



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Construcción de una planta hepática con capacidad de
percibir giberelinas

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Fernández Bonilla, Laura

Tutor/a: Mulet Salort, José Miguel

Cotutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: CATARINO, BRUNO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Construcción de una planta hepática con capacidad de percibir giberelinas

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Valencia, Enero de 2023

- **Laura Fernández Bonilla** -



Tutor: Bruno Catarino

Tutor UPV: Javier Agustí Feliú

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para dar las gracias a cada una de las personas que han hecho posible la realización de este trabajo. Sin ellas, mi paso por el laboratorio 2.07, que a veces se convertía en mi segunda casa, no hubiese sido tan entrañable. Ante todo, quiero hacer una especial mención a mi tutor Bruno, sin ti, nada de esto hubiera sido posible. Gracias por tu dedicación, tu pasión, tu paciencia, tus charlas para sacar adelante este proyecto, tu profesionalidad y sobre todo gracias por darme la oportunidad de aprender tanto contigo. Has estado para mí 24/7, ayudándome cuando más lo necesitaba e intentando que nunca me viniese abajo. Sin duda te has convertido en un referente para mí.

También he tenido la suerte de contar con la profesionalidad y consejos de Miguel. Para mí has sido como un tutor y sin ti no hubiese podido darle sentido a este trabajo. Gracias por sacar tiempo para reunirme y discutir conmigo los resultados que iba obteniendo. Agradecerte también por darme la oportunidad de formar parte del “team DELLA” y por confiar en mí para darme este trabajo. No sé cómo lo hacías, pero cada vez que entraba en tu despacho con un poco de bajón, conseguías que saliese de él mucho más positiva y mirando todo desde otro punto de vista. La pasión y dedicación que le he puesto a este proyecto sin duda también ha sido gracias a ti

Maca, para ti no tengo palabras, mi paso por el laboratorio ha sido inolvidable gracias a ti. Me falta espacio para enumerar todo lo que he aprendido contigo. No han sido dos, ni tres, sino cuatro las veces que te has puesto conmigo para sacar adelante el desesperado experimento de levaduras y siempre con una sonrisa de oreja a oreja y animándome cuando más lo necesitaba. Gracias por dejar que te robara puntas o medio de cultivo y por hacer que cada día que pasaba en el laboratorio fuese mucho más ameno, sobre todo con nuestras charlas en cabina que me daban vida. Has sido mi gran descubrimiento del labo.

No puedo terminar esta sección sin agradecer al resto de personas del 2.07 y 2.08: Cristina, Paula, Laura, Ceci, Alberto... da gusto contar con vosotros. Por último, gracias a mi familia y mis amigos por apoyarme y levantarme el ánimo en mis incontrolables momentos de desesperación.

RESUMEN

Las plantas terrestres conquistaron la superficie terrestre de nuestro planeta hace unos 500 millones de años. La evolución de las vías de señalización hormonal fue uno de los acontecimientos más importantes que permitieron la colonización y la radiación de complejas estructuras vegetales sobre la superficie de nuestro planeta. Entre ellas, la vía de señalización de giberelinas (GAs) desempeña un papel importante en el control del crecimiento de las plantas en una plenitud de condiciones ambientales. Sorprendentemente, la percepción de GAs está ausente en el linaje de las briófitas y esto se debe a la falta del receptor de la hormona GID1 y a la capacidad de dicho receptor para interactuar con las proteínas DELLA de las briófitas.

Uno de los objetivos de este trabajo es reconstruir la vía de señalización de GAs, tal y como se conoce en traqueófitas, en la briófito *Marchantia polymorpha*. Para ello, se ha creado su versión sintética de *M. polymorpha* que codifica el receptor GID1a de *Arabidopsis thaliana* y una proteína DELLA capaz de interactuar con GID1 en presencia de GAs. De hecho, cuando esta planta es suplementada con la hormona, su crecimiento es inducido, de forma similar a lo que ocurre en las traqueófitas, es decir, la expresión de GID1 y una DELLA quimérica son suficientes para promover la sensibilidad a GAs en la briófito *M. polymorpha*.

Además, los resultados mostrados en este trabajo sugieren que la F-box GID2, que promueve la degradación de DELLA en traqueófitas de forma dependiente a GAs, está conservada en briófitas para regular la represión del crecimiento mediada por DELLA independientemente de GAs. Así, las plantas terrestres han desarrollado diferentes mecanismos para regular la actividad de DELLA a través de GID2 en briófitas y traqueófitas. La diversificación de los mecanismos reguladores de las proteínas DELLA podrán ser una de las causas que contribuyeron a la radiación morfológica y de la capacidad de las plantas terrestres para adaptarse a diferentes nichos ecológicos.

Palabras clave: briófitas; traqueófitas; *Marchantia polymorpha*; giberelinas

ABSTRACT

Land plants conquered the terrestrial surface of our planet around 500 million years ago. The evolution of hormone signalling pathways was one of the most important events that allowed the colonisation and radiation of complex plant structures on the surface of our planet. Among them, the gibberellin (GAs) signalling pathway plays an important role in controlling plant growth under a plenitude of environmental conditions. Surprisingly, the perception of GAs is absent in the bryophyte lineage, and this is due to the lack of the GID1 hormone receptor and the ability of this receptor to interact with the DELLA proteins of bryophytes.

One of the aims of this work is to reconstruct the GAs signalling pathway, as known in tracheophytes, in the bryophyte *Marchantia polymorpha*. To this end, I have created a synthetic version of *M. polymorpha* that encodes the GID1a receptor of *Arabidopsis thaliana* and a DELLA protein capable of interacting with GID1 in the presence of GAs. In fact, when this plant is supplemented with the hormone, its growth is induced, similar to what occurs in tracheophytes, i.e., the expression of GID1 and a chimeric DELLA are sufficient to promote sensitivity to GAs in the bryophyte *M. polymorpha*.

Furthermore, the results shown in this work suggest that the F-box GID2, which promotes DELLA degradation in tracheophytes depending on GAs, is conserved in bryophytes to regulate DELLA-mediated growth repression independently of GAs. Thus, land plants have evolved different mechanisms to regulate DELLA activity through GID2 in bryophytes and tracheophytes. The diversification of the regulatory mechanisms of DELLA proteins could be one of the factors underlying the morphological radiation and the ability of land plants to adapt to different ecological niches.

Key words: bryophytes; tracheophytes; *Marchantia polymorpha*; gibberellins

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Evolución de las plantas terrestres.....	1
1.2. Las giberelinas como integradoras de información ambiental	4
1.3. Evolución de la vía de señalización por giberelinas	7
1.4. Enfoques biológicos para reconstruir vías moleculares en plantas.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	12
3.2. Métodos de transformación	12
3.2.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> y condiciones de crecimiento	12
3.2.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y condiciones de crecimiento	12
3.2.3. Transformación de <i>Marchantia polymorpha</i> y condiciones de crecimiento	13
3.3. Clonación y construcción de plásmidos para la transformación de <i>M. polymorpha</i>	14
3.3.1. Obtención de líneas de <i>M. polymorpha</i> sobreexpresoras de <i>AtGIDa</i>	14
3.3.2. Obtención de líneas de <i>M. polymorpha</i> sobreexpresoras <i>DELLA QUIMERA</i>	14
3.3.3. Obtención de líneas de <i>M. polymorpha</i> doble sobreexpresoras de <i>AtGID1a</i> con <i>DELLA QUIMERA</i>	15
3.3.4. Obtención de líneas de <i>M. polymorpha</i> sobreexpresoras de <i>MpGID2</i>	15
3.3.5. Obtención de construcciones para el ensayo de doble híbrido de levadura	15
3.3.6. Obtención de líneas de <i>M. polymorpha</i> mutadas en <i>MpGID2</i>	16
3.4. Ensayo de doble híbrido de levadura.....	16

3.5.	Análisis de expresión genética.....	17
3.5.1.	Extracción de ARN, síntesis de cDNA y RT-PCR.....	17
3.5.2.	Extracción de ADN, PCR, purificación de ADN y secuenciación.....	17
3.6.	Análisis fenotípico	17
3.7.	Análisis estadístico	18
4.	RESULTADOS	19
4.1.	Generación de la proteína sintética DELLA QUIMERA	19
4.2.	AtGID1a interactúa con DELLA QUIMERA de forma dependiente a GAs... 20	
4.3.	La expresión de AtGID1a y DELLA con N-terminal de plantas vasculares son suficientes para conferir sensibilidad a GAs en <i>M. polymorpha</i>	21
4.4.	MpGID2 es necesario y suficiente para regular el crecimiento mediado por MpDELLA en <i>M. polymorpha</i>	24
5.	DISCUSIÓN.....	27
6.	CONCLUSIONES	32
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	33
8.	ANEXO.....	38

LISTADO DE ABREVIATURAS

AD: Dominio de activación

BD: Dominio de unión

DEX: Dexametasona

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FTs: Factores de transcripción

GAs: Giberelinas

GID1: GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1

GID2: GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2

GR: Receptor glucocorticoides

H: Histidina

L: Leucina

LiAc: Acetato de litio

OE-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de extensión solapada

PEG: Polietilenglicol

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SD: Medio sintético definido

SLY1: SLEEPY1

Tak -1: Takaragaike -1

T: Triptófano

Y2H: Doble híbrido de levadura

3-AT: 3-amino-1,2,4-triazol

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Evolución de las plantas terrestres

Los organismos fotosintéticos surgieron por primera vez hace más de 1500 millones de años (Fürst-Jansen et al., 2020). Su aparición fue sin duda uno de los eventos más importantes en la evolución de la vida en la tierra que supuso cambios en la concentración de oxígeno atmosférico (Delaux et al., 2015; Donoghue et al., 2021; Wodniok et al., 2011) y el albedo de los continentes (Boyce & Lee, 2017; Donoghue et al., 2021). Estos sucesos permitieron dar forma a nuestro planeta y construir el camino hacia los ecosistemas terrestres actuales.

Gran parte de la diversidad biológica presente en la Tierra se debe a la capacidad de las cianobacterias para establecer relaciones simbióticas con diferentes huéspedes (Sánchez-Baracaldo et al., 2017), por eso, la teoría más comúnmente aceptada sobre el origen de los eucariotas fotosintéticos es que se dio a partir de la integración endosimbiótica de una cianobacteria de vida libre y un protista heterótrofo no fotosintético (Criscuolo & Gribaldo, 2011; de Vries & Gould, 2018; Delaux et al., 2015; Fürst-Jansen et al., 2020; Yoon et al., 2004). Los plástidos primarios son el resultado de esta asociación mutualista y están presentes en un importante grupo de eucariotas compuesto por el filo *Glaucophyta* (algas que contienen cianelas), *Rhodophyta* (algas rojas) y *Chloroplastida* (linaje verde que comprende a las algas verdes y plantas terrestres), y juntos, forman el subgrupo taxonómico *Archaeplastida* (Criscuolo & Gribaldo, 2011; Fürst-Jansen et al., 2020; Leliaert et al., 2012; Strassert et al., 2021). Los tres linajes arqueoplastídicos surgieron monofíleticamente a partir de dicha endosimbiosis primaria (Archibald, 2015; de Vries & Gould, 2018; Leliaert et al., 2012) y comparten un antepasado común que vivió hace 1900 millones de años (Han et al., 2019; Sánchez-Baracaldo et al., 2017). Así mismo, tras la evolución de los plástidos primarios, la fotosíntesis se extendió mediante endosimbiosis secundaria a otros linajes fotosintéticos, especialmente aquellos con plástidos derivados de algas rojas, tales como haptofitos, criptofitos y dinoflagelados (Sánchez-Baracaldo et al., 2017; Strassert et al., 2021; Yoon et al., 2004).

Estudios morfológicos y moleculares han identificado una importante división dentro del linaje *Chloroplastida*, dando lugar a dos linajes monofiléticos con divergencia temprana: *Chlorophyta* (clado compuesto por organismos clorófitos) y *Streptophyta* (clado compuesto por algas estreptófitas, también conocidas como carófitas) (Figura 1) (Becker & Marin, 2009; Fürst-Jansen et al., 2020). El primero de ellos, incluye la mayoría de lo que tradicionalmente se ha denominado algas verdes entre las cuales destacan especies pertenecientes a los tres grupos

principales de este linaje: *Ulvophyceae*, *Trebouxiophyceae* y *Chlorophyceae*. Algunos miembros de este clado son unicelulares (tales como *Chlamydomonas*) y otros multicelulares (por ejemplo, *Ulva* o lechuga de mar) (de Vries & Gould, 2018), pero todos, contienen células nadadoras con dos o cuatro flagelos (Lewis & McCourt, 2004).

Para realmente comprender el origen de las plantas terrestres (embriofitas), hay que recurrir al linaje *Streptophyta* ya que es mucho más amplio y contiene a las algas verdes carófitas a partir de las cuales evolucionaron las plantas terrestres hace aproximadamente 470 millones de años (Leliaert et al., 2012; Steemans et al., 2009). Por este motivo, las embriofitas ancestrales heredaron de las algas carófitas atributos de desarrollo, bioquímicos y biológicos que facilitaron su adaptación y colonización del hábitat terrestre (Bowman et al., 2017).

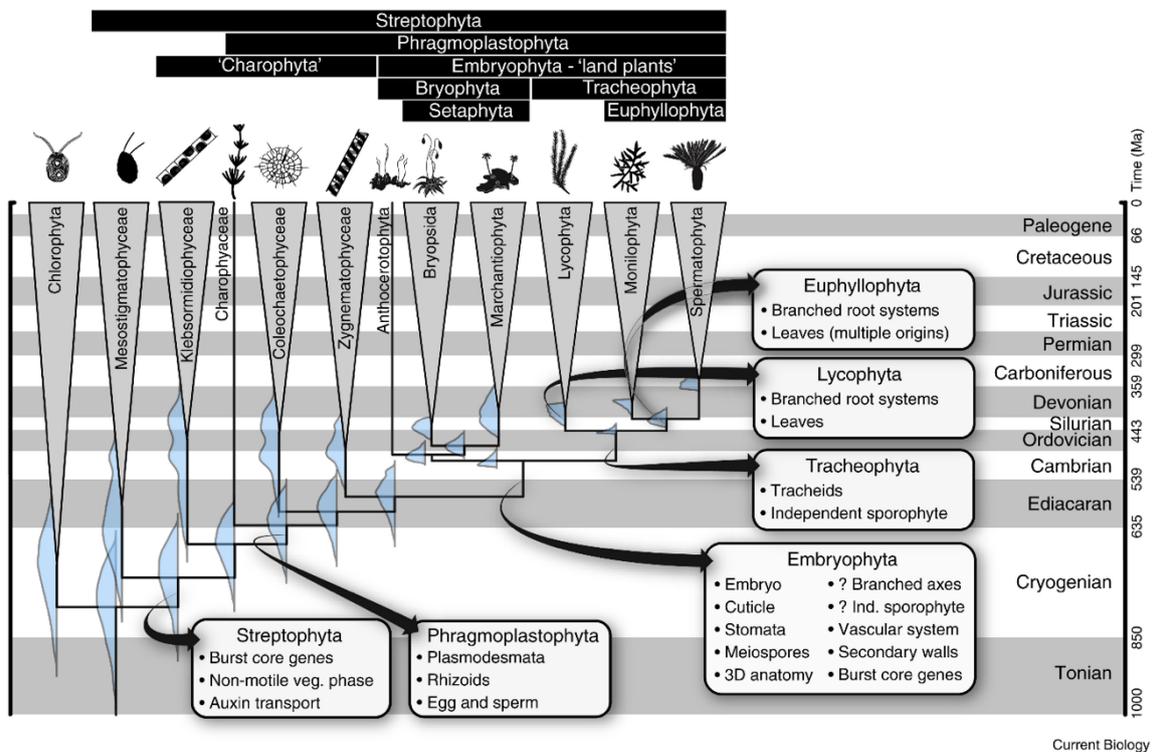


Figura 1: Escala temporal de la filogenia de los estreptófitos y representación de las principales innovaciones evolutivas de las plantas terrestres (Donoghue et al., 2021)

Los estreptófitos son un grupo parafilético que comprenden organismos predominantes de agua dulce y terrestre, con unos pocos representantes que viven en ambientes salobres (Lewis & McCourt, 2004). Este linaje se compone a su vez por cinco grupos taxonómicos distintos, entre los cuales se destaca el grupo *Zygnematophyceae* por ser considerado los parientes de algas más cercanos a las plantas terrestres (Cheng et al., 2019; Delaux et al., 2015; Donoghue et al., 2021;

Wodniok et al., 2011) y que, por tanto, comparten con el grupo embryophyta el mismo ancestro común (Figura 1) (Bowman et al., 2017).

El hecho de que las primeras algas estreptófitas vivieran en entornos de agua dulce, se considera un factor clave que hizo posible la transición más importante en la historia evolutiva del linaje verde: la terrestalización o colonización de la tierra. Las algas que ocupaban hábitats poco profundos y de agua dulce desarrollaron la capacidad de asentarse en un ambiente terrestre. Este cambio de entorno exigió un gran número de adaptaciones de forma escalonada a partir de las cuales se produjo una conquista gradual de la tierra (Fürst-Jansen et al., 2020). Desde entonces, han evolucionado dos grandes grupos monofiléticos de plantas terrestres cuyas relaciones han sido controvertidas durante mucho tiempo (Donoghue et al., 2021; Su et al., 2021): *Bryophyta* (linaje de plantas no vasculares) y *Traqueophyta* (linaje de plantas vasculares). Dentro del primer grupo se engloban a los musgos (Bryophyta), hepáticas (Marchantiophyta) y antoceros (Anthocerotophyta). Todos, en conjunto, constituyen el segundo grupo más diverso de las plantas terrestres, dejando en primer lugar al grupo de las traqueofitas. Este último linaje está compuesto por licófitos (Lycopodiophyta), helechos (Monilophyta) y plantas con semillas (Spermatophyta) donde se incluyen a las gimnospermas y angiospermas (Figura 1).

La terrestalización mediada por el linaje verde fue abarcada por una enorme diversificación de morfología y de desarrollo que les ayudó a hacer frente a determinados estímulos de estrés, especialmente los generados por las altas condiciones de luz y temperatura. La transición de hábitat acuáticos a terrestre implicó un cambio de crecimiento bidimensional a un crecimiento tridimensional organizado; el desarrollo de rizoides fue fundamental para su anclaje en la superficie terrestre; la aparición de cutículas para el intercambio de gases o el desarrollo del sistema activo del transporte vascular, son otros de los cambios evolutivos que confieren plasticidad para que las plantas se habitúen a un entorno cambiante. Todas estas variaciones adaptativas vinieron acompañadas de una mayor diversidad de redes reguladoras, incluidas las vías de integración de señales ambientales que median una comunicación celular endógena en las plantas y el medio que les rodea (Bowman et al., 2019). Uno de los componentes intrínsecos de estas redes de señalización son las fitohormonas.

1.2. Las giberelinas como integradoras de información ambiental

Todos los seres vivos evolucionan para sobrevivir en entornos cambiantes donde la presencia de depredadores o la falta de nutrientes son amenazas diarias con las que tienen que lidiar. Ahora bien, a las plantas les ha resultado especialmente difícil superar condiciones hostiles ya que son organismos sésiles y, una vez se asientan en un lugar determinado, la única opción que les queda es aclimatarse (Hernández-García et al., 2021). Para que esto ocurra, las señales exógenas tienen que percibirse correctamente e integrarse con los programas endógenos de la planta, de forma que ésta pueda responder con cambios fisiológicos, de crecimiento y desarrollo. Para coordinar estos procesos, se requieren sistemas integradores adicionales a partir de las cuales se puedan obtener respuestas de salida específicas. Las giberelinas (GAs) son señales moleculares capaces de modular estas respuesta y el estudio de su ruta de señalización es un buen ejemplo para comprender los mecanismos de integración de señales ambientales (Briones-Moreno et al., 2017) ya que poseen un metabolismo sensible a estímulos externos (Hernández-García et al., 2021), tales como la luz. De hecho, hay estudios de demuestran que la germinación se ve inducida por las GAs bioactivas que se sintetizan a grandes niveles cuando los fitocromos de las semillas perciben la luz (Yamauchi et al., 2007). Después de la germinación, en cambio, la relación entre la luz y las GAs es justamente la contraria (Alabadí & Blázquez, 2008). Por otro lado, la temperatura es otro importante factor externo que modula los niveles de esta hormona, estimulando, por ejemplo, el alargamiento del hipocótilo a altas temperaturas (Stavang et al., 2009). Así mismo, ante determinadas situaciones de estrés, las plantas reducen su tasa de crecimiento debido a que disminuye el contenido de GAs y, en su lugar, se promueven mecanismos de defensa (Achard et al., 2008). Todo esto, en conjunto, apunta a que la homeostasis de GAs está regulada por diversos factores que actúan simultáneamente para conseguir que se sintetice la cantidad óptima de esta hormona y con ello, establecer una fina regulación del desarrollo de embriofitas que podría ser la base de su enorme radiación morfológica y evolución.

Las GAs comprenden un amplio grupo de ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos cuyo esqueleto básico está constituido por 19 o 20 átomos de carbono. Se sabe con certeza que esta hormona se sintetiza de forma ubicua en las plantas traqueófitas y sus funciones están muy extendidas a lo largo del ciclo vital de la planta. Además de promover el crecimiento a través de la expansión y división celular, las GAs regulan procesos de desarrollo como la germinación de las semillas, la inducción florar, la maduración del polen, el cuajado de los frutos, entre otros (Davière & Achard, 2013; Griffiths et al., 2006; Hedden & Thomas, 2012; Yoshida et al.,

2018). La mayor parte de estas funciones son comunes en angiospermas, monocotiledóneas y gimnospermas. Pero, se ha visto que algunas pueden llegar a ser específicas en determinados clados de plantas, tal como en helechos, donde se ha demostrado que las GAs controlan la determinación del sexo (Tanaka et al., 2014)

En plantas vasculares, se han identificado más de 100 GAs, pero solo unas pocas, incluyendo GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇, tienen actividad biológica (Davière & Achard, 2013; Harberd et al., 2009; Yoshida et al., 2018). De hecho, GA₁ se considera la hormona bioactiva más extendida ya que se ha detectado con frecuencia en diversas especies vegetales. GA₄ también existe en la mayoría de las especies y se cree que es la principal GA bioactiva en *Arabidopsis thaliana* y algunos miembros de Cucurbitaceae (Yamaguchi, 2008). Muchas otras son precursores de las formas bioactivas de la hormona o son metabolitos desactivados (Davière & Achard, 2013).

El mecanismo por el que las GAs ejercen la modulación de crecimiento y desarrollo de las plantas es a través de la regulación transcripcional, que se apoya en una ruta de señalización relativamente simple. Los componentes centrales de esta ruta son las proteínas DELLA. Son proteínas nucleares solubles que actúan como reguladores negativos de la señalización de GAs de forma que el modo en que estas hormonas promueven el crecimiento es a través de la inactivación de las DELLA, y por tanto desreprimiendo los genes regulados por GAs. Estas proteínas no contienen en su estructura un dominio de unión al DNA, por lo que su principal modo de acción es a través de la interacción física con diversos factores de transcripción (FTs) capaces de unirse directamente a genes diana y modular su expresión (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008)

Las proteínas DELLA forman parte de la familia genética GRAS, compuesta por FTs presentes exclusivamente en plantas (Dill et al., 2004). Todas las DELLA presentan un dominio C-terminal muy conservado entre proteínas reguladoras, el dominio GRAS (Sun et al., 2010) (Figura 2). A través de este dominio, las proteínas DELLA son capaces de interactuar con cientos de FTs u otros reguladores transcripcionales, ya sea reprimiendo o potenciando positivamente su capacidad para activar la expresión de genes implicados en diferentes procesos fisiológicos de la planta. Esto hace que las DELLA jueguen un papel fundamental en la coordinación de múltiples programas transcripcionales a lo largo de la evolución. Esto, a su vez sugiere que sean importantes 'hubs' en la red que regula el equilibrio entre el crecimiento y la tolerancia al estrés en traqueofitas (Briones-Moreno et al., 2017; Claeys et al., 2014).

Por otro lado, en el extremo N-terminal de estas proteínas se encuentra el dominio DELLA, que confiere singularidad a esta subfamilia de proteínas para distinguirse del resto de la familia

GRAS (Figura 2). Este dominio es crucial para la interacción con el receptor de GAs inducida por la hormona (Briones-Moreno et al., 2017). Su estructura es en su mayor parte desconocida, probablemente debido a que posee un alto grado de desorden intrínseco (Sun et al., 2010). No obstante, alberga una pequeña región estructurada con motivos específicos de respuesta a GAs: motivo DELLA y TVHYNP (Figura 2)

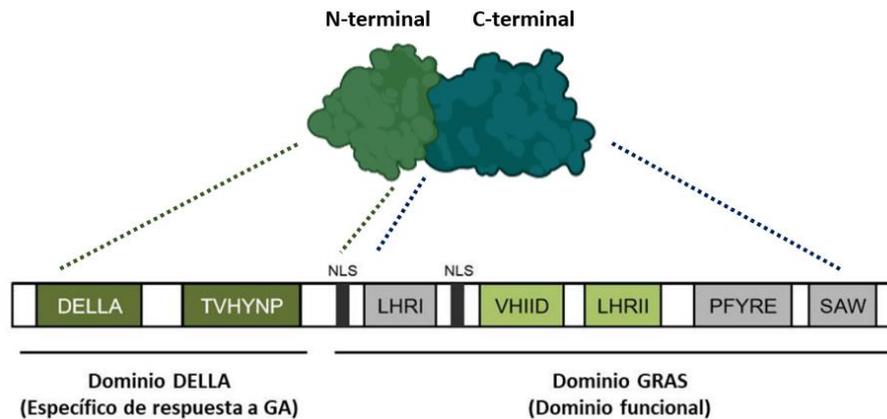


Figura 2: Representación de la proteína DELLA. El dominio GRAS está constituido por dos repeticiones heptadas de leucina (LRHI y LRHII) y tres motivos conservados (VHIID, PFYRE y SAW). El dominio DELLA está formado por los motivos DELLA y TVHYNP. (Adaptada de Davière & Achard, 2013 y Grau-Enguix, 2017).

Los únicos receptores de GAs conocidos hasta ahora son la familia de proteínas solubles GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) ubicados en el núcleo y citoplasma. Este receptor fue caracterizado inicialmente en arroz (Ueguchi-Tanaka et al., 2005) y consta de tres ortólogos en *Arabidopsis* (GID1a-c) (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006). Estructuralmente se caracterizan por disponer un bolsillo central en el que pueden acomodarse las GAs bioactivas. Cuando esto ocurre, se produce un cambio alostérico en el receptor que posibilita el plegamiento de la parte N-terminal sobre la apertura del bolsillo (Figura 3). Este cambio induce la interacción de GID1 con el dominio DELLA de la proteína DELLA localizada en el núcleo, formando así el complejo GA-GID1-DELLA. A su vez, el complejo induce un cambio conformacional en el dominio GRAS de la proteína DELLA que permitirá que sea marcada por poliubiquitinación para su posterior degradación por el proteosoma 26S (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Willige et al., 2007). Para que este marcaje ocurra, es necesario el complejo E3 ubiquitin-ligasa de tipo SCF dependiente en *Arabidopsis* de la proteína F-box SLEEPY1 (SLY1), cuyo ortólogo en arroz se denomina

GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2 (GID2) (Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Gomi et al., 2004) (Figura 3).

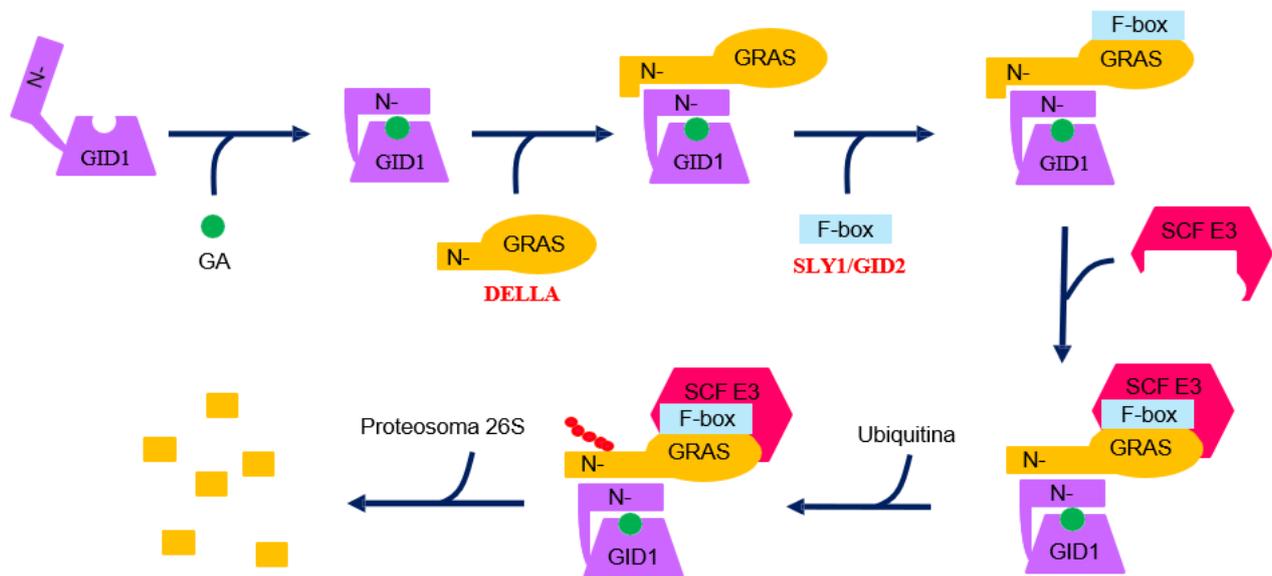


Figura 3: Modelo de la ruta de señalización de GAs en Arabidopsis. En presencia de la hormona, se produce la formación secuencial del complejo GA-GID1-DELLA y la posterior degradación de la proteína DELLA.

1.3. Evolución de la vía de señalización por giberelinas

El mecanismo de acción de las GAs ha sido ampliamente descrito en traqueófitas ya que su ruta de biosíntesis tal y como conoce en plantas vasculares, no está completa en las briófitas. Esto supone que el origen de la vía de señalización sea vinculado normalmente a las plantas vasculares, incluyendo licófitos, helechos y plantas con semillas, donde se han encontrado los componentes principales que intervienen en la ruta (GAs, GID1, SLY1/GID2 y DELLA) (Hernández-García et al., 2019; Hernández-García, et al., 2021).

La presencia de GAs en briófitas es controvertida ya que se ha detectado la existencia de esta hormona en linajes vegetales fuera de las plantas vasculares, pero derivan de vías no identificadas que tienen funciones desconocida (Hayashi et al., 2010; Hedden & Thomas, 2012). Aunque algunos estudios proponen la presencia de homólogos de GA20ox y GA3ox en el musgo *Sphagnum fallax* y la hepática *Marchantia polymorpha*, apoyando así la evolución de GA oxidasas en briófitas (Cannell et al., 2020), éstos son ortólogos de la amplia familia de oxidasas que incluye otras enzimas no implicadas en la síntesis de GAs. Además, no se han

detectado de manera fiable GAs bioactivas en briófitas, posiblemente porque no contienen la vía completa para la síntesis e inactivación de las formas bioactivas de la hormona (Cannell et al., 2020; Hernández-García et al., 2021) (Figura 4). En musgos, por ejemplo, no se dispone de informes que acrediten la presencia de GAs bioactivas y su aplicación de forma exógena no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de la planta (Hayashi et al., 2010). Probablemente, la evolución de la vía de señalización por GAs hasta llegar a la que se conoce actualmente en angiospermas, tuvo lugar después de la divergencia de las briófitas (Sun, 2011).

Desde un punto de vista evolutivo, las proteínas DELLA son anteriores a la aparición del metabolismo y percepción de GAs (Blázquez et al., 2020). La aparición de la familia GRAS, a la que pertenecen las proteínas DELLA, no se dio repentinamente en las embriofitas. Se cree que se produjo una transferencia horizontal de las proteínas GRAS, desde las bacterias a las plantas debido a su parecido con las metiltransferasas bacterianas (Zhang et al., 2012). Este evento posiblemente involucró a un ancestro algal ya que se ha detectado la presencia de proteínas GRAS en los parientes de algas más cercanos a las plantas terrestres, pertenecientes al grupo *Zygnematophyceae* (Engstrom, 2011). Ahora bien, se ha dilucidado el origen evolutivo de las proteínas DELLA, demostrando que la familia de genes GRAS de las algas son monofiléticas y evolucionaron de forma independiente a las plantas terrestres (Hernández-García et al., 2019). Esto explica por qué las DELLA se han encontrado exclusivamente en los linajes de embriofitas y no en las algas, lo que apunta a que su origen se dio en un ancestro común de todas las plantas terrestres (Hernández-García, et al., 2021).

El sistema de respuesta a GAs surge primero en las plantas vasculares. Por una parte, sólo se han encontrado genes que codifiquen el receptor GID1 en los genomas de traqueófitas (Blázquez et al., 2020; Hernández-García, et al., 2021). Por otra parte, se han encontrado homólogos de SLY/GID2 en los genomas de plantas no vasculares como *M. polymorpha* (Bowman et al., 2017), aunque no se ha demostrado que interaccionen con las DELLA correspondientes. Y, finalmente, se ha visto que sólo las DELLA de traqueófitas son capaces de interaccionar con el receptor GID1 de *Arabidopsis*, aunque los residuos necesarios para dicha interacción están presentes en muchas secuencias DELLA de briófitas (Hernández-García et al., 2019). Es probable que la falta de interacción se deba a diferencias en estructura secundaria o terciaria del dominio N-terminal de dichas DELLA. En otras palabras: el módulo de percepción de GAs, es decir, GA-GID1, solo ha demostrado ser funcional en plantas vasculares (Hernández-García et al., 2021). Esto implica que briófitas como *M. polymorpha* no tengan respuesta a GAs.

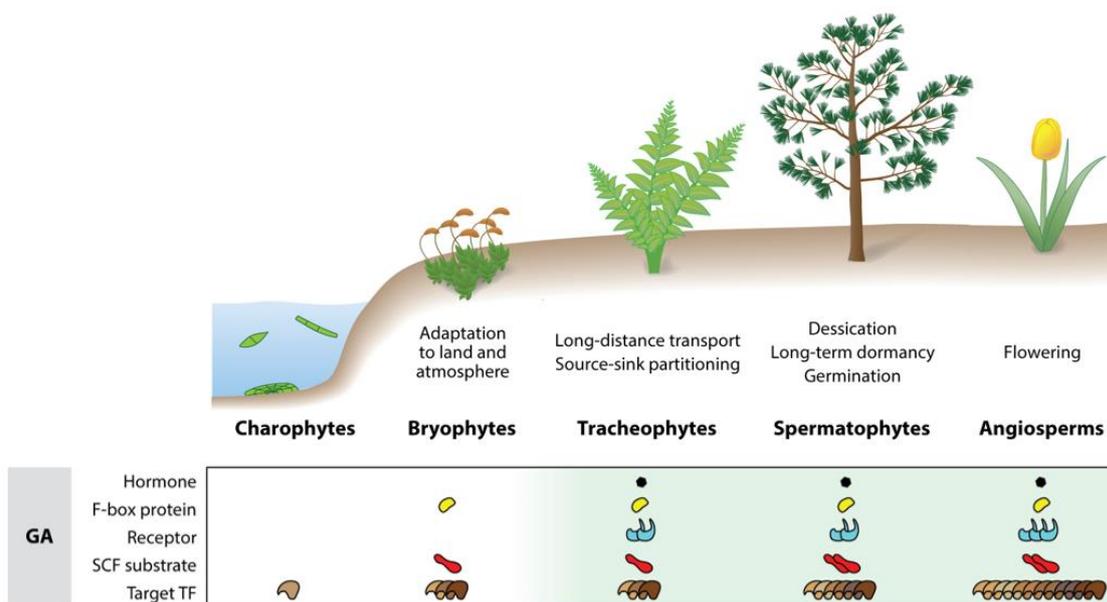


Figura 4: Aparición de los componentes de señalización de GAs a lo largo de la evolución del linaje verde. El sombreado en el recuadro indica la ausencia (blanco) y presencia (verde) de un sistema de señalización hormonal funcional. Las copias múltiples indican duplicaciones asociadas a la aparición de cada componente. Los distintos tonos de marrón para los FTs representan las múltiples familias de FTs a las que se dirigen las DELLA (Adaptada de Blázquez et al., 2020)

Aunque las plantas no vasculares carezcan del módulo de percepción de GAs, se ha propuesto que la DELLA ancestral ya cumpliría una función como reguladora del balance entre la respuesta al estrés y el crecimiento, ya que la alteración de la actividad de MpDELLA en la hepática *M. polymorpha* afecta a ambos procesos (Hernández-García et al., 2021). A raíz de esto surge la pregunta de qué le ha aportado a la plasticidad vegetal (es decir, a la capacidad de las plantas vasculares para adaptarse al entorno) contar con proteínas DELLA reguladas por GAs. Para contestar a esta pregunta, el abordaje propuesto es reconstruir en la hepática *M. polymorpha* el módulo de percepción de GAs.

1.4. Enfoques biológicos para reconstruir vías moleculares en plantas

Comprender los mecanismos moleculares que subyacen a rasgos complejos de las plantas no es una tarea fácil. El objetivo no es solo entender los programas endógenos de sus células vegetales, sino también cómo estos programas son capaces de modular una respuesta a partir de sistemas integradores de señales ambientales. Así pues, conocer las redes de señalización

hormonal implicados en esta respuesta es de vital importancia. Desde esta perspectiva, la biología sintética permite introducir sistemas sintéticos que respondan a esta hormona para extraer nuevas predicciones biológicas sobre esta ruta en plantas no vasculares.

La biología sintética es un campo emergente que permite rediseñar sistemas biológicos que ya existen en la naturaleza combinando los conocimientos y técnicas de biología molecular, química, informática e ingeniería (Chen et al., 2012). De esta manera, no se trata de una disciplina que cuestiona cómo funciona un sistema biológico concreto, en una especie concreta, sino que persigue entender los principios básicos de su arquitectura. Permite, en definitiva, reconstruir un sistema desde cero y adaptarlo específicamente a una función determinada.

El comienzo de esta nueva disciplina tuvo lugar en los sistemas bacterianos y su aplicación ha ido avanzando hasta los organismos eucariotas, incluidas las plantas. De hecho, se puede decir que la biología sintética vegetal se ha visto enriquecida por la biología sintética microbiana ya que los conceptos de diseño desarrollados a nivel microbiano son ciertamente aplicables a las plantas en lo que respecta a la expresión genética y la función celular básica. Así mismo, algunos sistemas microbianos se están utilizando directamente en plantas para mejorar el diseño y la construcción de nuevas funciones vegetales (Liu & Stewart, 2015).

Se han descrito algunos proyectos pioneros en plantas donde se utiliza biología sintética con fines específicos, tales como, el rediseño de rutas metabólicas para aumentar el rendimiento de metabolitos secundarios, la transferencia de la ruta de fotosíntesis C₄ al arroz (Baltes & Voytas, 2015) o la introducción de sistemas sintéticos de transducción de señales que respondan a estímulos ambientales son solo unos ejemplos (Lu et al., 2009). Una base común a estos proyectos es la necesidad de disponer de partes genéticas estandarizadas (tales promotores, terminadores y genes), técnicas que permitan controlar el código genético y herramientas para modificar las secuencias de ADN de las células vegetales.

2. OBJETIVOS

La capacidad de reproducir la actividad biológica de las GAs en una planta que no percibe la hormona es un paso esencial para establecer que realmente se comprende la regulación de crecimiento y desarrollo que ejerce sobre éstas. A pesar de que se disponen mecanismos ampliamente descritos de la función de GAs en angiospermas, sigue siendo un reto explorar su función y señalización en plantas terrestres no vasculares ya que lo que se conoce hasta ahora no permite establecer con seguridad una completa teoría sobre vía de señalización de GAs. La biología sintética es un potente enfoque que puede ayudar a alcanzar una comprensión más profunda sobre esto y, a su vez, podría aclarar el motivo por el cual algunas plantas han desarrollado esta señalización hormonal y hasta qué punto es importante y ventajosa para ellas.

Partiendo del conocimiento que se tiene sobre las GAs en arroz, *Arabidopsis*, tomate, y algunos cereales, parece razonable plantear la hipótesis de que las plantas vasculares presentan alto grado de plasticidad y aclimatación porque, en parte, cuentan con un mecanismo de percepción y señalización de GAs para la interpretación e integración de señales ambientales. Pero ¿qué les pasaría a las especies de plantas no vasculares si les introducimos la capacidad de percibir GAs y responder a ella? Para poner a prueba la hipótesis de partida y la pregunta que surge de ella, se va a reconstruir la señalización GAs en una especie modelo de plantas no vasculares: *M. polymorpha*. Es una hepática que carece del receptor de GAs, pero sí que conserva una proteína DELLA cuya regulación se desconoce. Además, cuenta con una proteína F-box SLY/GID2 que hace cuestionarse el hecho de que pueda estar involucrada en la regulación de procesos mediados por MpDELLA.

Teniendo en cuenta esto, se abordarán de forma concreta los siguientes objetivos:

1. Construir de forma sintética una proteína DELLA QUIMERA capaz tanto de interaccionar con el receptor GID1a de *A. thaliana*, como de mantener la interacción con FTs implicados en la biología de *M. polymorpha*.
2. Reconstruir las primeras etapas de la percepción y señalización de GAs en *M. polymorpha*. Esto implica introducir en dicha especie AtGID1a y comparar su comportamiento con el de individuos que no lo expresan.
3. Mutar la proteína F-box MpGID2 y sobreexpresar MpGID2 en *M. polymorpha* para comprobar su relación funcional con procesos regulados por MpDELLA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizó la línea macho Takaragaike-1 (Tak-1) de *M. polymorpha* como genotipo silvestre (Ishizaki et al., 2008). También se utilizó la línea MpDELLA-GR disponibles previamente en el laboratorio (Hernández-García., 2021). Salvo que se indique lo contrario, la propagación de las plantas se hizo como se describió previamente (Ishizaki et al., 2016) mediante el crecimiento de gemas en placas de cultivo con medio ½ Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado con 0,5 g/L de MES, 1% de agar y 1% de sacarosa. Se cultivaron en un fitotrón a 22 °C en condiciones de luz blanca fluorescente continua (100 μmol de fotones m^2s^{-1}).

3.2. Métodos de transformación

3.2.1. Transformación de *Escherichia coli* y condiciones de crecimiento

Se utilizaron células de *E. coli* electrocompetentes para la transformación por electroporación. Se empleó, por cada transformación, 1 μL de ADN plasmídico a una concentración entre 200-300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El ADN se introdujo en una alícuota de 60 μL de células TOP10. Para la electroporación, las células se transfirieron a cubetas previamente enfriadas y se sometieron a un pulso eléctrico de 1500 V aplicado por un Electro Cell Manipulator TM ECM 399 (BTX). Inmediatamente después, se les añadió 200 μL de medio LB (extracto de levadura 0,5%, triptona 1% y NaCl 1%) y se pusieron a recuperar a 37 °C en un agitador (300 r.p.m) durante aproximadamente 1 h. Por último, fueron plaqueadas en medio LB sólido complementado con los correspondientes antibióticos de selección en función del plásmido introducido. Para la selección de transformantes, se cultivaron durante 24h a 37 °C.

3.2.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y condiciones de crecimiento

Se utilizaron células electrocompetentes de la cepa C58 de *A. tumefaciens*. El proceso de transformación es el mismo al descrito para *E. coli*, salvo que, en este caso, las células de la cubeta se sometieron a un pulso eléctrico de 1440 V, y para su recuperación, fueron necesarias 2 h de incubación a 28 °C. Finalmente, fueron plaqueadas en medio LB sólido con rifampicina, gentamicina y el antibiótico de selección correspondiente para la selección de transformantes. Se cultivaron durante 48 h a 28 °C.

3.2.3. Transformación de *Marchantia polymorpha* y condiciones de crecimiento

La transformación de *M. polymorpha* se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Kubota et al., 2013). La línea masculina (Tak-1) y MpDELLA-GR se propagaron durante dos semanas en condiciones de luz blanca fluorescente continua ($100 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-2}$) a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Trascurridos los 14 días de edad, se cortó la parte apical de los talos maduros (a unos 2-3 mm de la punta), incluido el meristemo. A su vez, los talos se cortaron en cuatro trozos y se cultivaron durante 3 días y a 22°C en medio $\frac{1}{2}$ Gamborg B5 que contenía 1% de sacarosa para inducir la regeneración del tejido y facilitar su transformación mediada por *A. tumefaciens*. Se utilizaron aproximadamente 100 plántulas regenerados por transformación.

Para la creación de todas las líneas de *M. polymorpha* que se describirán más adelante, se utilizaron células electrocompetentes de la cepa C58 de *A. tumefaciens* que fueron transformadas con la construcción de interés que se desea expresar en la planta en función de la línea transgénica que se quiere crear.

Los cultivos de *A. tumefaciens* se iniciaron a partir de una única colonia y se cultivaron en 5 mL de medio LB suplementado con rifampicina ($3\mu\text{L}/\text{mL}$), gentamicina ($1\mu\text{L}/\text{mL}$) y el antibiótico de selección adecuado en función del plásmido introducido en la cepa bacteriana ($1\mu\text{L}/\text{mL}$). Se incubaron durante 2 días a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y con agitación. Del cultivo de células bacterianas, se centrifugó 1 mL durante 15 minutos a $2000 \times g$, se resuspendieron en 5 mL de medio 0M51C (10X 0M51C stock, sacarosa 2%, L-glutamina 0,03%, casaminoácidos 0,1%) al que adicionalmente se le añadió $100 \mu\text{M}$ de 3,5-dimetoxi-4-hidroxyacetofenona (acetosiringona) y se dejó en incubación a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y en agitación aproximadamente 6 h.

Las plántulas regeneradas y 1 mL del cultivo bacteriano, preparado como se ha descrito anteriormente, fueron co-cultivados durante 3 días a $22 \text{ }^\circ\text{C}$, bajo condiciones de luz blanca continua y en agitación (130 rpm) en 50 mL de medio 0M51C con $100 \mu\text{M}$ de acetosiringona.

Las plántulas se lavaron 5 veces con agua esterilizada y después con agua esterilizada que contenía $1 \text{ mg}/\text{mL}$ de cefotaxima durante 30 minutos. Finalmente, se transfirieron a placas selectivas que contenían $100 \text{ mg}/\text{L}$ de cefotaxima y $10 \text{ mg}/\text{L}$ del correspondiente antibiótico de selección.

3.3. Clonación y construcción de plásmidos para la transformación de *M. polymorpha*

Los vectores generados en este trabajo se realizaron a partir de reacciones de clonaje Gateway™ BP y LR (Invitrogen). Todas las construcciones fueron comprobadas mediante digestión con enzimas de restricción.

Las reacciones BP se hicieron usando 100 ng de gen de interés y 150 ng de vector de entrada pDONOR207, disponible previamente en el laboratorio. Las reacciones de recombinación se hicieron en un volumen total de 5 µL conteniendo 1 µL de BP-Clonase™ (Invitrogen) y se incubaron a 25°C durante toda la noche. La inactivación de las reacciones se realizó incubándolas con 1 µL de Proteasa K a 37 °C.

Para las reacciones LR se utilizaron 50-100 ng de vector de entrada pDONR207 o pDONR221 con el gen de interés, 150 ng de vector destino, 1 µL de enzima LR-Clonase II™ (Invitrogen) y tampón TE 1x (pH 8) hasta un volumen final de 5 µL. La mezcla se incubó a 25 °C durante toda la noche. La inactivación de las reacciones se llevó a cabo de la misma forma que para las reacciones BP.

3.3.1. Obtención de líneas de *M. polymorpha* sobreexpresoras de *AtGID1a*

El vector de entrada pDONR207-*AtGID1a* estaba disponible previamente en el laboratorio (Hernández-García et al., 2019). El vector para la sobreexpresión de *AtGID1a* se creó recombinando el clon de entrada pDONR207-*AtGID1a* con el vector destino pMpGWB308 mediante LR-Clonase II™ (Invitrogen). La construcción final EF1α::*AtGID1a*::citrina se utilizó para transformar el genotipo silvestre (Tak-1) de *M. polymorpha*.

3.3.2. Obtención de líneas de *M. polymorpha* sobreexpresoras DELLA QUIMERA

La proteína DELLA QUIMERA fue construida a partir de una reacción en cadena de la polimerasa de extensión solapada (OE-PCR) donde se fusionó el dominio N-terminal de *AtRGA* y el dominio C-terminal de *MpDELLA*. El cebador reverse de *AtRGA* y forward de *MpDELLA*, contienen una cola complementaria a la secuencia de *MpDELLA* y *AtRGA*, respectivamente (Tabla S1). Los extremos attB1 y attB2 se incorporaron a la *DELLA QUIMERA* a partir de una PCR con cebadores específicos (Tabla S1) que poseían las secuencias de las colas recombinantes para la reacción de clonación Gateway™ BP. De esta forma, se pudo recombinar *DELLA QUIMERA* con el vector de entrada pDONR207 mediante BP-Clonase™ (Invitrogen).

El plásmido de sobreexpresión se obtuvo recombinando el vector de entrada con el vector destino pMpGW108 mediante LR-Clonase II™ (Invitrogen). Este vector final se utilizó para transformar las líneas de genotipo silvestre Tak-1.

3.3.3. Obtención de líneas de *M. polymorpha* doble sobreexpresoras de AtGID1a con DELLA QUIMERA

El plásmido de sobreexpresión *DELLA QUIMERA* se obtuvo tal y como se ha descrito en el apartado anterior. El vector final se transfirió a las líneas transgénicas de *M. polymorpha* sobreexpresoras de AtGID1a para obtener líneas de doble sobreexpresión AtGID1a-*DELLA QUIMERA*.

3.3.4. Obtención de líneas de *M. polymorpha* sobreexpresoras de MpGID2

El gen *GID2* de *M. polymorpha*, se sintetizó como gBLOCK (I.D.T.) y se transfirió al vector de entrada pDONR207 mediante BP Clonase II™ (Invitrogen). La construcción final se obtuvo recombinando pDONR207-MpGID2 con el vector destino pMpGWB108 mediante LR-Clonase II™ (Invitrogen). La construcción final EF1 α ::MpGID2::citrina se utilizó para transformar el genotipo silvestre (Tak-1) y el fondo MpDELLA-GR.

3.3.5. Obtención de construcciones para el ensayo de doble híbrido de levadura

Los vectores de entrada pDONR207-AtRGA y pDONR221-MpDELLA estaban disponibles previamente en el laboratorio (Hernández-García et al., 2019). El vector de entrada pDONR207-*DELLA QUIMERA* se obtuvo tal y como se ha descrito en el apartado 3.3.2. Estos tres vectores se recombinaron con el vector destino pGADT7-GW utilizando LR-Clonase II™ (Invitrogen) para fusionar las proteínas DELLA QUIMERA, AtRGA y MpDELLA con el dominio de activación del factor de transcripción GAL4 (AD). Por otro lado, los vectores de entrada pDONR207-AtGID1a, pDONR207-AtGID2 y pDONR207-MpGID2 recombinaron con el vector destino pGBKT7-GW para fusionar las proteínas AtGID1a, AtGID2 y MpGID2 con el dominio de unión al ADN de GAL4 (BD).

Los plásmidos de entrada pDONR207-*DELLA QUIMERA* y pDONR207-MpGID2, obtenidos en este trabajo, se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación Sanger. El resto de los plásmidos de entrada y destino, disponibles previamente en el laboratorio, se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción.

3.3.6. Obtención de líneas de *M. polymorpha* mutadas en *MpGID2*

La edición del gen *MpGID2* se realizó mediante CRISPR/Cas9. Se diseñó una secuencia de RNA guía (sgRNA) específicas para dicho gen (Tabla S2). Para ello se hizo uso de las herramientas disponibles en el sitio web Benchling. El ARN guía se diseñó al inicio de la secuencia codificante de *MpGID2*, concretamente, entre el aminoácido 13 y 17.

3.4. Ensayo de doble híbrido de levadura

Las construcciones genéticas utilizadas en este ensayo se crearon a partir del sistema de clonación Gateway™ descrito anteriormente. Los vectores pGADT7 y pGBKT7 permiten la fusión de las proteínas de interés al dominio de activación (AD) y al dominio de unión (BD) de la proteína GAL4, respectivamente. GAL4 es un factor de transcripción que activa la expresión del gen reportero *HIS3*, que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de histidina (H).

Los ensayos de interacción de proteínas en levaduras se realizaron utilizando la cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de esta cepa deben prepararse frescas para mantener una alta eficiencia de transformación. Por ello, se incubó durante 2 días y a 30 °C una colonia de AH109 en medio nutritivo YPDA (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, adenina 0,2%). La transformación de las levaduras se realizó siguiendo el procedimiento de cotransformación mediado por polietilenglicol (PEG) y Acetato de litio (LiAc) (Lin & Lai, 2017). Las células transformadas fueron seleccionadas por su crecimiento en medio sintético definido (SD) sin leucina (-L) triptófano (-T) que son los marcadores de selección nutricional para los vectores pGADT7 y pGBKT7, respectivamente. Las interacciones de las proteínas se determinaron mediante el requerimiento nutricional de histidina (H) de forma que se usaron placas SD -L-T como control del crecimiento y placas SD-L-T-H suplementadas con 5 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT, Sigma-Aldrich) para evaluar la interacción proteica. A su vez, para evaluar la interacción dependiente de GA₃, el medio se complementó (o no) con 100 μM de GA₃. El goteo de las levaduras sobre las placas se hizo a partir de diluciones seriadas en agua Milli-Q estéril, partiendo de cultivos saturados como dilución 1. Se tomaron fotografías de las mismas diluciones 73 h después de la siembra.

3.5. Análisis de expresión genética

3.5.1. Extracción de ARN, síntesis de cDNA y RT-PCR

Para examinar los niveles de expresión de las líneas transgénicas sobreexpresoras de *AtGID1a*, *MpGID2* y doble sobreexpresora *AtGID1a* con *DELLA QUIMERA* se homogeneizaron en nitrógeno líquido plantas de 14 días de edad y se congelaron a -80°C hasta su uso.

El ARN se extrajo de los talos de cada línea utilizando el kit de extracción de ARN NucleoSpin[™] RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) según las indicaciones del fabricante. El protocolo incluye un paso de eliminación de ADN genómico en columna mediante la DNasa proporcionada por el fabricante. Las concentraciones y la calidad de las muestras de ARN fueron medidas en el espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000.

La síntesis de cDNA se efectuó a partir de la retrotranscripción del ARN total (usando la misma cantidad de ARN para todas las muestras), utilizando el sistema NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech) según las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de PCR semicuantitativa (RT-PCR) se realizaron con la NZYTaq II 2 x Green (NZYTech). El paso inicial de desnaturalización se hizo durante 3 min a 95°C . A continuación, se realizaron ciclos de 35 veces con 30 s a 94°C , 30 s a 56°C y 15 s a 72°C . La extensión final se realizó durante 8 min a 72°C . Los cebadores utilizados para cada línea transgénica se enumeran en la tabla S1.

3.5.2. Extracción de ADN, PCR, purificación de ADN y secuenciación.

Las plantas transgénicas de *Marchantia* sobreexpresoras de *AtGID1a* y mutadas para el gen *MpGID2* se comprobaron mediante amplificación por PCR a partir de extractos crudos de ADN. El programa utilizado es el mismo al descrito para RT-PCR. Los cebadores utilizados se enumeran en la tabla S1. Se confirmaron las gemas derivadas de la primera generación (G1) y sus descendientes se utilizaron para el resto de los experimentos.

Para las líneas mutadas en *MpGID2*, se comprobó la edición de su genoma mediante amplificación por PCR seguida de una secuenciación Sanger.

3.6. Análisis fenotípico

Para el análisis fenotípico de todas las líneas transgénicas creadas, las condiciones de cultivo fueron a 22°C bajo una intensidad lumínica de $200\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 14 días.

Las líneas de *M. polymorpha* sobreexpresoras de MpGID2 y mutadas en MpGID2 se fenotiparon en medio ½ Gamborg B5 con concentraciones crecientes de dexametasona (0 µM, 0,1 µM y 1 µM). Las líneas de genotipo silvestre (Tak-1) y en fondo MpDELLA-GR se utilizaron como control y se fenotiparon a las mismas concentraciones de dexametasona.

Las líneas de *M. polymorpha* sobreexpresora de DELLA QUIMERA y doble sobreexpresora AtGID1a-DELLA QUIMERA se fenotiparon en medio ½ Gamborg B5 con concentraciones crecientes de GAs (0 µM, 10 µM y 100 µM). Las líneas de genotipo silvestre (Tak-1) y sobreexpresoras de AtGID1a se utilizaron como control y se fenotiparon a las mismas concentraciones de GAs.

El tamaño del talo de cada línea fenotipada se cuantificó midiendo el área superficial (cm²) de más de 10 plantas cultivadas a partir de gemas. Todas las mediciones fueron realizadas con ImageJ (Schneider et al., 2012).

3.7. Análisis estadístico

Las diferencias entre los rasgos fenotípicos de las diferentes líneas generadas se evaluaron mediante comparaciones múltiples two-way ANOVA seguidas del test de Tukey HSD utilizando el software GraphPad Prism 5. Los gráficos representan los valores de probabilidad (*p*) mediante el número de asteriscos según la significancia: $p < 0,08$ (*) y $p < 0,05$ (**)

4. RESULTADOS

4.1. Generación de la proteína sintética DELLA QUIMERA

La función de las proteínas DELLA como elementos de señalización de GAs requiere la presencia de motivos específicos en su dominio N-terminal para que interactúen con la proteína GID1 que se comporta como receptora de GAs. Estudios previos han demostrado que las DELLA de musgos y hepáticas presentan algunas modificaciones en este dominio que imposibilitan su respuesta a esta hormona (Hernández-García et al., 2019). Por tanto, para poder engarzar posteriormente AtGID1 a la actividad DELLA, se decidió construir una versión quimérica de la proteína DELLA que contuviera el extremo N-terminal de una DELLA de *A. thaliana*, y el C-terminal (o GRAS) de la DELLA de *M. polymorpha*.

El genoma de *Marchantia* codifica un único gen MpDELLA (Hernández-García et al., 2021). En cambio, en *Arabidopsis* existen cinco genes que codifican las proteínas DELLA (AtGAI, AtRGA, AtRGL1, AtRGL2 y AtRGL3). A excepción de la proteína RGL3, se ha demostrado que todas ellas funcionan como reguladores negativos de la señalización por GAs (Dill et al., 2004). Concretamente, se sabe que AtRGA se expresa en mayor medida que los otros genes en los tejidos vegetativos (Tyler et al., 2004), y que la expresión de AtRGA en el dominio natural de AtRGL2 permite a AtRGA sustituir de forma eficiente las funciones de AtRGL2 (Gallego-Bartolomé et al., 2010). Además, las cinco DELLA de *A. thaliana* son capaces de interactuar de forma similar (aunque no con idéntica afinidad) con los tres receptores GID1 de esa especie (Suzuki et al., 2009). Por todo ello, en el presente trabajo se decidió utilizar el extremo N-terminal de una DELLA cualquiera (AtRGA en concreto) para la elaboración de la proteína DELLA QUIMERA.

El tamaño del fragmento N-terminal de AtRGA a emplear se estableció en base a trabajos previos donde se investigaron los motivos necesarios para la interacción con GID1a (Griffiths et al., 2006; Sun et al., 2010). Para el caso de MpDELLA, el corte del extremo C-terminal se hizo desde el comienzo del dominio GRAS (*Marchantia.info*). Después de la OE-PCR, se produjo la unión de ambos dominios para obtener la proteína DELLA QUIMERA. De forma concreta, está formada por 594 aminoácidos (1785 pb) de los cuales, los primeros 207 componen el extremo N-terminal y el resto pertenecen al extremo C-terminal (Figura 5).

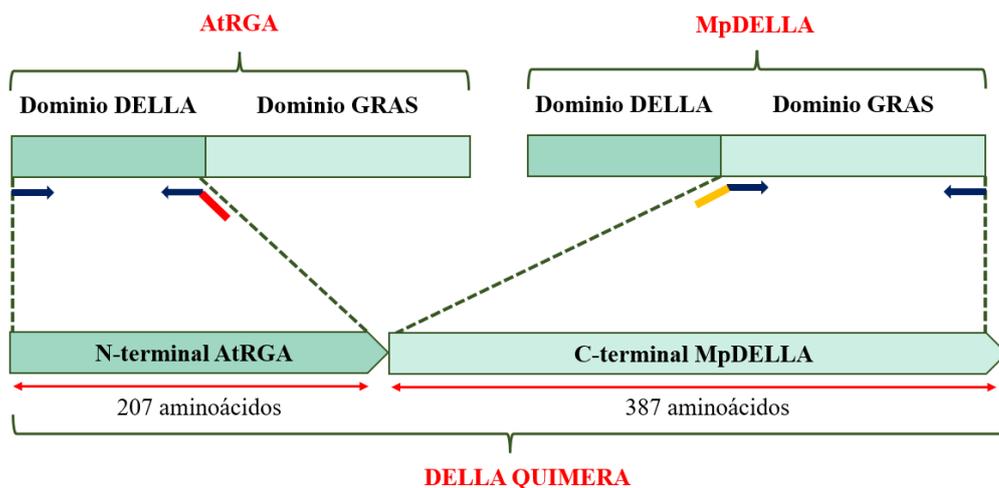


Figura 5: Construcción de una versión sintética de la proteína DELLA QUIMERA. En rojo y naranja se ilustra la cola de los cebadores complementaria a la secuencia de MpDELLA y AtRGA, respectivamente

4.2. AtGID1a interactúa con DELLA QUIMERA de forma dependiente a GAs

La conexión de DELLA QUIMERA con el módulo de percepción de GAs requiere la interacción física entre ella y los demás componentes que intervienen en la ruta de señalización por GAs. Para comprobar esta interacción se llevó a cabo el ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H). Este sistema consiste en la unión de cada una de las proteínas de estudio al dominio de unión (BD) y al dominio de activación (AD) del factor de transcripción GAL4 respectivamente, que regula la expresión del gen reportero *HIS3* que codifica una histidina sintetasa. Con este método de selección, se puede establecer de manera aproximada la fuerza de interacción proteica dependiendo del umbral de resistencia al 3-aminotriazol (3-AT) en medio carente de histidina.

Estudios anteriores han demostrado que las proteínas DELLA son capaces de autoactivar la expresión de genes reporteros cuando se expresan en levadura como fusiones de proteínas a BD, especialmente si contienen el extremo N-terminal (Dill et al., 2004), por lo que, en este trabajo, cada una de las DELLA se expresaron en levadura como fusiones de proteínas a AD.

Tanto la proteína AtRGA como DELLA QUIMERA mostraron tener interacción potencial con la proteína GID1a de *Arabidopsis* en presencia de GA₃ (Figura 6). Esta observación está en línea con resultados previos donde se demuestra la necesidad del dominio DELLA para que se produzca la unión con GID1 (Griffiths et al., 2006). Tal y como Hernández-García et al. (2019) ya demostraron, la DELLA de *Marchantia* no fue capaz de interactuar con AtGID1a (Figura

6). No obstante, sí pudo interactuar fuertemente con SLY/GID2 de *Marchantia* y *Arabidopsis*, tanto en presencia como ausencia de GA₃ (Figura 6). Esto es compatible con la hipótesis que esta F-box participa en la regulación de la estabilidad de la proteína DELLA de *Marchantia*. El que la interacción sea independiente de GA₃ implica que dicha regulación podría ser independiente de la formación del complejo GID1-GA₃. Para el caso de la proteína DELLA QUIMERA, ocurre algo parecido ya que también se apreció una fuerte interacción con MpGID2 y AtGID2. Estos resultados apoyan la idea de que el dominio GRAS de la proteína DELLA es suficiente para que se produzca la unión con la proteína F-box GID2.

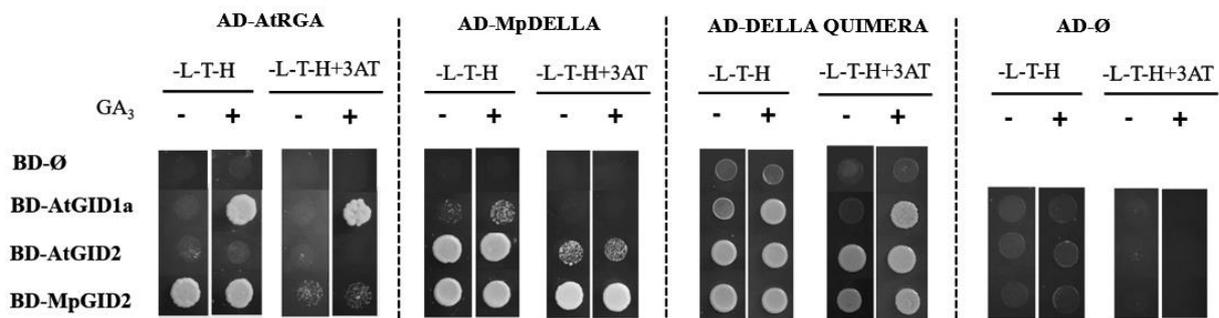


Figura 6: Ensayo Y2H entre las proteínas AtRGA, MpDELLA y DELLA QUIMERA, con el receptor GID1a de *Arabidopsis* y la proteína F-box GID2 de *Arabidopsis* y *Marchantia*, con o sin 100 µM de GA₃. AD y BD denotan fusiones al dominio de unión al ADN de GAL4 y al dominio de activación, respectivamente.

En contraste con estudios previo (Davière et al., 2008; Dill et al., 2004), la interacción que se produce entre AtRGA y AtGID2 en levadura no se consiguió detectar. Esto puede sugerir que se necesitan de otros componentes que intensifiquen la unión entre ambas proteínas. No ocurre lo mismo para el caso de MpGID2, ya que en ausencia o presencia de GA₃, se promueve la interacción directa con AtRGA, pero en presencia de 3-AT dicha interacción se hizo más débil, con o sin GA₃. Esto apunta a que MpGID2 es suficiente para que se produzca una interacción con las DELLA y a diferencia de AtGID2, puede ser una interacción que no dependa de otros componentes.

4.3. La expresión de AtGID1a y DELLA con N-terminal de plantas vasculares son suficientes para conferir sensibilidad a GAs en *M. polymorpha*

Dado que la proteína MpDELLA no interacciona con AtGID1a (Figura 6), es de esperar que la sobreexpresión en *M. polymorpha* de AtGID1a bajo el control del promotor constitutivo

MpEF1 α no cause ningún efecto en el fenotipo. Para comprobarlo se generaron transformantes y se verificó por PCR semicuantitativa la presencia del transcrito correspondiente en dichas transgénicas (Figura 7). Las 9 líneas obtenidas mostraron la sobreexpresión de AtGID1a, con la línea #12 como una de las que alcanzaba niveles más altos. En esta línea, y en el silvestre Tak-1 se introdujo entonces la construcción de DELLA QUIMERA expresada también bajo el control del promotor MpEF1 α .

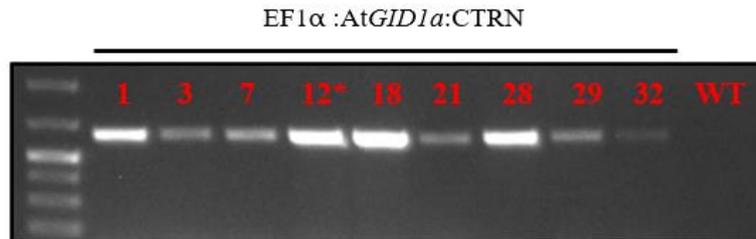


Figura 7: RT-PCR de las líneas transformantes de *Marchantia* que mostraron tener sobreexpresión de AtGID1a, siendo la línea #12 la que se seleccionó para retransformar con DELLA QUIMERA sobreexpresora.

Entre todos los procesos regulados por las GAs en *A. thaliana* figura la promoción del crecimiento. Sin embargo, como era de esperar, la aplicación de hasta 100 μ M GA₃ a gemas de *M. polymorpha* no tuvo ningún efecto sobre el tamaño de los talos en el silvestre Tak-1 o de los de la línea sobreexpresora DELLA QUIMERA #3 (DELLA QUIMERAox #3), ninguna de las cuales expresa un receptor de GAs (Figura 8). En la línea #12 sobreexpresora de AtGIDa (AtGID1aox #12) la aplicación de cantidades crecientes de GA₃ (10 μ m y 100 μ m) tuvo un mínimo efecto en la promoción del crecimiento, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 8). Por el contrario, las plantas de la línea #1 doble sobreexpresora de AtGID1a y DELLA QUIMERA sí que aumentaron de forma significativa su tamaño tras la aplicación de GA₃, especialmente a la concentración de 100 μ M (Figura 8). Este efecto no se observó, sin embargo, en las otras dos líneas examinadas (AtGID1aox DELLA QUIMERAox #4 y AtGID1aox DELLA QUIMERAaox #8), donde, a pesar de crecer en presencia de GA₃, no hay diferencias significativas en el tamaño de la superficie del talo respecto a la línea #12 sobreexpresora del receptor del GAs.

Los resultados de la línea #1 doble sobreexpresora de AtGID1a y DELLA QUIMERA son prometedores puesto que sugieren una reconstrucción de la sensibilidad de GAs en *Marchantia* a través de la expresión de GID1 y la proteína DELLA QUIMERA. No obstante, por PCR

semicuantitativa no se consiguió demostrar la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína sintética, por lo que, en análisis futuros se elucidará si realmente las plantas de esta línea expresan la *DELLA QUIMERA*.

Estos resultados, en conjunto, son compatibles con la idea de que la introducción de *AtGID1a* permite la interacción *in vivo* con una *DELLA* sintética que contiene el N-terminal de una *DELLA* de plantas vasculares, y que dicha interacción es dependiente de GAs y tiene un efecto negativo sobre la actividad de dicha *DELLA*.

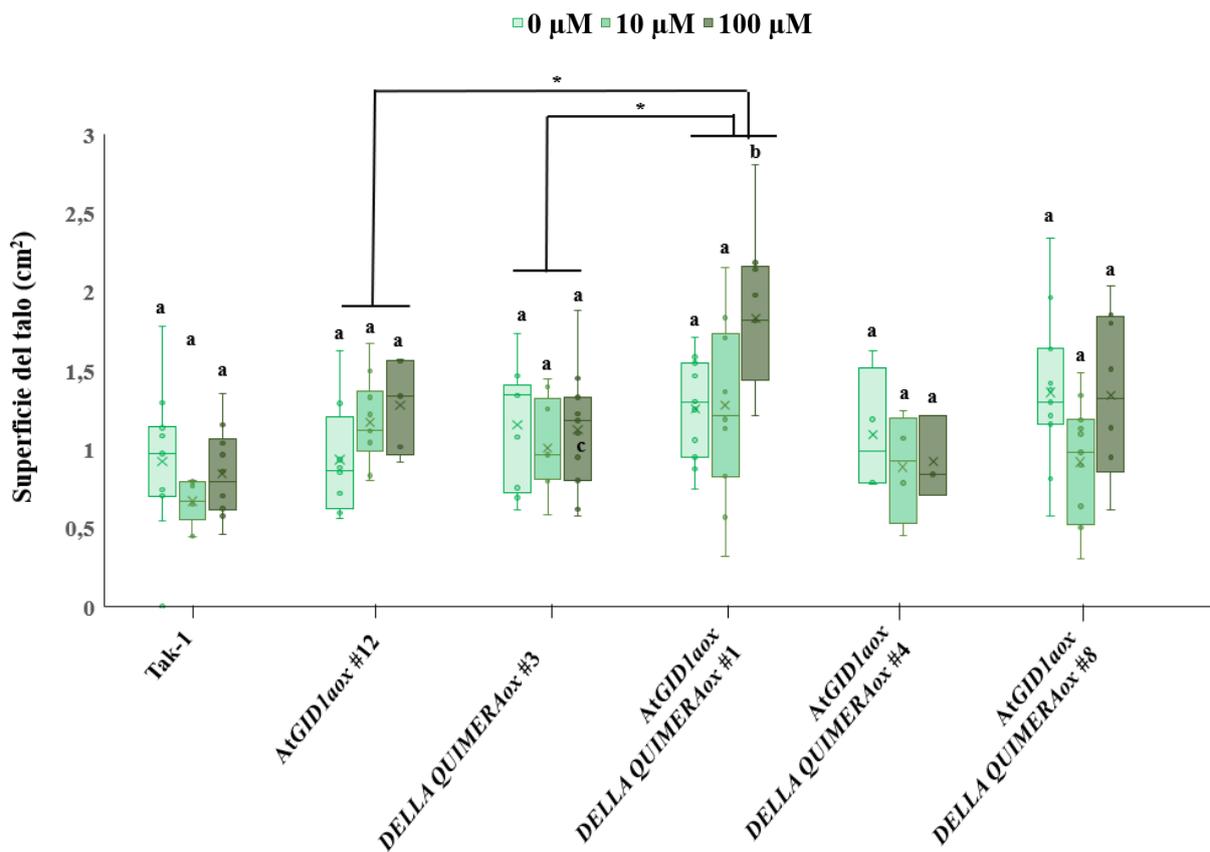


Figura 8: Medidas de área del talo de plantas control y doble sobreexpresoras *AtGID1a* *DELLA QUIMERA* con 14 días de edad cultivadas en condiciones control (0 μM) y en presencia de concentraciones crecientes de GA₃ (10 μM y 100 μM). Para todas las líneas, el número de plantas fenotipadas fue $n \geq 10$. Los valores de cada línea y para cada tratamiento que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0,08$ (*). En cada box plots se representa la media aritmética como una cruz, la mediana como una raya horizontal y los datos como puntos.

4.4. MpGID2 es necesario y suficiente para regular el crecimiento mediado por MpDELLA en *M. polymorpha*

La aparición de la proteína GID2 fue anterior al origen de las traqueófitas y por tanto al origen de la señalización de GAs que se da en plantas vasculares. Esto hace que se cuestione el hecho de si esta proteína es capaz de interactuar con la DELLA de briófitas para promover su regulación aun no habiendo sensibilidad a GAs. Además, como se ha visto con los resultados de Y2H (Figura 6), MpGID2 es capaz de interactuar con MpDELLA lo que es consistente con una posible regulación de la proteína de forma independiente a GAs. Para comprobarlo, se estableció una comparativa de que ocurre con el tamaño del talo de *M. polymorpha* cuando se sobreexpresa y se muta MpGID2 en fondo silvestre Tak-1 y en fondo MpDELLA:GR. Este último fondo es una línea inducible que expresa constitutivamente MpDELLA fusionada con el receptor de glucocorticoides de rata. Lo que se espera con este fondo es que se produzca una acumulación de la proteína en el núcleo inducido por dexametasona (DEX). y con ello una inhibición del crecimiento vegetativo. De esta forma, se examinó el crecimiento de la superficie del talo para cada una de las líneas en ausencia (0 μ M) y presencia (0,1 μ M y 1 μ M) de DEX.

La sobreexpresión de MpGID2 se hizo bajo el control del promotor constitutivo MpEF1 α y, mediante RT-PCR se demostró que tan solo la línea #9 en fondo MpDELLA-GR parece sobreexpresar MpGID2 (Figura 9A). Para el caso de las líneas de pérdida de función Mpgid2, los resultados de secuenciación mostraron que solo las líneas #8 y #19 en fondo MpDELLA:GR tenían MpGID2 editado (Figura 9B). Además, estas mutaciones causan la presencia de un codón stop prematuro a través de un cambio de lectura.

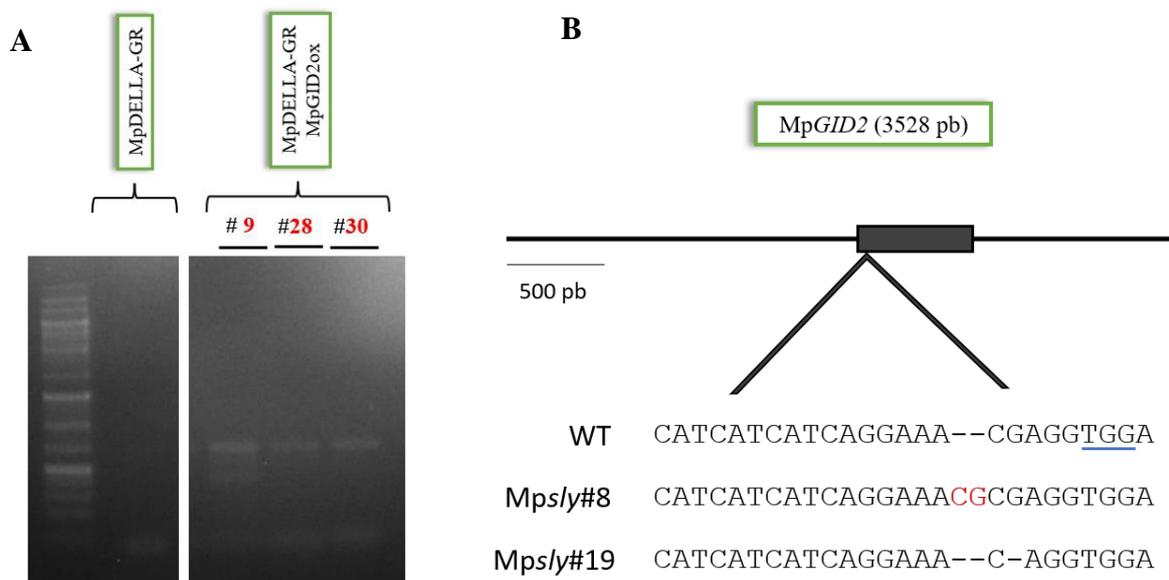


Figura 9: (A) RT-PCR de las líneas transformantes de MpDELLA-GR. Solo la línea #9 aparenta tener sobreexpresión de MpGID2 (B) Diagrama del gen MpGID2. La secuencia PAM está subrayada en la secuencia de la línea silvestre (WT). Las deleciones de pares de bases se representan con un guion (-) y las inserciones mediante tipografía roja.

Por un lado, la aplicación de DEX sobre la línea silvestre Tak-1 no tuvo ningún efecto sobre el tamaño de los talos (Figura 10). En la línea MpDELLA-GR, en cambio, si se aprecia una disminución significativa del tamaño tras aplicar 0,1 μM y 1 μM de DEX, lo cual es razonable debido a que se induce la acumulación de proteínas DELLA en el núcleo de las plantas (Figura 10).

Ante condiciones crecientes de dexametasona, las líneas mutadas (MpDELLA-GR Mpgid2 #8 y #19) mostraron tener una escalonada reducción de la superficie del talo estadísticamente significativa respecto a MpDELLA-GR (Figura 10). De hecho, para ambas líneas se aprecia una reducción aun mayor a la concentración de 1 μM de DEX (Figura 10). Estos datos apoyan la hipótesis de que MpGID2 es imprescindible para reprimir la detención del crecimiento mediada por MpDELLA en *Marchantia*.

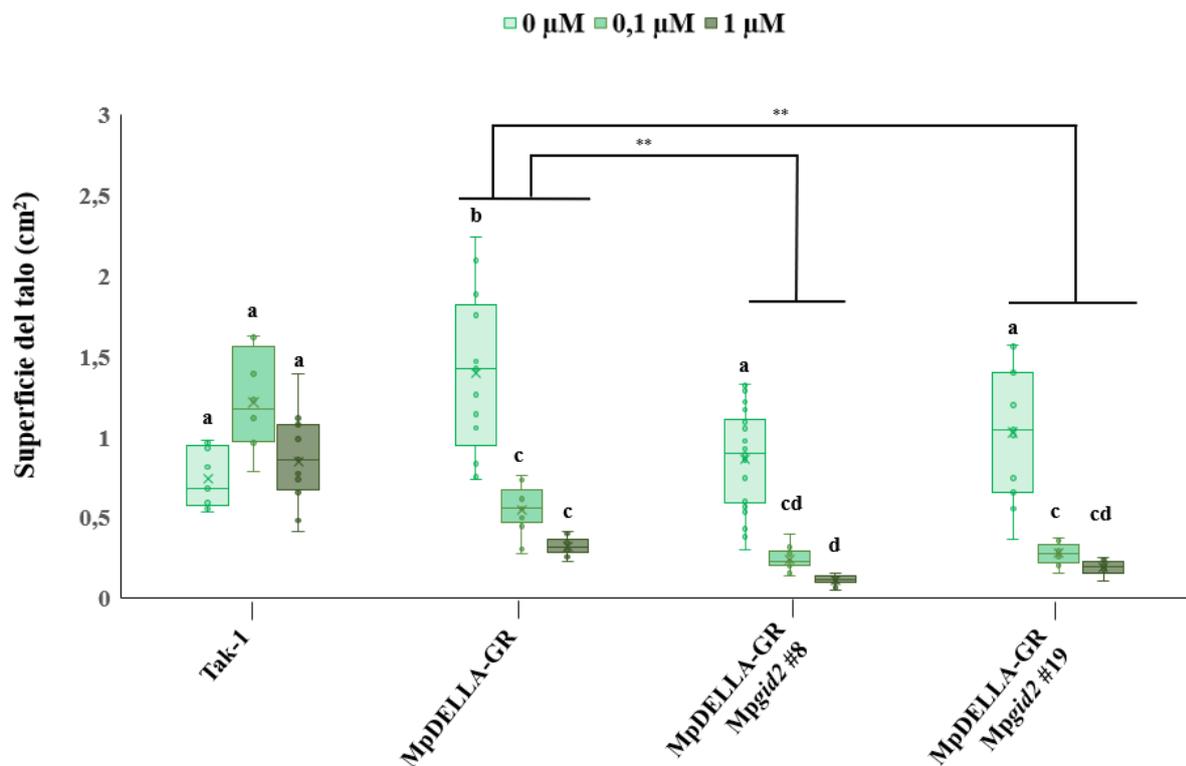


Figura 10: Medidas de área del talo de plantas control y mutantes de MpGID2 con 14 días de edad cultivadas en condiciones control (0 μM) y en presencia de concentraciones crecientes

de DEX (0,1 μM y 1 μM). Para todas las líneas, el número de plantas fenotipadas fue $n \geq 10$. Los valores de cada línea y para cada tratamiento que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0,08$ (*) y $p < 0,05$ (**). En cada box plots se representa la media aritmética como una cruz, la mediana como una raya horizontal y los datos como puntos.

Por otro lado, los resultados de sobreexpresión de MpGID2 (Figura 11) mostraron que la inhibición del crecimiento causada por la activación de MpDELLA:GR se atenuó en la línea #9 sobreexpresora de MpGID2 tanto en ausencia (0 μM) como presencia (0,1 μM y 1 μM) de DEX de forma que se puede dilucidar que la expresión de MpGID2 es suficiente para la restricción del crecimiento mediada por MpDELLA. Sin embargo, en las líneas #28 y #30 aparentemente no se vio el mismo efecto, lo cual es lógico debido a que no se evidenció una sobreexpresión clara de MpGID2. En conjunto, estos resultados sugieren que MpGID2 regula MpDELLA de forma independiente a GAs en *M. polymorpha*.

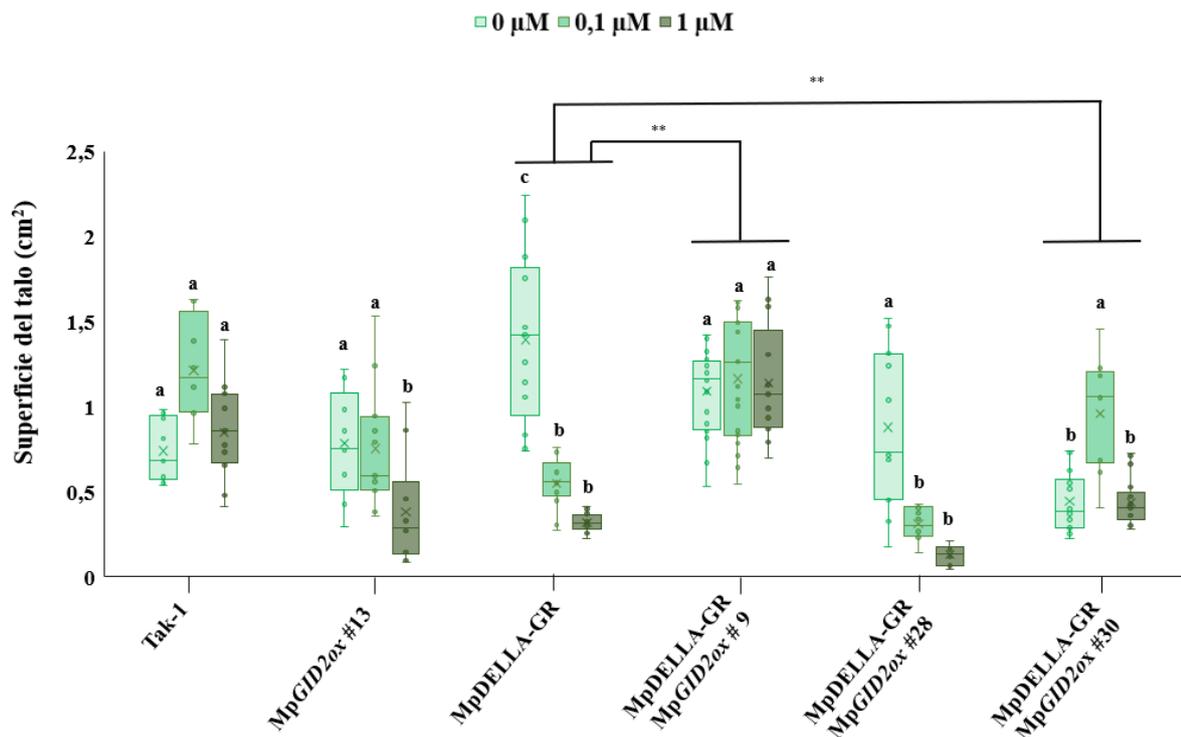


Figura 11: Medidas de área del talo de plantas control y sobreexpresoras de MpGID2 con 14 días de edad cultivadas en condiciones control (0 μM) y en presencia de concentraciones crecientes de DEX (0,1 μM y 1 μM). Para todas las líneas, el número de plantas fenotipadas fue $n \geq 10$. Los valores de cada línea y para cada tratamiento que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0,05$ (**). En cada box plots se representa la media aritmética como una cruz, la mediana como una raya horizontal y los datos como puntos.

5. DISCUSIÓN

Uno de los hitos más importantes en la evolución de la vida en la tierra ocurrió hace aproximadamente 500 millones de años, tras la colonización de los hábitats terrestres por descendientes de algas estreptófitas (Donoghue et al., 2021). Este exitoso evento evolutivo fue posible gracias al desarrollo de mecanismos que permiten a las plantas adaptarse y hacer frente a los retos impuestos por la superficie terrestre. Tal y como se ha comentado en este trabajo, el origen de las vías de señalización hormonal, concretamente las GAs, juegan un papel fundamental que facilitan esta adaptación. No obstante, no todas las plantas terrestres perciben esta hormona y aun así son capaces de sobrevivir en el medio terrestre. De hecho, cada vez son más las pruebas que descartan cualquier forma de señalización y percepción de GAs en briófitas y se asocia directamente con las traqueófitas (Figura 12 A) (Hirano et al., 2007). Por ello, uno de los principales objetivos de este trabajo fue crear una planta briofita capaz de percibir GAs y así comprender si esta capacidad confiere una mayor adaptabilidad a las plantas. Desde este punto de vista, se empleó la estrategia de biología sintética para programar el comportamiento de la hepática *M. polymorpha* utilizando partes genéticas que se combinan de forma racional y permitirán inferir si tenemos conocimientos suficientes para recrear la señalización de GAs en una planta que no responde a ella. Para conseguir esto, se realizó un par de modificaciones en *Marchantia* que le proporcionasen una vía de señalización de GAs similar a la de las plantas vasculares. En primer lugar, esta hepática fue transformada con el receptor de GAs *GID1* de *A. thaliana*, ya que es el principal componente de la ruta que no está codificado por el genoma de *M. polymorpha* (Bowman et al., 2017). En segundo lugar, se generó una versión quimérica de la proteína DELLA (compuesta por el extremo N-terminal de *AtRGA* y el C-terminal de *MpDELLA*) que podría interactuar con *GID1* y establecer una respuesta a esta hormona. Por ello, esta nueva versión de la proteína DELLA se usó para retransformar las líneas de *Marchantia* que expresaban el receptor de GAs.

Para constatar si la DELLA QUIMERA puede interactuar con *GID1* de forma dependiente de GAs, se realizó un Y2H a partir del cual se demostró que, efectivamente esta proteína solo interactúa con *AtGID1a* en presencia de GA_3 , tal y como ocurre en *A. thaliana* (Phokas & Coates, 2021). Ahora bien, para comprender si esta planta “sintética” de *Marchantia* era capaz de responder a la hormona *in vivo*, se cultivaron las plantas sobreexpresoras de *AtGID1a* y doble sobreexpresoras *AtGID1a DELLA QUIMERA*, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de GA_3 para medir su crecimiento. Este experimento ha demostrado que, las

plantas de *AtGID1aox* tuvieron un mínimo efecto en la promoción del crecimiento tras la aplicación de GA₃, apoyando así la teoría de que las plantas no vasculares son insensibles a la hormona debido a la ausencia de una proteína DELLA capaz de regular la respuesta a GAs. A su vez, no se observaron diferencias de tamaño entre las plantas *DELLA QUIMERAox* y las de la línea silvestre, respaldando así la hipótesis de que en briófitas se necesita de un receptor de GAs para desencadenar la regulación transcripcional mediada por DELLA. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con el genotipo silvestre de *Marchantia* (Figura 12 B), la nueva versión “sintética” de la planta es sensible a la hormona (Figura 12 C), aunque, es cierto que este resultado requiere una validación adicional con RT-PCRs para entender los diferentes niveles de expresión de la *DELLA QUIMERA* en las distintas líneas transformantes. Estos resultados, en conjunto, sientan la base para realización de experimentos más refinados que permitan comprender mejor el valor adaptativo de la señalización de GAs comparando como responden a la hormona las plantas silvestres de *Marchantia* y la versión sintética en diferentes condiciones ambientales. Como se ha visto, estos resultados ponen de relieve el poder de la biología sintética para adquirir una plena comprensión de una vía de desarrollo hormonal, ya que demuestra que los conocimientos actuales son suficientes para recrear la vía de señalización de GAs en una planta cuya ruta no está completamente ensamblada.

Una vez creada la capacidad de percibir GAs en briófitas (Figura 12 C), una posible estrategia futura, es reconstruir la ruta de biosíntesis de GAs en *M. polymorpha* tal y como se conoce en plantas vasculares. Para ello, será necesario un enfoque de biología sintética más refinado y complejo, pero permitirá comprender mejor el valor adaptativo de las GAs y su señalización en las plantas, ya que prescinde de una suplementación exógena de la hormona en todos los montajes experimentales. Además, se podría añadir cualquier capacidad reguladora (ya sea por una señal interna o externa) a la vía de biosíntesis con el uso de promotores específicos que promuevan la expresión de las enzimas implicadas en la biosíntesis de GAs en *Marchantia*. De hecho, ya se han visto otros abordajes de biología sintética similares para el ajuste de GAs bioactivas en plantas (He et al., 2020) de forma que se podrían considerar y rediseñar otros factores relacionados con la hormona, como la transducción de señales o las interacciones con otras fitohormonas que permitan impulsar a mayor escala la creación de plantas especialmente adaptables a entornos específicos.

La regulación de las proteínas DELLA en briófitas es un tema del cual hay muy poco conocimiento y no está del todo claro si los homólogos de los componentes que se sabe que regulan las DELLA en plantas vasculares se conservan funcionalmente en las no vasculares. Lo

que sí se sabe que MpDELLA impide el crecimiento en *Marchantia* principalmente a través de la inhibición de la división celular en la parte apical del talo (Hernández-García et al., 2021). En el presente trabajo se ha visto que en *M. polymorpha* “sintética” se da una regulación del crecimiento mediada por GAs, sugiriendo así, que la maquinaria que promueve la degradación de MpDELLA está activa en la planta. De hecho, se sabe que el genoma de *Marchantia* codifica un ortólogo de la proteína F-box SLY1/GID2, pero, a diferencia de lo que ocurre en traqueófitas, se desconoce si su función está conservada en briófitas y aun no se han confirmado la implicación de MpGID2 en la degradación de MpDELLA (El Mahboubi & Delaux, 2021). Mediante el ensayo de Y2H, se ha demostrado que MpDELLA es capaz de interactuar con MpGID2 y, para probar si esta proteína F-box es capaz de regular la represión del crecimiento dependiente de MpDELLA, se generaron líneas de pérdida de función mediante el sistema CRISPR/Cas9 y líneas sobreexpresoras de MpGID2 en un fondo de *M. polymorpha* que contiene la proteína DELLA fusionada a un receptor de glucocorticoides de rata. Tras el tratamiento con DEX, las líneas mutantes *Mpgid2* mostraron un deterioro del crecimiento inducido posiblemente por la acumulación de MpDELLA en los núcleos de las células, mientras que las líneas transformantes que sobreexpresaban MpGID2 mostraron el efecto contrario, es decir, un aumento en el crecimiento de la superficie de los talos promovida posiblemente por la degradación de MpDELLA. Estos resultados no solo sugieren que MpGID2 es necesaria, sino que también es suficiente para regular la represión de crecimiento mediada por DELLA en *M. polymorpha*, lo que concuerda con la hipótesis de que MpGID2 promueve la degradación de DELLA en este briófito.

La función de la proteína F-box está conservada en plantas terrestres y podría desempeñar un papel en la degradación de toda la familia DELLA en respuesta a GAs (McGinnis et al., 2003). Sin embargo, la degradación de la proteína DELLA parece estar promovida por una red reguladora diferente entre traqueófitas y briófitas. Por un lado, en plantas vasculares, GID2 promueve la degradación de DELLA cuando esta proteína forma un complejo con GID1-GA (Figura 12 A). En plantas no vasculares, en cambio, GID2 promueve la degradación de DELLA de manera independiente a la presencia de GAs (Figura 12 B). Esto permite especular que la regulación del nivel de la proteína DELLA por GID2 es un mecanismo ancestral que operó en las primeras plantas terrestres y que posteriormente ha ido evolucionando hasta conferir una complejidad reguladora dependiente de GAs, concretamente en el linaje de plantas vasculares. Además, sería interesante profundizar la regulación de MpDELLA dependiente de MpGID2 a nivel espacio-tiempo para entender mejor los mecanismos de crecimiento de *M. polymorpha*.

A modo de resumen, este trabajo ha permitido establecer las bases para posteriores análisis que dilucidarán el valor adaptativo de la señalización de GAs en plantas y además comprender mejor como se regula la actividad de la proteína DELLA en briófitas para inferir de qué manera han evolucionado tales mecanismos en plantas. Los resultados preliminares sugieren que la expresión de un receptor de GAs y de una proteína DELLA quimérica capaz de interactuar con dicho receptor, son suficientes para conferir sensibilidad a GAs en briofitas. Además, también se ha demostrado que, en plantas no vasculares, la represión del crecimiento mediada por DELLA está regulada por GID2 de forma independiente a GAs y esto se contrasta con lo que ocurre en plantas vasculares. Esta evolución independiente de estos mecanismos reguladores en los dos linajes de plantas terrestres podría ser uno de los factores que subyacen a la enorme diversidad de formas vegetales y a la adaptación a diferentes nichos ecológicos.

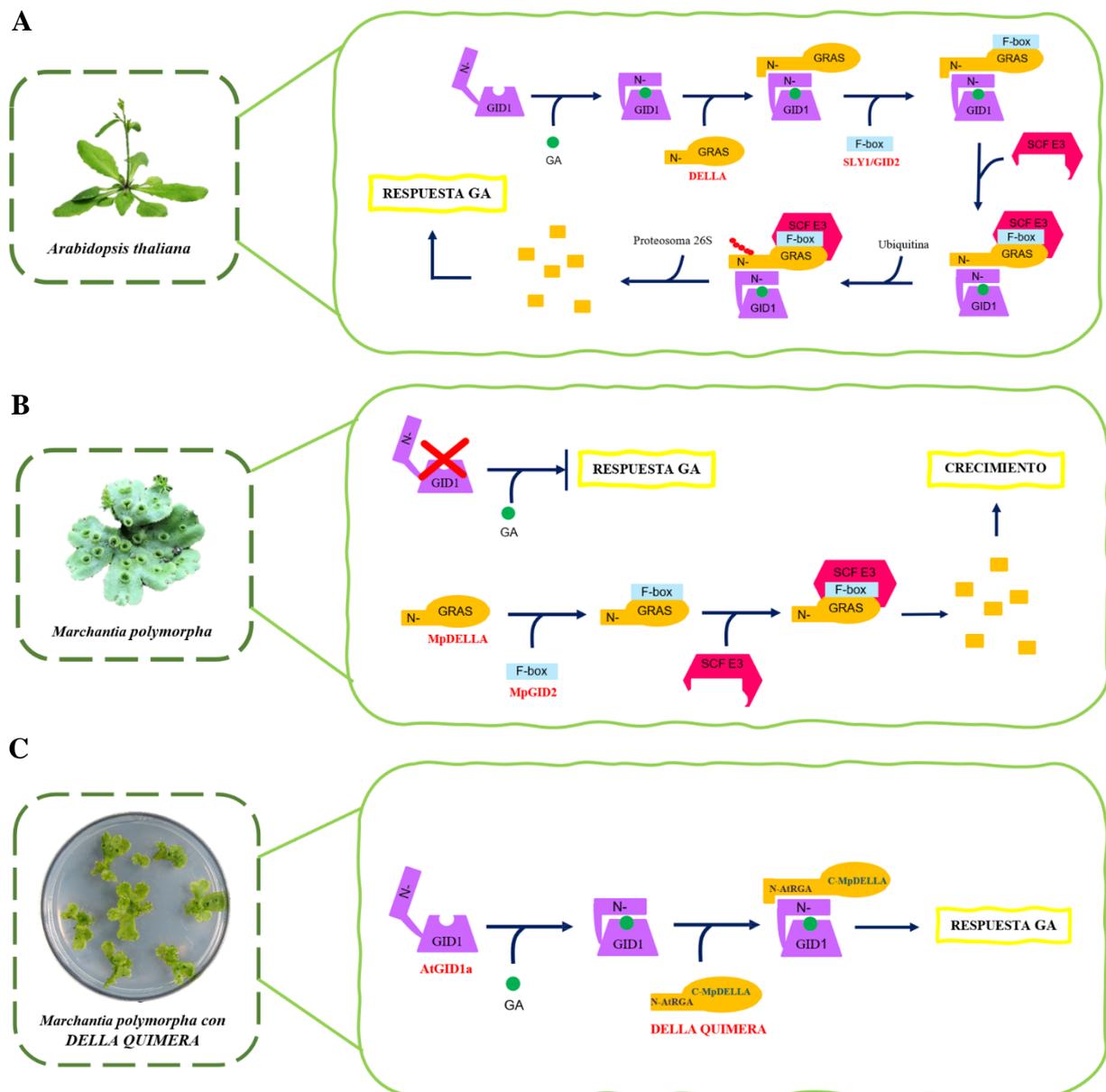


Figura 12: Modelos propuestos de señalización de GAs que resumen lo que hemos visto en este trabajo. (A) Respuesta a GA mediada por GID1 en *A. thaliana*. (B) En *M. polymorpha* no hay respuesta a GA en presencia de la hormona debido a la ausencia del receptor GID1. MpGID2 promueve la degradación de DELLA de forma independiente a GAs promoviendo así su crecimiento posiblemente a través de SCF E3. (C) La expresión de AtGID1 y DELLA QUIMERA confieren sensibilidad a GA en *M. polymorpha*.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

1. Mediante biología sintética se puede construir una proteína DELLA quimérica capaz de actuar en *M. polymorpha*.
2. La expresión del receptor de GAs de *Arabidopsis* y una DELLA QUIMERA son suficientes para reconstruir la vía de señalización de GAs en *M. polymorpha*.
3. La proteína MpGID2 es necesaria y suficiente para establecer una relación funcional con procesos regulados por MpDELLA.
4. La diversificación de los mecanismos reguladores de las proteínas DELLA podrán ser una de las causas que contribuyeron a la radiación morfológica y de la capacidad de las plantas terrestres para adaptarse a diferentes nichos ecológicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., & Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, *60*(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern301>
- Achard, P., Renou, J. P., Berthomé, R., Harberd, N. P., & Genschik, P. (2008). Plant DELLAs Restrict Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current Biology*, *18*(9), 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
- Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2008). Integration of light and hormone signals. *Plant Signaling and Behavior*, *3*(7), 448–449. <https://doi.org/10.4161/psb.3.7.5558>
- Archibald, J. M. (2015). Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(33), 10147–10153. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421374112>
- Baltes, N. J., & Voytas, D. F. (2015). Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends in Biotechnology*, *33*(2), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.11.008>
- Becker, B., & Marin, B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany*, *103*(7), 999–1004. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp044>
- Blázquez, M. A., Nelson, D. C., & Weijers, D. (2020). Evolution of Plant Hormone Response Pathways. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 327–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100309>
- Bowman, J. L., Briginshaw, L. N., Fisher, T. J., & Flores-Sandoval, E. (2019). Something ancient and something neofunctionalized—evolution of land plant hormone signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, *47*, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.09.009>
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S. S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M. A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C. R., ... Schmutz, J. (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*, *171*(2), 287–304.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>
- Boyce, C. K., & Lee, J. E. (2017). Plant Evolution and Climate over Geological Timescales. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, *45*(May), 61–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-015629>
- Brones-Moreno, A., Hernández-García, J., Vargas-Chávez, C., Romero-Campero, F. J., Romero, J. M., Valverde, F., & Blázquez, M. A. (2017). Evolutionary analysis of DELLA-associated transcriptional networks. *Frontiers in Plant Science*, *8*(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00626>
- Cannell, N., Emms, D. M., Hetherington, A. J., MacKay, J., Kelly, S., Dolan, L., & Sweetlove, L. J. (2020). Multiple Metabolic Innovations and Losses Are Associated with Major Transitions in Land Plant Evolution. *Current Biology*, *30*(10), 1783–1800.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.086>
- Chen, Y. Y., Galloway, K. E., & Smolke, C. D. (2012). Conceptual frameworks for biological design Synthetic biology: advancing biological frontiers by building synthetic systems. *Genome Biology*, *13*, 240. <http://genomebiology.com/2012/13/2/240>
- Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., Wittek, S., Reder, T., Günther, G., Gontcharov, A., Wang, S., Li, L., Liu, X., Wang, J., Yang, H., ... Melkonian, M. (2019). Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land Plant Evolution. *Cell*, *179*(5), 1057–1067.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.019>
- Claeys, H., De Bodt, S., & Inzé, D. (2014). Gibberellins and DELLAs: Central nodes in growth regulatory networks. *Trends in Plant Science*, *19*(4), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.001>
- Crisuolo, A., & Gribaldo, S. (2011). Large-Scale phylogenomic analyses indicate a deep origin of primary plastids within cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(11), 3019–3032. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr108>
- Davière, J. M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development (Cambridge)*, *140*(6), 1147–1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>
- Davière, J. M., de Lucas, M., & Prat, S. (2008). Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA

- function. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(4), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.05.004>
- De Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E., & Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451(7177), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature06520>
- de Vries, J., & Gould, S. B. (2018). The monoplastidic bottleneck in algae and plant evolution. *Journal of Cell Science*, 131(2), 1–13. <https://doi.org/10.1242/jcs.203414>
- Delaux, P. M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C. J., Sederoff, H. W., Stevenson, D. W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M. R., Dunand, C., Morris, R. J., Roux, C., ... Ane, J. M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., & Sun, T. P. (2004). The arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*, 16(6), 1392–1405. <https://doi.org/10.1105/tpc.020958>
- Donoghue, P. C. J., Harrison, C. J., Paps, J., & Schneider, H. (2021). The evolutionary emergence of land plants. *Current Biology*, 31(19), R1281–R1298. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.038>
- El Mahboubi, K., & Delaux, P. M. (2021). Plant biology: Two green revolutions mediated by DELLA. *Current Biology*, 31(16), R1001–R1003. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.024>
- Engstrom, E. M. (2011). Phylogenetic analysis of GRAS proteins from moss, lycophyte and vascular plant lineages reveals that GRAS genes arose and underwent substantial diversification in the ancestral lineage common to bryophytes and vascular plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(6), 850–854. <https://doi.org/10.4161/psb.6.6.15203>
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L. M., & Deng, X. W. (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature*, 451(7177), 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature06448>
- Fu, X., Richards, D. E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., & Harberd, N. P. (2004). The arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*, 16(6), 1406–1418. <https://doi.org/10.1105/tpc.021386>
- Fürst-Jansen, J. M. R., De Vries, S., De Vries, J., & De Vries, J. (2020). Evo-physio: On stress responses and the earliest land plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(11), 3254–3269. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa007>
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Marín, J. A., Prat, S., Blázquez, M. A., & Alabadí, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between della proteins in arabidopsis. *Molecular Biology and Evolution*, 27(6), 1247–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq012>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., & Matsuoka, M. (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant Journal*, 37(4), 626–634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01990.x>
- Grau Enguix, F. (2017). Genética Química aplicada a la señalización por giberelinas y fosfato en Arabidopsis (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z. L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A. L., Hedden, P., Sun, T. P., & Thomas, S. G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(12), 3399–3414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047415>
- Han, X., Chang, X., Zhang, Z., Chen, H., He, H., Zhong, B., & Deng, X. W. (2019). Origin and Evolution of Core Components Responsible for Monitoring Light Environment Changes during Plant Terrestrialization. *Molecular Plant*, 12(6), 847–862. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.04.006>
- Harberd, N. P., Belfield, E., & Yasumura, Y. (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory

- mechanism: How an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell*, *21*(5), 1328–1339. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066969>
- Hayashi, K. I., Horie, K., Hiwatashi, Y., Kawaide, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Nakashima, T., Nakajima, M., Mander, L. N., Yamane, H., Hasebe, M., & Nozaki, H. (2010). Endogenous diterpenes derived from entkaurene, a common gibberellin precursor, regulate protonema differentiation of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology*, *153*(3), 1085–1097. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157909>
- He, J., Xin, P., Ma, X., Chu, J., & Wang, G. (2020). Gibberellin Metabolism in Flowering Plants: An Update and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *11*(May), 5–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00532>
- Hedden, P., & Thomas, S. G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, *444*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20120245>
- Hernández-García, J., Briones-Moreno, A., & Blázquez, M. A. (2021). Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *109*(May 2020), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.009>
- Hernández-García, J., Briones-Moreno, A., Dumas, R., & Blázquez, M. A. (2019). Origin of Gibberellin-Dependent Transcriptional Regulation by Molecular Exploitation of a Transactivation Domain in DELLA Proteins. *Molecular Biology and Evolution*, *36*(5), 908–918. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz009>
- Hernández-García, J., Sun, R., Serrano-Mislata, A., Inoue, K., Vargas-Chávez, C., Esteve-Bruna, D., Arbona, V., Yamaoka, S., Nishihama, R., Kohchi, T., & Blázquez, M. A. (2021). Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Current Biology*, *31*(16), 3678–3686.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.010>
- Hirano, K., Nakajima, M., Asano, K., Nishiyama, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Katoh, E., Xiang, H., Tanahashi, T., Hasebe, M., Banks, J. A., Ashikari, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., & Matsuoka, M. (2007). The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, *19*(10), 3058–3079. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051524>
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K. T., & Kohchi, T. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant and Cell Physiology*, *49*(7), 1084–1091. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn085>
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., & Kohchi, T. (2016). Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant and Cell Physiology*, *57*(2), 262–270. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv097>
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., & Kohchi, T. (2013). Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *77*(1), 167–172. <https://doi.org/10.1271/bbb.120700>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *31*(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, *91*(10), 1535–1556. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>
- Liu, W., & Stewart, C. N. (2015). Plant synthetic biology. *Trends in Plant Science*, *20*(5), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.02.004>
- Lu, T. K., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2009). Next-generation synthetic gene networks. *Nature Biotechnology*, *27*(12), 1139–1150. <https://doi.org/10.1038/nbt.1591>
- McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T. P., & Steber, C. M. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, *15*(5), 1120–1130. <https://doi.org/10.1105/tpc.010827>
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., & Yamaguchi, I. (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant Journal*, *46*(5), 880–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02748.x>
- Phokas, A., & Coates, J. C. (2021). Evolution of DELLA function and signaling in land plants. *Evolution and*

Development, 23(3), 137–154. <https://doi.org/10.1111/ede.12365>

- Sánchez-Baracaldo, P., Raven, J. A., Pisani, D., & Knoll, A. H. (2017). Early photosynthetic eukaryotes inhabited low-salinity habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(37), E7737–E7745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620089114>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Stavang, J. A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M. D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J. E., García-Martínez, J. L., Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant Journal*, 60(4), 589–601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03983.x>
- Stemans, P., Hérisse, A. Le, Melvin, J., Miller, M. A., Paris, F., Verniers, J., & Wellman, C. H. (2009). Origin and radiation of the earliest vascular land plants. *Science*, 324(5925), 353. <https://doi.org/10.1126/science.1169659>
- Strasser, J. F. H., Irisarri, I., Williams, T. A., & Burki, F. (2021). A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22044-z>
- Su, D., Yang, L., Shi, X., Ma, X., Zhou, X., Hedges, S. B., & Zhong, B. (2021). Large-Scale Phylogenomic Analyses Reveal the Monophyly of Bryophytes and Neoproterozoic Origin of Land Plants. *Molecular Biology and Evolution*, 38(8), 3332–3344. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab106>
- Sun, T. P. (2011). The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Current Biology*, 21(9), R338–R345. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.036>
- Sun, X., Jones, W. T., Harvey, D., Edwards, P. J. B., Pascal, S. M., Kirk, C., Considine, T., Sheerin, D. J., Rakonjac, J., Oldfield, C. J., Xue, B., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2010). N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of interaction with GID1/gibberellic acid receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11557–11571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027011>
- Suzuki, H., Park, S. H., Okubo, K., Kitamura, J., Ueguchi-Tanaka, M., Iuchi, S., Katoh, E., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Asami, T., & Nakajima, M. (2009). Differential expression and affinities of Arabidopsis gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant Journal*, 60(1), 48–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03936.x>
- Tanaka, J., Yano, K., Aya, K., Hirano, K., Takehara, S., Koketsu, E., Lacsamana Ordonio, R., Park, S. H., Nakajima, M., Ueguchi-Tanaka, M., & Matsuoka, M. (2014). Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway. *Science*, 346(6208), 469–473. <https://doi.org/10.1126/science.1259923>
- Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Sun, T. P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(2), 1008–1019. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039578>
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. I. C., Kitano, H., Yamaguchi, I., & Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693–698. <https://doi.org/10.1038/nature04028>
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M. N., Maier, A., & Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(4), 1209–1220. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051441>
- Wodniok, S., Brinkmann, H., Glöckner, G., Heidel, A. J., Philippe, H., Melkonian, M., & Becker, B. (2011). Origin of land plants: Do conjugating green algae hold the key? *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-104>
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Yamauchi, Y., Takeda-kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2007). Contribution of Gibberellin Deactivation by AtGA2ox2 to the Suppression of Germination of Dark-Imbibed Arabidopsis thaliana Seeds. 48(3), 555–561. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm023>

- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 809–818. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh075>
- Yoshida, H., Tanimoto, E., Hirai, T., Miyanoiri, Y., Mitani, R., Kawamura, M., Takeda, M., Takehara, S., Hirano, K., Kainosho, M., Akagi, T., Matsuoka, M., & Ueguchi-Tanaka, M. (2018). Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor *GID1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(33), E7844–E7853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806040115>
- Zhang, D., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2012). Bacterial GRAS domain proteins throw new light on gibberellic acid response mechanisms. *Bioinformatics*, 28(19), 2407–2411. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts464>

8. ANEXO

Tabla S1: cebadores usados en este trabajo

GEN		Secuencia (5' → 3')	Descripción
AtRGA	<i>Forward</i>	ATGAAGAGAGATCATCACCA	<i>Para OE-PCR</i>
AtRGA	<i>Reverse</i>	CATTGAATCCGAACGAGTTGACTC ACCCGCCG	<i>Contiene la cola complementaria a MpDELLA</i>
MpDELLA	<i>Forward</i>	GAGTCAACTCGTTCGGATTCAATG GCTGGAGC	<i>Contiene la cola complementaria AtRGA</i>
MpDELLA	<i>Reverse</i>	GGAACAATGCCATGCCGATG	<i>Para OE-PCR</i>
AtRGA	<i>Forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTCCATGAAGAGAGATCATCA CC	<i>Contiene los extremos attB1</i>
AtRGA	<i>Reverse</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTCAGTACGCCGCCGTCGA GAG	<i>Contiene los extremos attB2</i>
MpDELLA	<i>Forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTCCATGGATTCCTCTGCCGAT T	<i>Contiene los extremos attB1</i>
MpDELLA	<i>Reverse</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTATCAGGAACAATGCCATGC CGATG	<i>Contiene los extremos attB2</i>
DELLA QUIMERA	<i>Forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTCCATGAAGAGAGATCATCA CC	<i>Contiene los extremos attB1</i>
DELLA QUIMERA	<i>Reverse</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTATCAGGAACAATGCCATGC CGATG	<i>Contiene los extremos attB2</i>

<i>AtGID1</i>	<i>Forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTAATGGCTGCGAGCGATGA AG	<i>Contiene los extremos attB1</i>
<i>AtGID1</i>	<i>Reverse</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTAACATTCCGCGTTTACA AAC	<i>Contiene los extremos attB2</i>
<i>DELLA QUIMERA</i>	<i>Forward</i>	GACGGTGGAGGTAACATGGA	<i>Para RT-PCR</i>
<i>DELLA QUIMERA</i>	<i>Reverse</i>	CTTCTGCGCAAGCTAGAAGC	<i>Para RT-PCR</i>
<i>MpGID2</i>	<i>Forward</i>	CTGCTCATCATCATCGTCATCG	<i>Para amplificación por PRC</i>
<i>MpGID2</i>	<i>Reverse</i>	ACTTCGTCTTTGCTCCATTCG	<i>Para amplificación por PRC</i>
<i>MpGID2</i>	<i>Forward</i>	GTTTGTTCGTAGGGACTGCAG	<i>Para secuenciar</i>
<i>AtGID1a</i>	<i>Forward</i>	ATGGCTGCGAGCGATGAAG	<i>Para RT-PCR</i>
<i>AtGID1a</i>	<i>Reverse</i>	TTAACATTCCGCGTTTACAAAC	<i>Para RT-PCR</i>
<i>DELLA QUIMERA</i>	<i>Forward</i>	GCTAGCATGGATCTCGGG	<i>Para secuenciar pENTRY</i>
<i>DELLA QUIMERA</i>	<i>Reverse</i>	CACGGGCCAGAGCTGCAGC	<i>Para secuenciar pENTRY</i>
<i>DELLA QUIMERA</i>	<i>Interno forward</i>	GCTCGAGTCCTGATTCTATG	<i>Para secuenciar</i>
<i>DELLA QUIMERA</i>	<i>Interno reverse</i>	CTTCACGTCGTCCAGCTTC	<i>Para secuenciar</i>

Tabla S2: secuencia del RNA guía diseñado para la edición genómica de *MpGID2*

GEN		Secuencia (5' → 3')
<i>MpGID2</i>	<i>Forward</i>	CTCGATCATCATCAGGAAACGAGG
<i>MpGID2</i>	<i>Reverse</i>	AAACCCTCGTTTCCTGATGATGATLA

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

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.				✓

