



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de la interacción entre SLEEPY1 y DELLA en
Marchantia polymorpha

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Jiménez Cañete, Néstor

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Cotutor/a externo: BLAZQUEZ RODRIGUEZ, MIGUEL ANGEL

Director/a Experimental: MELLADO SANCHEZ, MACARENA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural
(ETSEAMN)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

Estudio de la interacción entre SLEEPY1 y DELLA en *Marchantia polymorpha*

TRABAJO DE FIN DE GRADO — Grado en Biotecnología

Alumno: D. Néstor Jiménez Cañete

Tutor académico: Prof. Dr. Javier Agustí Feliú

Cotutor Externo: Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez

Directora experimental: Dña. Macarena Mellado Sánchez

Curso académico: 2019-2023

Valencia, 14 de JULIO de 2023

Estudio de la interacción entre SLEEPY1 y DELLA en *Marchantia polymorpha*

Resumen:

Las DELLA son proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. En las plantas vasculares, la hormona giberelina promueve la degradación de las proteínas DELLA por el proteasoma. Este proceso requiere el reclutamiento de la maquinaria de poliubiquitinación a través de la interacción entre DELLA y la proteína F-box SLEEPY1 (SLY1). *Marchantia polymorpha*, como las demás plantas no-vasculares, carece de una ruta completa de señalización de giberelinas, pero sí que contiene una MpDELLA y una MpSLY. En este trabajo hemos investigado la posible regulación de MpDELLA por MpSLY. Empleando la técnica de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC), hemos encontrado que ambas proteínas interactúan en células vegetales. Además hemos asociado la sobreexpresión de MpSLY a unos niveles endógenos menores de la proteína MpDELLA y a una menor actividad; mientras que el análisis transcriptómico de mutantes *Mpsly* indica que la pérdida de función de MpSLY hace que aumente la actividad MpDELLA. Estos resultados apoyan un modelo en el que los niveles de DELLA en briófitas (al menos en *Marchantia polymorpha*) están regulados por una F-box ortóloga a SLY1 aunque no lo hagan en respuesta a la hormona giberelina.

Palabras clave: *Marchantia polymorpha*, DELLA, SLY1, interacción, poliubiquitinación.

Autor: Néstor Jiménez Cañete

Tutor académico: Prof. Dr. Javier Agustí Feliu

Tutor externo: Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez

Directora experimental: Macarena Mellado Sánchez

Valencia, Julio de 2023

Estudi de la interacció entre SLEEPY1 i DELLA en *Marchantia polymorpha*

Resum:

Les DELLA són proteïnes implicades en la regulació del creixement i desenvolupament de les plantes. En les plantes vasculars, l'hormona giberel·lina promou la degradació de les proteïnes DELLA pel proteasoma. Aquest procés requereix el reclutament de la maquinària de poliubiquitinació a través de la interacció entre DELLA i la proteïna F-box SLEEPY1 (SLY1). *Marchantia polymorpha*, com altres plantes no-vasculars, no té una ruta completa de senyalització de giberel·lines, però sí que conté una MpDELLA i una MpSLY. En aquest treball hem investigat la possible regulació de MpDELLA per MpSLY. Emprant la tècnica de Complementació Bimolecular de Fluorescència (BiFC), hem trobat que les dues proteïnes interactuen en cèl·lules vegetals. A més, hem associat la sobreexpressió de MpSLY a uns nivells endògens més baixos de la proteïna MpDELLA i a una menor activitat; mentre que l'anàlisi transcriptòmic de mutants *Mpsly* indica que la pèrdua de funció de MpSLY fa augmentar l'activitat de MpDELLA. Aquests resultats donen suport a un model en el qual els nivells de DELLA en briòfitas (almenys en *Marchantia polymorpha*) estan regulats per una F-box ortòloga a SLY1 encara que no ho facen en resposta a l'hormona giberel·lina.

Paraules clau: *Marchantia polymorpha*, DELLA, SLY1, interacció, poliubiquitinació.

Autor: Néstor Jiménez Cañete

Tutor acadèmic: Prof. Dr. Javier Agustí Feliu

Tutor extern: Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez

Directora experimental: Macarena Mellado Sánchez

València, juliol de 2023

Study of the interaction between SLEEPY1 and DELLA in *Marchantia polymorpha*

Abstract:

DELLA proteins are involved in the regulation of plant growth and development. In vascular plants, the gibberellin hormone promotes the degradation of DELLA proteins through the proteasome. This process requires the recruitment of the polyubiquitination machinery through the interaction between DELLA and the F-box protein SLEEPY1 (SLY1). *Marchantia polymorpha*, like other non-vascular plants, lacks a complete gibberellin signaling pathway, but it does contain an MpDELLA and an MpSLY. In this study, we investigated the possible regulation of MpDELLA by MpSLY. Using the Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) technique, we found that both proteins interact in plant cells. Furthermore, we associated the overexpression of MpSLY with lower endogenous levels of the MpDELLA protein and reduced activity. Transcriptomic analysis of Mpsly mutants indicates that the loss of MpSLY function leads to increased MpDELLA activity. These results support a model in which DELLA levels in bryophytes (at least in *Marchantia polymorpha*) are regulated by an orthologous F-box protein to SLY1, although they do not respond to the gibberellin hormone.

Keywords: *Marchantia polymorpha*, DELLA, SLY1, interaction, polyubiquitination.

Author: Néstor Jiménez Cañete

Academic Supervisor: Prof. Dr. Javier Agustí Feliu

External Supervisor: Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez

Experimental Director: Macarena Mellado Sánchez

Valencia, July 2023

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no sería posible sin una infinidad de personas que han estado apoyándome incondicionalmente en algún punto de este largo recorrido: empezando el día que comencé la carrera hace 4 años, hasta ahora que finalizo mis estudios de grado con este proyecto. Es por ello que me gustaría dedicar unas líneas a esas personas en agradecimiento por su dedicación y apoyo.

En primer lugar, a mi familia por hacerme ser la persona que soy ahora mismo y, sobre todo, por su fe ciega y absoluta en mí. Cuando les comuniqué que quería ser biotecnólogo no entendían qué era eso ni a qué iba a dedicarme — sigo pensando que no lo entienden todavía— pero aun así me dijeron que si eso era lo que yo quería para mi futuro, que fuera adelante con ello.

Agradecer también a la que es mi segunda familia, mis amigos. En especial a todos esos biotecnólogos que el destino cruzó en mi camino y de los que tan orgulloso estoy. Este largo recorrido ha sido mucho más sencillo gracias a vuestro apoyo y amor incondicional. Me siento muy afortunado de teneros en mi vida.

Agradecer sin duda alguna a Miguel que me abrió las puertas del laboratorio hace dos años, cuando buscaba prácticas en su grupo. Recuerdo el primer día, cuando me acogiste y me presentaste a ese maravilloso grupo que habéis formado. ¡Bendita suerte tuve! No creo que pudiera haber encontrado mejor sitio para tener una primera toma de contacto con un laboratorio de investigación. Muchísimas gracias por volver a darme la oportunidad de hacer este trabajo con vosotros y por tu mentoría con el mismo.

También quiero agradecer a todas las personas del IBMCP que me he cruzado estos meses. Gente del 2.05, 2.08 y, la que es ya mi segunda casa, el laboratorio 2.07, agradezco infinitamente que hayáis facilitado mi estancia allí. Me habéis integrado como si fuera uno más. Quiero destacar a Cris, no solo porque fue mi primera tutora hace un año, sino por ser una persona maravillosa y que siempre tiene buenas palabras para los demás. Ella me guio durante mis primeros pasos dentro de un laboratorio.

Por último y, de hecho, más importante, no puedo presentar este trabajo sin dedicar unas palabras a la guía de esta aventura: Maca. Este proyecto no habría salido adelante sin ella. Pese a que ya sabía de su profesionalidad, tener a Maca de tutora ha superado todas mis expectativas. Gracias por tu sabiduría, tu dedicación, tus ganas de enseñarme, tu incondicional ayuda y sobre todo por tu santa paciencia, que no sé cómo no se te ha agotado conmigo. No sólo has sido un pilar a nivel académico, sino un rayo de luz si algún día estaba más decaído. Siempre me alegrabas y subías el ánimo si algo salía mal. Me has enseñado a aprender de los errores y volver a intentarlo. Te pido disculpas por todas aquellas veces que has tenido que reñirme sabiendo que no te gusta y te agradezco haberme aguantado diariamente. Gracias por todos los momentos vividos durante este viaje de 7 meses, que se me han hecho cortísimos a tu lado. He tenido toda la suerte de tener a alguien tan excepcional como tutora, y que además se haya convertido en una fantástica amiga.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las giberelinas como transmisoras de información ambiental a las células	1
1.2 Evolución de la señalización de giberelinas.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	8
3.2 Material microbiológico	8
3.3 Ensayo <i>BiFC</i>	9
3.4 Generación de líneas mutantes y sobreexpresora de MpSLY	9
3.4.1 Transformación de <i>Marchantia polymorpha</i>	9
3.4.2 Genotipado de las líneas Mpsly MpDELLA-GR	10
3.4.3 Genotipado de las líneas EF1□:MpSLY-cit MpDELLA-GR	11
3.5 Fenotipado de las líneas mutantes y sobreexpresoras	12
3.6 Aparición de gametangióforos	12
3.7 Crecimiento con dexametasona (DEX)	12
3.8 SDS-PAGE y Western Blot.....	13
3.9 RNA-seq.....	14
4. RESULTADOS	16
4.1 MpSLY y MpDELLA interactúan físicamente entre sí en plantas.....	16
4.2 La presencia/ausencia de MpSLY altera el efecto de la actividad de MpDELLA.....	17
4.3 La sobreexpresión de MpSLY altera la cantidad de proteína en MpDELLAox	24
4.4 Análisis transcriptómico de la pérdida de función de MpSLY	26
5. DISCUSIÓN.....	28
5.1 MpSLY y MpDELLA interactúan físicamente entre sí en plantas.....	28
5.2 La presencia/ausencia de MpSLY altera el efecto de la actividad de MpDELLA.....	28
5.3 La sobreexpresión de MpSLY altera la cantidad de proteína en MpDELLAox	29
5.4 Análisis transcriptómico de la pérdida de función de MpSLY	30
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32
8. ANEXOS.....	37

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Secuencias de los primers y guías utilizados	15
Figura 1. Estructura química de la giberelina GA ₁	1
Figura 2. Ruta de biosíntesis de GAs bioactivas en plantas de semilla.....	2
Figura 3. Estructura de la proteína DELLA	3
Figura 4. Representación del modelo de la vía de señalización de las giberelinas	4
Figura 5. Análisis evolutivo de los genes relacionados con la biosíntesis y la ruta de señalización de GAs.....	6
Figura 6. Descripción cortes realizados durante el proceso de transformación	10
Figura 7. Esquema gráfico del ensayo de BiFC	16
Figura 8. Ensayo BiFC.....	17
Figura 9. Representación del efecto de la MpDELLA-GR en presencia y ausencia de DEX.....	18
Figura 10. Genotipado de <i>Mpsly</i>	19
Figura 11. Genotipado de MpSLYox.....	20
Figura 12. Fenotipado de la líneas mutantes <i>Mpsly</i> y MpSLYox.....	21
Figura 13. Formación de gametangióforos.....	22
Figura 14. Tratamiento DEX de <i>Mpsly</i>	23
Figura 15. Tratamiento DEX de MpSLYox.....	24
Figura 16. Genotipado EF1 α ::MpSLY-CITRINA (EF1 α ::MpDELLA-FLAG).....	25
Figura 17. Ensayo Western Blot utilizando el anticuerpo α -FLAG-HRP	25
Figura 18. Análisis transcriptómico de MpDELLA-GR y la línea mutante de MpSLY	27

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que viven en ambientes en constante cambio siendo en muchas ocasiones desfavorables para su desarrollo y crecimiento. El estrés que puede experimentar puede deberse a agentes bióticos, como son los ataques de herbívoros, y/o a agentes abióticos, como la sequía, la salinidad o las temperaturas extremas. Cabe destacar que el estrés abiótico es aquel que genera mayor preocupación ya que causa un alto impacto en la reducción de la productividad agrícola (Zhu, 2016).

La capacidad de adaptación al entorno se debe en gran parte al papel que presentan las hormonas vegetales en la respuesta a diferente tipo de estreses así como en el desarrollo y crecimiento vegetal, ya que gracias a ellas la planta puede alterar la fisiología de la planta y las rutas bioquímicas de forma eficiente (Davies, 2010).

1.1 Las giberelinas como transmisoras de información ambiental a las células

Entre las hormonas de plantas, las giberelinas (GAs) (Figura 1) son especialmente importantes para la coordinación de programas defensivos y de desarrollo.

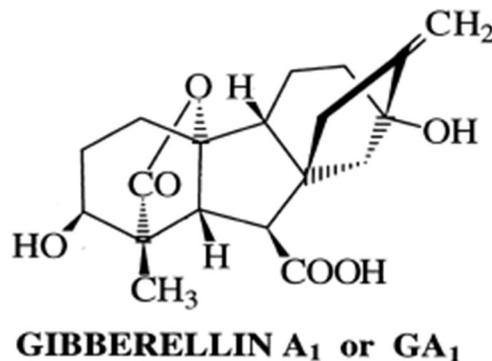


Figura 1. Estructura química de la giberelina GA₁ (Davies, 2010)

La biosíntesis de giberelinas en angiospermas (Figura 2) deriva de la vía de biosíntesis de los isoprenoides. En la mayoría de los casos, se forman a partir de la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP) en los plástidos (Lichtenthaler et al., 1997; Eisenreich et al., 2001; Kasahara et al., 2002). El primer paso del proceso implica la conversión del *trans*-geranilgeranil difosfato (GGPP) en *ent*-kaureno, gracias a la acción de enzimas como dos diterpeno ciclasas monofuncionales (DTC), *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS) y *ent*-kaureno sintasa (KS) (Van Schie et al., 2007). Posteriormente, las dioxigenasas P450 actúan para producir el *ent*-kaureno oxidado, que se convierte en el *ent*-anillo giberelánico común a todas las GAs. Los pasos posteriores ocurren en el citosol y son catalizados por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OGD), como GA20ox y GA3ox, para formar GAs bioactivas (Su et al., 2016). GA20ox

también inactiva los GAs bioactivos. Se cree que las modificaciones como la metilación pueden inactivar de manera reversible las GAs (Rieu et al., 2008; Varbanova et al., 2007).

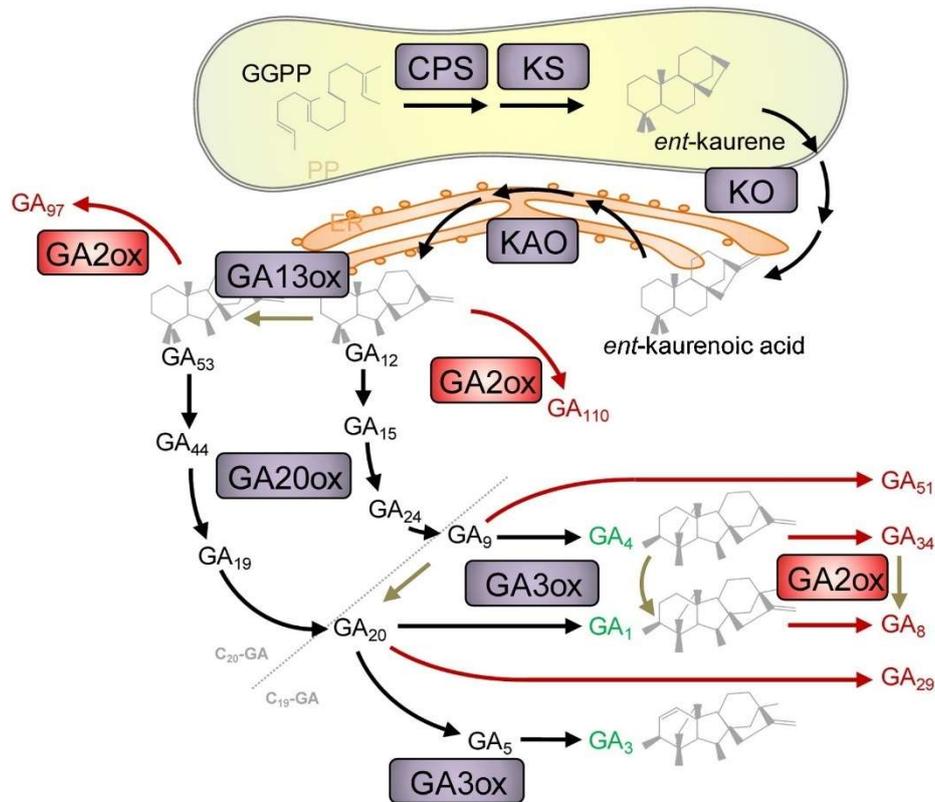


Figura 2. Ruta de biosíntesis de GAs bioactivas en plantas de semilla. (Hernández-García et al., 2021)

La biosíntesis de GAs en angiospermas está regulada tanto por factores endógenos como ambientales, principalmente a nivel transcripcional (Yamaguchi & Kamiya, 2000). De hecho, las GAs se han propuesto como mediadores importantes que transmiten información ambiental a procesos de desarrollo y de defensa de las plantas mediante la regulación transcripcional. Entre los diversos procesos biológicos controlados por GAs en angiospermas están la germinación, la fructificación o la inducción de la masculinidad en flores dioicas (Davies, 2010). Además, están implicadas en procesos de adaptación frente a estrés abiótico (Colebrook et al., 2014). La acción de las GAs está completamente vinculada a la actividad de un pequeño grupo de proteínas, denominadas DELLA. La pérdida de función de estas proteínas mimetiza el efecto de tratamientos continuados con GAs, mientras que alelos mutantes de ganancia de función en DELLA causan un fenotipo equivalente al de la falta de GAs (Sun & Gubler, 2004).

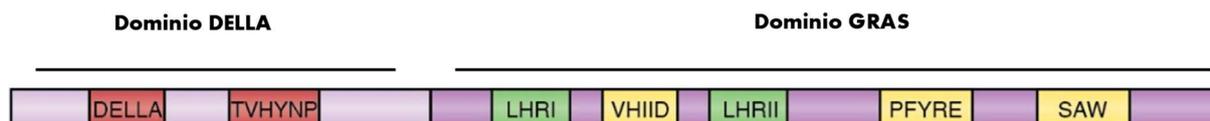


Figura 3. Estructura de la proteína DELLA. DELLA está conformada por dos dominios principales: el dominio GRAS, que consta de dos repeticiones heptadas de leucina (LRHI y LRHII), y tres motivos conservados (VHIID, PFYRE y SAW); y el dominio DELLA, que está compuesto principalmente por dos motivos (DELLA y TV) (Adaptada de Davière & Achard, 2013).

Las DELLA son proteínas nucleares pertenecientes a la familia GRAS, formada por factores de transcripción (FTs) presentes de forma exclusiva en las plantas (Dill et al., 2004). Forman parte de esta familia debido a que contienen el dominio GRAS en su parte C-terminal, formado por dos repeticiones de heptada de leucina (LHRI y LHRII) y tres motivos conservados (VHIID, PFYRE y SAW). Las proteínas DELLA difieren de las demás proteínas GRAS ya que comparten homología en su extremo N-terminal, presentando el motivo DELLA y el motivo TVHYNP (Davière & Achard, 2013). Además, en este extremo también presentan una señal de localización nuclear y un dominio de unión a fosfotirosina SH2 putativo (Vera-Sirera et al., 2016). Además, este dominio es crucial para la interacción con el receptor *GID1* y GA (Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Willige et al., 2007).

La ruta de señalización de las giberelinas en traqueófitas (Figura 4), tal y como se revisa en Davière & Achard (2013), está compuesta, en primera instancia, por unas proteínas capaces de captar las GAs, las GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (*GID1*). Esta proteína fue caracterizada por primera vez en arroz y presenta 3 ortólogos en *Arabidopsis* (*GID1A*, *GID1B* y *GID1C*). Presenta la capacidad de interaccionar con GAs debido a que estructuralmente posee un bolsillo de unión a GAs y cuando esta ocurre, se produce un cambio conformacional de forma que la GA se ve envuelta por la proteína — el bolsillo se cierra —. Esta alteración en la estructura terciaria provoca también que *GID1* sea capaz de interaccionar con los motivos DELLA y TVHYNP de las proteínas DELLA, generando el complejo GA-*GID1*-DELLA. Tras este suceso llega la implicación de la segunda proteína de esta ruta señalización, GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2 (*GID2*) o SLEEPY1 (*SLY1*). Estas son proteínas F-box de arroz y *Arabidopsis*, respectivamente, y forman parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa de tipo SCF (*SKP1*, *CULLIN*, F-BOX), encargado de la unión de poliubiquitinas a una proteína objetivo para así marcarla y ser degradada posteriormente por el proteasoma 26S. *GID2/SLY1* reconoce al complejo GA-*GID1*-DELLA por el dominio GRAS de la proteína DELLA que será poliubiquitinizada gracias a que se puede formar el complejo SCF^{*GID2/SLY1*}. Así la proteína DELLA queda marcada para su degradación llevada a cabo por el proteasoma 26S. De esta forma, las plantas vasculares pueden desestabilizar a DELLA mediante la señalización por medio de GAs, evitando su efecto de reducción del crecimiento.

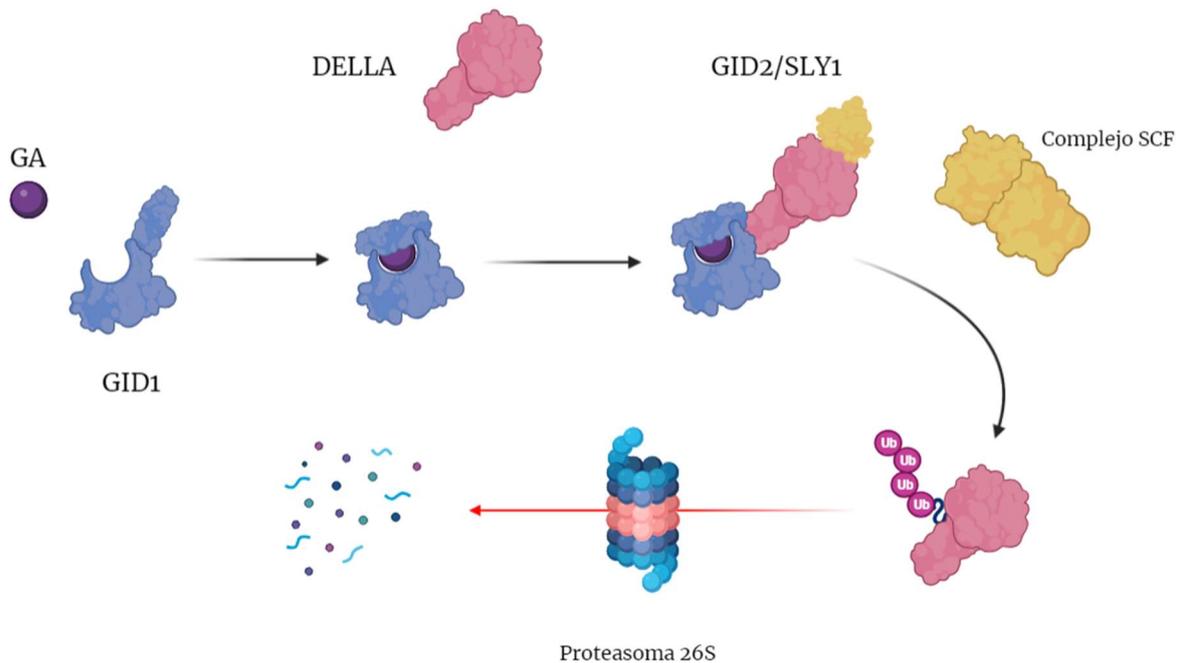


Figura 4. Representación del modelo de la vía de señalización de las giberelinas (GAs) en traqueófitas. Cuando la hormona está presente, se establece una secuencia de eventos en la que se forma el complejo GA-GID1-DELLA, permitiendo actuar a GID2/SLY1 que llama a la maquinaria de poliubiquitinación y posteriormente ocurre la degradación de la proteína DELLA por el proteasoma 26S.

A nivel funcional, en la estructura de estas proteínas no se ha encontrado un dominio de unión al DNA, es por ello que se cree que deben interactuar con FTs o con reguladores de la transcripción (RTs), modulando la expresión de genes implicados en múltiples procesos fisiológicos, bien sea reprimiéndola o promoviéndola. Esta interacción estaría mediada por el dominio GRAS (Marín-de la Rosa et al., 2014). Los mecanismos mediante los cuales DELLA regula la actividad transcripcional pueden ser: el secuestro de factores de transcripción, el de los reguladores de transcripción o mediante la coactivación transcripcional. Para secuestrar los FT como pueden ser los *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (PIFs), DELLA provoca que no puedan unirse al DNA anulando así la transcripción mediada por estos (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Además, DELLA actúa secuestrando RTs, promoviendo la actividad transcripcional: tal son los casos de la interacción entre DELLA y JA ZIM-domain 1 (JAZ1) — DELLA, que promueve la señalización del ácido jasmónico impidiendo que JAZ1 reprima al activador transcripcional MYC2 uniéndose a él. Por último, DELLA ejerce de coactivador transcripcional al unirse a *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS* (ARR) — FTs que actúan en el proceso de señalización de CK — (Hou et al., 2010; Marín-La Rosa et al., 2015).

1.2 Evolución de la señalización de giberelinas

Los reguladores centrales de la señalización por GAs, las proteínas DELLA, están conservadas en todas las plantas terrestres (Hernández-García et al., 2019). Además, no sólo están conservadas las proteínas, sino también sus propiedades bioquímicas: en todas las plantas terrestres examinadas, las correspondientes proteínas DELLA mantienen la capacidad de interactuar con docenas de FTs y regular a través de ellos la transcripción de genes diana (Briones-Moreno et al., 2023). El mantenimiento de esta capacidad durante millones de años ha ido acompañado de la conservación también de la función central que se atribuye a las proteínas DELLA: la coordinación entre programas de crecimiento y desarrollo, con los de defensa frente al estrés. Así, en la briófito *Marchantia polymorpha*, la acumulación de MpDELLA en plantas que sobreexpresan el único gen DELLA de este organismo provocó enanismo y una capacidad defensiva mayor frente al estrés oxidativo (Hernández-García et al., 2021), al igual que sucede en angiospermas (Thomas et al., 2016).

Sin embargo, la regulación de los niveles de DELLA por GAs sólo ocurre en las plantas vasculares o traqueófitas (Blázquez et al., 2020). No toda la maquinaria necesaria para sintetizar GAs bioactivas está presente en briófitas, aunque se ha propuesto la presencia de homólogos de GA20ox y GA3ox en el musgo *Sphagnum fallax* y la hepática *M. polymorpha*, lo cual respalda la evolución de las oxidasas de giberelina (GA) en briófitas. Estos ortólogos pertenecen a una amplia familia de oxidasas que también incluye otras enzimas no involucradas en la síntesis de las GAs. Además, en las briófitas no se ha detectado de manera confiable la presencia de GAs bioactivas, posiblemente debido a la falta de la vía completa para la síntesis e inactivación de las formas bioactivas de la hormona (Cannell et al., 2020; Hernández-García et al., 2021). En cuanto a la percepción de GAs, solo se han identificado genes para GID1 en traqueófitas (Blázquez et al., 2020). También se observó que únicamente las DELLA de traqueófitas son capaces de interactuar con receptores GID1 de *Arabidopsis* pero no es el caso de las DELLA en no vasculares, lo que puede deberse a diferencias estructurales en la región N-terminal — donde se encuentran los dominios DELLA y TVHYNP responsables de la unión de GA-GID1 con DELLA — (Hernández-García et al., 2019; 2021). En cambio, en plantas como *M. polymorpha*, homólogos de GID2/SLY1 sí se han encontrado, este es el caso de MpSLY (Bowman et al., 2017). Sin embargo, no se ha estudiado si esta molécula es capaz de interactuar o está relacionada con la proteína MpDELLA.

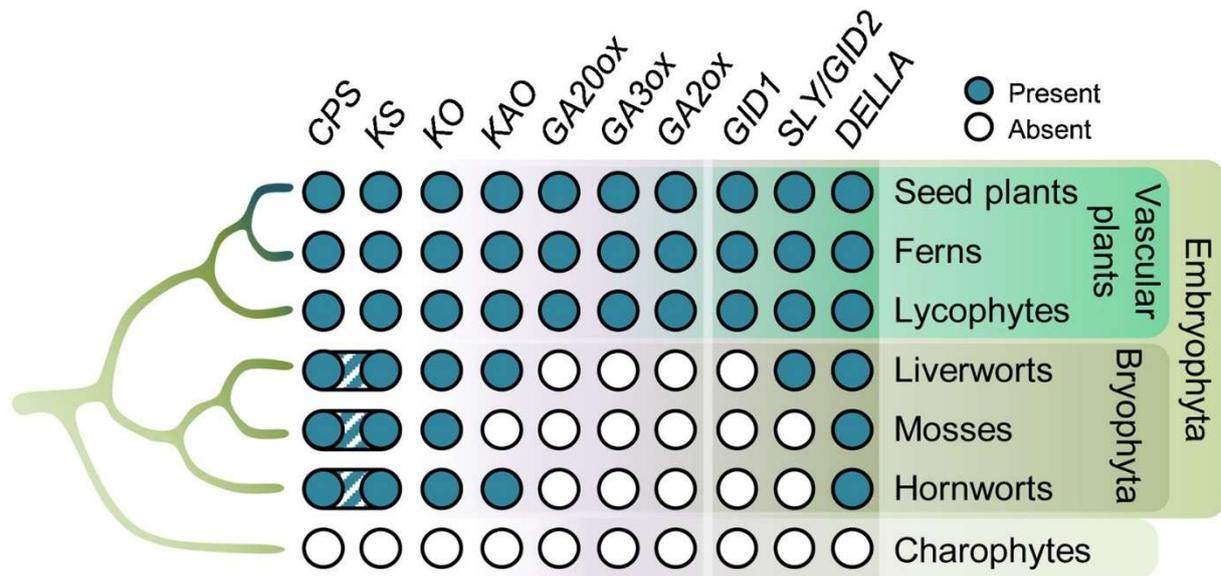


Figura 5. Análisis evolutivo de los genes relacionados con la biosíntesis y la ruta de señalización de GAs. En el gráfico, las filas representan diferentes grupos de linajes de plantas. La presencia o ausencia de los genes en cada columna se indican con círculos de color azul o blanco, respectivamente. Las relaciones evolutivas se indican en un árbol situado en el lado izquierdo. (Hernández-García et al., 2021)

Todos estos datos dan a entender que las proteínas DELLA son componentes clave en la regulación transcripcional de múltiples procesos fisiológicos en plantas. Estas proteínas pertenecen a la familia GRAS y contienen dominios conservados en su estructura, que van a permitir su regulación y un correcto desempeño de su función. Las DELLA están muy relacionadas con las GAs; sin embargo no todas las plantas, como es el caso de las briofitas, poseen la vía completa para la síntesis de las formas bioactivas de la hormona ni mecanismos para detectarlas como el receptor GID1. Ello sugiere que las briófitas no tienen una respuesta funcional a las giberelinas. Además, la interacción entre las proteínas DELLA y los receptores GID1 se ha observado principalmente en plantas vasculares. Estos hallazgos resaltan la importancia de las proteínas DELLA en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas vasculares y plantean interrogantes sobre su papel en las briófitas. Aunque se han conservado ciertas funciones básicas de las proteínas DELLA como es el caso de *M. polymorpha*. Es necesario seguir investigando para comprender completamente la evolución y la diversidad de las proteínas DELLA en el reino vegetal.

2. OBJETIVOS

En *Marchantia polymorpha* la proteína MpDELLA es conservada y con ella función de coordinar el crecimiento con la respuestas a estrés. Sin embargo, carece del receptor de GAs, GID1 y las enzimas responsables de la síntesis de la hormona. Surge así la interrogante de cómo se controlan la actividad y los niveles de la proteína MpDELLA en esta planta. La presencia de la F-box (MpSLY) en *M. polymorpha*, similar a las codificadas por *SLY* y *GID2* en *A. thaliana* y arroz respectivamente, nos lleva a plantear la hipótesis de que MpSLY regula los niveles de MpDELLA a través de una vía independiente de las giberelinas (GAs).

En este trabajo se abordarán los siguientes objetivos:

- Determinar si las proteínas MpSLY y MpDELLA interactúan físicamente en células vegetales.
- Estudiar el efecto de mutar y sobreexpresar MpSLY sobre la actividad de MpDELLA.
- Comprobar los niveles de la proteína MpDELLA dependen de la actividad de MpSLY.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Como genotipo silvestre se utilizó Takaragaike-1 (Tak-1), la línea macho de *M. polymorpha* (Ishizaki et al., 2008). Además, se utilizó la línea MpDELLA-GR obtenida de trabajos previos realizados en el laboratorio (Hernández-García et al., 2021). Todas las líneas fueron propagadas asexualmente mediante el crecimiento de gemas en placas de cultivo con medio ½ Gamborg B5 (0,5 g/L de MES, 1% de agar) suplementado con 1% sacarosa (Ishizaki et al., 2015). Las condiciones en las que crecieron las plantas fueron las siguientes: 22°C en condiciones de luz blanca fluorescente de forma continua o en ciclo de día largo (16h luz + 8h oscuridad) según las necesidades de los experimentos.

3.2 Material microbiológico

Escherichia coli

La cepa de *E. coli* empleada en este trabajo es la cepa electrocompetente TOP10, la cual permite la introducción de material genético exógeno gracias a la utilización de un pulso eléctrico. Así pues, se utilizó esta bacteria para la obtención y almacenamiento de plásmidos.

El método de transformación consiste en la adición de 1 µL del plásmido de interés a una alícuota de 40 µL con las células electrocompetentes, homogeneizando correctamente utilizando una pipeta. Posteriormente, se traspasó todo el contenido a una cubeta de electroporación estéril para así aplicar un pulso eléctrico de 1500V durante 5 ms, gracias a la utilización del electroporador Electro Cell Manipulator TM ECM 399 (BTX). Tras esto, se adicionaron 200 µL de medio LB líquido (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%) y se recuperó el contenido celular en un tubo Eppendorf de 1.5 mL donde permaneció en agitación a 37 °C durante 1 h para reponerse del shock generado por la descarga. Pasada la hora de incubación, se plaqueó todo el volumen sobre una placa de LB sólido (LB líquido con 1% agar) suplementado con el antibiótico al cual la bacteria con el plásmido es resistente. Finalmente, se dejó crecer a 37°C durante 24 h para realizar la selección de los transformantes.

Agrobacterium tumefaciens

En este caso la cepa utilizada fue C58 de la especie *A. tumefaciens* la cual es otra variante electrocompetente. Esta especie bacteriana fue utilizada tanto para la transformación de *M. polymorpha* así como para la agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*, por su capacidad de introducir DNA foráneo en plantas.

El método de transformación utilizado es idéntico al empleado con *E. coli*, a excepción de una serie de condiciones. El pulso eléctrico aplicado fue de 1440 V, la temperatura de incubación de 28 °C y el crecimiento en placa se mantuvo 48h. Además del antibiótico correspondiente, el medio donde se realizó la selección debe estar suplementado con rifampicina y gentamicina.

3.3 Ensayo *BiFC*

Para el ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular, conocido en inglés como *Bimolecular fluorescence complementation* (BiFC), se diseñaron las construcciones MpSLY-YFN y MpSLY-YFC, donde se introdujo la CDS del gen MpSLY a los plásmidos de destino pMDC43-YFN y pMDC43-YFC (Belda-Palazón et al., 2012) respectivamente. Estas construcciones se realizaron gracias a una reacción LR del sistema de clonaje Gateway, donde el vector de entrada era MpSLY-pEN207 que se encontraba disponible en el laboratorio (Fernández-Bonilla., 2023) y se comprobó el plásmido generado mediante digestión. Además, también se utilizaron las construcciones MpDELLA-YFC, MpDELLA-YFN, GAIdel2-YFC y GAIdel2-YFN, disponibles en el laboratorio y obtenidos por el mismo método visto anteriormente.

Posteriormente, se agroinfiltraron las hojas de hasta 3 plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad con diferentes cultivos de *A. tumefaciens* portadores de las construcciones mencionadas anteriormente. En cada hoja de la planta se infiltraron dos combinaciones que actúan como control negativo y la combinación con la interacción de interés. El material vegetal se recogió a los 3 días de haber realizado la infiltración y las hojas fueron analizadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 780, excitando la proteína amarilla fluorescente (YFP) reconstruida a una longitud de onda de 503 nm y capturando su emisión a 517 nm.

3.4 Generación de líneas mutantes y sobreexpresora de MpSLY

3.4.1 Transformación de *Marchantia polymorpha*

Todas las nuevas líneas se transformaron en un fondo que sobreexpresa MpDELLA de manera condicional gracias a la fusión con el receptor de glucocorticoide MpDELLA-GR. Sobre esta línea se generó líneas mutantes de *Mpsly* (MpDELLA-GR) mediante CRISPR-Cas9 y líneas transgénicas sobreexpresoras de MpSLY fusionadas a citrina, EF1 α ::MpSLY-cit (MpDELLA-GR).

Para realizar el proceso de transformación en *M. polymorpha* se siguió el procedimiento llevado a cabo en Kubota et al. (2013). En primer lugar, se cultivaron alrededor de 25 gemas de la planta madre, en este caso la línea MpDELLA-GR, durante 14 días en condiciones de luz blanca fluorescente y ciclo de día largo (80 μmol de fotones m^2s^{-1}) a 22°C en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa. Pasado este tiempo, se cortaron 2-3 mm de las partes apicales de la planta, siendo estas descartadas tal y como se muestra en la Figura 6. El resto del talo también se cortó en cuatro trozos, siendo estos cultivados durante 3 días a 22°C en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa para así promover la regeneración del tejido y favorecer la posterior transformación mediada por *A. tumefaciens*.

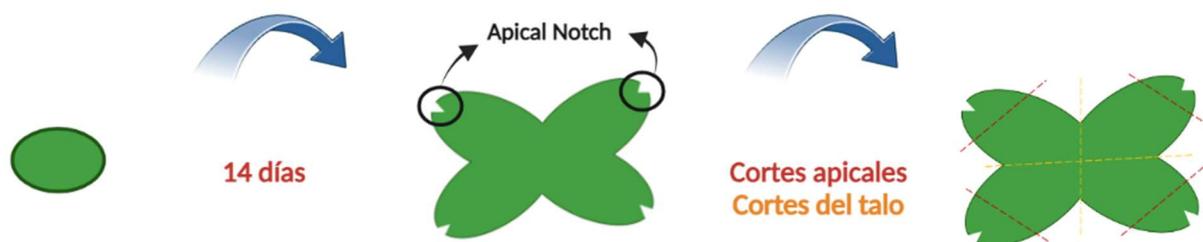


Figura 6. Descripción gráfica de los cortes realizados sobre la *M. polymorpha* durante el proceso de transformación

Como ya se describió previamente, para realizar la transformación se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* C58, transformada con la construcción de interés. Partiendo de una única colonia, se cultivó en 5 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección, rifampicina y gentamicina, en la proporción descrita anteriormente, en agitación durante 2 días a 28°C. Concluido este tiempo se centrifugó 1mL a 2000 x g, resuspendiendo el pellet en 5 mL en medio 0M51C (10X 0M51C stock, sacarosa 2%, L-glutamina 0,03%, casaminoácidos 0,1%) con 100 µM de 3,5-dimetoxi-4-hidroxyacetofenona (acetosiringona) y se incubó a 28°C alrededor de 6 h.

Una vez obtenidas las plántulas y el cultivo bacteriano, se co-cultivaron durante 3 días a 22°C, bajo condiciones de luz blanca, día largo (80 µmol de fotones m²s⁻¹) en agitación (130 rpm) en 50 mL de medio 0M51C con 100 µM de acetosiringona. Transcurrido este período, se procedió a realizar los lavados. Estos consisten en lavar 5 veces con agua esterilizada y una última vez con agua esterilizada suplementada con el antibiótico cefotaxima a una concentración de 1 mg/mL donde permanecerán durante 30 minutos con el fin de eliminar la mayor cantidad de *A. tumefaciens* posible. Una vez concluidos los lavados, se traspasaron los explantes a placas con medio de selección compuesto por 100 mg/L de cefotaxima y 10 mg/L del antibiótico de selección que presente la construcción.

Para generar líneas mutantes *Mpsly* *MpDELLA-GR*, se introdujo la secuencia para la síntesis de la Cas9 y las dos RNA guía (gRNA) *Mpsly* — cuya secuencia se encuentra en la Tabla 1— que actúa como guía permitiendo mutar la secuencia genómica del gen *MpSLY*. El plásmido donde se encontraban las secuencias y fue introducido al *A. tumefaciens*. era *Mpsly* (pMpGE010), disponible en el laboratorio.

Mientras que la construcción que introdujo en las líneas sobreexpresoras de *MpSLY* está compuesta por el promotor fuerte EF1α, la CDS del gen *MpSLY* y la CDS de la proteína citrina (*cit*). El plásmido donde se encontraba la construcción y fue introducido al *A. tumefaciens*. era pMpGWB108.

3.4.2 Genotipado de las líneas *Mpsly* *MpDELLA-GR*

Se realizó una extracción del DNA genómico siguiendo el protocolo empleado en Edwards et al. (1991) y se comprobó si el gen *MpSLY* había sido mutado mediante una PCR. Se realizó una PCR usando la

polimerasa de alta afinidad KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen®), utilizando MMS_091 como primer directo y MMS_092 como primer reverso — la secuencia de estas está detallada en la Tabla 1—, el amplicón original es de 700 pb. El programa utilizado consta de un primer paso de desnaturalización durante 1 min a 95 °C. A continuación, se realizaron 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 51 °C y 10 s a 72 °C. La extensión final se realizó durante 5 min a 72 °C.

Generando un amplicón en el control positivo de 700pb, las bandas de interés — aquellas que den una banda de menor tamaño a la del control — fueron extraídas gracias al kit Zymoclean™ Gel DNAREcovery Kit y se mandaron a secuenciar para comprobar donde se había producido la mutación.

3.4.3 Genotipado de las líneas EF1 α ::MpSLY-cit MpDELLA-GR

Para comprobar si había una expresión diferencial de MpSLY entre las líneas se realizó una RT-PCR, comprobando así que el transgén expresaba de forma mayoritaria el gen con respecto a la silvestre y a la línea MpDELLA-GR. Para ello se hizo crecer las líneas sobreexpresoras de MpSLY (MpSLYox) obtenidas, la línea MpDELLA-GR y la línea silvestre Tak-1 durante 2 semanas en luz fluorescente blanca en ciclo de día largo (80 μmol de fotones m^2s^{-1}). Se realizaron 3 réplicas biológicas para cada línea. Los pasos que se detallan a continuación se realizaron para cada repetición.

Pasado el tiempo de crecimiento, se recogió el material vegetal y se introdujo en N₂ líquido para así triturarlas usando un mortero y se obtuvo un polvo de tejido. Una cantidad de 500 mg de este polvo fue transferido a un tubo Eppendorf para así poder realizar la extracción de ARN utilizando el kit Nucleospin® RNA Plant de Macherey-Nagel. Posteriormente, se verificó la concentración y la calidad del ARN extraído utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Todas las concentraciones de las extracciones se llevaron a la dilución más baja obtenida para evitar discrepancias debido a la eficiencia de la extracción.

Con el ARN obtenido se realizó una RT-PCR, para así obtener cDNA mediante una retrotranscripción utilizando el sistema NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech) según las instrucciones del fabricante. Acto seguido procedió a realizarse una PCR utilizando la polimerasa de baja afinidad MyTaq Red DNA Polymerase (Meridian Bioscience™) y se emplearon MMS_097 como primer directo y MMS_092 como primer reverso — la secuencia de estas está detallada en la Tabla 1—, generando un amplicón de 200 pb. El programa utilizado consta de un primer paso de desnaturalización durante 1 min a 95 °C. A continuación, se realizaron 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 51 °C y 10 s a 72 °C. La extensión final se realizó durante 5 min a 72 °C.

Otra forma de comprobar que el transgén había sido introducido de forma correcta fue mediante visualización de fluorescencia en el microscopio confocal. Para ello se cultivaron durante dos días gemas de MpSLYox que fueron analizadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 780, al reportero *-citrina* a una longitud de onda de 515 nm y capturando su emisión a 528 nm.

Además, para comprobar si las plantas seguían manteniendo el transgén MpDELLA-GR se realizó una PCR. En este caso, se utilizó la polimerasa de baja afinidad MyTaq Red DNA Polymerase (Meridian Bioscience™) y se emplearon DELLA:GRfw como primer directo y DELLA:GRrv como primer reverso — la secuencia de estas está detallada en la Tabla 1—, generando un amplicón de. El programa utilizado consta de un primer paso de desnaturalización durante 1 min a 95 °C. A continuación, se realizaron ciclos de 35 veces con 15 s a 95 °C, 20 s a 57 °C y 10 s a 72 °C. La extensión final se realizó durante 5 min a 72 °C.

3.5 Fenotipado de las líneas mutantes y sobreexpresoras

Todas la líneas mutantes, sobreexpresoras y la planta madre MpDELLA-GR se cultivaron durante 21 días en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa a 22 °C en condiciones de luz blanca fluorescente día largo (80 μmol de fotones m^2s^{-1}). Posteriormente, se realizó la toma de imágenes gracias al macroscópico digital Leica DMS1000.

3.6 Aparición de gametangióforos

En esta ocasión, 3 gemas de todas la líneas mutantes *Mpsly* (MpDELLA-GR), la línea sobreexpresora EF1 α ::MpSLY-CITRINA (MpDELLA-GR) #9, la línea sobreexpresora de MpDELLA (EF1 α ::MpDELLA-FLAG) y Tak-1 se cultivaron primeramente durante 3 semanas en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa creciendo a 22°C en condiciones de luz blanca fluorescente en ciclo de día largo (80 μmol de fotones m^2s^{-1}). Posteriormente, se pasaron a tierra y crecieron durante 22 días a 22 °C en condiciones de luz blanca suplementada con rojo lejano, para inducir la aparición de gametangióforos, en ciclo de día largo (16 h luz + 8 h oscuridad).

Se contaron el número de gametangióforos día a día y a la finalización del experimento se recolectaron los gametangióforos formados y se tomaron imágenes gracias al macroscópico digital Leica DMS1000.

3.7 Crecimiento con dexametasona (DEX)

Para este ensayo se propagaron alrededor de 20 gemas/medio de cultivo de todas la líneas mutantes, sobreexpresoras y la planta madre MpDELLA-GR, que se cultivaron durante 3 semanas a 22°C en condiciones de luz blanca fluorescente continua (100 μmol de fotones m^2s^{-1}). Los medios de cultivo van a ser ½ Gamborg B5 1% sacarosa (mock) y ½ Gamborg B5 1% sacarosa suplementado con dexametasona a 100 nM (DEX). Las plantas se pasaron a medio fresco a la semana de ser cultivadas con el fin de ver el efecto de la dexametasona de forma correcta. Transcurridas las 3 semanas de cultivo, se tomaron imágenes de cada una de las placas y se trató digitalmente las imágenes. Las mediciones de las áreas fueron realizadas con ImageJ (Schneider et al., 2012), midiendo para cada una de las líneas un número mayor o igual a 18 plantas.

Se repitió el ensayo para MpDELLA-GR y las líneas sobreexpresoras, en esta ocasión con 3 tipos de medios distintos: mock, 100 nM DEX y 1 μM DEX. Se dejaron crecer a las plantas durante 2 semanas

en las mismas condiciones de luz y temperatura que en el ensayo anterior, midiendo para cada una de las líneas un número mayor o igual a 10 plantas.

Se evaluaron las diferencias de áreas entre las diversas líneas generadas utilizando análisis two-way ANOVA para realizar comparaciones múltiples. Todo esto se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5.

3.8 SDS-PAGE y Western Blot

Las líneas utilizadas en esta ocasión son una línea madre que presenta la construcción EF1 α ::MpDELLA-FLAG, la cual se encontraba disponible en el laboratorio con anterioridad y varias líneas EF1 α ::MpSLY-CITRINA EF1 α ::MpDELLA-FLAG. Todas ellas se generaron a partir de la transformación de la línea madre con la construcción EF1 α ::MpSLY-CITRINA mediante el protocolo visto con anterioridad. Para genotipar estas nuevas líneas creadas, se realizó una PCR con la polimerasa de baja afinidad MyTaq Red DNA Polymerase (Meridian Bioscience) usando el primer MMS_097 como primer directo y GFP_rv como primer reverso —las secuencias de ambos primers se detallan en la Tabla 1—, generando un amplicón de 525pb. El programa utilizado consta de un primer paso de desnaturalización durante 1 min a 95 °C y 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 58 °C y 10 s a 72 °C. La extensión final se realizó durante 5 min a 72 °C.

Para comparar los niveles de proteína MpDELLA que había en cada línea se realizó un ensayo Western Blot. En este ensayo se propagaron gemas de todas las líneas en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa durante 2 semanas a 22°C en condiciones de luz blanca fluorescente continua (100 μmol de fotones m^2s^{-1}). Para ello, se recogió muestra de las plantas a analizar, congelando el tejido en N_2 líquido y machacando en el mortero, extrayendo así su contenido proteico y obteniendo un polvo de tejido.

Se transfirieron 500 mg de este polvo a tubos Eppendorf de 2 mL. Se añadieron 250 μL de tampón Laemmli 4X (Tris-HCl 0,135 M, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 50 %, azul de bromofenol al 0,03 %) complementado con ditioneitol (DTT) 1 M y los tubos se homogenizaron mediante el uso del Vortex y se dejaron en hielo durante 15 minutos. Los tubos se centrifugaron dos veces a 4 °C durante 15 minutos a la máxima velocidad. Los sobrenadantes se combinaron en un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL.

Una vez obtenidas, se procedió a realizar el ensayo Western Blot en geles de poliacrilamida, compuestos por un gel de concentración al 5% (125 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% de SDS, 5% de acrilamida/bisacrilamida, 0.1% de APS (p/v), 0.2% de TEMED (v/v)) y un gel de resolución al 10% (375 mM de Tris-HCl pH 8.8, 0.1% de SDS (p/v), 10% de acrilamida/bisacrilamida, 0.05% de APS (p/v), 0.05% de TEMED (v/v)). Se cargaron 80 μL de todas las líneas a genotipar y se realizó una electroforesis en gel de SDS-PAGE. Se llevó a cabo en posición vertical utilizando el sistema Mini-Protean Tetra Cell de Bio-Rad, empleando Running Buffer 1X de Bio-Rad. El gel se resolvió a 140 V durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las proteínas se transfirieron del gel a una

membrana PVDF (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare Life Sciences) previamente activada en metanol, utilizando el Mini Trans-Blot® Module de Bio-Rad a 100 V durante 1 hora a 4 °C. Se verificó la presencia de proteínas utilizando una solución Ponceau-S y se bloquearon las membranas, durante 1 hora, en agitación utilizando una solución de bloqueo (TBS 0,1%, Tween 20 (TBS-T), leche en polvo desnatada al 5%) para evitar uniones inespecíficas. Tras ello, se incubó con el anticuerpo α -FLAG-HRP (ANTI-FLAG® M2-Peroxidase (HRP); Sigma-Aldrich), a una concentración 1:5000 diluido en solución de bloqueo durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con TBS-T durante 1x15 minutos y 3x5 minutos a la misma temperatura. Para el revelado, se añadió un sustrato quimioluminiscente siguiendo las instrucciones del fabricante NZY Advanced ECL (Nzytech) y se detectaron las bandas resultantes en el Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

3.9 RNA-seq

Las líneas utilizadas en este ensayo fueron MpDELLA-GR, *Mps/y-2* MpDELLA-GR y EF1 α ::MpSLY-cit MpDELLA-GR #9. Se propagaron 25 gemas/medio de cada línea para poder obtener la mayor cantidad de tejido posible y se dejaron crecer en ambos tratamientos durante 2 semanas a 22°C en condiciones de luz blanca fluorescente continua (100 μ mol de fotones m^2s^{-1}). Los medios utilizados son mock y DEX. Se recogió el material vegetal e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Una vez congeladas, se machacaron las muestras utilizando un mortero y se extrajo el contenido de RNA mediante el uso del kit Nucleospin® RNA Plant de la empresa Macherey-Nagel. Tras esto, se comprobó la concentración obtenida de RNA durante la extracción, así como su calidad utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y se llevaron todas las concentraciones de las extracciones a la dilución más pequeña obtenida para evitar diferencias debidas a la eficiencia de la extracción. La preparación de librerías y la secuenciación se realizaron en una plataforma Illumina NextSeq 500 en el Beijing Genomics Institute (Hong Kong, China), que nos suministraron un mínimo de 20 millones de lecturas “paired-ends” de 100 pb por muestra. La calidad de las lecturas se comprobó con FastQC v.0.11.9. Los adaptadores se eliminaron de las lecturas usando Cutadapt, y los alineamientos a la v6 del genoma de *M. polymorpha* y el conteo de lecturas por gen se realizaron con distintas opciones del paquete Samtools en Linux. Por último, el análisis de expresión diferencial se realizó con la herramienta online Degust (<https://degust.erc.monash.edu/>) empleando el programa Limma.

Tabla 1. Secuencias de los primers y guías utilizados.

Nombre	Secuencia
gRNA1 <i>Mpsly</i>	5'- CTC GAT CAT CAT CAG GAA ACG AGG -3'
gRNA2 <i>Mpsly</i>	5'- TAG TAG TAG TCC TTT GCT CCC AAA -3'
MMS_091 (fw)	5'- CTG CTC ATC ATC ATC GTC ATC G -3'
MMS_092 (rv)	5'- ACT TGG TCT TTG CTC CAT TCG -3'
DELLA:GRfw (fw)	5'- AGG AGA ACA ATG GCT GCC -3'
DELLA:GRrv (rv)	5'- AGG GGT GAG CTG TGG TAA T -3'
MMS_097(fw)	5'- TCG ATT CAG CAC TGG CCA T -3'
GFP_rv (rv)	5'- TCG CCG GAC ACG CTG AAC TTG TG -3'

4. RESULTADOS

4.1 MpSLY y MpDELLA interactúan físicamente entre sí en plantas

Para averiguar si MpSLY y MpDELLA están relacionadas funcionalmente, el primer paso es comprobar si son capaces de interactuar entre sí, como sucede en otras especies de plantas vasculares (Hernández-García et al., 2019; 2021). En un trabajo previo se había comprobado que MpSLY y MpDELLA interactúan entre ellas en un ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) (Fernández-Bonilla, 2023). Ya que se trata de un sistema heterólogo muy alejado de las plantas, decidimos emplear una nueva técnica esta vez para comprobar si dicha interacción se produce también en células vegetales. Para ello se realizó un ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) en *Nicotiana benthamiana*.

La BiFC consiste en la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con los genes objeto de estudio fusionados cada uno con las mitades complementarias de una proteína fluorescente que por sí solas no presentan la capacidad de emitir luz. Así pues, si se da una interacción entre las dos proteínas de interés las dos mitades del fluoróforo estarán lo suficientemente cercanas como para reconstruir el fluoróforo completo y así poder emitir cuando absorbe radiación a la longitud de onda correspondiente.

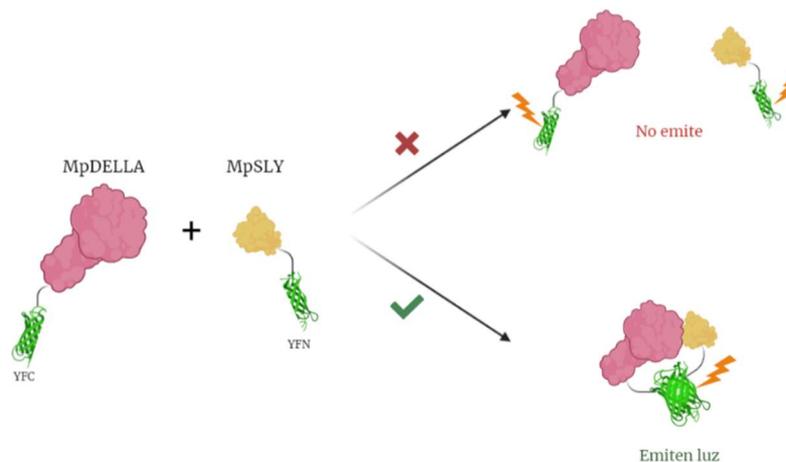


Figura 7. Esquema gráfico del ensayo de BiFC donde la proteína YFP es dividida en dos partes y si se da la interacción se reconstruirá la proteína, emitiendo luz.

En este trabajo se utilizó como fluoróforo la proteína fluorescente amarilla (YFP), que se excita a una longitud de onda de 503nm y emite a una longitud de onda de 517 nm cuando esta se reconstituye. En este caso se fusionó MpDELLA con la mitad N-terminal de la YFP (YFN) y MpSLY con la mitad C-terminal (YFC). También se realizaron las construcciones recíprocas, así como una pareja de construcciones control: GAIdel2-YFN y GAIdel2-YFC. La proteína GAIdel2 es la una versión truncada de la proteína GAI que ha perdido la capacidad de interactuar con ninguna proteína (Marín-de la Rosa et al., 2015).

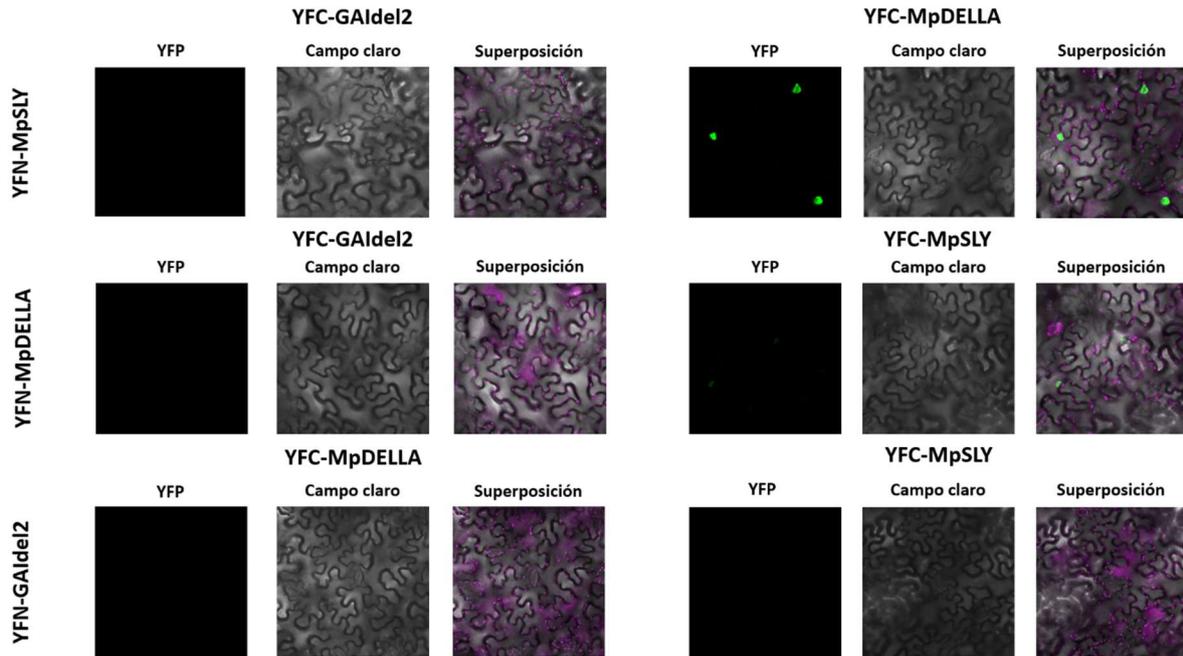


Figura 8. Ensayo BiFC: interacción entre MpDELLA y MpSLY, se usó GAIdel2 como control negativo. YFP reconstruida se excita a 503 nm y emite a 517 nm

Tal y como se muestra en la Figura 8, tanto cuando se analiza la interacción YFN-MpSLY con YFC-MpDELLA como cuando se analiza la interacción YFN-MpDELLA con YFC-MpSLY se mostró señal fluorescente en las hojas, mientras que en las interacciones usadas como controles negativos no aparece señal como cabría esperar. Este resultado nos permite confirmar en células vegetales la interacción entre MpSLY y MpDELLA que ya se veía en levaduras.

4.2 La presencia/ausencia de MpSLY altera el efecto de la actividad de MpDELLA

Para investigar si la interacción entre MpSLY y MpDELLA tiene algún efecto sobre la actividad de MpDELLA, decidimos generar mutantes de *M. polymorpha* de pérdida y de ganancia de función de MpSLY. Y para relacionar el fenotipo de estos mutantes con la actividad de MpDELLA, realizamos dichas mutaciones en un fondo genético denominado MpDELLA-GR. Este fondo genético proviene del silvestre Tak-1 que se transformó con la construcción EF1 α ::MpDELLA-GR. Estas plantas expresan de manera constitutiva una fusión entre MpDELLA y el receptor de glucocorticoides (GR). La presencia de GR confiere a MpDELLA una localización citoplasmática, y sólo se trasloca al núcleo (donde realmente ejerce su función) cuando las plantas se tratan con el glucocorticoide dexametasona (DEX) (Figura 9) (Hernández-García et al., 2021). En los ensayos que realizaremos provocaremos la acumulación de MpDELLA en el núcleo en fondos silvestre y mutantes, y observaremos el efecto que tiene dicha MpDELLA sobre el crecimiento de las plantas.

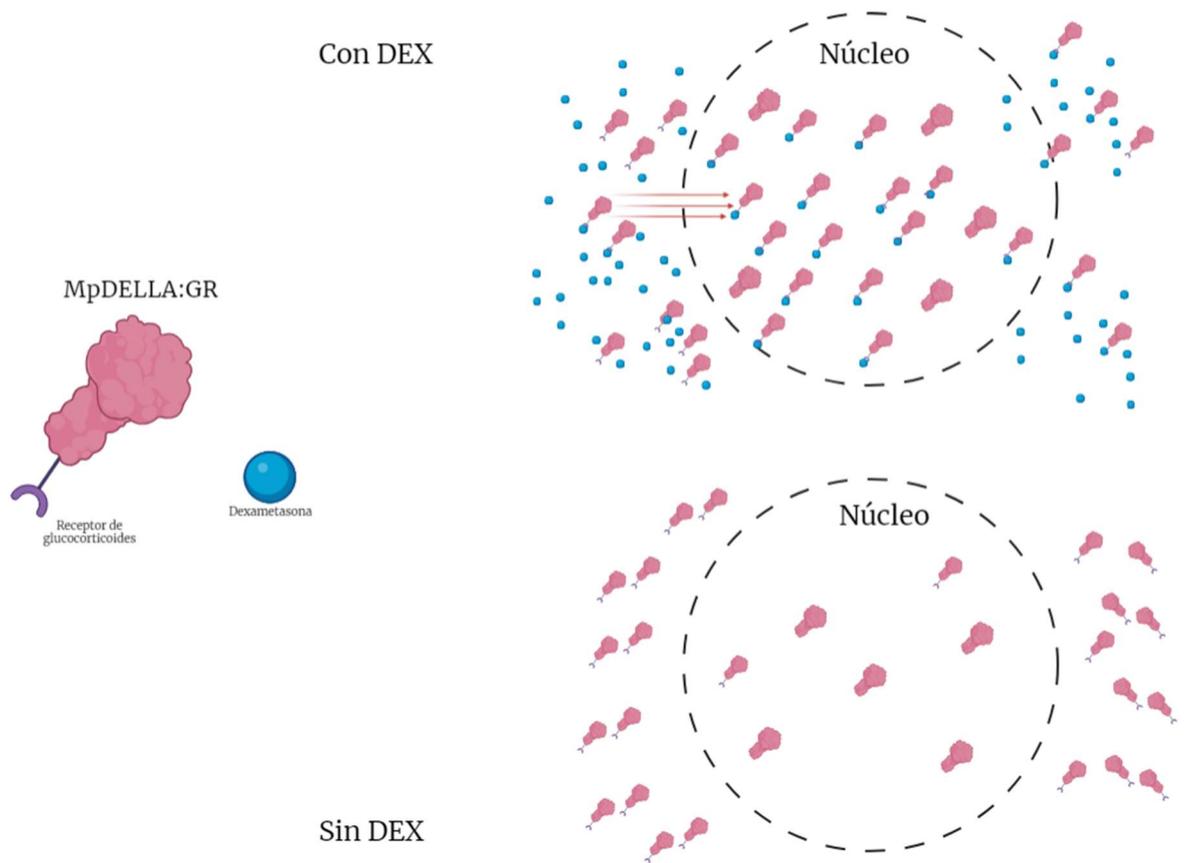


Figura 9. Representación del efecto de la MpDELLA-GR en presencia y ausencia de DEX

Las líneas mutantes se generaron mediante el uso de CRISPR/Cas9 usando dos RNA guías: “gRNA1 *Mps/y*” y “gRNA2 *Mps/y*”, los cuales dirigen a las Cas9 a la secuencia del gen *MpSLY* permitiendo así su mutación (Figura 10A). Gracias a la utilización de los primers MMS_091 y MMS_092, se genotiparon las líneas mutantes obtenidas resultando en tres alelos— *Mps/y*-2 (MpDELLA-GR), *Mps/y*-18 (MpDELLA-GR) y *Mps/y*-22 (MpDELLA-GR)— cuyas secuencias fueron modificadas tal y como se detallan en la Figura 10B. Mientras que en *Mps/y*-2 (MpDELLA-GR) sufrió una delección en 2 bases, *Mps/y*-18 (MpDELLA-GR) se vio alterado mediante una delección de 5 bases y, en cambio, en *Mps/y*-22 (MpDELLA-GR) se adicionaron dos bases. Todas estas modificaciones en la secuencia del gen provocan un cambio en la pauta de lectura produciendo una versión truncada al inicio de *MpSLY*.

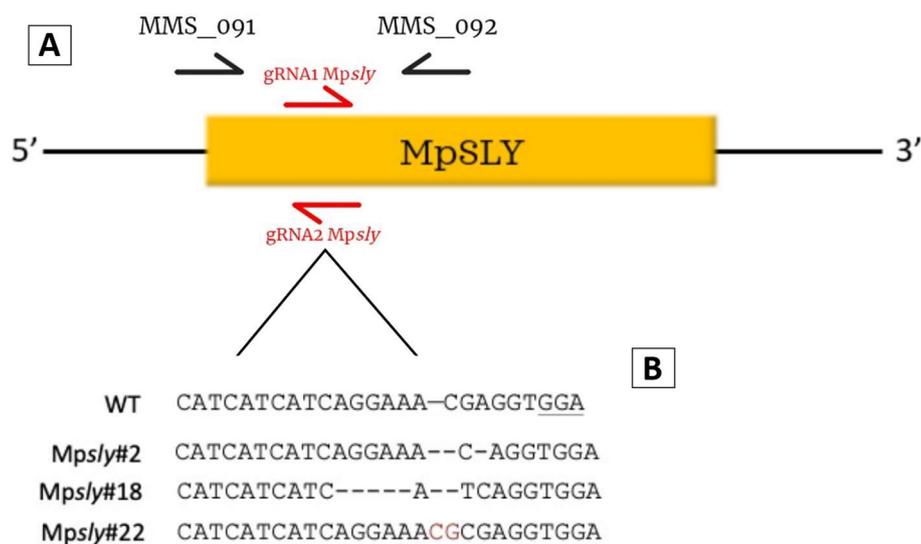


Figura 10. Genotipado de la mutación del gen *MpSLY* mediante el sistema Crisp/CAS9 en el fondo genético *MpDELLA-GR*. **A.** Esquema gráfico de la secuencia *MpSLY*, las guías y los primers utilizados durante el genotipado. **B.** Secuencia de DNA de *MpSLY* (3528 pb) en la línea silvestre Tak-1 y las líneas mutantes *Mpsly* generadas mediante CRISPR/Cas9, alrededor de la secuencia PAM (subrayada) Las deleciones se indican con (-) y las inserciones están escritas en rojo

Por otra parte, las líneas sobreexpresoras de *MpSLY* (*MpSLYox*) se crearon a partir de la transformación de la línea *MpDELLA-GR*, introduciéndole la construcción *EF1 α ::MpSLY-citrina*, donde el gen *MpSLY* fusionado al reportero *-citrina* se expresa bajo el control de un promotor constitutivo. Se generaron cuatro líneas *MpSLYox* distintas — *EF1 α ::MpSLY-citrina* (*MpDELLA-GR*) #8, *EF1 α ::MpSLY-citrina* (*MpDELLA-GR*) #9, *EF1 α ::MpSLY-citrina* (*MpDELLA-GR*)#12 y *EF1 α ::MpSLY-citrina* (*MpDELLA-GR*) #15 —, cuya identidad se comprobó mediante PCR de la secuencia de *MpDELLA-GR* usando los primers *DELLA:GRfw* y *DELLA:GRrv* (amplicón de 242pb) (Figura 11A y 11B). Para comprobar si hay un patrón de expresión de *MpSLY* mayor en *MpSLYox* se extrajo el ARN de plantas de 2 semanas de edad y se realizó una RT-PCR del transcrito del gen *MpSLY* usando los primers *MMS_097* y *MMS_092* (amplicón de 200pb) (Figura 11C y 11D). Se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 11D, observándose señal pero sin poder concluir diferencias significativas. La comprobación de que el transcrito se estaba expresando llegó mediante la observación en el microscopio confocal del reportero *-citrina* unida a la proteína *MpSLY* (Figura 11E).

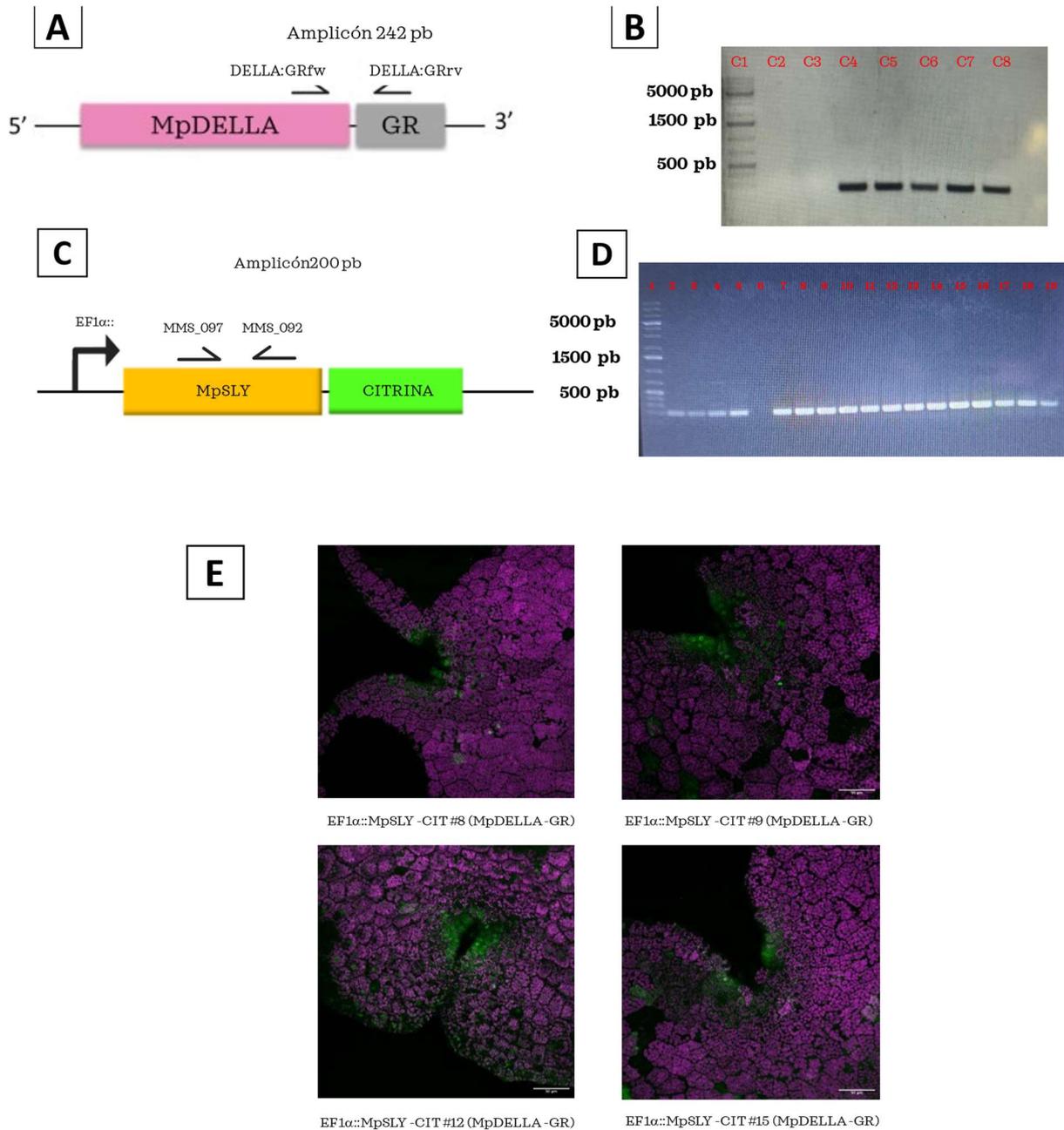


Figura 11. Genotipado de MpSLYox **A.** Esquema gráfico de la secuencia MpDELLA-GR y los primers utilizados durante el genotipado. **B.** Gel de electroforesis que muestra el resultado de la PCR generando un amplicón de 242 pb con los primers DELLA:GRfw y DELLA:GRrv cada carril muestra los siguiente: C1: *GeneRuler 1kb DNA Ladder*; C2: H_2O ; C3: *Tak-1*; C4: *MpDELLA-GR*; C5: *EF1α::MpSLY-CITRINA #8 (MpDELLA-GR)*; C6: *EF1α::MpSLY-CITRINA #9 (MpDELLA-GR)*; C7: *EF1α::MpSLY-CITRINA #12 (MpDELLA-GR)*; C8: *EF1α::MpSLY-CITRINA #15 (MpDELLA-GR)* **C.** Esquema gráfico de la secuencia *EF1α::MpSLY-citrina* y los primers utilizados durante el genotipado. **D.** Gel de electroforesis que muestra el resultado de la PCR generando un amplicón de 242 pb con los primers MMS_097 y MMS_092 cada carril muestra los siguiente: C1: *GeneRuler 1kb DNA Ladder*; C2-C4: *Tak-1*; C5-7: *MpDELLA-GR*; C8-10: *EF1α::MpSLY-CITRINA #8 (MpDELLA-GR)*; C11-13: *EF1α::MpSLY-CITRINA #9 (MpDELLA-GR)*; C14-16: *EF1α::MpSLY-CITRINA #12 (MpDELLA-GR)*; C17-19: *EF1α::MpSLY-CITRINA #15 (MpDELLA-GR)* **E.** Imagen capturada al microscopio confocal Zeiss LSM 780 excitando al reportero *-citrina* a una longitud de 515 nm y capturando la emisión a 528 nm.

A simple vista, las líneas sobreexpresoras y mutantes de MpSLY no mostraron grandes diferencias de aspecto o de tamaño con respecto a su parental MpDELLA-GR en ausencia de DEX (es decir, con niveles silvestres de actividad MpDELLA) (Figura 12). Tan sólo se puede destacar que las *Mpsly* eran ligeramente más pequeñas y presentaban más *gemma cups*, que son las estructuras donde se generan las gemas utilizadas para la propagación asexual de la planta, y en zonas diferentes a MpDELLA-GR. En cambio, algunas de las MpDELLA-GR desarrollaban más talos que las plantas mutantes. Por el contrario, las línea MpSLYox desarrollaron más lóbulos en el talo que el resto de las líneas, y además eran más alargadas a las demás y con un desarrollo retrasado de *gemma cups*.

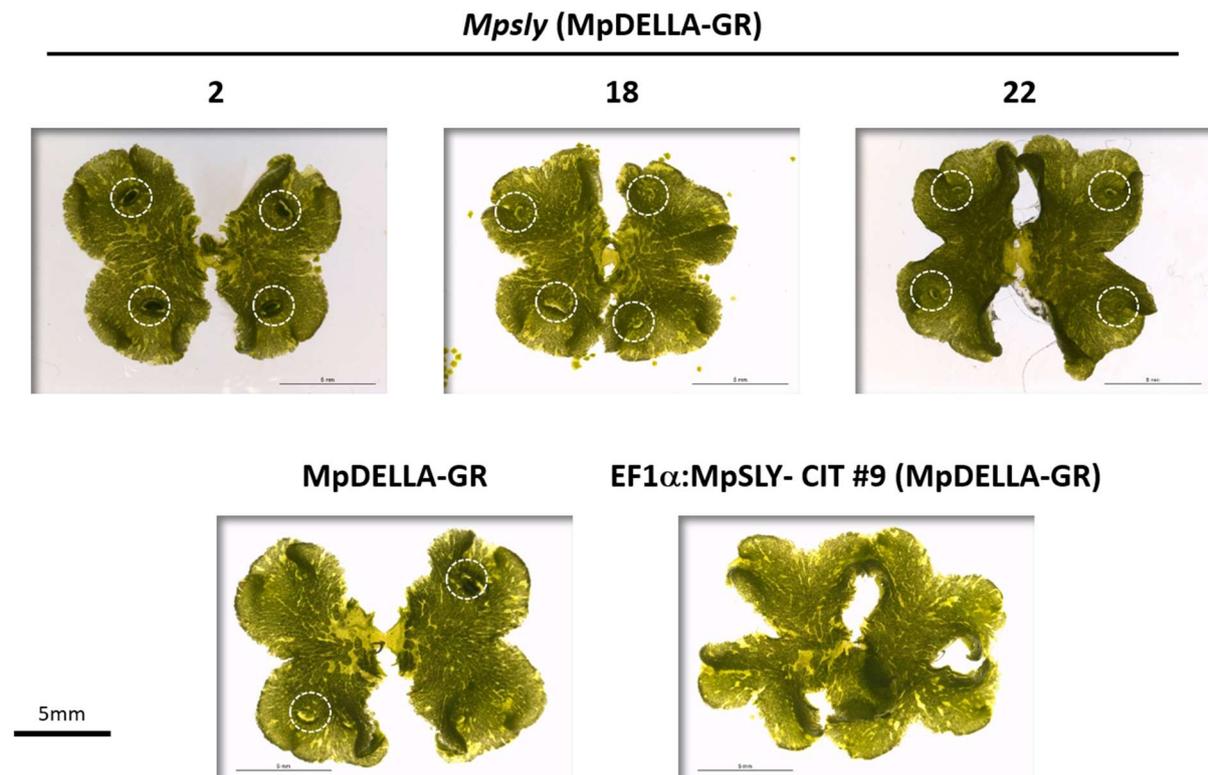


Figura 12. Fenotipado de las líneas mutantes *Mpsly* y MpSLYox comparadas con su fondo genético MpDELLA-GR, después de crecer durante tres semanas en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa a 22°C a luz blanca fluorescente en ciclo de día largo. Las circunferencias discontinuas blancas muestran la localización de las *gemma cups*. La escala mostrada en las imágenes es de 5 mm.

Uno de los defectos causados por la sobreacumulación de MpDELLA en el núcleo es el retraso en la formación de gametangióforos (Hernández-García et al, 2021). Para averiguar si la actividad de MpSLY influye en este proceso reproductivo de , se indujo la formación de gametangióforos mediante la iluminación con luz roja lejana (Kohchi et al., 2021) y se contabilizaron las estructuras que aparecían. Como se había descrito previamente, las plantas silvestres comenzaron a producir gametangióforos a los 12 días, mientras que la sobreexpresión de MpDELLA impedía la entrada en fase reproductora. En cuanto a MpSLY, dos de las líneas de pérdida de función mostraron un amplio retraso en la formación de gametangióforos, mientras que la tercera línea se comportó como una silvestre. Y la única línea sobreexpresora examinada también mostró una ausencia de gametangióforos durante todo el

experimento (Figura 13). En cuanto a la morfología de los gametangióforos, eran de mayor tamaño aquellos que provenían de Tak-1 con respecto a los mutantes, siendo entre estos *Mpsly-2* el que presentaba anteridióforos (gametangióforo masculino) más grandes.

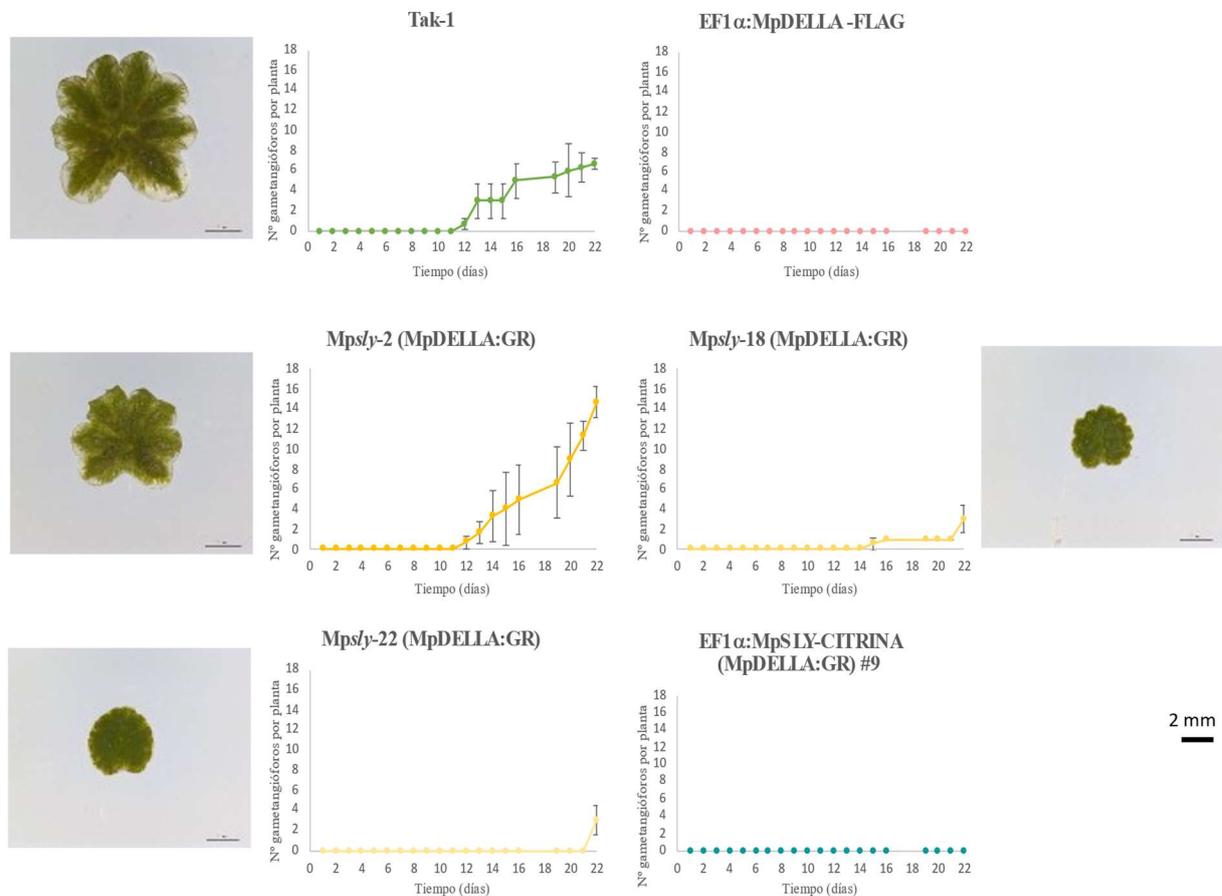


Figura 13. Formación de gametangióforos en líneas sobreexpresoras de MpDELLA, MpSLY y mutantes *Mpsly*. Junto a cada gráfica se muestra una imagen representativa del anteridióforo (gametangióforo masculino), de cada una de las líneas donde aparecieron gametangióforos. La escala mostrada en las imágenes es de 2 mm.

Una vez caracterizado el efecto de la sobreexpresión y la mutación de MpSLY en plantas silvestres para MpDELLA, decidimos examinar el efecto de dichas alteraciones sobre la actividad de MpDELLA de forma más específica. Para ello hicimos uso de uno de los efectos más claros de la sobreacumulación de MpDELLA: la inhibición del crecimiento vegetativo de *M. polymorpha* (Hernández-García, Sun, et al., 2021). Se cultivaron plantas de *M. polymorpha* de los distintos genotipos durante 3 semanas en ausencia (mock) y en presencia de 100 nM DEX y se midió el área de varias plantas de cada línea.

La activación de MpDELLA-GR causó una reducción significativa en el tamaño de las plantas tanto en fondo silvestre como *Mpsly* (Figura 14A). En cuanto a las diferencias entre genotipos, se vio que todas las mutantes menos *Mpsly-22* (MpDELLA-GR) presentaban diferencias de tamaño en mock con respecto a la planta madre en mock. Por ejemplo, la línea *Mpsly-18* (MpDELLA-GR) en mock no presentaba diferencias significativas con respecto a MpDELLA-GR en 100 nM DEX (Figura 14A). También se calculó el cociente de inhibición del crecimiento por el tratamiento de DEX en cada línea,

no resultando en diferencias significativas entre las líneas (Figura 14B), pero las líneas Mpsly-2 y Mpsly-18 respondieron a DEX reduciendo aún más que una silvestre el tamaño final de las plantas.

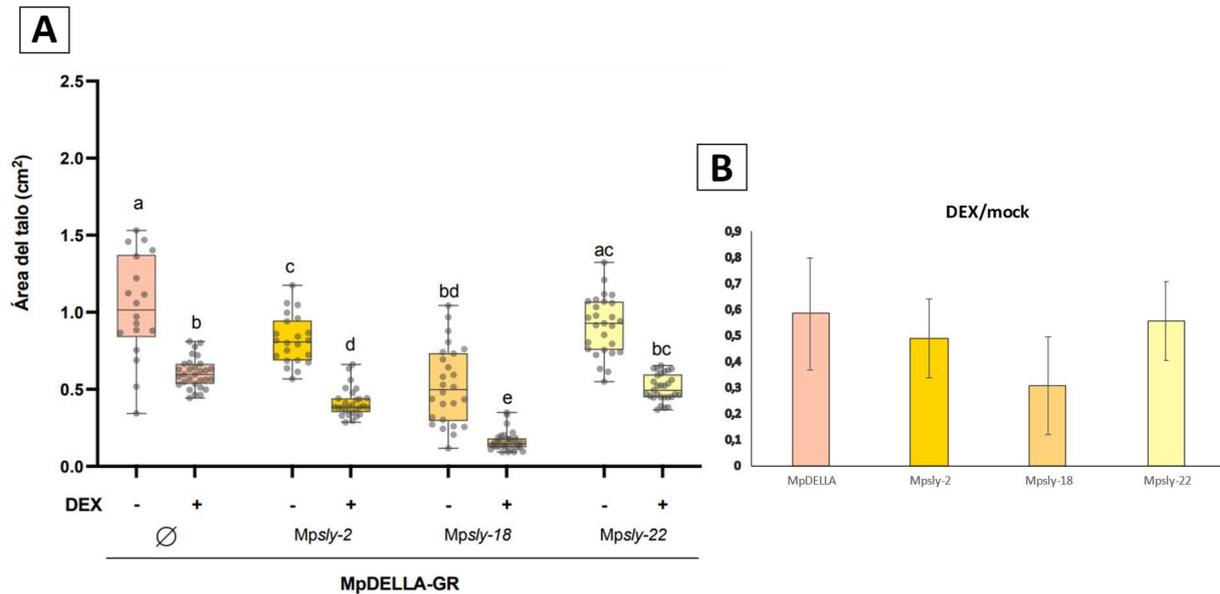


Figura 14. Tratamiento DEX de Mpsly. **A.** Medidas de área de MpDELLA-GR y las líneas mutantes de MpSLY con 3 semanas de edad cultivadas en mock (-) y en presencia de una concentración de 100 nM DEX (+). El número mínimo de plantas fenotipadas fue de 18 para todas las líneas. Los valores de cada línea y para cada tratamiento que no comparten la misma letra difieren significativamente. **B.** Ratios DEX/mock para cada una de las líneas.

Por otro lado, las líneas sobreexpresoras también fueron comparadas con MpDELLA-GR. A diferencia de las mutantes de pérdida de función, todas las líneas sobreexpresoras se mostraron insensibles al tratamiento con 100 nM DEX. no son significativamente diferentes en tamaño cuando crecen en mock. En cambio, EF1 α ::MpSLY-CITRINA #12 (MpDELLA-GR) y EF1 α ::MpSLY-CITRINA #15 (MpDELLA-GR) no responden al tratamiento de DEX, en cuanto a una reducción de tamaño ya que no presentaban diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, las línea EF1 α ::MpSLY-CITRINA #8 (MpDELLA-GR) o la línea EF1 α ::MpSLY-CITRINA #9 (MpDELLA-GR) obtuvieron una diferencia significativa entre los dos tratamientos pero no una reducción sino un aumento en la superficie medida (Figura 15A). Al igual que ocurrió con las mutantes, se calculó el cociente de inhibición del crecimiento por el tratamiento de DEX, no resultando en diferencias significativas entre las líneas sobreexpresoras pero si con MpDELLA-GR (Figura 15B).

Para ver si la capacidad inhibitoria de MpSLY sobre la actividad de MpDELLA dependía de la dosis relativa de las dos proteínas, repetimos el experimento a una concentración mayor de DEX (1 μ M). Como muestra la Figura S1, a esta concentración de DEX las plantas con sobreexpresión de MpSLY sí que redujeron su tamaño, aunque dicha reducción fue menor que la observada en la línea MpDELLA-GR con niveles normales de MpSLY.

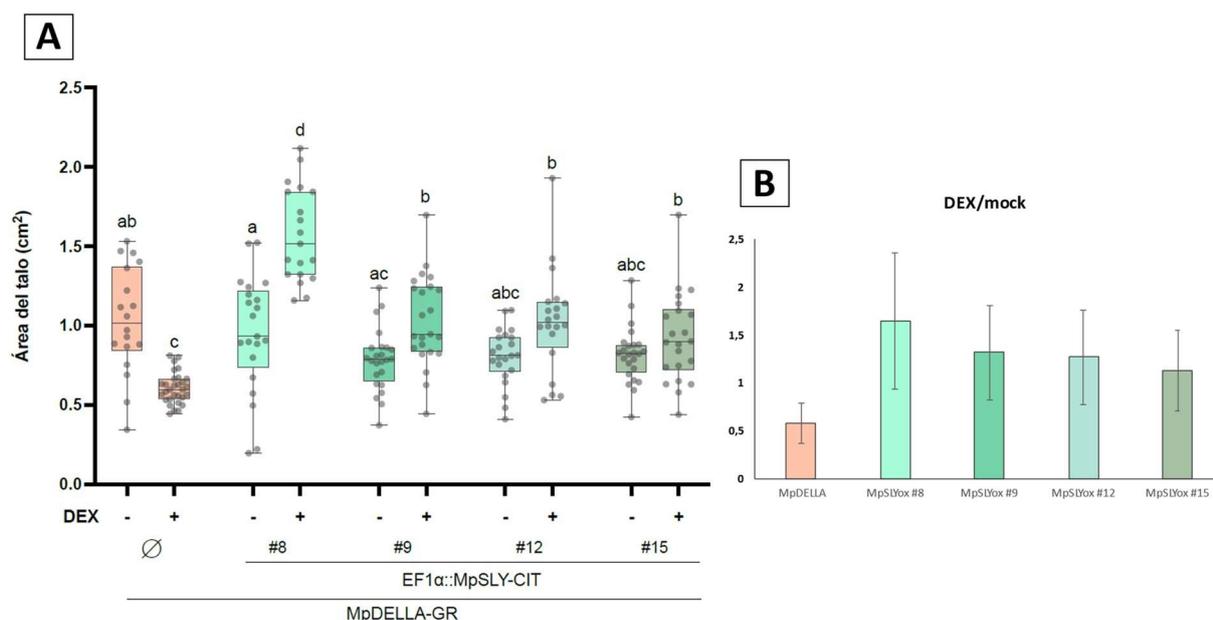


Figura 15. Tratamiento DEX de MpsLYox A. Medidas de área de MpDELLA-GR y las líneas sobreexpresoras de MpsLY con 3 semanas de edad cultivadas en mock (-) y en presencia de una concentración de 100 nM DEX (+). El número mínimo de plantas fenotipadas fue de 18 para todas las líneas. Los valores de cada línea y para cada tratamiento que no comparten la misma letra difieren significativamente. **B.** Ratios DEX/mock para cada una de las líneas.

4.3 La sobreexpresión de MpsLY altera la cantidad de proteína en MpDELLAox

Teniendo en cuenta la identidad de MpsLY (una proteína F-box, que suele estar implicada en el marcaje de proteínas para su degradación), la interacción física con MpDELLA, y el efecto negativo de MpsLY sobre la actividad de MpDELLA, una explicación hipotética para la relación funcional entre ambas proteínas sería que MpsLY promoviese la degradación de MpDELLA. Para comprobarlo, se construyó una línea transgénica de *M. polymorpha* expresando la proteína MpDELLA etiquetada con el epítipo Flag bajo el control de un promotor constitutivo, y sobre ella se introdujo la construcción para sobreexpresar MpsLY-citrina. La comprobación de que las líneas generadas presentaban el transgén MpsLY-citrina se realizó mediante PCR como se muestra en la Figura 16A. De esta manera se seleccionaron las líneas: EF1α::MpsLY-CITRINA #1 (EF1α::MpDELLA-FLAG), EF1α::MpsLY-CITRINA #4 (EF1α::MpDELLA-FLAG), EF1α::MpsLY-CITRINA #7 (EF1α::MpDELLA-FLAG), EF1α::MpsLY-CITRINA #8 (EF1α::MpDELLA-FLAG) y EF1α::MpsLY-CITRINA #9 (EF1α::MpDELLA-FLAG).

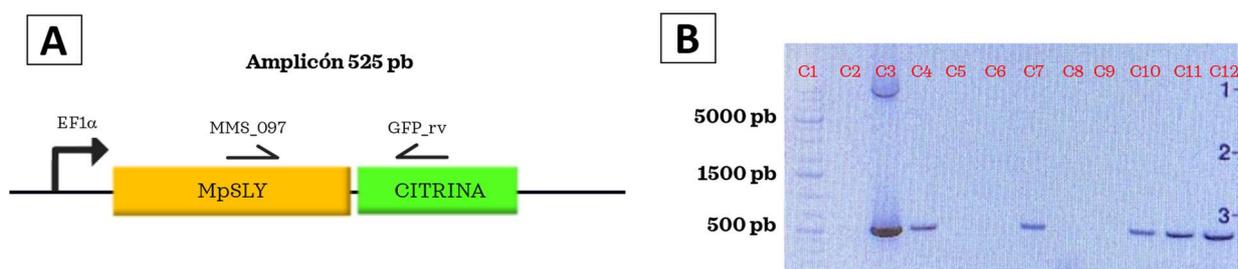


Figura 16. Genotipado EF1 α ::MpSLY-CITRINA (EF1 α ::MpDELLA-FLAG A. Esquema gráfico de la secuencia EF1 α ::MpSLY-CITRINA y los primers utilizados durante el genotipado. **B.** Gel de electroforesis que muestra el resultado de la PCR generando un amplicón de 525 pb con los primers DELLA:GRfw y DELLA:GRrv cada carril muestra los siguiente: C1: GeneRuler 1kb DNA Ladder; C2: H₂O ; C3: MpSLY- pMpGWB108; C4: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #1 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG) ; C5: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #2 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C6: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #3 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C7: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #4 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C8: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #5 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C9: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #6 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C10: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #7 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C11: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #8 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C12: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #9 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG)

A continuación realizamos un análisis de Western Blot utilizando el anticuerpo α -FLAG-HRP en muestras extraídas de plantas de 14 días de edad de la línea EF1 α ::MpDELLA-Flag y dos líneas EF1 α ::MpDELLA-FLAG MpSLYox (#1 y #8).

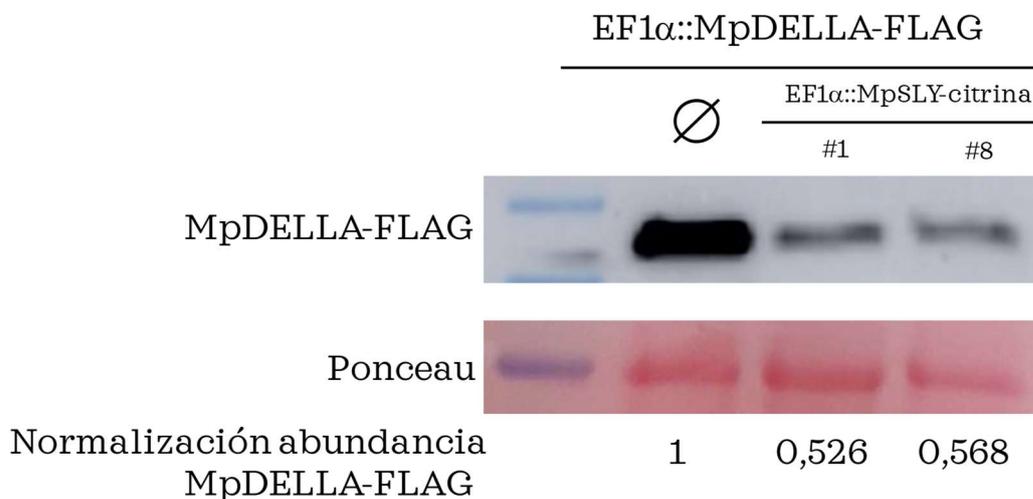


Figura 17. Ensayo Western Blot utilizando el anticuerpo α -FLAG-HRP. Cada columna contiene: C1: PageRuler Prestained Protein Ladder ; C2: EF1 α ::MpDELLA-FLAG; C3: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #1 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG); C4: EF1 α ::MpSLY-CITRINA #8 (EF1 α ::MpDELLA-FLAG). En la primera fila se muestra el resultado del revelado quimioluminiscente del anticuerpo, en la segunda se muestra la imagen del Ponceau y en la tercera fila se muestran los valores de la normalización de la abundancia de MpDELLA-FLAG con respecto a la línea EF1 α ::MpDELLA-FLAG

Como muestra la Figura 17, el resultado obtenido mostró que la línea EF1 α :MpDELLA-Flag presenta mayor cantidad de proteínas MpDELLA que las dos líneas sobreexpresoras MpSLY, las cuales su cantidad de MpDELLA se vio reducida a la mitad aproximadamente.

4.4 Análisis transcriptómico de la pérdida de función de MpSLY

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren que MpSLY podría ser la proteína F-box que regula los niveles de la proteína MpDELLA: los mutantes *Mpsly* mostraron mayor sensibilidad frente a MpDELLA al analizar su efecto en el crecimiento del talo; y la sobreexpresión de MpSLY causó una reducción en los niveles de MpDELLA, así como una mayor insensibilidad a la activación de MpDELLA. Para saber si la hipotética regulación de MpDELLA por MpSLY se manifiesta únicamente en el control del crecimiento o si se podría extender a otros procesos regulados por MpDELLA de forma general, decidimos realizar un análisis transcriptómico de plantas en las que activamos MpDELLA-GR mediante la adición de DEX, tanto en un fondo silvestre como en un fondo mutante para *Mpsly*.

Se cultivaron plantas EF1 α ::MpDELLA-GR (a partir de ahora “DGR”) y del mutante EF1 α ::MpDELLA-GR *Mpsly-2* (a partir de ahora “*Mpsly*”) durante 14 días en medio ½ Gamborg B5 1% sacarosa (mock) y medio ½ Gamborg B5, 1% sacarosa suplementado con 100nM DEX (DEX), tras lo que se recogieron las muestras, se extrajo el RNA y se envió a secuenciar a la empresa Beijing Genomics Institute (BGI) mediante la plataforma de Illumina. El análisis informático indicó que el comportamiento transcriptómico fue significativamente distinto en las cuatro condiciones (los dos genotipos y el tratamiento) (Figura 18A). El tratamiento con DEX en una planta silvestre para MpSLY causó una expresión diferencial, estadísticamente significativa (FDR<0.01) de 269 genes (208 inducidos, 61 reprimidos) (Figura 18B). Ese mismo tratamiento en el mutante *Mpsly* alteró la expresión de 518 genes (299 inducidos, 219 reprimidos) (Figura 18B). Pero lo que resultó más interesante es que entre los genes diferencialmente regulados por MpDELLA en un fondo silvestre, la tendencia fue la de mostrar una diferencia todavía mayor en el mutante *Mpsly* (Figura 18C). Estos resultados encajan con la idea de que la falta de MpSLY causa una mayor acumulación de MpDELLA y por tanto unos mayores efectos transcripcionales que en plantas silvestres.

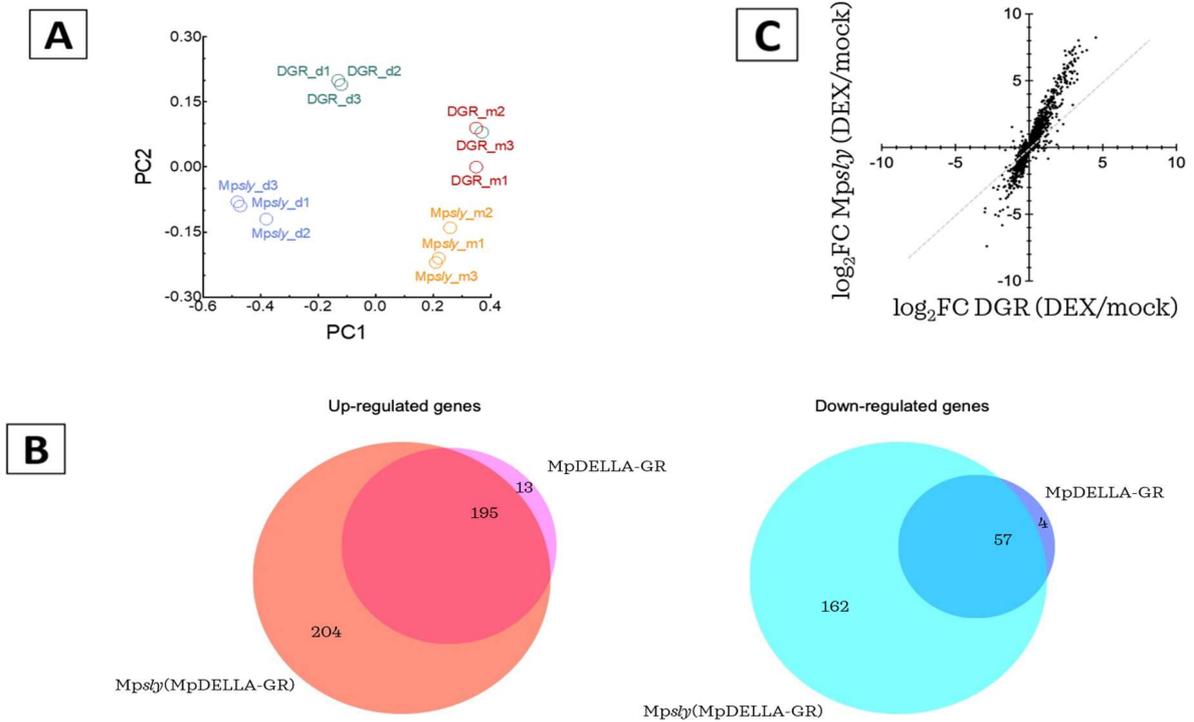


Figura 18. Análisis transcriptómico de MpDELLA-GR (DGR) y la línea mutante de MpsLY (Mpsly). **A.** Análisis de las componentes principales (PCA) de las líneas crecidas en mock y en 100 nM DEX. **B.** Diagrama de Venn mostrando el número de genes que se expresan (rojo) o se reprimen (azul) dos veces más ($\log_2FC > 1$ para los sobreexpresados y $\log_2FC < -1$ para los reprimidos, con un false discovery rate (FDR) < 0.01) cuando crecen en 100 nM DEX en ambas líneas, superponiéndose los genes donde ocurre el suceso en ambas líneas. **C.** Gráfica de inducción de expresión por DEX, donde en el eje X se muestra el \log_2FC de DELLA-GR (DGR) cuando crece en DEX frente a mock y el eje Y muestra ese mismo valor para Mpsly (DELLA-GR). La línea gris discontinua muestra la línea de tendencia de la constante

5. DISCUSIÓN

Las fitohormonas, como las giberelinas, desempeñan un papel fundamental en la integración de estímulos externos al activar una vía de señalización en respuesta a ellos. Sin embargo, esta ruta no está conservada a lo largo de los linajes de las plantas. Las plantas no vasculares como *Marchantia polymorpha*, carecen de GAs y su receptor *GID1*, no obstante, se han identificado ortólogos tanto de *DELLA* y como de la f-box *SLY*, responsable de la poliubiquitinación y degradación de las *DELLA*. Esto plantea la hipótesis de que la f-box pueda regular de forma independiente la degradación de *MpDELLA*.

5.1 *MpSLY* y *MpDELLA* interactúan físicamente entre sí en plantas

Para ello se comprobó si estas dos proteínas presentaban la capacidad de interactuar entre ellas. Hirano et al, revela que la interacción entre *DELLA* y *SLY* en los ortólogos de arroz ocurre específicamente cuando la proteína *DELLA* experimenta cambios conformacionales debido a la unión del complejo hormona giberelina (GA)-receptor *GID1* (Hirano et al., 2010). En cambio, nuestro ensayo de BiFC muestra la interacción entre estas dos proteínas sin la necesidad de ninguna interacción previa (Figura 8). Esto respalda los resultados vistos previamente en el laboratorio donde se llegó a la misma conclusión empleando el sistema Y2H (Fernández-Bonilla, 2023). Estos resultados confirman que la interacción entre ambas proteínas sigue siendo efectiva en células vegetales. Aun así, estos dos ensayos solo permiten visualizar si la interacción existe o no, pero no indica como se da ni en qué región ocurre.

5.2 La presencia/ausencia de *MpSLY* altera el efecto de la actividad de *MpDELLA*

En *Marchantia polymorpha* *DELLA* mantiene su capacidad de regular la división celular, las respuestas durante el desarrollo y al estrés. Este trabajo tiene como objetivo dilucidar si la f-box *MpSLY* altera la estabilidad y/o actividad de *MpDELLA*. Para ello se generaron líneas mutantes y sobreexpresoras del gen *MpSLY* en un fondo de sobreexpresión condicional, *MpDELLA*. La línea *EF1 α ::MpDELLA-GR* presenta una fusión al receptor de glucocorticoides (GR) y sólo se transloca al núcleo, donde *MpDELLA* es activa, cuando son tratadas con el glucocorticoide dexametasona. Gracias a esta línea somos capaces de relacionar la pérdida o ganancia de función de *MpSLY* con la actividad de *MpDELLA* de forma más directa.

Las diferencias que se pueden observar a nivel de fenotipo en estas líneas son las siguientes: El tamaño de los talos varía ligeramente entre líneas. las líneas mutantes *Mpsly* (*DELLA-GR*) en comparación a la línea original (*DELLA-GR*) presentan un tamaño menor. Sin embargo, *Mpsly* presenta un incremento en la formación de copas. En la línea sobreexpresora *MpSLY* (*DELLA-GR*) se observa una inversión en ambos fenotipos, se caracteriza por una formación de talo más alargado y un retraso en la formación de copas. Previamente se ha descrito que en líneas que sobreexpresan el gen *MpDELLA* el tamaño de la planta es menor, esto podría concordar con la hipótesis de que *MpSLY* reduce los niveles de

MpDELLA y por lo tanto muestra un fenotipo similar en cuanto al tamaño de la planta (Hernández-García et al., 2021). Además, se observó la aparición de gametangióforos donde en ambas líneas se observó una alteración en la formación de los anteridióforos. La línea mutante presenta estructuras de menor tamaño, mientras que en la línea sobreexpresora no se desarrolla (Figura 13). En Hernández-García et al. (2021) muestra que la sobreexpresión de MpDELLA retrasa la aparición de los anteridióforos. La formación de estructuras sexuales en *M. polymorpha* podría estar regulado por la actividad de MpDELLA, y donde MpSLY podría jugar un papel secundario afectando su estabilidad (Hernández-García et al., 2021).

El experimento clave para poder asociar la actividad de MpDELLA a la pérdida y ganancia de función de MpSLY fue el tratamiento con dexametasona (Figura 14 y Figura 15). La acumulación de MpDELLA provoca una reducción en el crecimiento de las plantas (Hernández-García et al., 2021). Anteriormente se ha descrito que las líneas transgénicas presentan tamaños diversos a la MpDELLA-GR en el medio sin tratamiento de DEX. Sin embargo, frente al glucocorticoide las líneas *Mpsly* reducían incluso más el tamaño con respecto a MpDELLA-GR lo cual indica la sensibilidad al tratamiento. La capacidad de MpSLY para degradar MpDELLA se ve afectada en los mutantes de *Mpsly*. Por otro lado, las *MpSLYox* a la misma concentración de DEX, no parecen verse afectadas en su crecimiento a pesar de presentar más MpDELLA en su núcleo. Estas líneas presentan sensibilidad a DEX cuando se someten a una concentración 10 veces mayor (1 μ M DEX) aunque su sensibilidad sigue siendo menor respecto a MpDELLA-GR (Figura S1). Estos resultados indican que MpSLY está afectando a la actividad normal de MpDELLA, como se ha descrito anteriormente en *Arabidopsis* y arroz al mutar *SLY1/GID2* los efectos que provoca la actividad de DELLA se vieron incrementados, mientras que el doble mutante para *SLY1/GID2* y *DELLA* revertía el efecto de la primera mutación, esto se debe a que la F-box SLY1 presenta la capacidad de degradar DELLA y de no estar presente esta se acumula incrementando así su efecto sobre la planta (Dill et al., 2004; McGinnis et al., 2003, Sasaki et al., 2003).

5.3 La sobreexpresión de MpSLY altera la cantidad de proteína en MpDELLAox

En plantas vasculares la f-box SLY regula la estabilidad de la DELLA mediante la degradación por el proteasoma 26S (Dill et al., 2004; McGinnis et al., 2003, Sasaki et al., 2003). Estudios realizados previamente en *Arabidopsis* y arroz, los mutantes *sly1* presentan una acumulación de los niveles de proteína de DELLA (Dill et al., 2004; McGinnis et al., 2003, Sasaki et al., 2003). En este trabajo se generaron líneas sobreexpresoras de MpSLY en un fondo de MpDELLA etiquetada con la proteína FLAG para estudiar los niveles de la proteína (Figura 17). Se observó que las líneas sobreexpresoras de MpSLY presentaban menor cantidad de MpDELLA. En conclusión, los niveles MpDELLA se ven afectados en presencia de la f-box, confirmando que es capaz de degradar a MpDELLA de manera independiente.

5.4 Análisis transcriptómico de la pérdida de función de MpSLY

DELLA presenta un papel clave a la hora de regular diversos FTs, modulando su patrón de expresión (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Hou et al., 2010; Marín-La Rosa et al., 2015). Esta función se ha visto que también se ha conservado en *Marchantia* (Briones-Moreno et al., 2023). En un trabajo previo se realizó un RNA-seq comparando el transcriptoma de una línea sobreexpresora de MpDELLA con la línea silvestre, viéndose que existía un número mayor de genes que incrementaban su expresión a mayor nivel de MpDELLA (Hernández-García et al., 2021). Esto puede correlacionarse en nuestros resultados ya que cuando se muta MpSLY se ve un mayor número de genes sobreexpresados con respecto a los reprimidos, esto se debería a que al no presentar una f-box capaz de degradar MpDELLA se está viendo un efecto de sobreexpresión similar al visto. También se aprecia que la mayoría de los genes diferencialmente expresados bien sea de forma positiva o negativa en MpDELLA cuando se tratan con DEX también sufren cambios de expresión diferenciales en MpSLY. En cambio, hay una mayor cantidad de genes que están cambiando su comportamiento de expresión cuando se altera a MpSLY.

6. CONCLUSIONES

Mediante la realización de este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- MpSLY y MpDELLA interaccionan en células vegetales.
- La ganancia de función de MpSLY reduce los niveles y la actividad de la proteína MpDELLA.
- La pérdida de función de MpSLY condujo a una activación excesiva de MpDELLA, tanto en términos de crecimiento como en el comportamiento de los genes diana de MpDELLA.

En definitiva, se propone que MpSLY es un potencial regulador fisiológicamente relevante de los niveles de MpDELLA, promoviendo su degradación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BELDA-PALAZÓN, B., RUIZ, L., MARTÍ, E., TÁRRAGA, S., TIBURCIO, A. F., CULIÁÑEZ, F., FARRÀS, R., CARRASCO, P., & FERRANDO, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLOS ONE*, 7(10), e46907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907>
- BLAZQUEZ, M. A., NELSON, D. R., & WEIJERS, D. (2020). Evolution of Plant Hormone Response Pathways. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 327-353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100309>
- BOWMAN, J. L., KOHCHI, T., YAMATO, K. T., GRIMWOOD, J., SHU, S., ISHIZAKI, K., YAMAOKA, S., NISHIHAMA, R., NAKAMURA, Y., BERGER, F., ADAM, C., AKI, S. S., ALTHOFF, F., ARAKI, T., ARTEAGA-VAZQUEZ, M. A., BALASUBRMANIAN, S., BARRY, K., BAUER, D., BOEHM, C., . . . TAKEZAWA, D. (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>
- BRIONES-MORENO, A., HERNÁNDEZ-GARCÍA, J., VARGAS-CHÁVEZ, C., BLANCO-TOURINÁN, N., PHOKAS, A., ÚRBEZ, C., CERDÁN, P. D., COATES, J. C., ALABADÍ, D., & BLÁZQUEZ, M. A. (2023). DELLA functions evolved by rewiring of associated transcriptional networks. *Nature plants*. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01372-6>
- CANNELL, N., EMMS, D. M., HETHERINGTON, A. J., MACKAY, J., KELLY, S. L., DOLAN, L., & FERNIE, A. R. (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>
- COLEBROOK, E. H., THOMAS, S. H., PHILLIPS, A. N., & HEDDEN, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *The Journal of Experimental Biology*, 217(1), 67-75. <https://doi.org/10.1242/jeb.089938>
- DAVIÈRE, J., & ACHARD, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147-1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>
- DAVIES, P. (2010). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. En *Springer eBooks* (pp. 1-15). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1
- DE LUCAS, M., DAVIÈRE, J., 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>
- DILL, A., THOMAS, S. H., HU, J., STEBER, C. M., & SUN, T. (2004). The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation[W]. *The Plant Cell*, 16(6), 1392-1405. <https://doi.org/10.1105/tpc.020958>

- EDWARDS, K. W., JOHNSTONE, C., & THOMPSON, C. V. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
- EISENREICH, W., ROHDICH, F., & BACHER, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2), 78-84. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01812-4](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01812-4)
- FENG, S., MARTÍNEZ, C., GUSMAROLI, G., WANG, Y., ZHOU, J., WANG, F., CHEN, L. Q., YU, L., IGLESIAS-PEDRAZ, J. M., KIRCHER, S., SCHÄFER, E., LI, W., FAN, L., & 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>
- FÉRNANDEZ-BONILLA, L. (2023) Construcción de una planta hepática con capacidad de percibir giberelinas. [TFM] Universitat politècnica de València <https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/191728/Fernandez%20-%20Construccion%20de%20una%20planta%20hepatica%20con%20capacidad%20de%20percibir%20giberelinas.pdf?sequence=1&isAllowed=>
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, J., BRIONES-MORENO, A., & BLÁZQUEZ, M. A. (2021). Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 109, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.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., GÓMEZ-CADENAS, A., 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., ASANO, K., TSUJI, H., KAWAMURA, M., MORI, H., KITANO, H., UEGUCHI-TANAKA, M., & MATSUOKA, M. (2010). Characterization of the Molecular Mechanism Underlying Gibberellin Perception Complex Formation in Rice. *The Plant Cell*, 22(8), 2680-2696. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075549>
- HOU, X., LEE, L. C., XIA, K., YAN, Y., & YU, H. (2010). DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Developmental Cell*, 19(6), 884-894. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.024>

- ISHIZAKI, K., CHIYODA, S., YAMATO, K. T., & KOHCHI, T. (2008). Agrobacterium-Mediated Transformation of the Haploid Liverwort *Marchantia polymorpha* L., an Emerging Model for Plant Biology. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1084-1091. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn085>
- ISHIZAKI, K., NISHIHAMA, R., YAMATO, K. T., & KOHCHI, T. (2015). Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 262-270. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv097>
- KASAHARA, H., HANADA, A., KUZUYAMA, T., TAKAGI, M., KAMIYA, Y., & YAMAGUCHI, S. (2002). Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45188-45194. <https://doi.org/10.1074/jbc.m208659200>
- KOHCHI, T., YAMATO, K. T., ISHIZAKI, K., YAMAOKA, S., & NISHIHAMA, R. (2021). Development and Molecular Genetics of *Marchantia polymorpha*. *Annual Review of Plant Biology*, 72(1), 677-702. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-082520-094256>
- 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>
- LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M., & SCHWENDER, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 643-652. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01049.x>
- MARÍN-DE LA ROSA, N. M., PFEIFFER, A., HILL, K., LOCASCIO, A., BHALERAU, R. P., MISKOLCZI, P., GRONLUND, A. L., WANCHOO-KOHLI, A., THOMAS, S. H., BENNETT, M. J., LOHMANN, J. U., BLÁZQUEZ, M. A., & ALABADÍ, D. (2015). Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. *PLOS Genetics*, 11(7), e1005337. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005337>
- MARÍN-DE LA ROSA, N. M., SOTILLO, B., MISKOLCZI, P., GIBBS, D., VICENTE, J., CARBONERO, P., OÑATE-SÁNCHEZ, L., HOLDSWORTH, M. J., BHALERAU, R. P., ALABADÍ, D., & BLÁZQUEZ, M. A. (2014). Large-Scale Identification of Gibberellin-Related Transcription Factors Defines Group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as Functional DELLA Partners. *Plant Physiology*, 166(2), 1022-1032. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244723>
- MCGINNIS, K. M., THOMAS, S. H., SOULE, J. D., STRADER, L. C., ZALE, J., SUN, T., & STEBER, C. M. (2003). The *Arabidopsis Sleepy1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase[W]. *The Plant Cell*, 15(5), 1120-1130. <https://doi.org/10.1105/tpc.010827>
- RIEU, I., ERIKSSON, S. V., POWERS, S. J., GONG, F., GRIFFITHS, J., WOOLLEY, L. D., BENLLOCH, R., NILSSON, O., THOMAS, S. H., HEDDEN, P., & PHILLIPS, A. N. (2008). Genetic Analysis

- Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(9), 2420-2436. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058818>
- SASAKI, A., ITOH, H., GOMI, K., UEGUCHI-TANAKA, M., ISHIYAMA, K., KOBAYASHI, M., JEONG, D., AN, G., KITANO, H., ASHIKARI, M., & MATSUOKA, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an f-box mutant. *Science*, 299(5614), 1896-1898. <https://doi.org/10.1126/science.1081077>
- SCHNEIDER, C. C., RASBAND, W., & 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>
- SU, P., TONG, Y., CHENG, Q., HU, Y., ZHANG, R., YANG, J., TENG, Z., GAO, W., & HUANG, L. (2016). Functional characterization of ent-copalyl diphosphate synthase, kaurene synthase and kaurene oxidase in the *Salvia miltiorrhiza* gibberellin biosynthetic pathway. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep23057>
- SUN, T., & GUBLER, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 197-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141753>
- THOMAS, S. H., BLÁZQUEZ, M. A., & ALABADÍ, D. (2016). DELLA Proteins: Master Regulators of Gibberellin-Responsive Growth and Development. En *John Wiley & Sons, Ltd eBooks* (pp. 189-228). <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch7>
- UEGUCHI-TANAKA, M., NAKAJIMA, M., KATOH, E., OHMIYA, H., ASANO, K., SAJI, S., HONGYU, X., ASHIKARI, M., KITANO, H., YAMAGUCHI, I., & MATSUOKA, M. (2007). Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice DELLA protein, *SLR1*, and gibberellin. *The Plant Cell*, 19(7), 2140-2155. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043729>
- VAN SCHIE, C. C. N., AMENT, K., SCHMIDT, A. J., LANGE, T., HARING, M. A., & SCHUURINK, R. C. (2007). Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *Plant Journal*, 52(4), 752-762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03273.x>
- VARBANOVA, M., YAMAGUCHI, S., YANG, Y., MCKELVEY, K., HANADA, A., BOROCHOV, R., YU, F., JIKUMARU, Y., ROSS, J. R., CORTES, D., JE, C., MA, NOEL, J. P., MANDER, L. N., SHULAEV, V., KAMIYA, Y., RODERMEL, S., WEISS, D. J., & PICHERSKY, E. (2007). Methylation of Gibberellins by *Arabidopsis* *GAMT1* and *GAMT2*. *The Plant Cell*, 19(1), 32-45. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044602>
- VERA-SIRERA, F., GOMEZ, M. F., & PEREZ-AMADOR, M. A. (2016). DELLA Proteins, a Group of GRAS Transcription Regulators that Mediate Gibberellin Signaling. En *Elsevier eBooks* (pp. 313-328). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800854-6.00020-8>
- WILLIGE, B. C., GHOSH, S. K., NILL, C., ZOURELIDOU, M., DOHMANN, E. M., MAIER, A., & SCHWECHHEIMER, C. (2007). The DELLA domain of GA insensitive mediates the interaction with the GA insensitive Dwarf1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(4), 1209-1220. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051441>

- YAMAGUCHI, S., & KAMIYA, Y. (2000). Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. *Plant and Cell Physiology*, 41(3), 251-257.
<https://doi.org/10.1093/pcp/41.3.251>
- ZHU, J. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>

8. ANEXOS

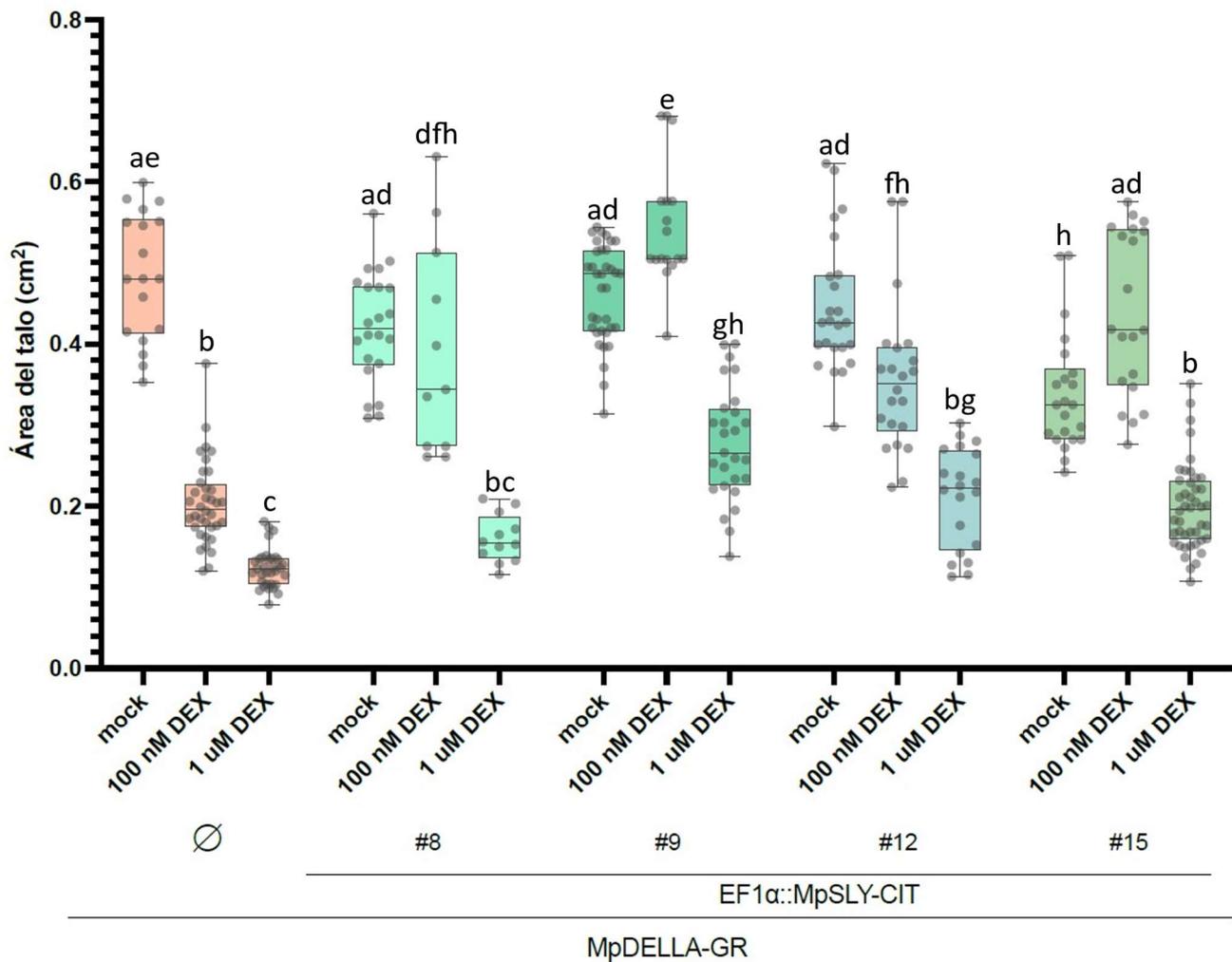


Figura S1. Medidas de área de MpDELLA-GR y las líneas sobrexpresoras de MpSLY con 2 semanas de edad cultivadas en mock, en 100 nM DEX y 1 μM DEX. El número mínimo de plantas fenotipadas fue de 10 para todas las líneas. Los valores de cada línea y para cada tratamiento que no comparten la misma letra difieren significativamente

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.				✓