estímulos ambientales (Bellandi *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022). Entre los principales inductores de la señalización de Ca^{2+} se encuentran los aminoácidos, incluyendo el L-glutamato, que activa receptores tipo glutamato (GLRs), esenciales para la transmisión de señales de calcio en plantas (Bellandi *et al.*, 2022). Sin embargo, se han identificado otros aminoácidos que también pueden actuar como posibles agonistas de los GLRs (Bellandi *et al.*, 2022; Vincill *et al.*, 2013). Además, se ha observado que el ACC también es capaz de activar la señalización de Ca^{2+} a través de estos canales (Mou *et al.*, 2020). En *Arabidopsis thaliana*, se ha visto que la aplicación exógena de algunos de estos compuestos es capaz de inducir respuestas sistémicas de calcio, desencadenando la propagación de ondas de Ca^{2+} desde los tejidos tratados hacia otras regiones de la planta (Toyota *et al.*, 2018). Por tanto, para evaluar tanto las respuestas proximales como distales en el talo de *Marchantia polymorpha*, se analizó si cada uno de los 20 aminoácidos proteínogénicos y el ACC son capaces de actuar como agonistas de los GLRs, de manera similar a lo descrito en plantas vasculares, cuando se aplican de manera exógena en la planta.

Los resultados obtenidos (Fig. 6A-D) muestran cómo la aplicación exógena del aminoácido L-glutamato induce la propagación de señales de calcio en tres regiones del talo (local, proximal y distal) de las líneas sensoras L47 y L48 de *Marchantia polymorpha*, en comparación con el tratamiento control. En la línea L47 (Fig. 6A) los resultados indican un aumento significativo de estas señales en las regiones local y proximal a los 30 segundos tras la aplicación del L-glutamato respecto al control. No obstante, en las regiones distales no se detectaron cambios significativos. A los 60 segundos, las señales de calcio en las regiones local y proximal comenzaron a disminuir, aunque permanecieron significativamente elevadas en comparación con el control. En la línea L48 (Fig. 6B), la respuesta al L-glutamato siguió un patrón similar, con un aumento de las señales de calcio en las regiones local y proximal a los 30 segundos, aunque con una magnitud algo menor que en L47. Además, en las regiones distales se observó un incremento significativo a los 60 segundos, lo que sugiere una propagación más eficiente de la señal en esta línea en comparación con L47.

Las imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia MacroFluo (Fig. 6C-D) son la base de los datos cuantitativos, mostrando además la progresión temporal de la fluorescencia en las plantas tratadas. En ambas líneas (L47 y L48), se observa una señal inicial en la región local, que posteriormente se propaga hacia las

regiones proximal y distal. En el control, no se observan cambios en la fluorescencia, lo que confirma que el aumento observado es específico del tratamiento por el aminoácido L-glutamato y sugiere que la activación de los receptores GLR podría participar en esta respuesta.

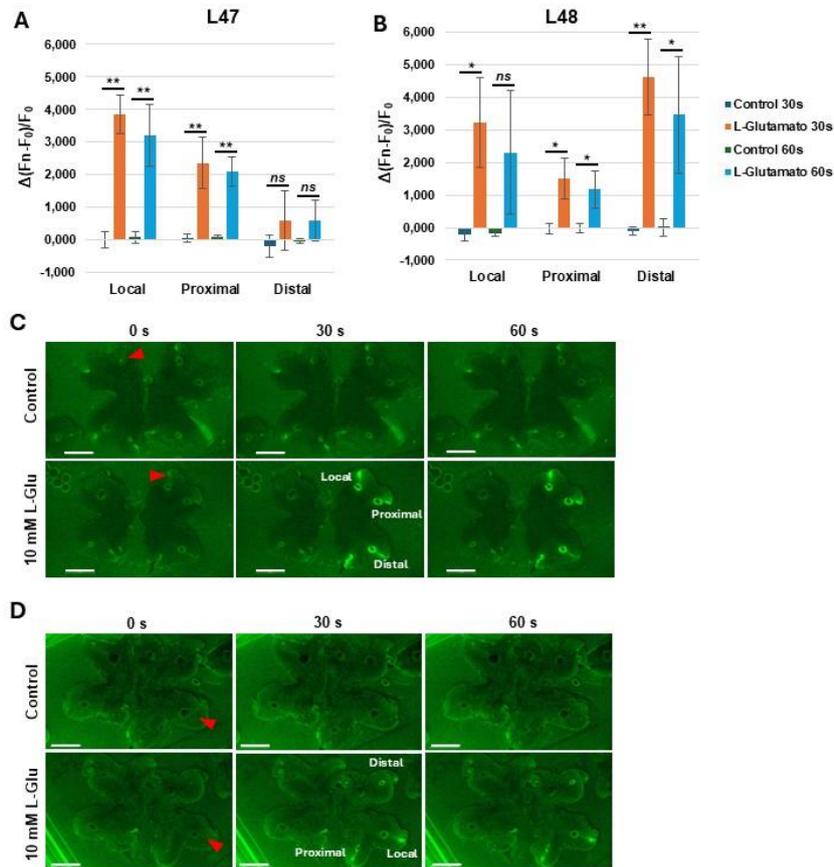


Figura 6. La aplicación exógena de L-glutamato desencadena la transmisión sistémica de ondas de Ca^{2+} . Cuantificación del incremento de la fluorescencia ($\Delta F/F$) emitida por el sensor GCaMP3 a los 30 y 60 segundos tras la aplicación de 10 mM de L-glutamato en las líneas sensoras GCaMP3 L47 (A) y L48 (B). Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar ($n=10-15$). Los asteriscos indican el nivel de significación calculado con un t -test no pareado comparando el control frente al tratamiento para cada tiempo y posición: * p-valor $<0,05$, ** p-valor $<0,01$, ns no significativo. (C-D) Secuencia de imágenes de la fluorescencia de las plantas de *M. polymorpha* expresando el sensor GCaMP3 en las líneas L47 (C) y L48 (D) antes (0 segundos) y después de los tratamientos (30 y 60 segundos). La flecha indica el lugar de aplicación del aminoácido. Barras de escala: 5 mm (C-D).

En este contexto, se evaluó la capacidad de otros aminoácidos para inducir respuestas similares o diferenciales en la línea L47 de *Marchantia polymorpha*. Los resultados presentados muestran la magnitud de las señales de calcio en las mismas tres regiones (local, proximal y distal) 30 segundos después de la aplicación exógena de 20 aminoácidos diferentes a una concentración de 10 mM, además de 1 mM de ACC y un control (Fig. 7A-D).

En la región local (Fig. 7A), el L-glutamato indujo el mayor incremento en la señal de fluorescencia, confirmando su capacidad como principal activador de señales en las áreas cercanas al sitio de aplicación. Otros aminoácidos como la L-

glutamina, la L-histidina, la L-glicina, la L-metionina y la L-serina, también generaron incrementos significativos en la fluorescencia, aunque de menor magnitud en comparación con el L-glutamato.

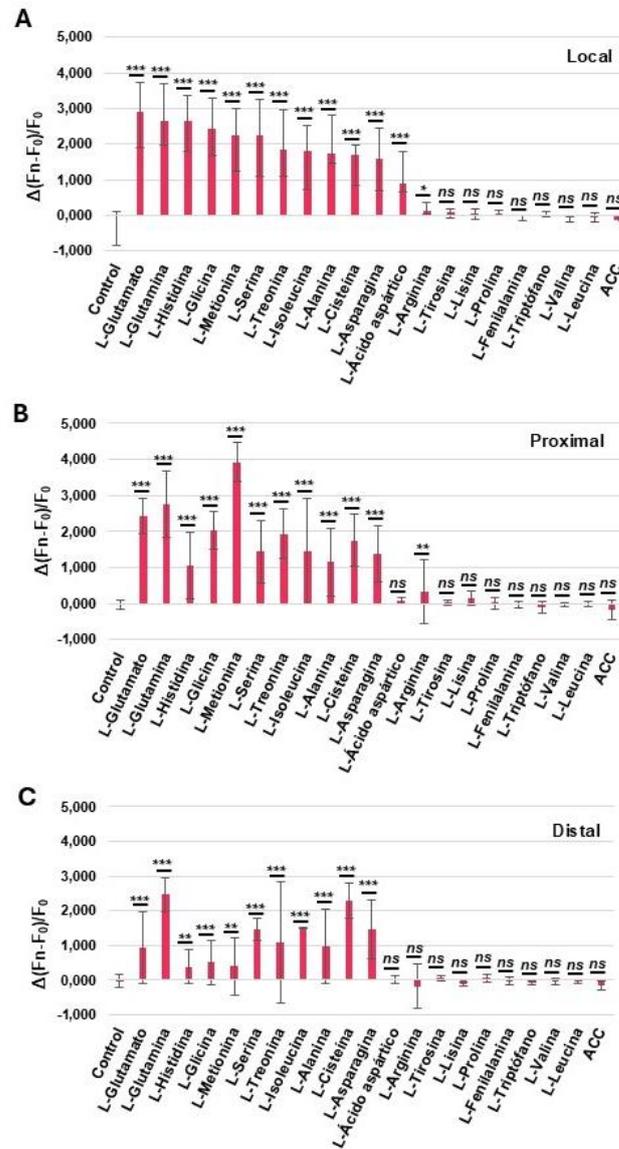


Figura 7. Efecto de los 20 aminoácidos proteínogénicos y ACC en la señalización de Ca²⁺ en *Marchantia polymorpha*. Cuantificación del incremento de fluorescencia ($\Delta F/F$) emitida por el sensor GCaMP3 a los 30 segundos tras la aplicación de tratamientos diferentes: Control o 10 mM de cada uno de los 20 aminoácidos y 1 mM de ACC. Los valores se analizaron en tres regiones de la línea sensora L47: (A) Local, (B) Proximal y (C) Distal. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar ($n=4$). Los asteriscos indican el nivel de significación calculado con un t -test no pareado comparando el control frente al tratamiento para cada tiempo y posición: * p-valor $<0,05$, ** p-valor $<0,01$, *** p-valor $<0,001$, ns no significativo. (C-D) Secuencia de imágenes de la fluorescencia de las plantas de *M. polymorpha* expresando el sensor GCaMP3 en las líneas L47 (C) y L48 (D) antes (0 segundos) y después de los tratamientos (30 y 60 segundos). La flecha indica el lugar de aplicación del aminoácido. Barras de escala: 5 mm (C-D).

Por otro lado, aminoácidos como la L-isoleucina, la L-alanina, la L-cisteína, la L-asparagina y el L-ácido aspártico produjeron aumentos moderados en la señal de fluorescencia, pero significativamente mayores que los del control. En contraste, aminoácidos como la L-fenilalanina, el L-triptófano, la L-valina y la L-leucina no mostraron diferencias significativas respecto al control, lo que indica

que su efecto sobre la señalización de Ca^{2+} es nulo o limitado en esta región. De manera similar, el ACC tampoco indujo cambios significativos en la señal de fluorescencia.

En la región proximal (Fig. 7B) el L-glutamato continuó siendo el principal inductor de señales de Ca^{2+} , aunque con valores más bajos que en la región local. Aminoácidos como la L-histidina, la L-serina, la L-isoleucina y la L-alanina mantuvieron efectos significativos, pero con una reducción en su intensidad respecto a la región local. En el caso de la L-metionina, se observó un aumento significativo en la fluorescencia, superando al resto de los aminoácidos en esta región proximal. Similar a la región local, los aminoácidos L-fenilalanina, L-triptófano, L-valina, L-leucina y el ACC no presentaron cambios en comparación con el control.

En general, en la región distal (Fig. 7C), que representa el área más alejada del sitio de aplicación, los efectos de los aminoácidos fueron más atenuados. El L-glutamato generó un incremento en la fluorescencia, aunque considerablemente menor que en las regiones local y proximal, lo que sugiere una disminución en la propagación de la señal de Ca^{2+} con la distancia. Aminoácidos como L-histidina, L-glicina y L-metionina continuaron mostrando incrementos significativos en esta región, pero los valores fueron cercanos al límite de detección. En contraste, aminoácidos como L-arginina perdieron por completo su capacidad para inducir señales detectables en esta región, mientras que la L-glutamina mantuvo un efecto similar en todas las regiones analizadas. Al igual que en las regiones local y proximal, aminoácidos como L-triptófano, L-fenilalanina, L-leucina, L-valina y el ACC no produjeron diferencias significativas.

Para evaluar el papel de los receptores GLR en la propagación de señales de calcio inducidas por aminoácidos, se analizaron las líneas mutantes *Mp glr -7* y *Mp glr -9* de *Marchantia polymorpha*, en comparación con sus respectivas líneas sensoras L47 y L48. Se aplicaron exógenamente tanto L-glutamato como L-metionina, y se evaluaron sus efectos en la propagación de señales de calcio en diferentes regiones (local, proximal y distal) a los 30 segundos de la aplicación del aminoácido (Fig. 8 y Fig. 9).

En las líneas sensoras L47 y L48, el L-glutamato (Fig. 8A; Fig. 9A) induce un aumento significativo en las señales de calcio en las regiones local y proximal 30 segundos después de su aplicación, mientras que en la región distal la inducción es más débil. En contraste, las líneas mutantes *Mp glr -7* y *Mp glr -9* no muestran ningún tipo de respuesta en las regiones analizadas, lo que subraya el papel crucial del gen *MpGLR* en la mediación de estas señales. De manera similar, el tratamiento con L-metionina en las líneas sensoras (Fig. 8B; Fig. 9B) también genera un incremento en las señales de calcio en las regiones local y proximal, aunque el efecto en la región distal es muy reducido. En las líneas mutantes

Mpplr-7 y *Mpplr-9*, la aplicación de L-metionina tampoco produce respuestas significativas, reforzando aún más la implicación de MpGLR en la regulación de señales de calcio en respuesta a estos compuestos.

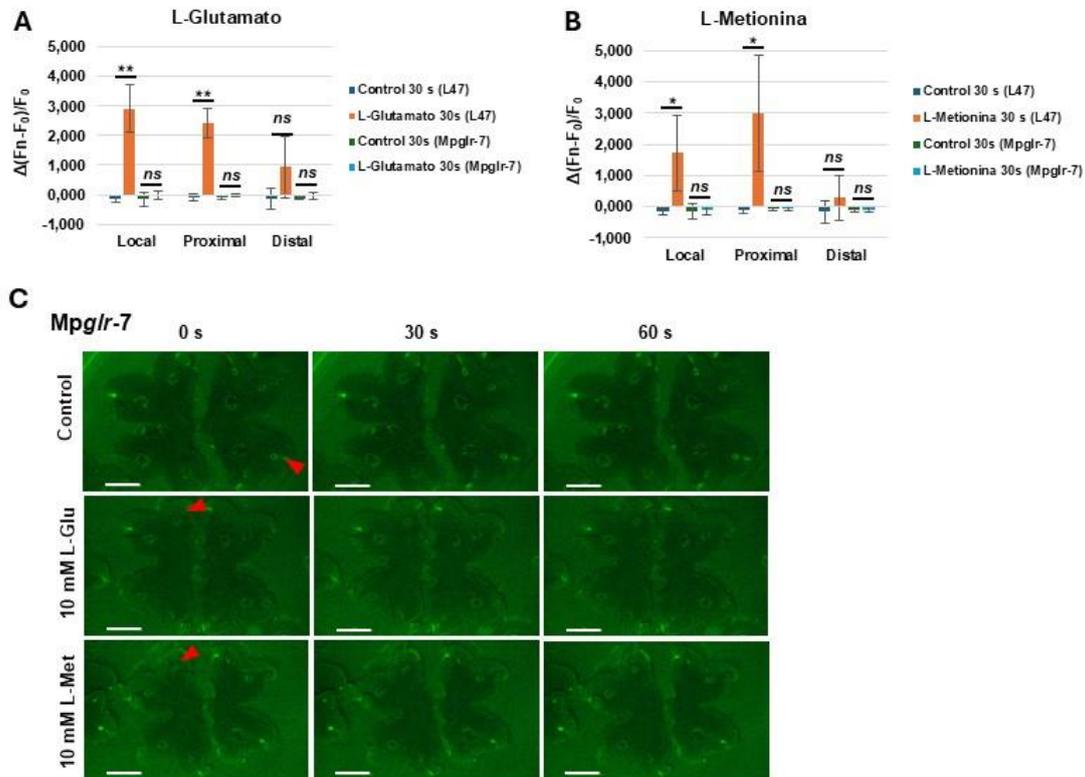


Figura 8. La aplicación exógena de L-glutamato y L-metionina sobre plantas mutantes no desencadena la transmisión de ondas de Ca^{2+} . (A-B) Cuantificación del incremento de la fluorescencia ($\Delta F/F$) emitida por el sensor GCaMP3 a los 30 segundos tras la aplicación de los tratamientos: Control, 10 mM de L-Glutamato (A) y 10 mM L-Metionina (B) comparando la línea L47 y su mutante *Mpplr-7*. Los valores se analizaron en tres regiones: Local, Proximal y Distal. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar ($n=10$). Los asteriscos indican el nivel de significación calculado con un *t-test* no pareado comparando plantas mutantes frente a las plantas silvestres para cada uno de los tratamientos: * p-valor $<0,05$, ** p-valor $<0,01$, *** p-valor $<0,001$, ns (no significativo). (C) Secuencia de imágenes de la fluorescencia de las plantas de *M. polymorpha* expresando el sensor GCaMP3 antes (0 segundos) y después de los tratamientos (30 y 60 segundos). La flecha roja indica el lugar de aplicación del aminoácido. Barras de escala: 5 mm (C).

Además, se observan diferencias específicas en la respuesta al tratamiento con L-metionina entre las líneas sensoras. En la línea L47, el incremento de fluorescencia es particularmente alto en la región proximal, lo que sugiere que la señalización de calcio inducida por la metionina en esta línea es más eficiente a medida que la señal avanza con el tiempo. Por el contrario, en la línea L48, la señal de calcio disminuye gradualmente al propagarse hacia regiones más distales, lo que podría indicar una menor eficiencia en la transmisión de la señal de calcio en esta línea.

Las imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia MacroFluo (Fig. 8C; Fig. 9C) son la base de los datos cuantitativos y verifican que en las líneas mutantes *Mpplr-7* y *Mpplr-9*, no se detecta propagación de señales de calcio tras la aplicación de L-glutamato o L-metionina. En estas líneas, la intensidad de la

fluorescencia permanece constante en todas las regiones del talo a lo largo de los intervalos de tiempo evaluados (0, 30 y 60 segundos).

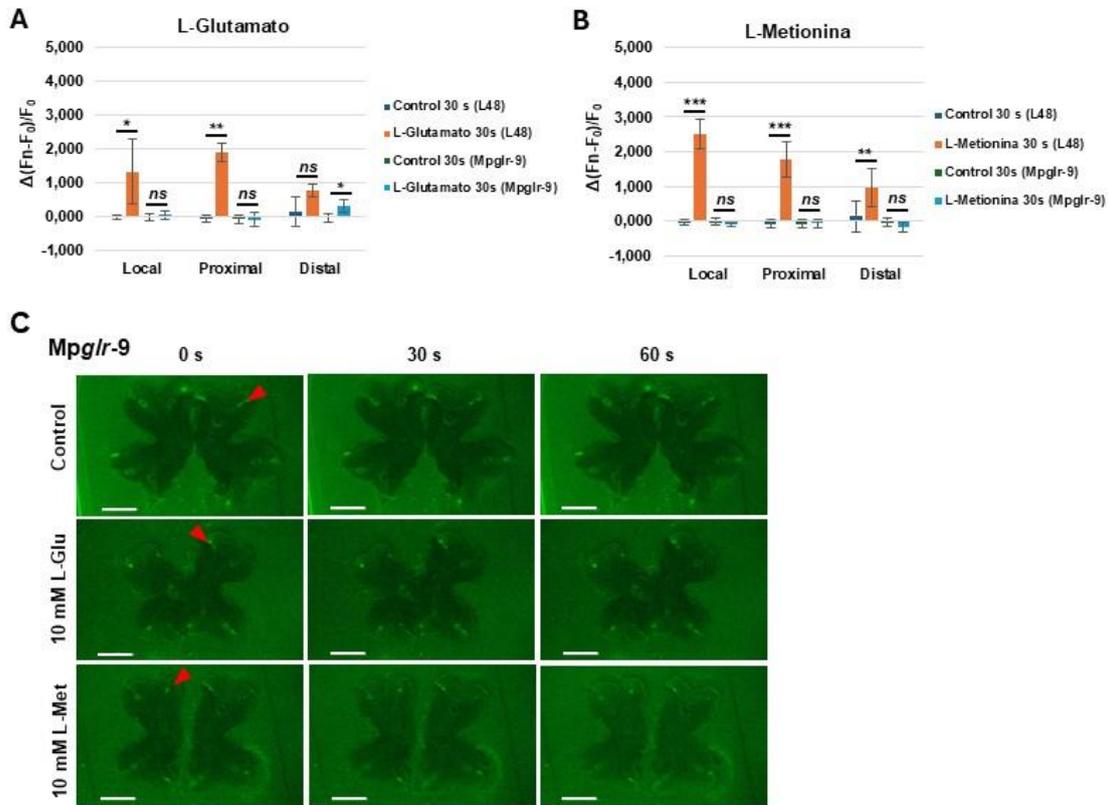


Figura 9. La aplicación exógena de L-glutamato y L-metionina sobre plantas mutantes no desencadena la transmisión de ondas de Ca^{2+} . (A-B) Cuantificación del incremento de la fluorescencia ($\Delta F/F_0$) emitida por el sensor GCaMP3 a los 30 segundos tras la aplicación de los tratamientos: Control, 10 mM de L-glutamato (A) y 10 mM L-Metionina (B) comparando la línea L48 y su mutante *Mpglr-9*. Los valores se analizaron en tres regiones: Local, Proximal y Distal. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar ($n=10-15$). Los asteriscos indican el nivel de significación calculado con un *t-test* no pareado comparando plantas mutantes frente a las plantas silvestres para cada uno de los tratamientos: * p-valor $<0,05$, ** p-valor $<0,01$, *** p-valor $<0,001$, *ns* (no significativo). (C) Secuencia de imágenes de la fluorescencia de las plantas de *M. polymorpha* expresando el sensor GCaMP3 antes (0 segundos) y después de los tratamientos (30 y 60 segundos). La flecha roja indica el lugar de aplicación del aminoácido. Barras de escala: 5 mm (C).

Estos resultados sugieren que el canal MpGLR es esencial para la transducción de señales de calcio en respuesta al L-glutamato y la L-metionina, desempeñando un papel clave en los mecanismos de propagación de estos estímulos. Además, las diferencias en la propagación de las señales de calcio entre las regiones local y distal sugieren que la proximidad a la fuente del estímulo es un factor determinante en la capacidad de respuesta, siendo más evidente en las regiones cercanas.

4.2 La unión de diferentes ligandos de MpGLR provoca respuestas fisiológicas en *M. polymorpha*

Estudios genéticos previos han identificado a los canales GLR como elementos esenciales para la propagación de señales de Ca^{2+} en *M. polymorpha* (Sanmartín *et al.*, 2024; Watanabe *et al.*, 2024). Estos canales son capaces de responder a una amplia variedad de ligandos, lo que desencadena respuestas fisiológicas

que desempeñan un papel clave en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la señalización del calcio en las plantas (Wudick *et al.*, 2018a). Entre ellos, el L-glutamato destaca como el activador más estudiado, mientras que la L-metionina ha demostrado generar respuestas intensas en isoformas específicas de los GLRs (Tapken *et al.*, 2013); además, se ha reportado que el ACC también puede activar la señalización de Ca^{2+} mediada por los GLRs (Mou *et al.*, 2020). Para evaluar el impacto de estos ligandos en el desarrollo de *M. polymorpha*, se analizaron sus respuestas fisiológicas tras 7 días de cultivo en medio Gamborg's B5 suplementado con 100 μM y 1 mM de L-glutamato, 1 mM de L-metionina y 50 μM de ACC. Estas respuestas se evaluaron tanto en las líneas sensoras L47 y L48, como en sus respectivos mutantes *Mpplr-7* y *Mpplr-9* (Fig. 10A-D).

Los resultados muestran que, en general, se observa una notable disminución en el crecimiento del talo de *M. polymorpha* al cultivar las plantas en medios suplementados con L-metionina y ACC en comparación con el control, siendo este efecto más pronunciado en el tratamiento con L-metionina (Fig. 10A). Además, se observa una respuesta diferencial entre las líneas parentales L47 y L48 y los mutantes en el tratamiento con L-metionina. Las líneas L47 y L48 presentan un crecimiento similar entre ellas, mientras que los mutantes exhiben un crecimiento significativamente mayor, al compararlas con su respectiva línea parental (Fig. 10C y 10E), destacando particularmente el alelo *Mpplr-7*, que muestra el mayor crecimiento entre las líneas analizadas. Por otro lado, en el tratamiento con ACC, se observa una reducción de crecimiento tanto en las líneas parentales como en los mutantes *Mpplr*, siendo este efecto ligeramente mayor en los mutantes, al observarse diferencias significativas respecto a su línea parental (Fig. 10C y 10E). Por el contrario, no se han observado diferencias apreciables sobre el crecimiento en ninguno de los cuatro genotipos con respecto al control con las dos concentraciones de L-glutamato estudiadas (Fig. 10A); tampoco se han encontrado diferencias significativas en el crecimiento entre las líneas parentales y los mutantes (Fig. 10C y 10E).

Al analizar detalladamente los talos (Fig. 10B, 10D), se observa que los diferentes tratamientos tienen un impacto significativo en el desarrollo y la cantidad de tejido fotosintético de *Marchantia*. En particular, los talos expuestos a 50 μM ACC muestran una disminución general del tejido fotosintético, caracterizado por la presencia de estructuras que permiten el intercambio de gases (en inglés *air chambers*) en todo el talo, en comparación con el control. Este efecto negativo podría estar relacionado con la función del ACC como precursor del etileno, una hormona vegetal que puede regular procesos como la senescencia y respuestas al estrés. En el caso de la metionina, no se observa una disminución evidente del tejido fotosintético, ya que las plantas tratadas mantienen un color verde uniforme. Sin embargo, parece haber un efecto específico en la región apical de los talos, donde se perciben cambios en la morfología en comparación con el tratamiento control. Dado que la región apical es clave para el crecimiento y la formación de tejidos nuevos, este efecto sugiere

que la metionina podría estar alterando procesos como la división celular, el desarrollo del tejido clorofílico o la fotosíntesis en esta región. En resumen, el crecimiento y la cantidad de tejido fotosintético en los talos es más estable bajo condiciones de control y o en los tratamientos con L-glutamato. Sin embargo, el ACC y la L-metionina tienen efectos negativos en el desarrollo de las regiones con capacidad fotosintética.

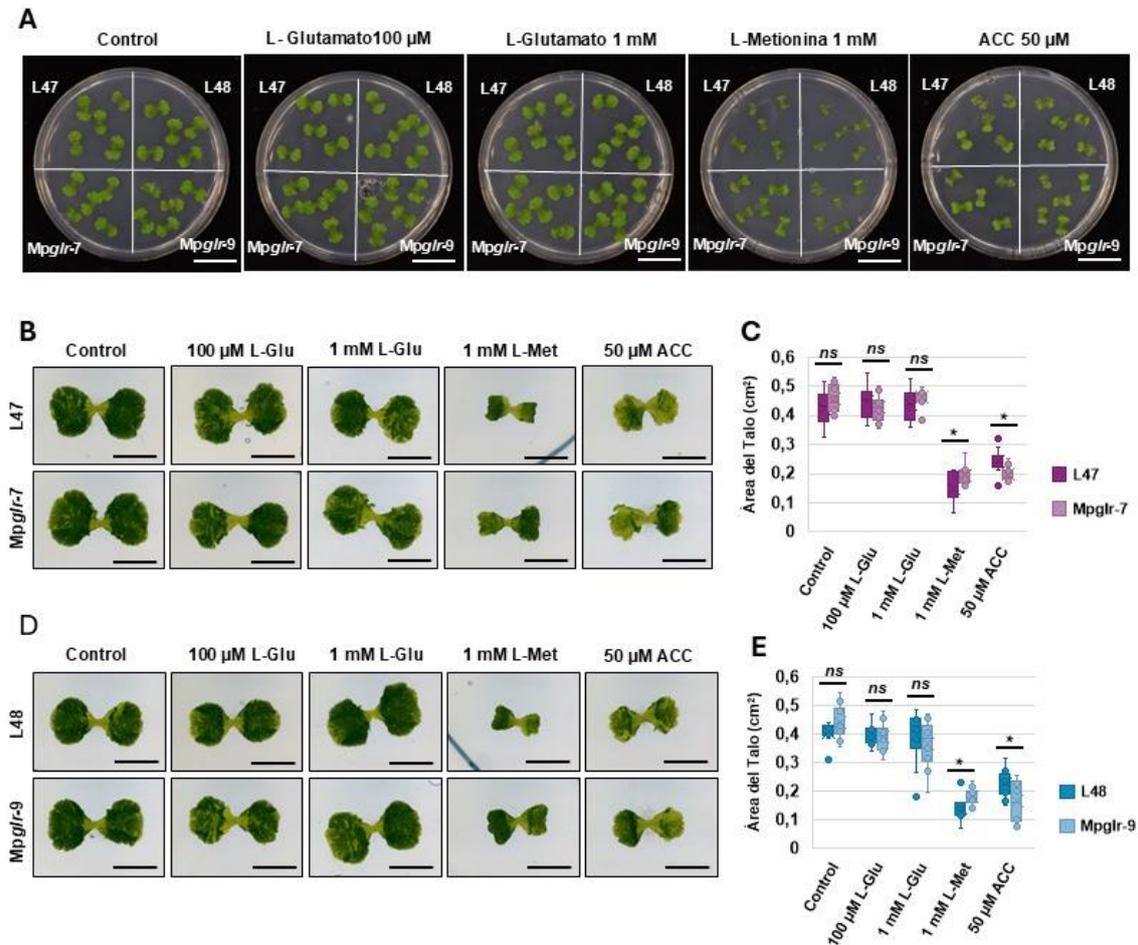


Figura 10. Efecto de posibles ligandos de MpGLR sobre el crecimiento de *Marchantia*. (A) Imágenes de plantas de las líneas sensoras L47 y L48 y los mutantes Mp*glr*-7 y Mp*glr*-9 crecidas durante 7 días en medio Gamborg's B5 (Control) o en medio suplementado con 100 μ M y 1 mM de L-glutamato, 1 mM de L-metionina y 50 μ M de ACC. Se muestran los genotipos de las plantas (arriba: líneas GCaMP3; abajo: líneas Mp*glr*). (B) Detalle del efecto de los diferentes tratamientos con aminoácidos en plantas L47 y los mutantes Mp*glr*-7. (C) Cuantificación del área del talo tras los diferentes tratamientos con aminoácidos. Se muestra la comparación entre la línea mutante con su correspondiente línea parental. (D) Detalle del efecto de los diferentes tratamientos con aminoácidos en plantas L48 y los mutantes Mp*glr*-9. (E) Cuantificación del área del talo tras los diferentes tratamientos con aminoácidos. Se muestra la comparación entre la línea mutante con su correspondiente línea parental. Los asteriscos indican el nivel de significación calculado con un t-test no pareado comparando plantas mutantes frente a las plantas silvestres para cada uno de los tratamientos: * p-valor <0.05, ns no significativo. Barras de escala: 2 mm (A), 5 mm (B-D).

Con el fin de determinar si los aminoácidos que presentan capacidad de activar la señalización de calcio y/o efectos sobre el crecimiento de *Marchantia* modulan la expresión de MpGLR, se utilizaron dos líneas transgénicas, disponibles en el laboratorio, que portan una construcción con el promotor MpGLR fusionado al gen reportador *GUS* (MpGLR*pro*:*GUS*#2 y MpGLR*pro*:*GUS*#6; Fig. 11A-B). Plantas de estas líneas se crecieron en presencia de L-glutamato, L-metionina y

ACC y se analizó el patrón de expresión a diferentes tiempos. Las plantas analizadas fueron crecidas durante 4 días en GB5 y posteriormente transferidas durante 4 o 7 días adicionales en medio suplementado con los diferentes aminoácidos. Se observó un patrón de expresión similar en ambas líneas, tanto en talos de 8 días como en talos de 11 días, con ligeras diferencias en la intensidad de la señal en cada línea según el tipo de aminoácido. Los resultados obtenidos coinciden con los del apartado anterior, mostrando un efecto en el crecimiento en los tratamientos con L-metionina y ACC tanto en las plantas de 8 días como en las de 11 días.

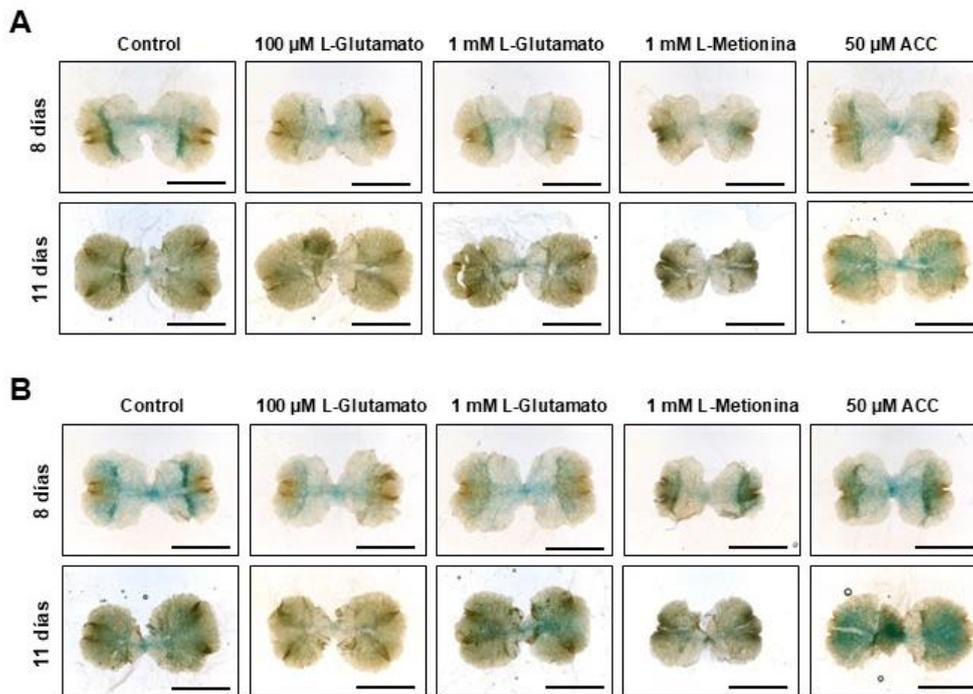


Figura 11. Regulación de la expresión de *MpGLR* por la aplicación exógena de ligandos putativos. Ensayo histoquímico de β -glucuronidasa con gemas crecidas en placas de GB5 suplementadas con 100 μ M y 1 mM de L-glutamato, 1 mM de L-metionina y 50 μ M de ACC durante 8 días (paneles superiores de A y B) o crecidas durante 4 días en placas GB5 y posteriormente transferidas a placas suplementadas con 100 μ M y 1 mM de L-glutamato, 1 mM de L-metionina y 50 μ M de ACC (paneles inferiores de A y B). Se muestra una imagen representativa de la expresión de *MpGLRpro:GUS* tras los diferentes tratamientos en dos líneas transgénicas independientes: (A) *MpGLRpro:GUS#2* y (B) *MpGLRpro:GUS#6*. Barras de escala: 5 mm (A-B).

En relación con la expresión de *MpGLRpro:GUS*, en talos de 8 días se observa actividad en la región del meristemo apical, que se extiende hacia la zona central del talo. Sin embargo, la mayor expresión se observa en la zona media del talo y en la región donde se diferencian los rizoides. En cambio, en los talos de 11 días, la expresión de *MpGLR* suele ser más uniforme en todo el talo, siendo especialmente evidente en las plantas cultivadas en medio con ACC. En los tratamientos con L-metionina, se observa un patrón similar en plantas de las dos líneas en los dos tiempos estudiados, observándose una disminución significativa en la actividad GUS respecto al control. Por otro lado, en presencia de ACC, a los 8 días la expresión es similar al control; mientras que a los 11 días se observa una actividad GUS significativamente más intensa que el control. Por

otro lado, el patrón de expresión de MpGLR con L-glutamato es ligeramente más débil que el control, especialmente en la línea MpGLR_{pro}:GUS#6 (Fig. 11B), donde se aprecia una mayor diferencia entre las plantas tratadas con L-glutamato que las crecidas en medio control. En general, la línea MpGLR_{pro}:GUS#6 presenta una actividad GUS superior en comparación con la línea MpGLR_{pro}:GUS#2 (Fig. 11A), lo que podría reflejar diferencias debidas al sitio de inserción del transgén.

4.3 El estrés abiótico altera el crecimiento de *M. polymorpha*

La señalización mediada por calcio en plantas vasculares desempeña un papel fundamental en la respuesta a factores externos, donde los canales GLR ejercen un papel relevante (Simon *et al.*, 2023; Wudick *et al.*, 2018a). Sin embargo, se desconoce un posible papel de MpGLR en estas respuestas en *Marchantia*. Para estudiar el papel de este canal en la respuesta frente al estrés abiótico, se analizó el efecto a dos tipos de estreses, el estrés salino, inducido por sal y el estrés osmótico, inducido por polietilenglicol (PEG), sobre el crecimiento de *M. polymorpha*.

Para evaluar el impacto de diferentes concentraciones de sal, las plantas se crecieron durante 7 días en medio Gamborg's B5 suplementado con 40 mM, 70 mM y 100 mM de NaCl y se estudió su efecto en plantas del genotipo silvestre Tak-1, de la línea sensora L47 y el mutante Mpglr-7 (Fig. 12A-D). Los resultados muestran un comportamiento similar entre las plantas Tak-1 y las plantas de la línea L47 bajo las diferentes condiciones de salinidad estudiadas. Se observa una disminución del crecimiento a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio. A 40 mM de NaCl se observa una disminución del crecimiento en comparación con el control cercana al 15-20%. A mayores concentraciones de sal (70 mM y 100 mM NaCl), la disminución del crecimiento se vuelve más evidente, alcanzando niveles de reducción de alrededor del 80% (Fig. 12A). En general, no hay diferencias significativas entre el genotipo Tak-1 y la línea sensora L47 (Fig. 12B). Al analizar el efecto de las distintas concentraciones de NaCl en plantas de la línea L47 frente a su alelo mutante Mpglr-7 (Fig. 12C), se observó una disminución en el crecimiento similar en ambos genotipos, lo que sugiere que el canal MpGLR no parece estar implicado en la respuesta frente al estrés salino en *Marchantia* en las condiciones estudiadas.

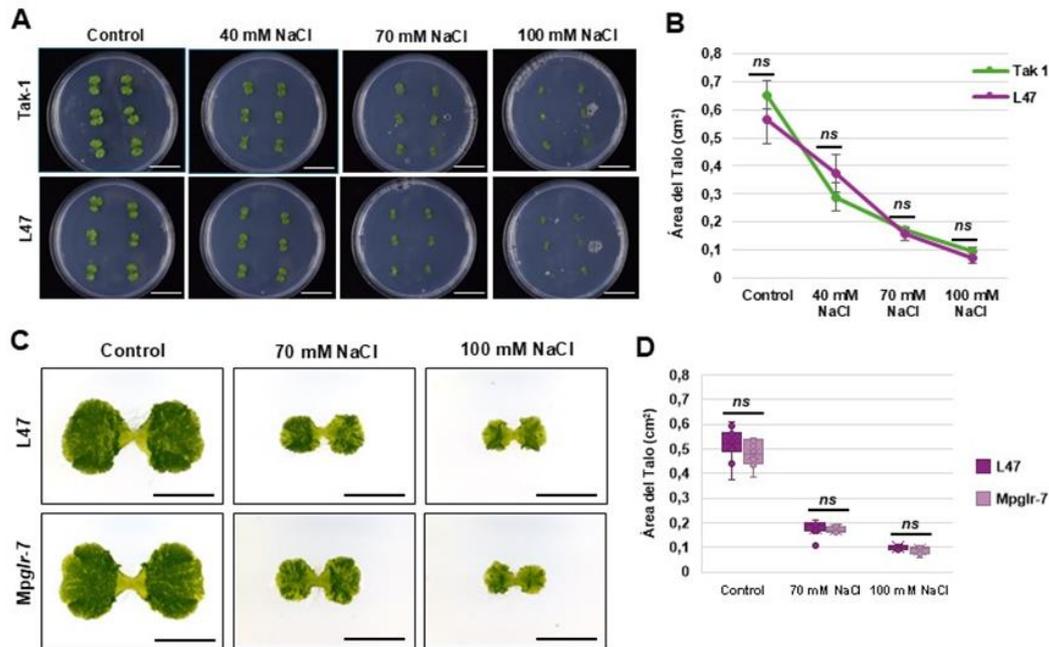


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de sal sobre el crecimiento de *Marchantia*. (A) Efecto sobre el crecimiento de plantas silvestres Tak-1 y la línea sensora L47 crecidas durante 7 días en placas de GB5 suplementadas con 40 mM, 70 mM y 100 mM de sal. (B) Cuantificación del área del talo de plantas silvestres Tak-1 y la línea sensora L47 crecidas en distintas concentraciones de sal. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar ($n=5-10$). Se muestra la comparación entre las plantas Tak-1 y línea sensora L47. (C) Detalle del fenotipo de plantas de la línea sensora L47 y el mutante *Mpglr-7* tras los 7 días de crecimiento. (D) Cuantificación del área del talo tras crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl. Se muestra la comparación entre plantas de la línea L47 y el mutante *Mpglr-7*. ns no significativo indica el nivel de significancia calculado con un *t-test* no pareado al comparar plantas mutantes frente a plantas silvestres para cada uno de los tratamientos. Barras de escala: 2 mm (A), 5 mm (B).

Para evaluar el impacto de diferentes concentraciones de polietilenglicol, en primer lugar, se crecieron plantas del genotipo silvestre Tak-1 durante 7 días en medio Gamborg's B5 suplementado con concentraciones crecientes de PEG (5%, 10%, 15%, 20% y 25% de PEG). No se observó un efecto significativo en el crecimiento de las plantas crecidas a concentraciones bajas de PEG (5% y 10%) (Fig. 13A-B). Sin embargo, este efecto es evidente en plantas crecidas con 20 y 25% de PEG, donde se observa una reducción del crecimiento del talo cercana al 50% (Fig. 13B).

Para estudiar el papel de MpGLR en esta respuesta, se seleccionaron tres concentraciones (5%, 15% y 25%) y se crecieron plantas de la línea L47 y el mutante *Mpglr-7*. Al analizar el crecimiento de los talos en estas concentraciones, se observa un impacto significativo del estrés en ambos genotipos (Fig. 13C), ya que el crecimiento del talo disminuye a medida que la concentración de PEG aumenta. Sin embargo, el análisis estadístico entre el genotipo L47 y su mutante demuestra que no existen diferencias significativas entre estas líneas (Fig. 13D), lo que sugiere que la ausencia de MpGLR no afecta a la respuesta al estrés inducido por PEG.

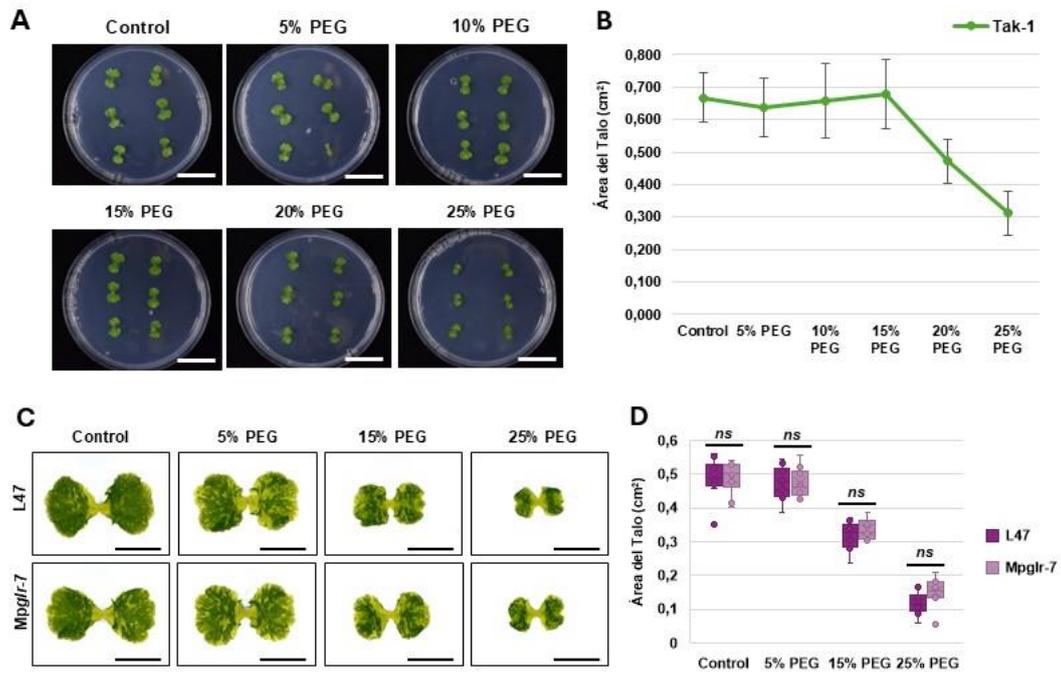


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG) sobre el crecimiento de *Marchantia*. (A) Efecto sobre el crecimiento de plantas silvestres de Tak-1 crecidas durante 7 días en placas GB5 suplementadas con 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de polietilenglicol (PEG). (B) Variación del crecimiento del área del talo en plantas silvestres Tak-1 bajo las distintas concentraciones de polietilenglicol. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar ($n=5-10$). (C) Detalle del efecto fenotípico sobre plantas correspondientes a la línea L47 y su línea mutante *Mpglr-7*, tras 7 días de crecimiento en diferentes concentraciones de PEG. (D) Cuantificación del área del talo tras crecimiento en diferentes concentraciones de PEG. Se muestra la comparación entre plantas de la línea L-47 y su línea mutante *Mpglr-7*. La notación ns no significativo indica el nivel de significancia calculado con un *t-test* no pareado al comparar plantas mutantes frente a plantas silvestres para cada uno de los tratamientos. Barras de escala: 2 mm (A), 5 mm (B).

5. Discusión

Los receptores tipo Glutamato (GLR) son componentes clave en la señalización celular de las plantas, y su activación por ligandos específicos, como los aminoácidos (Grenzi *et al.*, 2020), permite la propagación de señales de calcio, lo que contribuye a modular la transducción de señales y la respuesta de las plantas frente a condiciones adversas, como el estrés abiótico (Toyota *et al.*, 2018; Wudick *et al.*, 2018a). Se ha descrito que los aminoácidos glutamato y glicina son los principales activadores de estos receptores, ya que inducen respuestas sistémicas de calcio cuando se aplican de manera exógena en los cotiledones de las plantas (Bellandi *et al.*, 2022). Sin embargo, se han identificado otros aminoácidos como posibles agonistas, aunque con menor intensidad, como la alanina, la serina, la asparagina y la cisteína (Bellandi *et al.*, 2022; Vincill *et al.*, 2013). Además, se ha observado que el ACC es capaz de activar la señalización de Ca^{2+} a través de los canales GLR en *Physcomitrella* (Mou *et al.*, 2020). Por ello, en este trabajo se ha evaluado el papel de los 20 aminoácidos proteínogénicos y el ACC como posibles agonistas en la señalización mediada por calcio en *Marchantia*, analizando su respuesta a nivel local y en tejidos sistémicos, tanto proximales como distales.

Los resultados de este trabajo han demostrado que la aplicación exógena de algunos de estos aminoácidos es capaz de inducir la activación de la señalización de calcio en *Marchantia polymorpha* mientras que el ACC no provoca la activación de las ondas de calcio. Esto respalda la hipótesis de que ciertos aminoácidos actúan como posibles agonistas de los receptores GLR, tal como se ha documentado previamente en plantas vasculares (Bellandi *et al.*, 2022; Vincill *et al.*, 2013). En particular, el L-glutamato, el principal ligando de los receptores GLR en plantas vasculares, demostró ser el principal activador de señalización de calcio en *Marchantia*, induciendo un aumento significativo en las ondas de calcio, tanto en la región local como en el tejido sistémico proximal de las líneas L47 y L48.

Por otro lado, se ha observado que otros aminoácidos también pueden inducir respuestas inmediatas cuando se aplican exógenamente sobre el talo de *Marchantia polymorpha*. En particular, la L-glutamina ha mostrado ser altamente inductiva en la región local, solo superada por el L-glutamato. Esto podría explicarse por la estrecha relación metabólica entre ambos compuestos. El glutamato, precursor directo de la glutamina, puede ser regenerado mediante el ciclo GS-GOGAT, un mecanismo clave en el metabolismo del nitrógeno (Fortunato *et al.*, 2023). Una vez aplicada exógenamente, la glutamina podría ser metabolizada para aumentar los niveles de glutamato, que interactúa directamente con los receptores GLR, desencadenando las vías de señalización calcio intracelular. Además, es posible que los GLR también sean capaces de

reconocer la glutamina, dada su flexibilidad en la detección de diferentes ligandos.

Por el contrario, otros aminoácidos, como la L-fenilalanina y el L-triptófano, no generaron respuestas detectables, lo que sugiere que estos aminoácidos probablemente carecen de las características estructurales necesarias, como grupos funcionales adecuados o estructuras que favorecen la interacción con los GLR. Además, aunque estudios previos han demostrado que el ACC puede activar la señalización de calcio en *Arabidopsis* y *Physcomitrella* (Mou et al., 2020), en el caso de *Marchantia polymorpha*, no se observa activación de la señalización de calcio tras la aplicación exógena del ACC, lo que sugiere que los efectos observados en otras especies podrían depender de diferencias en la estructura de los canales o a mecanismos alternativos. Por otro lado, el análisis de los mutantes *Mpglr-7* y *Mpglr-9* sugiere un papel importante de estos receptores en la activación de la señalización de calcio mediada por ciertos aminoácidos en *Marchantia polymorpha*, ya que, no se observaron respuestas significativas tras la aplicación de L-glutamato o L-metionina, lo que refuerza la idea de que estos aminoácidos podrían actuar como agonistas de los MpGLR y que estos canales son esenciales para la propagación de señales de calcio en esta especie.

Para profundizar en el papel de estos aminoácidos, se analizó el efecto sobre el desarrollo de *Marchantia* en ensayos de crecimiento en medio Gamborg's B5 suplementado con aminoácidos. Las plantas crecidas en L-glutamato no mostraron diferencias significativas en el crecimiento en comparación con el control; mientras que las plantas crecidas en medio suplementado con L-metionina o ACC experimentaron una reducción notable en el crecimiento, siendo el efecto más pronunciado con la L-metionina. Estos resultados sugieren que el glutamato actúa principalmente como señalizador, sin afectar directamente al crecimiento. En contraste, la reducción del crecimiento observada con la metionina sugiere que los efectos del aminoácido sobre el crecimiento van más allá de la activación directa de los GLR y la señalización de calcio. Aunque la metionina activa la señalización de calcio a través de la unión a los receptores GLR, podría estar involucrada en la regulación de vías metabólicas u hormonales que afectan al crecimiento de manera negativa. En línea con los resultados, donde el tratamiento con ACC redujo el crecimiento de *Marchantia polymorpha*, estudios previos han mostrado que el ACC inhibe el crecimiento de gemas y el desarrollo de esta planta al suprimir la división celular, de manera similar a lo observado en nuestros resultados. Además, se ha demostrado que mutantes de pérdida de función de la ACC sintasa (MpACS), que participa en la biosíntesis del etileno, producen niveles bajos de ACC, lo que resulta en gemas más grandes y tasas de gemas más numerosas (Li et al., 2020). Estos hallazgos sugieren que el ACC podría ser una señal evolutivamente conservada que regula varios procesos de crecimiento y desarrollo en las

plantas, especialmente en respuesta a factores de estrés y otros estímulos ambientales (Mou *et al.*, 2020).

Nuestros resultados sugieren que el gen *MpGLR* desempeña un papel clave en la respuesta diferencial de las plantas a la L-metionina y al ACC, actuando como un modulador en vías metabólicas y de señalización relacionadas con el crecimiento. En presencia de L-metionina, las plantas mutantes (*Mpglr-7* y *Mpglr-9*) muestran un mayor crecimiento en comparación con las líneas parentales (L47 y L48), lo que sugiere que la pérdida de función de *MpGLR* confiere una menor sensibilidad o una mayor tolerancia a este aminoácido. Esto indica que *MpGLR* y/o la señalización mediada por calcio podría estar implicado en la regulación negativa del crecimiento en respuesta a la L-metionina, posiblemente modulando su conversión a ACC o su impacto en la señalización hormonal. Por el contrario, bajo tratamiento con ACC, las plantas mutantes presentan un crecimiento más reducido que las líneas sensoras, lo que sugiere que *MpGLR* podría actuar como un modulador de la respuesta al ACC, limitando sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento. Esto apunta a una conexión directa entre *MpGLR* y la señalización del etileno, ya que el ACC es el precursor de esta hormona.

Los patrones de expresión de *MpGLR* observados en las líneas *MpGLR_{pro}:GUS*, aportaron información adicional sobre la actividad de estos canales en respuesta a los diferentes tratamientos. La mayor actividad GUS en regiones específicas, como el meristemo apical, refleja la importancia de los GLRs en estas áreas clave para el crecimiento y desarrollo. En general, aunque los patrones de expresión son similares, la línea *MpGLR_{pro}:GUS#6* muestra una mayor actividad GUS en comparación con *MpGLR_{pro}:GUS#2*, lo que podría atribuirse a factores como el efecto de posición del transgén. También es posible que la regulación epigenética influya en estas diferencias, con la línea #2 mostrando niveles de expresión más bajos debido a mecanismos de represión epigenética.

La expresión diferencial del marcador GUS en respuesta a L-metionina y ACC sugiere roles específicos de *MpGLR* en la señalización de estos compuestos. En presencia de metionina, se observa una baja actividad GUS en comparación con el control, lo que sugiere que la L-metionina tiene un efecto menor sobre las vías que regulan la expresión de *MpGLR*. Por el contrario, el tratamiento con ACC resulta en una expresión mayor de *MpGLR*, lo que sugiere una regulación de *MpGLR* mediada por la transducción de señales derivadas del ACC y el etileno.

Finalmente, los resultados obtenidos bajo condiciones de estrés abiótico demuestran que tanto la salinidad como el estrés osmótico inducido por PEG provocan una reducción en el crecimiento de *M. polymorpha*. Este efecto se intensifica con el aumento de las concentraciones de NaCl y PEG, lo que concuerda con estudios previos en los que se observó un gradiente negativo de crecimiento con el aumento de las concentraciones de sal y PEG (Tan *et al.*,

2023). La ausencia de diferencias significativas entre las plantas silvestres y el mutante *MpGLR-7* sugiere que las vías involucradas en la respuesta al estrés abiótico podrían ser independientes de los canales GLR.

En conjunto, los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster demuestran que los canales GLR son esenciales en la señalización de calcio en *M. polymorpha*, mediada por aminoácidos como el L-glutamato. Sin embargo, las respuestas al estrés abiótico parecen involucrar vías independientes de MpGLR. Todo esto resalta la complejidad de la señalización en especies no vasculares, proporcionando nuevas perspectivas para entender sus mecanismos de adaptación.

6. Conclusiones

- La aplicación exógena de algunos aminoácidos, como el L-glutamato y la L-metionina, induce la señalización de calcio tanto local como sistémica en *M. polymorpha*.
- Los canales GLR son esenciales en la señalización de calcio mediada por aminoácidos como el L-glutamato en *M. polymorpha*.
- La L-metionina afecta al crecimiento de *Marchantia* a través de vías independientes de los GLR.
- La inducción de la expresión de MpGLR en plantas crecidas con ACC sugiere la importancia de la señalización por etileno en la modulación de la señalización mediada por calcio.
- Las respuestas al estrés abiótico, en particular al estrés salino y el estrés osmótico, son independientes de la actividad del canal MpGLR en *M. polymorpha*.

7. Referencias bibliográficas

- Aguilar-Cruz, A., Grimanelli, D., Haseloff, J., & Arteaga-Vázquez, M. A. (2019). DNA methylation in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist*, *223*(2), 575-581.
- Ahmed, I., Kumar, A., Bheri, M., Srivastava, A. K., & Pandey, G. K. (2023). Glutamate receptor like channels: Emerging players in calcium mediated signaling in plants. *International Journal Of Biological Macromolecules*, *234*, 123522.
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., & Galaud, J. (2018). Calcium Signalling in Plant Biotic Interactions. *International Journal Of Molecular Sciences*, *19*(3), 665.
- Alfieri, A., Doccula, F. G., Pederzoli, R., Grenzi, M., Bonza, M. C., Luoni, L., Candeo, A., Armada, N. R., Barbiroli, A., Valentini, G., Schneider, T. R., Bassi, A., Bolognesi, M., Nardini, M., & Costa, A. (2019b). The structural bases for agonist diversity in an *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor-like channel. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *117*(1), 752-760.
- Alvarez, J., Montero, M., & García-Sancho, J. (1999). Subcellular CA²⁺ dynamics. *Physiology*, *14*(4), 161-168.
- Bellandi, A., Papp, D., Breakspear, A., Joyce, J., Johnston, M. G., De Keijzer, J., Raven, E. C., Ohtsu, M., Vincent, T. R., Miller, A. J., Sanders, D., Hogenhout, S. A., Morris, R. J., & Faulkner, C. (2022c). Diffusion and bulk flow of amino acids mediate calcium waves in plants. *Science Advances*, *8*(42).
- Bhar, A., Chakraborty, A., & Roy, A. (2023). The captivating role of calcium in plant-microbe interaction. *Frontiers In Plant Science*, *14*.
- Boczek, T., Sobolczyk, M., Mackiewicz, J., Lisek, M., Ferenc, B., Guo, F., & Zylinska, L. (2021). Crosstalk among Calcium ATPases: PMCA, SERCA and SPCA in Mental Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, *22*(6), 2785.
- Bose, J., Pottosin, I. I., Shabala, S. S., Palmgren, M. G., & Shabala, S. (2011). Calcium Efflux Systems in Stress Signaling and Adaptation in Plants. *Frontiers In Plant Science*, *2*.
- Bowman, J. L. (2013). Walkabout on the long branches of plant evolution. *Current Opinion In Plant Biology*, *16*(1), 70-77.
- 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.
- Bowman, J. L., Arteaga-Vazquez, M., Berger, F., Briginshaw, L. N., Carella, P., Aguilar-Cruz, A., Davies, K. M., Dierschke, T., Dolan, L., Dorantes-Acosta, A. E., Fisher, T. J., Flores-Sandoval, E., Futagami, K., Ishizaki, K., Jibrán,

R., Kanazawa, T., Kato, H., Kohchi, T., Levins, J., . . . Zachgo, S. (2022). The renaissance and enlightenment of *Marchantia* as a model system. *The Plant Cell*, *34*(10), 3512-3542.

Chiu, J. C., Brenner, E. D., DeSalle, R., Nitabach, M. N., Holmes, T. C., & Coruzzi, G. M. (2002). Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor-Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology And Evolution*, *19*(7), 1066-1082.

Choi, W., Hilleary, R., Swanson, S. J., Kim, S., & Gilroy, S. (2016). Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. *Annual Review Of Plant Biology*, *67*(1), 287-307.

Choi, W., Miller, G., Wallace, I., Harper, J., Mittler, R., & Gilroy, S. (2017). Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca²⁺, ROS and electrical signals. *The Plant Journal*, *90*(4), 698-707.

Dahl, T. W., Hammarlund, E. U., Anbar, A. D., Bond, D. P. G., Gill, B. C., Gordon, G. W., Knoll, A. H., Nielsen, A. T., Schovsbo, N. H., & Canfield, D. E. (2010). Devonian rise in atmospheric oxygen correlated to the radiations of terrestrial plants and large predatory fish. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *107*(42), 17911-17915.

De Bortoli, S., Teardo, E., Szabò, I., Morosinotto, T., & Alboresi, A. (2016). Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms. *Biophysical Chemistry*, *218*, 14-26.

DeFalco, T. A., & Zipfel, C. (2021). Molecular mechanisms of early plant pattern-triggered immune signaling. *Molecular Cell*, *81*(17), 3449-3467.

Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., & Pottosin, I. (2018). Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*, *220*(1), 49-69.

Dietrich, P., Moeder, W., & Yoshioka, K. (2020). Plant Cyclic Nucleotide-Gated Channels: New Insights on Their Functions and Regulation. *PLANT PHYSIOLOGY*, *184*(1), 27-38.

Edel, K. H., & Kudla, J. (2014). Increasing complexity and versatility: How the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium*, *57*(3), 231-246.

Fortunato, S., Nigro, D., Lasorella, C., Marcotuli, I., Gadaleta, A., & De Pinto, M. C. (2023). The Role of Glutamine Synthetase (GS) and Glutamate Synthase (GOGAT) in the Improvement of Nitrogen Use Efficiency in Cereals. *Biomolecules*, *13*(12), 1771.

Frank, W., Ratnadewi, D., & Reski, R. (2005). *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, *220*(3), 384-394. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1351-1>

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.

García Laynes, F. (2019). *Identificación de transcritos de receptores de glutamato en etapas ontogénicas de flores y frutos de chile habanero (Capsicum chinense Jacq.) bajo diferentes condiciones ambientales* (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

Gilroy, S., Bialasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, *171*(3), 1606-1615.

Green, M. N., Gangwar, S. P., Michard, E., Simon, A. A., Portes, M. T., Barbosa-Caro, J., Wudick, M. M., Lizzio, M. A., Klykov, O., Yelshanskaya, M. V., Feijó, J. A., & Sobolevsky, A. I. (2021). Structure of the Arabidopsis thaliana glutamate receptor-like channel GLR3.4. *Molecular Cell*, *81*(15), 3216-3226.e8.

Grenzi, M., Bonza, M. C., Alfieri, A., & Costa, A. (2020). Structural insights into long-distance signal transduction pathways mediated by plant glutamate receptor-like channels. *New Phytologist*, *229*(3), 1261-1267.

Hou, C., Tian, W., Kleist, T., He, K., Garcia, V., Bai, F., Hao, Y., Luan, S., & Li, L. (2014). DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Research*, *24*(5), 632-635.

Kato, H., Yasui, Y., & Ishizaki, K. (2020). Gemma cup and gemma development in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist*, *228*(2), 459-465.

Kenrick, P., & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, *389*(6646), 33-39.

Koselski, M., Trebacz, K., Dziubinska, H., & Krol, E. (2008). Light- and dark-induced action potentials in *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(1), 13-18.

Koselski, M., Wasko, P., Derylo, K., Tchorzewski, M., & Trebacz, K. (2020). Glutamate-Induced Electrical and Calcium Signals in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant And Cell Physiology*, *61*(10), 1807-1817.

Koselski, M., Wasko, P., Kupisz, K., & Trebacz, K. (2019). Cold- and menthol-evoked membrane potential changes in the moss *Physcomitrella patens*: influence of ion channel inhibitors and phytohormones. *Physiologia Plantarum*, *167*(3), 433-446.

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. *The Plant Journal*, *93*(3), 515-533.

Li, D., Flores-Sandoval, E., Ahtesham, U., Coleman, A., Clay, J. M., Bowman, J. L., & Chang, C. (2020). Ethylene-independent functions of the

ethylene precursor ACC in *Marchantia polymorpha*. *Nature Plants*, 6(11), 1335-1344.

Mou, W., Kao, Y., Michard, E., Simon, A. A., Li, D., Wudick, M. M., Lizzio, M. A., Feijó, J. A., & Chang, C. (2020). Ethylene-independent signaling by the ethylene precursor ACC in *Arabidopsis* ovular pollen tube attraction. *Nature Communications*, 11(1).

Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500(7463), 422-426.

Nguyen, C. T., Kurenda, A., Stolz, S., Chételat, A., & Farmer, E. E. (2018). Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 115(40), 10178-10183.

Oliver, M. J. (2005). Desiccation Tolerance in Bryophytes: A Reflection of the Primitive Strategy for Plant Survival in Dehydrating Habitats? *Integrative And Comparative Biology*, 45(5), 788-799.

Park, C., & Shin, R. (2022). Calcium channels and transporters: Roles in response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers In Plant Science*, 13.

Petersen, O. H. (2002). Calcium signal compartmentalization. *Biological Research*, 35(2).

Petersen, O. H., Courjaret, R., & Machaca, K. (2017). Ca²⁺ tunnelling through the ER lumen as a mechanism for delivering Ca²⁺ entering via store-operated Ca²⁺ channels to specific target sites. *The Journal Of Physiology*, 595(10), 2999-3014.

Pikor, D., Hurła, M., Słowikowski, B., Szymanowicz, O., Poszwa, J., Banaszek, N., Drelichowska, A., Jagodziński, P. P., Kozubski, W., & Dorszewska, J. (2024). Calcium Ions in the Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(23), 13133.

Poovaiah, B. W., Du, L., Du, L., Singh, A., Wang, H., Zeng, H., & Xu, L. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers In Plant Science*, 6.

Price, M. B., Jelesko, J., & Okumoto, S. (2012). Glutamate Receptor Homologs in Plants: Functions and Evolutionary Origins. *Frontiers In Plant Science*, 3.

Qi, Z., Stephens, N. R., & Spalding, E. P. (2006). Calcium Entry Mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* Glutamate Receptor with a Broad Agonist Profile. *PLANT PHYSIOLOGY*, 142(3), 963-971.

Qudeimat, E., Faltusz, A. M. C., Wheeler, G., Lang, D., Holtorf, H., Brownlee, C., Reski, R., & Frank, W. (2008). A P IIB -type Ca²⁺-ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(49), 19555-19560.

Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., . . . Boore, J. L. (2008). The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*, 319(5859), 64-69.

Reyes, A. J., Álvarez-Herrera, J. G., & Fernández, J. P. (2013). *Papel del calcio en la apertura y el cierre estomático y sus interacciones con solutos compatibles. Una revisión.*

Romeis, T., & Herde, M. (2014). From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. *Current Opinion In Plant Biology*, 20, 1-10.

Sanmartín, M., Rojo, E., Kurenda, A., Larruy-García, B., Zamarreño, Á. M., Delgadillo, M. O., Brito-Gutiérrez, P., García-Mina, J. M., Farmer, E. E., & Sánchez-Serrano, J. J. (2024). GLR-dependent calcium and electrical signals are not coupled to systemic, oxylipin-based wound-induced gene expression in *Marchantia polymorpha*. *The New phytologist*, 10.1111/nph.19803. Advance online publication.

Scherzer, S., Böhm, J., Huang, S., Iosip, A. L., Kreuzer, I., Becker, D., Heckmann, M., Al-Rasheid, K. A., Dreyer, I., & Hedrich, R. (2022). A unique inventory of ion transporters poises the Venus flytrap to fast-propagating action potentials and calcium waves. *Current Biology*, 32(19), 4255-4263.e5.

Singh, A., Kanwar, P., Yadav, A. K., Mishra, M., Jha, S. K., Baranwal, V., Pandey, A., Kapoor, S., Tyagi, A. K., & Pandey, G. K. (2013). Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *FEBS Journal*, 281(3), 894-915.

Shao, Q., Gao, Q., Lhamo, D., Zhang, H., & Luan, S. (2020). Two glutamate- and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *Science Signaling*, 13(640).

Shi, S., Li, S., Asim, M., Mao, J., Xu, D., Ullah, Z., Liu, G., Wang, Q., & Liu, H. (2018). The *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs) and Their Roles in Plant Growth Regulation and Abiotic Stress Responses. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(7), 1900.

Shimamura, M. (2015). *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant And Cell Physiology*, 57(2), 230-256.

Simon, A. A., Navarro-Retamal, C., & Feijó, J. A. (2023). Merging Signaling with Structure: Functions and Mechanisms of Plant Glutamate Receptor Ion Channels. *Annual Review Of Plant Biology*, 74(1), 415-452.

Storti, M., Costa, A., Golin, S., Zottini, M., Morosinotto, T., & Alboresi, A. (2018b). Systemic Calcium Wave Propagation in *Physcomitrella patens*. *Plant And Cell Physiology*.

Tan, Q. W., Lim, P. K., Chen, Z., Pasha, A., Provar, N., Arend, M., Nikoloski, Z., & Mutwil, M. (2023). Cross-stress gene expression atlas of

Marchantia polymorpha reveals the hierarchy and regulatory principles of abiotic stress responses. *Nature Communications*, 14(1).

Tapken, D., Anschütz, U., Liu, L., Huelsken, T., Seebohm, G., Becker, D., & Hollmann, M. (2013). A Plant Homolog of Animal Glutamate Receptors Is an Ion Channel Gated by Multiple Hydrophobic Amino Acids. *Science Signaling*, 6(279).

Teardo, E., Formentin, E., Segalla, A., Giacometti, G. M., Marin, O., Zanetti, M., Lo Schiavo, F., Zoratti, M., & Szabò, I. (2011). Dual localization of plant glutamate receptor AtGLR3.4 to plastids and plasmamembrane. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(3), 359-367.

Teardo, E., Carraretto, L., De Bortoli, S., Costa, A., Behera, S., Wagner, R., Lo Schiavo, F., Formentin, E., & Szabo, I. (2014). Alternative Splicing-Mediated Targeting of the Arabidopsis GLUTAMATE RECEPTOR3.5 to Mitochondria Affects Organelle Morphology. *PLANT PHYSIOLOGY*, 167(1), 216-227.

Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., Howe, G. A., & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361(6407), 1112-1115.

Tucker, E. B., Lee, M., Alli, S., Sookhdeo, V., Wada, M., Imaizumi, T., Kasahara, M., & Hepler, P. K. (2005). UV-A Induces Two Calcium Waves in *Physcomitrella patens*. *Plant And Cell Physiology*, 46(8), 1226-1236.

Valmonte, G. R., Arthur, K., Higgins, C. M., & MacDiarmid, R. M. (2013). Calcium-Dependent Protein Kinases in Plants: Evolution, Expression and Function. *Plant And Cell Physiology*, 55(3), 551-569.

Vincent, T. R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S. T., Pitino, M., Toyota, M., Gilroy, S., Miller, A. J., Hogenhout, S. A., & Sanders, D. (2017). Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding. *The Plant Cell*, 29(6), 1460-1479.

Vincill, E. D., Bieck, A. M., & Spalding, E. P. (2012). Ca²⁺ Conduction by an Amino Acid-Gated Ion Channel Related to Glutamate Receptors. *PLANT PHYSIOLOGY*, 159(1), 40-46.

Vincill, E. D., Clarin, A. E., Molenda, J. N., & Spalding, E. P. (2013). Interacting Glutamate Receptor-Like Proteins in Phloem Regulate Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(4), 1304-1313.

Wang, P., Lee, C., Lin, Y., Lee, M., Chen, P., Chang, H., & Chang, I. (2019). The Glutamate Receptor-Like Protein GLR3.7 Interacts With 14-3-3 ω and Participates in Salt Stress Response in Arabidopsis thaliana. *Frontiers In Plant Science*, 10.

Watanabe, K., Hashimoto, K., Hasegawa, K., Shindo, H., Tsuruda, Y., Kupisz, K., Koselski, M., Wasko, P., Trebacz, K., & Kuchitsu, K. (2024). Rapid Propagation of Ca²⁺ Waves and Electrical Signals in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant And Cell Physiology*.

Waadt, R., Krebs, M., Kudla, J., & Schumacher, K. (2017). Multiparameter imaging of calcium and abscisic acid and high-resolution quantitative calcium measurements using R-GECO1-mTurquoise in Arabidopsis. *New Phytologist*, 216(1), 303-320.

Wudick, M. M., Michard, E., Nunes, C. O., & Feijó, J. A. (2018a). Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates? *Journal Of Experimental Botany*, 69(17), 4151-4163.

Wudick, M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M. A., Nunes, C. O., Campos, C., Damineli, D. S. C., Carvalho, J. C., Lima, P. T., Pantoja, O., & Feijó, J. A. (2018b). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science*, 360(6388), 533-536.

Xu, G., Moeder, W., Yoshioka, K., & Shan, L. (2022b). A tale of many families: calcium channels in plant immunity. *The Plant Cell*, 34(5), 1551-1567.

Yamaoka, S., Inoue, K., & Araki, T. (2021). Regulation of gametangia and gametangiophore initiation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Reproduction*, 34(4), 297-306.

Yu, B., Liu, N., Tang, S., Qin, T., & Huang, J. (2022). Roles of Glutamate Receptor-Like Channels (GLRs) in Plant Growth and Response to Environmental Stimuli. *Plants*, 11(24), 3450.

Zheng, Y., Luo, L., Wei, J., Chen, Q., Yang, Y., Hu, X., & Kong, X. (2018). The glutamate receptors AtGLR1.2 and AtGLR1.3 increase cold tolerance by regulating jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 506(4), 895-900.

Zhu, X., Caplan, J., Mamillapalli, P., Czymmek, K., & Dinesh-Kumar, S. P. (2010). Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. *The EMBO Journal*, 29(5), 1007-1018.