



Caracterización funcional de MpKIN10 y su
relación con la regulación de MpDELLA de
Marchantia polymorpha

Autor: Javier Aranda Ibáñez

Tutores: Macarena Mellado Sánchez
Miguel A. Blázquez Rodríguez

Tutor UPV: Javier Agustí Feliu

Trabajo Final de Máster
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas
València, Noviembre 2025



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Agradecimientos

La primera persona a la que me gustaría agradecer de forma especial es a mi supervisora, Macarena Mellado Sánchez. Su capacidad para guiarme en los momentos de mayor incertidumbre y su dedicación han sido imprescindibles. Gracias a su apoyo he aprendido no solo a resolver problemas científicos, sino también a mantener la calma y avanzar cuando las cosas se complicaban.

También quiero reconocer la atención y el apoyo de Miguel Ángel Blázquez, cuya cercanía ha hecho que este proceso sea mucho más llevadero. Su ejemplo profesional y humano ha sido una gran fuente de inspiración. La medalla Margarita Salas que ha recibido recientemente es un reflejo del gran trabajo y compromiso que demuestra con todo su equipo, algo que también he podido vivir de primera mano.

Mi agradecimiento se extiende también a Cecilia Costigliolo, por su tiempo y su trato amable, y a todas las personas que forman parte de los laboratorios 2.07 y 2.08. Gracias por responder a mis preguntas (muchas veces repetidas), por compartir vuestros conocimientos y por crear un ambiente de trabajo agradable.

Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias a mi familia, pareja y amigos. Su apoyo constante, sus palabras de ánimo y su confianza han sido un pilar fundamental para poder llegar hasta aquí. Sin ellos, este trabajo no habría sido posible. También quiero agradecer a Borja Belda-Palazón y a su laboratorio por su colaboración en la realización de los ensayos de fosforilación in vitro

Resumen

Las proteínas DELLA son reguladores centrales del crecimiento vegetal, cuya función y regulación están estrechamente asociadas con la vía de señalización de giberelinas y la interacción con otras rutas, como la mediada por SnRK1. En este trabajo se ha estudiado la función de MpDELLA en *Marchantia polymorpha* mediante un enfoque combinado de mutagénesis dirigida, ensayos funcionales y análisis de interacciones proteicas. Para ello, se generaron líneas mutantes de MpKIN10 mediante edición génica con CRISPR/Cas9. Se obtuvieron tres alelos con codones de parada prematuros que resultan en versiones truncadas de diferente longitud de la proteína MpKIN10. Estas líneas fueron utilizadas para analizar la relación funcional entre MpDELLA y MpKIN10.

Además, se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína mediante sistema de doble híbrido en levadura y se hicieron ensayos de fosforilación in vitro, lo que permitió comprobar que MpDELLA es un sustrato de MpKIN10. Los resultados obtenidos apoyan un modelo en el que la fosforilación de MpDELLA por MpKIN10 modula su actividad funcional, sugiriendo la conservación de este mecanismo en plantas terrestres tempranas.

Este trabajo contribuye a comprender cómo las vías de señalización de energía y crecimiento interactúan en briófitos y proporciona nuevas herramientas genéticas y funcionales para explorar la regulación de DELLA en contextos evolutivos.

Palabras clave: MpDELLA; MpKIN10; *Marchantia polymorpha*; SnRK1; fosforilación; edición génica; CRISPR.

Abstract

DELLA proteins are central regulators of plant growth whose activity is closely linked to the gibberellin signaling pathway and to other regulatory networks, such as those mediated by SnRK1 kinases. In this work, the function of MpDELLA in *Marchantia polymorpha* was investigated through a combination of site-directed mutagenesis, functional assays, and protein–protein interaction analyses. Mutant lines of MpKIN10 were generated and characterized using CRISPR/Cas9 gene editing, identifying three alleles carrying premature stop codons that truncate the protein at different positions. These mutant lines were used to explore the functional relationship between MpDELLA and MpKIN10.

Protein–protein interaction assays using the yeast two-hybrid system, together with in vitro phosphorylation tests, revealed that MpDELLA acts as a substrate of MpKIN10. The results support a model in which phosphorylation of MpDELLA by MpKIN10 modulates its functional activity, suggesting that this regulatory mechanism is conserved in early land plants.

Overall, this study contributes to a better understanding of how energy and growth signaling pathways interact in bryophytes, providing new genetic and functional tools to explore DELLA regulation in an evolutionary context.

Keywords: MpDELLA; MpKIN10; *Marchantia polymorpha*; SnRK1; phosphorylation; gene editing; CRISPR.

Lista de abreviaturas

AD	–	Dominio de activación	(Activation Domain)
AMPK	–	Quinasa activada por AMP	(AMP-activated protein kinase)
BD	–	Dominio de unión	(Binding Domain)
BSA	–	Albúmina sérica bovina	(Bovine Serum Albumin)
CDS	–	Secuencia codificante de ADN	(Coding DNA Sequence)
CRISPR	–	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)	
Cas9	–	Proteína asociada a CRISPR tipo 9	(CRISPR-associated protein 9)
DCMU	–	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (herbicida inhibidor de la fotosíntesis)	
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico	
EDTA	–	Ácido etilendiaminotetraacético	(Ethylenediaminetetraacetic acid)
EF1α	–	Factor de elongación 1 alfa	(promotor constitutivo)
GA	–		Giberelina
His	–		Histidina
IPTG	–	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (inductor de expresión génica en bacterias)	
LB	–	Medio Luria–Bertani	(medio de cultivo bacteriano)
LC-MS/MS	–	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (<i>Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry</i>)	
MES	–	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico	(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)
mRNA	–	ARN mensajero	(Messenger RNA)
ORF	–	Marco de lectura abierto	(Open Reading Frame)
PCR	–	Reacción en cadena de la polimerasa	(Polymerase Chain Reaction)
PEG	–	Polietilenglicol	(Polyethylene glycol)
RNA	–	Ácido ribonucleico	
SDS-PAGE	–	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)	
SnRK1	–	Quinasa relacionada con <i>Sucrose non-fermenting 1</i>	(<i>Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 1</i>)
TF	–	Factor de transcripción	(Transcription Factor)
TiO₂	–	Dióxido de titanio (utilizado en el enriquecimiento de péptidos fosforilados)	
Ub	–		Ubiquitina
Y2H	–	Sistema de doble híbrido en levadura (<i>Yeast Two-Hybrid</i>)	

Índice

1. Introducción.....	7
1.1. La quinasa SnRK1/KIN10 como regulador del metabolismo vegetal	7
1.2. Interacciones moleculares de MpDELLA con reguladores clave en <i>Marchantia polymorpha</i>	8
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1 Material microbiológico	12
3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento	12
3.3 Análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS)	12
3.4 Clonación de fragmentos de DNA	12
3.5 Ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H)	13
3.5.1 Preparación de levaduras	13
3.5.2 Transformación en levadura	13
3.6 Obtención y validación de líneas mutantes de <i>MpKIN10</i> mediante edición génica	14
3.6.1 Diseño de mutantes CRISPR-Cas9 <i>MpKIN10</i>	15
3.6.2 Fenotipado de mutantes CRISPR-Cas9 <i>MpKIN10</i>	15
3.6.3 Generación de mutantes sobreexpresoras de KIN10.....	16
3.7 Tratamientos de sensibilidad energética	16
4. Resultados.....	18
4.1. Análisis funcional de MpDELLA mediante mutagénesis dirigida y validación por espectrometría de masas	18
4.1.1. Producción y purificación de proteínas recombinantes	18
4.1.2. Identificación de residuos fosforilados (PhosphoSITE).....	20
4.2. Ensayos de interacción proteína proteína mediante sistema de doble híbrido en levadura (Y2H)	21
4.3 Efectos de la pérdida y ganancia de función de <i>MpKIN10</i> sobre el desarrollo de <i>Marchantia polymorpha</i>	23
4.4. Caracterización de las mutantes:	25
4.4.1 Número de copas por semana	25
4.4.1.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre	25
4.4.1.2 Mutantes sobreexpresoras en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG	25
4.4.1.3 Mutantes pérdida de función <i>MpKIN10</i>	25
4.4.2 Área de las plantas por semana	26
4.4.2.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre	26

4.4.2.2 Mutantes sobreexpresoras en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG	26
4.4.2.3 Mutantes pérdida de función <i>MpKIN10</i>	26
4.4.3 Copas/Área mutantes por semana	27
4.4.3.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre	27
4.4.3.2 Mutantes pérdida de función <i>MpKIN10</i>	27
4.4.4 Área de las copas de los mutantes en la tercera semana.	27
4.4.4.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre	27
4.4.4.2 Mutantes pérdida de función <i>MpKIN10</i>	28
4.4.5 Área de los mutantes creciendo 1 semana en DCMU 1 μ M	28
4.4.5.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre	28
4.4.5.2 Mutantes pérdida de función <i>MpKIN10</i>	29
5. Discusión	30
5.1 Interacción de las versiones MpDELLA, MpDELLA SxD y MpDELLA SxAcon MpSLY, MpCOP1 y MpMED15	30
5.2 Posibles papeles de MpKIN10 en el área, número de copas y área de las copas.	30
6. Conclusiones	31
7. Líneas futuras.....	32
8. Referencias bibliográficas.....	33

1. Introducción

Las fitohormonas son compuestos clave en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente en respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Entre ellas encontramos las giberelinas (GAs), que están implicadas en la elongación celular, la germinación y otros procesos clave del desarrollo (Shani et al., 2024 ; Zhang et al. 2022). El estudio de estas fitohormonas en plantas vasculares ha permitido entender cómo se regulan los procesos moleculares detrás del crecimiento y la adaptación vegetal. Para entender el origen evolutivo de estas redes de señalización es necesario comparar su arquitectura y su función en organismos de diversos linajes, para inferir su estado ancestral (Zegers et al., 2024 ; Delaux et al., 2019).

En este contexto, las briófitas —entre ellas *Marchantia polymorpha*— son generalmente un grupo muy útil al haberse separado del resto de las plantas terrestres hace más de 400 millones de años, en el Devónico, en los primeros pasos de la vida vegetal en tierra firme. Aunque presentan características morfológicas, funcionales y genómicas más simples que las traqueófitas o plantas vasculares (no tienen raíces verdaderas o tejidos vasculares que sí aparecen en el otro linaje), esto no significa que las briófitas sean organismos primitivos, sino que son tan “derivados” como las traqueófitas, y de hecho hay signos de haber sufrido procesos de simplificación (Harris et al., 2022).

La ruta de señalización de GAs es relativamente simple (Alabadí & Sun 2025): Comprende un receptor llamado GID1, que una vez reconoce a la hormona sufre un cambio conformacional que le permite interactuar con las proteínas DELLA. Esta interacción facilita el reconocimiento por SLEEPY (SLY), una proteína F-box que media la poliubiquitinación de DELLA y su degradación por el proteasoma 26S. Por otra parte, las DELLA son reguladores transcripcionales que interactúan con cientos de factores de transcripción. De esta manera, los niveles de GAs influyen sucesivamente en los niveles de DELLA y en la reprogramación transcripcional de numerosos procesos.

A diferencia de las plantas vasculares, las briófitas como *M. polymorpha* carecen de receptores funcionales de giberelinas y de las propias GAs bioactivas. Sin embargo, si que se han encontrado homólogos funcionales de las proteínas DELLA (receptor funcional de las GA) (Blázquez et al., 2020).

Esto nos lleva a una pregunta importante: ¿Cómo se controla la actividad de las proteínas DELLA en plantas que no tienen el sistema de percepción de GAs? La hipótesis de la línea principal de trabajo del laboratorio es que ese control puede ejercerse mediante modificaciones postraduccionales como las que también concurren en plantas vasculares como *Arabidopsis thaliana* (Blanco-Touriñán et al., 2020)

1.1. La quinasa SnRK1/KIN10 como regulador del metabolismo vegetal

Las proteína-quinasas juegan un papel central en la regulación de procesos celulares mediante la fosforilación de proteínas diana (Broeckx et al., 2016; Tomé et al., 2014). Dentro de este grupo, las quinasas SnRK (Sucrose non-fermenting-1 Related Kinases) constituyen una familia de serina/treonina quinasas ampliamente conservada en plantas, con homólogos funcionales en levaduras (SNF1) y mamíferos (AMPK). La fosforilación por el complejo SnRK1 se ha visto que actúa como sensor de energía en plantas. Su subunidad catalítica principal, KIN10, es la responsable de la actividad quinasa y se considera el elemento central en esta vía. Cuando la energía en la célula vegetal es baja, SnRK1/KIN10 activa mecanismos para ahorrar recursos y adaptarse al estrés (Broeckx et al., 2016).

En *A. thaliana*, las subunidades catalíticas KIN10 (SnRK1.1) y KIN11 (SnRK1.2) forman parte del complejo SnRK1, siendo KIN10 la más ampliamente expresada y funcionalmente dominante (Broeckx et al., 2016; Liu et al., 2023). Este complejo regula procesos catabólicos como la

degradación de azúcares, proteínas y lípidos, y reprime rutas anabólicas como la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas cuando la planta se encuentra en déficit energético (Baena-González & Hanson, 2017; Tomé et al., 2014). Desde un punto de vista estructural, KIN10 presenta tres dominios principales: un dominio catalítico quinasa altamente conservado (IPR000719), un dominio UBA (Ubiquitin-Associated Domain), implicado en la interacción con proteínas ubiquitinadas, y un dominio KA1 (Kinase Associated 1), que parece cumplir funciones de localización subcelular y auto-inhibición (Broeckx et al., 2016; SMART/InterPro, 2024).

Estudios filogenéticos han demostrado que SnRK1 está conservado desde briófitos hasta angiospermas, y su función se mantiene como regulador metabólico clave, encargado de frenar el crecimiento de la planta (Zhu et al., 2023; Yu et al., 2023). En diversas especies, se ha vinculado su actividad con la respuesta a estrés salino, hipoxia, frío, o déficit de energía. En *A. thaliana*, KIN10 regula la expresión de genes de respuesta al estrés energético como *DIN6* y *bZIP11*, además de controlar rutas de autofagia, síntesis de aminoácidos y almacenamiento de sacarosa (Tomé et al., 2014; Baena-González et al., 2007).

En *Marchantia*, la quinasa MpKIN10 ha sido identificada como el ortólogo funcional de SnRK1, codificado por el gen *Mp6g18720*. Presenta una estructura proteica con los mismos dominios conservados observados en *Arabidopsis*, y se expresa en tejidos tanto vegetativos como reproductivos, según los datos disponibles en Marchantia.info. La comparación estructural mediante el programa *Chimera X* muestra una alta similitud entre las proteínas de *Arabidopsis* (naranja) y *Marchantia* (azul), tras eliminar las regiones con bajo B-factor, que corresponden a zonas de la proteína menos fiables en la predicción estructural (Figura 1).

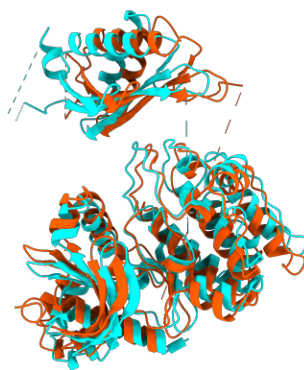


Figura 1. Comparación de la estructura de KIN10 en *Arabidopsis thaliana* (naranja) y *Marchantia polymorpha* (azul) obtenida con *Chimera X*. Para el análisis se eliminaron las regiones con bajo B-factor, consideradas aproximaciones poco fiables a la estructura real. La superposición de las dos estructuras revela la conservación estructural de KIN10 entre briófitos y plantas vasculares.

Dado que SnRK1/KIN10 coordina señales metabólicas con el desarrollo, su estudio en *M. polymorpha* permitiría entender la evolución de esta vía de señalización en plantas terrestres, y estudiar su posible conexión con la actividad de MpDELLA (Serrano-Mislata et al., 2021).

1.2 Interacciones moleculares de MpDELLA con reguladores clave en *Marchantia polymorpha*

Se ha demostrado que MpDELLA interactúa con reguladores como MpMED15, MpCOP1 y MpSLY. El estudio de estas interacciones es de interés porque sitúa a MpDELLA como un “centro de control” donde se cruzan diferentes señales de la planta. Para profundizar en este aspecto, en este trabajo se han diseñado versiones de MpDELLA mutadas (SxA y SxD), que imitan estados no fosforilables o fosfomiméticos respectivamente, con el objetivo de comprobar si la fosforilación modifica la capacidad de interacción de DELLA con estas proteínas.

Estas tres proteínas actúan en contextos diferentes. En primer lugar, MpMED15 forma parte del complejo Mediador, un gran complejo multiproteico conservado en eucariotas que conecta los factores de transcripción con la RNA polimerasa II. Este complejo actúa como un integrador de señales que decide si un gen se activa o se reprime. La subunidad MED15, perteneciente al módulo tail, sirve como punto de unión específico con MpDELLA. En este proceso, MpDELLA, a través de su dominio GRAS, se asocia a un factor de transcripción (TF) que reconoce secuencias concretas en el DNA. Una vez anclado al TF, MpDELLA recluta a MED15 y con ello al Mediador completo, lo que permite la formación del complejo de preiniciación (PIC) sobre el promotor del gen diana (figura 2 a). Gracias a esta interacción, se activa la transcripción de un gen inducible por DELLA (Hernández-García et al., 2024).

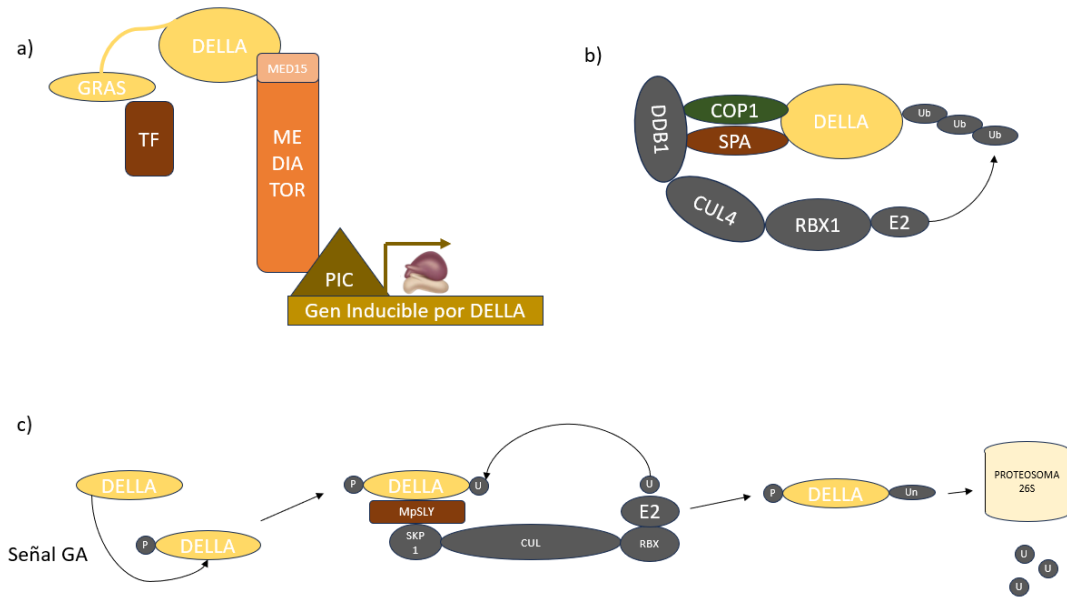


Figura 2 Esquema de las principales interacciones conocidas de MpDELLA con reguladores de diferentes vías.

a) MpMED15, subunidad del complejo Mediador, actúa como puente entre MpDELLA y la ARN polimerasa II, permitiendo modular la transcripción de genes inducibles.
b) MpCOP1, regulador clave de la respuesta a la luz, forma parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa (junto con SPA y CUL4) que favorece la ubiquitinación y degradación de DELLA..
c) MpSLY, proteína F-box homóloga a SLY1 en *Arabidopsis*, reconoce a MpDELLA dentro del complejo SCF y la dirige hacia el proteasoma 26S para su degradación.

En segundo lugar, hablaremos de MpCOP1. Es un regulador clásico de la respuesta a la luz. En oscuridad, COP1 marca para su degradación a factores de transcripción que inducen el desarrollo fotomorfogénico, y en condiciones de luz esta represión se libera. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que en *Arabidopsis*, COP1 también puede actuar sobre las proteínas DELLA, promoviendo su ubiquitinación y degradación de manera independiente a las giberelinas (Blanco-Touriñán et al., 2022). Esta función se lleva a cabo a través de un complejo E3 ubiquitina ligasa en el que COP1 se asocia con SPA (Suppressor of PhyA-105) y con otras subunidades como DDB1, CUL4, RBX1 y E2. En este complejo, COP1 y SPA actúan como módulos de reconocimiento que acercan a DELLA a la maquinaria de ubiquitinación, mientras que CUL4 y RBX1 forman el andamiaje central, y E2 transfiere las moléculas de ubiquitina. Como se muestra en la Figura 2b, este proceso conduce a la poliubiquitinación de DELLA, lo que finalmente marca la proteína para su degradación en el proteasoma 26S. En *Marchantia*, esta interacción sugiere que la vía de percepción de la luz puede modular directamente la estabilidad de MpDELLA.

Por último, MpSLY es una proteína F-box, homóloga de SLY1 en *Arabidopsis* y de GID2 en arroz. Las proteínas F-box reconocen de manera específica la proteína diana que debe ser degradada por el proteosoma 26S. Están dentro de un complejo ubiquitina ligasa SCF. En *Marchantia*, pese a que no existen giberelinas, se ha demostrado que MpSLY interacciona físicamente con MpDELLA y regula sus niveles, de manera que la pérdida de función de MpSLY conduce a una mayor acumulación y actividad de MpDELLA, mientras que su sobreexpresión favorece una reducción de sus niveles (Jiménez Cañete, 2023). Estos resultados sugieren que el control de la estabilidad de DELLA a través de proteínas F-box y el sistema ubiquitina–proteasoma constituye un mecanismo ancestral.

Tal como se ilustra en la figura 2c, en plantas vasculares la señal de giberelinas (GA) desencadena la unión del receptor GID1 al motivo DELLA, lo que permite que SLY1/GID2 reclute a la proteína hacia el complejo SCF (formado por Skp1, Cullin y RBX1 en *Arabidopsis*). Posteriormente, la enzima E2 transfiere moléculas de ubiquitina (Ub) a DELLA, marcándola para su degradación en el proteosoma 26S (Wang & Deng, 2011). Aunque en *Marchantia* esta señalización hormonal no existe, la interacción de MpSLY con MpDELLA podría mostrar que se conserva un modo de regulación basado en la vía SCF–proteasoma para evitar una acumulación excesiva de DELLA que altere el crecimiento y la respuesta al estrés.

En conjunto, estas interacciones muestran que MpDELLA no actúa de manera aislada, sino que forma parte de una red de regulación compleja donde confluyen señales de energía, luz, transcripción y degradación proteica. Esta capacidad de integrar información de diferentes vías convierte a MpDELLA en un nodo de la biología molecular de *M. polymorpha*.

En este contexto, surge una pregunta: ¿Cómo influye la señalización energética en la función de MpDELLA? Este trabajo explora dos grandes vías de regulación del crecimiento: por un lado, la función de MpDELLA como represor conservado en briófitos, y por otro, el papel del complejo SnRK1, y en particular de su subunidad catalítica KIN10, como sensor energético y regulador de la homeostasis metabólica.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo se enmarca en el estudio de mecanismos potenciales de regulación ambiental del desarrollo en plantas a través de las proteínas DELLA. Más en concreto, este trabajo se centra en reunir evidencia experimental que apoye o refute la idea de que MpSnRK1 regula el desarrollo también en *Marchantia*, y que la MpDELLA es una de sus dianas de fosforilación.

Por tanto, los objetivos específicos son:

1. Averiguar si MpDELLA podría ser diana de MpSnRK1 y sus consecuencias funcionales. Esto se realizará mediante ensayos de fosforilación in vitro y, en su caso, mutagénesis del sitio de fosforilación. El efecto fenotípico de dicha mutación se estudiará analizando la capacidad de las variantes de MpDELLA de interaccionar con otros reguladores como MpMED15, MpCOP1 y MpSLY.
2. Obtener plantas de *Marchantia* alteradas en la actividad SnRK1 y estudiar su fenotipo. Esto se realizará mediante edición génica por CRISPR/Cas9 de MpKIN10, y por sobreexpresión de la misma MpKIN10.

3. Materiales y métodos

3.1 Material microbiológico

Para las clonaciones se usaron células competentes de *Escherichia coli* Stellar™ (Takara Bio). En los ensayos Y2H se usaron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* AH109. Para las transformaciones en *Marchantia* se usó *Agrobacterium tumefaciens*, en concreto la cepa C58.

3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Marchantia* accesión Tak 1 como material de partida. Se cultivaron en medio Gamborg's B5 ½ (1,58 g/L Gamborg's B5, 0,5 g/L MES, 2% sacarosa, 10 g/L Plant Propagation Agar) ajustado a pH 5,7, bajo condiciones de fotoperiodo largo (16 h de luz, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y 8 h de oscuridad).

3.3 Análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Las proteínas recombinantes MpKIN10 y MpDELLA se expresaron en *E. coli* fusionadas a etiquetas de histidina y se purificaron. Las bandas de interés (~100 kDa) se visualizaron en geles de SDS-PAGE y se seleccionaron para su envío a análisis proteómico.

Las muestras se procesaron mediante digestión enzimática con tripsina y posterior análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El análisis se realizó en un Orbitrap.

Los datos obtenidos se compararon con la base de datos de *Marchantia* disponible en Phytozome. Para la identificación de residuos fosforilados, se aplicó un enriquecimiento de péptidos fosforilados mediante TiO_2 y se utilizó la herramienta PhosphoSite para asignar la localización de las modificaciones.

3.4 Clonación de fragmentos de DNA

Se elaboraron líneas sobreexpresoras de MpKIN10. Para su clonación, se diseñaron oligonucleótidos específicos que incorporaban en sus extremos los sitios de recombinación attB1 y attB2. Gracias a esto se amplificó el ORF completo por PCR. Se introdujo mediante el sistema Gateway en el vector de entrada pEN221, y posteriormente se transfirió por recombinación LR al vector de destino pMpGWB108, utilizado para generar las líneas sobreexpresoras de *MpKIN10* bajo el control del promotor constitutivo EF1 α (ver tabla 1 anexo) y la etiqueta citrina.

La diferencia entre señales de fosforilación de los análisis de espectrometría de masas permitió seleccionar residuos de serina específicos para hacer mutagénesis dirigida. Se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieron sustituir estos residuos por alanina (SxA, versión no fosforilable) o por ácido aspártico (SxD, versión fosfomimética).

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó la herramienta In-Fusion Cloning Primer Design Tool (Takara Bio; disponible en: <https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in-fusion-cloning-tools>), en combinación con *Benchling*, donde se alinearon las secuencias de los plásmidos disponibles y se seleccionó la región diana de mutagénesis (ver oligonucleótidos en tabla 2 anexo).

Posteriormente, se amplificó del plásmido de entrada con el inserto de MpDELLA (MpDELLA pEN221) mediante PCR de alta fidelidad (PrimeSTAR), incorporando las mutaciones. Con estos productos de la PCR se realizó una reacción In-Fusion para recircularizar el plásmido, obteniendo así los plásmidos mutados MpDELLA SxA 221 y MpDELLA SxD 221 (ver tabla 1 anexo).

Estos plásmidos se utilizaron como *entry* en reacciones LR para transferir los fragmentos mutados al vector de destino pGADT7, generando los plásmidos MpDELLA pGADT7, MpDELLA SxA pGADT7 Y MpDELLA SxD pGADT7 (ver tabla 1 anexo).

Tras la transformación en *E. coli* y la selección antibiótica, las colonias positivas fueron confirmadas por digestión usando enzimas de restricción y finalmente se confirmaron por secuenciación (ver oligonucleótidos en tabla 2 anexo).

De manera complementaria, se clonaron en el vector pGBKT7 las secuencias codificantes de MpSLY, MpCOP1 y MpMED15, con el fin de evaluar sus interacciones con MpDELLA y sus variantes mutadas en los ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H). Para los ensayos de Y2H, se generaron construcciones específicas en el vector pGADT7 y pGBKT7 (ver tabla 1 anexo).

3.5 Ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H)

Se transformaron células de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 con las combinaciones de plásmidos pGADT7 (AD) y pGBKT7 (BD) con MpDELLA (wild type y mutantes SxA y SxD) y con las proteínas MpSLY, MpCOP1 y MpMED15. Los cultivos transformados se seleccionaron en medios sintéticos sin leucina ni triptófano (-L-T). Esto permitió la selección de colonias con ambos plásmidos. El vector pGADT7 porta el marcador de auxotrofia LEU2 (complementa el crecimiento en ausencia de leucina), mientras que el vector pGBKT7 porta el marcador TRP1 (complementa el crecimiento en ausencia de triptófano). Solo las levaduras que contienen ambas construcciones sobreviven en medio -L-T. De esta forma los ensayos de interacción proteína-proteína se hacen con células doblemente transformadas (ver tabla 2 en el Anexo).

Para evaluar la interacción proteína-proteína, las colonias positivas se sembraron en diluciones seriadas sobre medios más restrictivos sin histidina (-L-T-H) y medios sin histidina suplementados con 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), un inhibidor competitivo que aumenta la exigencia de selección.

En los ensayos se decidió clonar MpDELLA en el vector pGADT7 (AD) porque, cuando se probó en pGBKT7 (BD), mostró autoactivación del gen reportero incluso en ausencia de pareja de interacción. Este fenómeno podía generar falsos positivos en la interpretación de los resultados.

3.5.1 Preparación de levaduras

Como paso previo, se refrescaron colonias de *S.cerevisiae*. Para ello se preparó medio SD líquido suplementado con histidina, leucina y triptófano a una concentración final de 20 mg/L cada uno. La fuente de carbono se aportó mediante glucosa estéril filtrada, ajustada a una concentración final del 2 % (p/v). Se inoculó un raspado de colonia en 3 mL de este medio por tubo y se incubó durante 48 h a 28 °C con agitación.

3.5.2 Transformación en levadura

Cada tubo de levadura se abocó en un eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en una mezcla que contenía:

-5 µL de ADN monocatenario de esperma de salmón (desnaturalizado previamente 10 minutos a 95 °C y enfriado en hielo),

-1,5 µg de cada plásmido (pGADT7 y pGBKT7), con volumen ajustado según la concentración de cada uno y se ajustó con agua estéril hasta completar un volumen total de 50 µL. A continuación, se añadieron 500 µL de solución PLATE recién preparada (8,89 mL de PEG 4000 al 50 %, 1 mL de acetato de litio 1 M, 100 µL de Tris-HCl 1 M pH 7,5 y 80 µL de EDTA 0,5 M). Las muestras se incubaron en agitación durante 24 horas a 28 °C.

Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos, se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 200–300 µL de agua estéril. Las muestras fueron sembradas en placas SD -L-T para la selección de transformantes dobles (Gietz & Schiestl, 1989).

3.6 Obtención y validación de líneas mutantes de *MpKIN10* mediante edición génica

Con el objetivo de estudiar la función de *MpKIN10* en *Marchantia*, se generaron líneas mutantes mediante edición génica por CRISPR/Cas9. También se diseñaron líneas sobreexpresoras de *MpKIN10* en explantes de *Marchantia* Tak 1 (fondo silvestre) y en explantes de *Marchantia* con la proteína DELLA etiquetada con FLAG.

Para ambas transformaciones, se cultivó la cepa de *Agrobacterium* C58 portadora de los plásmidos respectivos. En el caso de las mutantes CRISPR se cultivó una cepa de *Agrobacterium* portadora de *MpKIN10-1_pMpGEen03*. En el caso de las mutantes sobreexpresoras de *MpKIN10* se cultivó la cepa de *Agrobacterium* portadora del plásmido *MpKIN10_pMpGWB108*, que contiene el cassette de sobreexpresión del gen *MpKIN10* bajo el promotor constitutivo EF1α y la etiqueta citrina (tabla 1 anexo).

Se cultivaron durante dos días en medio LB con kanamicina 50 µg/mL a 28 °C bajo agitación. Se pipeteó 1 ml del cultivo saturado y se centrifugó durante 20 min a 2000 × g. El pellet bacteriano se resuspendió en 5 ml de medio OM51C suplementado con 100 µM de acetosiringona (5 µl de una solución madre 100 mM por cada 5 ml de medio), lo que induce la activación de los genes *vir* en *Agrobacterium*. La suspensión se incubó a 28 °C un mínimo de 4 horas para favorecer dicha activación.

En paralelo, se prepararon explantes de *M. polymorpha* a partir de talos jóvenes en regeneración. Se seccionaron manualmente los talos en fragmentos pequeños, evitando las regiones apicales donde se localizan los meristemos. Los fragmentos, de entre 1 y 5 mm de tamaño, se transfirieron posteriormente al medio líquido de co-cultivo. En el caso de las mutantes CRISPR se seleccionaron trozos del talo de *Marchantias* Tak 1, mientras que en el caso de las mutantes sobreexpresoras se transformaron de sobre un fondo silvestre Tak 1 y sobre una línea sobreexpresora de *MpDELLA* etiquetada con FLAG.

Para el co-cultivo se añadieron 1 mL de la suspensión bacteriana previamente preapada a 50 mL de medio líquido OM51C suplementado con 2% (p/v) de sacarosa, reajustando con acetosiringona a una concentración final de 100 µM. Los explantos se mantuvieron en co-cultivo con *Agrobacterium* durante tres días en condiciones de día largo (16 horas a una intensidad lumínica de 60 µmol m⁻² s⁻¹ y 8 horas en oscuridad) a 22 °C.

Posteriormente se realizó la selección de transformantes. Para ello los explantes se lavaron para eliminar el exceso de bacterias con agua esteril. Se realizaron 5 lavados y se incubaron durante 30 min en solución de cefotaxima a 1 mg/ml (300 µl de una solución madre 100 mg/ml en 30 ml de agua estéril) para eliminar posibles restos de *Agrobacterium*. Los explantes limpios se transfirieron a placas de medio líquido Gamborg B5 suplementado con los antibióticos de selección correspondientes (higromicina) y cefotaxima 50 µg/mL para eliminar los restos de *Agrobacterium*. Tras un periodo inicial en el que los explantes mostraron un aspecto necrótico, posteriormente recuperaron su crecimiento y regeneraron brotes verdes resistentes. En ese momento, las plantas regeneradas se trasplantaron a medio B5 sólido. Las placas se incubaron bajo condiciones de día largo (16 horas a una intensidad lumínica de 60 µmol m⁻² s⁻¹ y 8 horas en oscuridad) a 22 °C. Durante un periodo de 3–4 semanas, permitiendo la regeneración exclusiva de plantas transgénicas resistentes.

3.6.1 Diseño de mutantes CRISPR-Cas9 *MpKIN10*

Para realizar las líneas CRISPR, se diseñaron guías específicas contra la región codificante del gen *MpKIN10*, y se ensamblaron en vectores del sistema pMpGE, desarrollados por el grupo de Takayuki Kohchi (*Ishizaki et al.*, 2015), mediante clonación Gateway™ LR (Thermo Fisher Scientific).

Se diseñaron guías CRISPR específicas contra regiones codificantes del gen empleando la plataforma *Benchling*. El diseño se basó en la secuencia de *MpKIN10*, seleccionando motivos PAM (NGG) localizados en exones para asegurar un corte efectivo por la Cas9. Se priorizaron guías situadas lo más cerca posible del codón de inicio (ATG). Se evitó seleccionar guías que tuvieran un ATG en el marco después del sitio de corte, lo que podría generar proteínas truncadas. Las guías seleccionadas tenían un alto valor de *on-target score* y bajo riesgo de *off-target*. Se seleccionaron dos guías en los exones 1 y 2 de *MpKIN10* (ver tabla 2 anexo), de las cuales únicamente la guía 2 resultó funcional en la obtención de mutantes.

En primer lugar, se clonaron las guías de RNA específica contra *MpKIN10* en el vector de entrada *pMpGEen03*. Posteriormente, este vector se recombinó mediante la reacción Gateway™ LR con el vector de destino *pMpGE010*, que contiene el cassette de expresión de la proteína Cas9. Finalmente obtuvimos un único plásmido funcional capaz de dirigir simultáneamente la expresión de la guía de RNA y de Cas9 en *Marchantia*. Para generar las líneas sobreexpresoras se aplicó el método de transformación comentado en apartados anteriores.

Una vez se regeneraron las plantas mutantes y se sembraron sus gemas, se extrajo DNA de las líneas transformadas. Para ello, se emplearon fragmentos de talo jóvenes, que fueron congelados en nitrógeno líquido y triturados con un mortero. Posteriormente, los tejidos se incubaron en tampón de lisis (TNES), y el DNA se precipitó con isopropanol tras varias centrifugaciones. Los pellets obtenidos se lavaron, se dejaron secar al aire y finalmente se resuspendieron en agua estéril.

Para el genotipado de las mutantes se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos que amplificaban las regiones flanqueantes a las guías CRISPR utilizadas en *MpKIN10*, con el objetivo de detectar las mutaciones por secuenciación. El diseño de los primers se realizó a partir de la secuencia de *MpKIN10*, seleccionando regiones cercanas a los sitios PAM de cada guía, con una longitud de ~20 pb, un contenido GC adecuado y Tm similares entre forward y reverse. Para la guía 2 se escogieron exones aguas abajo del PAM.

Con estos oligonucleótidos se amplificaron los exones 1 y 2 de *MpKIN10*, y los productos se purificaron mediante columnas de sílice, siguiendo el protocolo del kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel). En este procedimiento, los fragmentos de DNA se unieron a la membrana de sílice en presencia de sales, se eliminaron impurezas mediante lavados sucesivos y finalmente se eluyeron en un volumen reducido de tampón de elución del mismo kit, obteniendo DNA limpio y concentrado. Finalmente, las muestras se enviaron a secuenciación Sanger, lo que permitió confirmar la presencia de mutaciones en las líneas transformadas (ver Tabla 2 en el Anexo).

3.6.2 Fenotipado de mutantes CRISPR-Cas9 *MpKIN10*

Las secuencias fueron cargadas en la plataforma *Benchling*, y alineadas con la región genómica del gen *MpKIN10* (sin usar la CDS, para asegurar cobertura del locus completo). En total se identificaron tres grupos distintos de mutantes. Finalmente, se estableció un seguimiento fenotípico de las líneas regeneradas: se hicieron fotografías semanales del crecimiento y desarrollo de las plantas sobreexpresoras y se compararon con la referencia Tak 1.

Se obtuvieron 3 líneas independientes de mutantes que llamamos, *Mpkin10-1CR*, *Mpkin10-2CR* y *Mpkin10-3CR*. Estas líneas se sembraron junto a Tak-1 (silvestre) en medio Gamborg B5. Las Tak-1 no tenían ningún suplemento en las placas, pero las mutantes crecían con cefotaximia y higromicina 50mg/ml para evitar contaminaciones por *Agrobacterium*. Tras una, dos y tres semanas se fotografiaron las mutantes con un macroscopio DMS 1000 LEICA. Se seleccionaron 5 plantas de cada grupo en cada semana para hacer las fotografías. A parte se realizaron fotografías de las copas de los mutantes con escala para evaluar cambios en su morfología en función de los grupos estudiados y se contó el número de copas de las plantas.

Tras la toma de imágenes, se procedió a la cuantificación del área del talo de las *Marchantias* estudiadas. Para ello, se calibró la escala en cada imagen utilizando la barra de referencia incluida en las fotografías.

Además del análisis del área, se contó el número total de copas por planta en las semanas 1, 2 y 3 de crecimiento. Este enfoque se ha utilizado en estudios previos como el de (Yasui et al. 2019), donde el número de copas se usó para evaluar el impacto de distintas mutaciones sobre la reproducción vegetativa de *M. polymorpha*. En este conteo también se incluyeron las copas en fase de desarrollo temprano, es decir, aquellas estructuras que presentan la morfología típica de una gemma cup pero que aún no contienen gemas visibles.

Una vez obtenidos los valores de número de copas y área de las *Marchantias*, se decidió normalizar los datos y representar gráficamente como se comportaba la relación número de copas/área (mm²) entre los diferentes grupos de mutantes estudiados.

Se siguió una metodología muy similar para medir el área de las copas estudiadas. De acuerdo con la definición morfológica propuesta por (Suzuki et al. 2020), se consideró como gema cup a toda la estructura visible en el dorso del talo que alberga y protege las gemas, incluyendo tanto la pared externa como la región central donde se alojan los propágulos. En este caso se midieron todas las copas de las plantas, con un requisito mínimo de medir 20 copas de cada grupo estudiado. Se midieron sus áreas y se seleccionaron las 10 copas con más área. Aquellos grupos que no cumplieron el requisito de tener al menos 20 copas medibles no se incluyeron en los análisis del área de las copas.

Se utilizó la herramienta Oval de ImageJ, que permite trazar selecciones elípticas o circulares ajustadas a la forma visible de cada estructura. Cada copa se delimitó manualmente siguiendo el borde interno visible en las imágenes, y a continuación se midió el área mediante la función Analyze → Measure.

3.6.3 Generación de mutantes sobreexpresoras de *MpKIN10*

Una vez obtenidas las líneas sobreexpresoras, se extrajo DNA de las líneas transformadas siguiendo el mismo protocolo que con las mutantes CRISPR y se hizo una PCR diagnóstica, amplificando un fragmento de aproximadamente 1700 pb correspondiente a la región entre *MpKIN10* y el marcador de citrina de las mutantes. La señal fue detectada en múltiples líneas independientes (EF1α::MpDELLA-FLAG #4-#8), confirmando la integración del transgén. Se observó además una banda en el control silvestre Tak-1, en concordancia con los resultados obtenidos mediante análisis *in silico* de la secuencia, que indicaban homología en la región amplificada.

3.7 Tratamientos de sensibilidad energética

Se evaluó la función de los mutantes CRISPR de *MpKIN10* bajo estrés energético mediante tratamientos de DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), herbicida que bloquea el transporte de electrones en el fotosistema II y genera una condición de baja disponibilidad

energética a nivel celular para analizar respuestas mediadas por MpKIN10 (Li et al., 2021). El mismo esquema de tratamiento se empleó en líneas sobreexpresoras en fondo silvestre de MpKIN10.

Como material vegetal se emplearon las tres líneas de CRISPR MpKIN10, la línea silvestre tak-1, las 2 líneas sobreexpresoras de MpKIN10, las 4 líneas sobreexpresoras de *MpKIN10* en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG y las plantas control EF1 α ::MpDELLA-FLAG. Para cada condición se sembraron 25 gemas en placas con medio B5 suplementado con cefotaxima e higromicina (50 mg/mL cada uno) para las líneas mutantes. Cada una de las líneas crecieron bajo condiciones control (sin DCMU) y DCMU 1 μ M. Las plantas se mantuvieron durante una semana en condiciones lumínicas de día largo (16 horas a una intensidad lumínica de 60 μ mol m⁻² s⁻¹ y 8 horas en oscuridad) a 22 °C. Posteriormente, se tomaron fotografías con el macroscopio Leica DMS1000.

4. Resultados

4.1. Análisis funcional de MpDELLA mediante mutagénesis dirigida y validación por espectrometría de masas

Como hemos apuntado en la Introducción, la interacción funcional de SnRK1 con las proteínas DELLA en *Arabidopsis* y la presencia de MpKIN10 en el genoma de *Marchantia* permiten hipotetizar que esta interacción podría estar conservada y, en ese caso, ser un mecanismo ancestral de regulación que precedió al módulo de percepción de GAs.

La primera indicación de que MpDELLA podría ser fosforilada por SnRK1 fue la presencia de un motivo consenso característico en su secuencia proteica. Este motivo tiene la forma [R/K]XXSXX[S/T], donde R/K representa un aminoácido básico (arginina o lisina), X corresponde a cualquier aminoácido, y S/T indica un residuo de serina o treonina susceptible de fosforilación. Este tipo de motivo ha sido descrito previamente en diferentes sustratos de SnRK1 y está asociado a su reconocimiento y modificación postraduccional (Serrano-Mislata et al., 2021) (Figura 3).

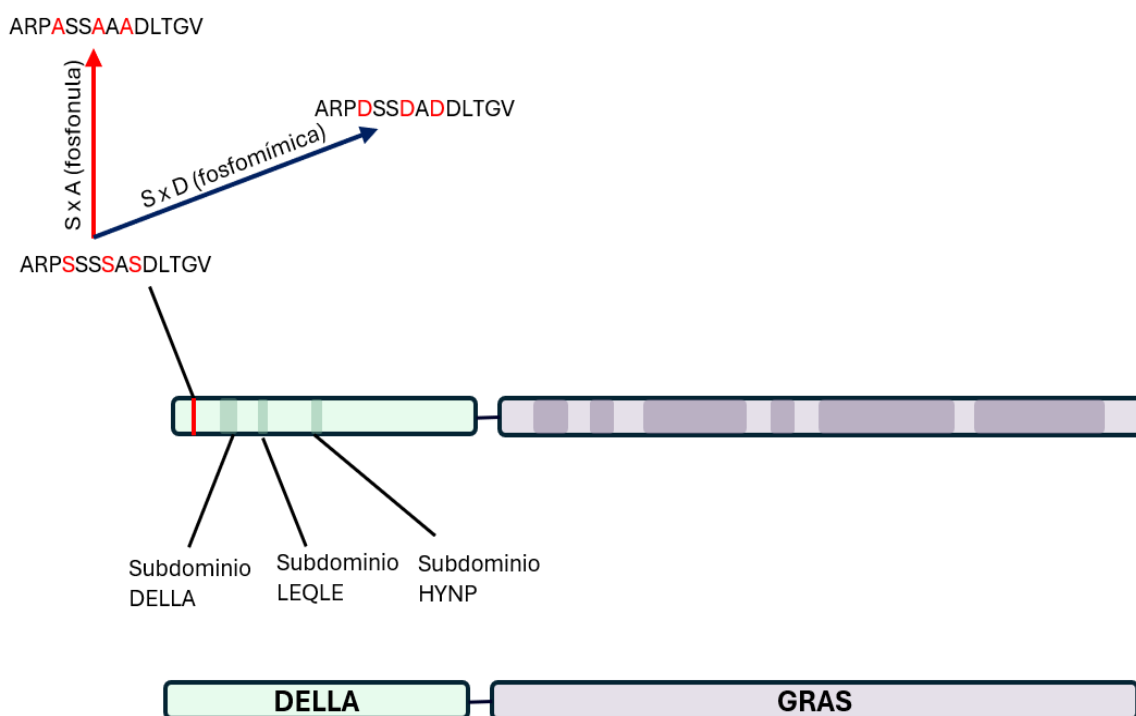


Figura 3. Esquema de la proteína MpDELLA mostrando sus dominios principales (DELLA y GRAS) y la localización de las mutaciones generadas. Se diseñaron dos versiones mutadas: MpDELLA SxA, en la que tres residuos de serina fueron sustituidos por alanina para impedir la fosforilación, y MpDELLA SxD, en la que los mismos residuos se sustituyeron por ácido aspártico con el fin de imitar un estado de fosforilación constitutiva.

4.1.1. Producción y purificación de proteínas recombinantes

Para validar experimentalmente si MpKIN10 puede fosforilar a MpDELLA, se generaron proteínas recombinantes en *E. coli* fusionadas a colas de 6xHis, lo que facilitó su detección y purificación. Además de la versión silvestre de MpDELLA se expresaron la versión constitutivamente activa

(T175D) e inactiva (K48M) de MpKIN10. La expresión se verificó mediante inducción con IPTG (Figura 4a).

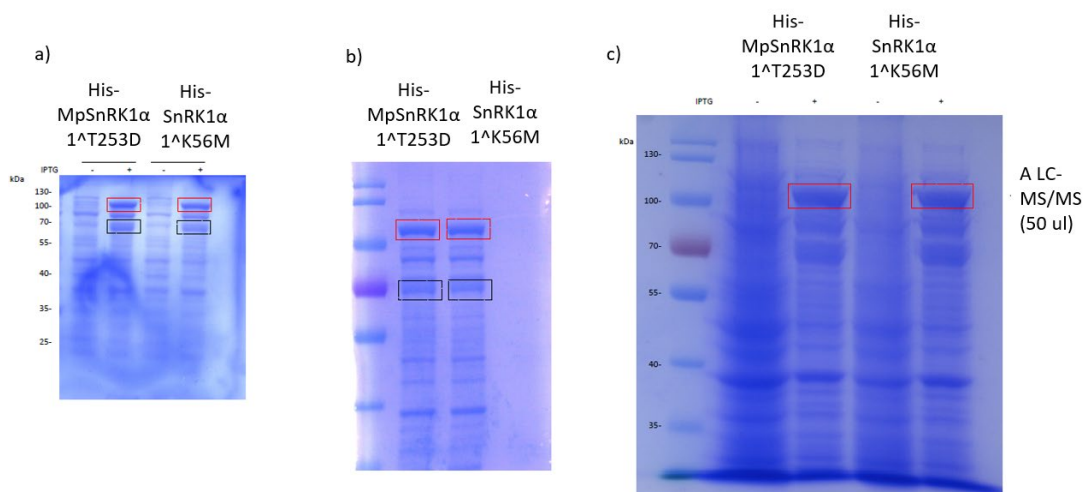


Figura 4. Producción y purificación de proteínas recombinantes MpKIN10 y MpDELLA. a) Expresión en *E. coli* de proteínas recombinantes fusionadas a etiquetas GST/His. Las bandas observadas alrededor de 100 kDa (recuadros rojos) corresponden a MpKIN10 y MpDELLA tras inducción con IPTG. b) Purificación de las proteínas recombinantes, mostrando una intensidad comparable entre las variantes activa (T175D) e inactiva (K48M) de MpKIN10. Esto permitió asegurar cantidades similares, lo que nos hizo pasar al siguiente paso. c) Selección de las bandas purificadas (recuadros rojos) enviadas a espectrometría de masas (LC-MS/MS) para identificar residuos de serina fosforilados en MpDELLA.

Las bandas observadas alrededor de 100 kDa (recuadros rojos) confirman que tanto MpKIN10 como MpDELLA fueron producidos con éxito.

Posteriormente las muestras se purificaron para asegurar suficiente cantidad de proteína en las condiciones deseadas, lo cual se muestra en la Figura 4b, donde se observa una intensidad comparable entre las muestras activas e inactivas. Gracias a esto hicimos un análisis equitativo de fosforilación.

Finalmente, en la Figura 4c se muestra la selección de las bandas purificadas que fueron enviadas a espectrometría de masas (LC-MS/MS) para identificar los residuos de serina fosforilados en MpDELLA. Como el análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS) consume por completo las muestras procesadas, se planificaron dos rondas de análisis independientes. En la primera ronda, se incluyeron distintas condiciones experimentales, tanto con como sin inducción por IPTG, utilizando las versiones activa (MpKIN10-T175D) e inactiva (MpKIN10-K48M) de la quinasa. Esta primera exploración permitió obtener un panorama general de los residuos fosforilados en MpDELLA.

A partir de esos resultados, se observó que las condiciones sin IPTG no aportaban información adicional, por lo que se diseñó una segunda ronda que estaría centrada únicamente en comparar las condiciones activa e inactiva de MpKIN10. En esta segunda fase se utilizó una mayor cantidad de proteína por muestra, lo que permitió aumentar la sensibilidad del análisis y confirmar con mayor precisión las diferencias observadas en los sitios de fosforilación.

4.1.2. Identificación de residuos fosforilados (PhosphoSITE)

El análisis espectrométrico permitió detectar con alta probabilidad varios residuos fosforilados en MpDELLA, destacando un péptido clave (se usa la letra s minúscula para hacer referencia a las serinas seleccionadas): ARPsSSsAsDLTGV TSPQYR. Las serinas seleccionadas además están en una región altamente conservada del dominio DELLA si se la compara con la misma DELLA de *Arabidopsis*. La elección de estas serinas se basó en la conservación de los residuos, la alta probabilidad de localización y en su intensidad en condiciones activas, según los valores de TiO2 detectados (ver Tabla 1).

Tabla 1. Residuos de serina identificados como fosforilados en MpDELLA mediante análisis espectrométrico. Se muestran los péptidos detectados, la probabilidad de localización de la fosforilación en cada serina (“Best Localization Probability”) y la intensidad de señal obtenida en las diferentes condiciones de TiO₂. Las columnas “TiO2banda1”, “TiO2banda2” y “TiO2banda3” corresponden a tres réplicas de la condición activa de MpKIN10 (T175D), mientras que “TiO2banda4” refleja la condición inactiva (K48M). Los altos valores de probabilidad de localización (próximos a 1), junto con la intensidad de señal registrada en condiciones activas, respaldan la idea de que estos residuos constituyen sitios de fosforilación regulados por MpKIN10

Index	Gene	Protein	Protein ID	Peptide	Best Localization Probability	TiO2b anda1 _1 Localiz ation Proba bility	TiO2b anda2 _1 Localiz ation Proba bility	TiO2b anda3 _1 Localiz ation Proba bility	TiO2b anda4 _1 Localiz ation Proba bility	TiO2b anda1 _1 Intensi ty
AOA06 8PER5_ S16	DELLA	tr AOA06 8PER5 A OA068PE R5_MAR PO	AOA068PER 5	ARPsSSsA SDLTGVTS PQYR	0.8285	0.369 5	0.306 1	0.828 5	0.0	72736 .5
AOA06 8PER5_ S19	DELLA	tr AOA06 8PER5 A OA068PE R5_MAR PO	AOA068PER 5	ARPsSSsA SDLTGVTS PQYR; PSSsASD LTGVTS PQYR	0.9381	0.932 5	0.906 7	0.938 1	0.0	3,15E +13
AOA06 8PER5_ S21	DELLA	tr AOA06 8PER5 A OA068PE R5_MAR PO	AOA068PER 5	ARPsSSs AsDLTGV TSPQYR	0.9399	0.933 9	0.903 5	0.939 9	0.0	1,64E +13
AOA06 8PER5_ S28	DELLA	tr AOA06 8PER5 A OA068PE R5_MAR PO	AOA068PER 5	ARPsSSs ASDLTGV TsPQYR	0.9411	0.724 9	0.0	0.941	0.941 1	73.71 6.055
AOA06 8PER5_ S35	DELLA	tr AOA06 8PER5 A OA068PE R5_MAR PO	AOA068PER 5	HHsGSVG VDQQLLA HTGGYSN VR	0.9341	0.911 1	0.866 5	0.934 1	0.0	88510 9.1
AOA06 8PER5_ S37	DELLA	tr AOA06 8PER5 A OA068PE R5_MAR PO	AOA068PER 5	HHsGSVG VDQQLLA HTGGYSN VR	0.8795	0.879 5	0.0	0.0	0.0	31818 2.28

A0A068PER5_T27	DELLA	tr A0A068PER5 A0A068PER5_MARPO	A0A068PER5	ARPSSTASDLTGVTSPQYR	0.9337	0.9337	0.0	0.4721	0.0	19.478.799
A0A068PER5_T281	DELLA	tr A0A068PER5 A0A068PER5_MARPO	A0A068PER5	FAHFTANQAILEAVQNHKR	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
A0A068PER5_T504	DELLA	tr A0A068PER5 A0A068PER5_MARPO	A0A068PER5	RRMtDA GFQLR	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	48634.48
A0A068PER5_Y51	DELLA	tr A0A068PER5 A0A068PER5_MARPO	A0A068PER5	HHSGSVGVDDQQLLHTGGYSNVR	0.8755	0.8755	0.0	0.0	0.0	40.165.793

En la columna “Best Localization Probability” se muestra la probabilidad de que la fosforilación se localice con precisión en una serina concreta dentro del péptido. Valores cercanos a 1 (por ejemplo, 0,9381 o 0,9411) indican una alta confianza en la posición específica de la fosforilación. Por otra parte, la intensidad del péptido fosforilado bajo condiciones activas (cuando MpKIN10 está en su forma activa T175D) se puede observar en las columnas etiquetadas como “TiO2banda1”, “TiO2banda2” y “TiO2banda3”, que corresponden a las tres réplicas de dicha condición. Se destacan señales fuertes en estas columnas (por ejemplo, 1,14E+14 o 36.047.766), mientras que en la columna “TiO2banda4” (condición MpKIN10 inactiva, K48M) esas señales son mucho menores o nulas. Esta diferencia refuerza la hipótesis de que dichos residuos están siendo fosforilados en presencia de MpKIN10 activa y justifica su selección como serinas candidatas.

La combinación de una alta probabilidad de localización y una señal intensa en condiciones activas sugiere que los residuos identificados actúan como dianas directas de MpKIN10. No obstante, esto no descarta que otros residuos puedan fosforilarse en diferentes contextos o mediante la acción de otras quinasas, aunque sí permite señalar aquellos cuya fosforilación parece depender específicamente de MpKIN10 en este experimento.

Esta evidencia sirvió para justificar la construcción de las variantes MpDELLA SxA y SxD, que ayudarían a probar experimentalmente el papel regulador de la fosforilación en estos residuos específicos. Para comprobar la validez de esta predicción, se diseñaron versiones mutadas de MpDELLA que imitan diferentes estados de fosforilación (ver figura 3) con el fin de expresar las proteínas recombinantes y estudiar su fosforilación por MpKIN10.

4.2. Ensayos de interacción proteína-proteína mediante sistema de doble híbrido en levadura (Y2H)

Para averiguar si la fosforilación de MpDELLA por MpKIN10 podía tener un efecto sobre su estabilidad o sobre su actividad como activadora transcripcional, decidimos examinar la capacidad de las versiones “fosfonula” y “fosfomimética” de interaccionar con MpCOP1 y MpSLY por un lado, y con MpMED15 por otro. Las combinaciones de vectores se transformaron en células de levadura y se sembraron en placas selectivas: Por una parte, se hicieron placas –L–T (sin leucina ni triptófano). Estas servirían para tener un control de la transformación doble. En

esta placa solo crecerían las levaduras que tengan los dos vectores (pGADT7 y pGBK), ya que cada uno complementa la auxotrofia de la levadura para leucina (LEU2) y triptófano (TRP1)

También se utilizaron placas -L-T-H (sin histidina, leucina, ni triptófano). En este medio las levaduras solo pueden crecer si las proteínas fusionadas al activation domain y al binding domain interaccionan físicamente.

Por último, también se emplearon placas -L-T-H + 3-AT. El 3-aminotriazol (3-AT) inhibe la síntesis de histidina. Esto hace más difícil el crecimiento de las levaduras, que solo crecerán si la interacción entre ellas es suficientemente fuerte. Se prepararon placas con 7 μ M de 3-AT.

En estos ensayos, la proteína MpDELLA (silvestre) y sus versiones mutantes MpDELLA-SxA y MpDELLA-SxD se clonaron en el vector pGADT7, fusionándolas al Activation Domain (AD) del factor de transcripción GAL4 (ver tabla 1 anexo). Por otra parte, las proteínas candidatas interactoras —MpSLY, MpCOP1 y MpMED15— se clonaron en el vector pGBK, fusionándolas al Binding Domain (BD) de GAL4 (figura 5, a).

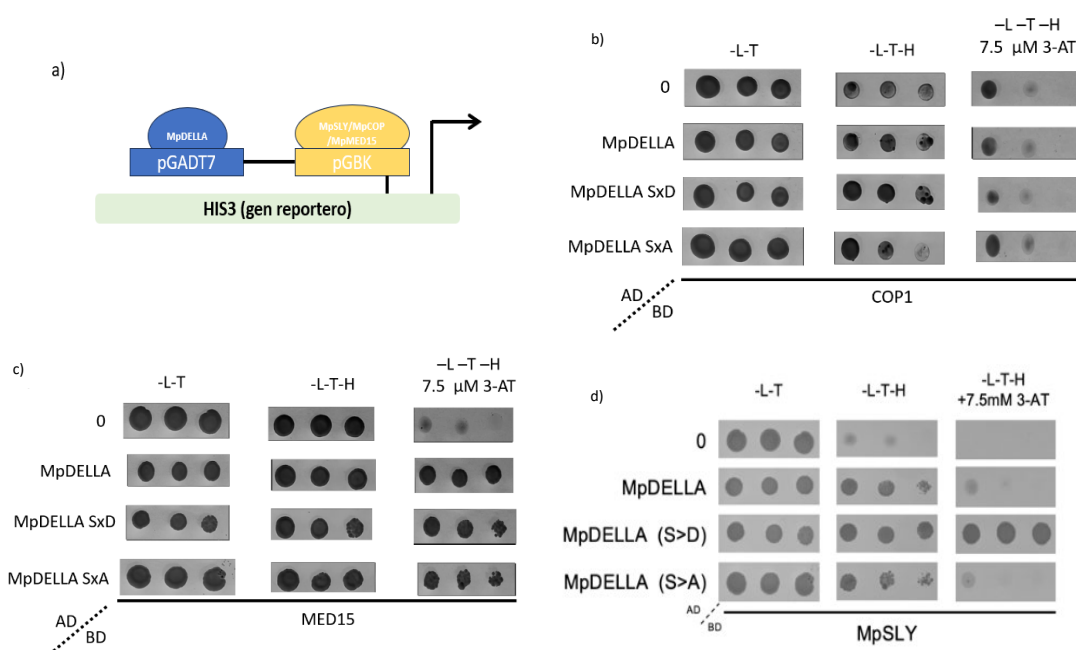


Figura 5. Ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H). (a) Esquema del sistema Y2H. MpDELLA (y sus versiones mutantes MpDELLA-SxA y MpDELLA-SxD) se clonaron en el vector pGADT7 (AD), mientras que MpSLY, MpCOP1 y MpMED15 se introdujeron en pGBK (BD). La interacción entre ambas fusiones activa la expresión del gen reportero *HIS3*, que permite el crecimiento en medios sin histidina. (b) Interacción con MpCOP1 (c) Interacción con MpMED15 (d) Interacción con MpSLY.

Mientras que el ensayo con MpCOP1 resultó inconcluyente (ya que ninguna de las combinaciones de MpCOP1 con las variantes de MpDELLA crecieron en medio selectivo más que el control negativo) (Figura 5c), los ensayos con MpMED15 y con MpSLY sí que permitieron sacar conclusiones. Por una parte, la interacción con MpMED15 no fue afectada por ninguna de las mutaciones (Figura 5d), indicando que la capacidad de transactivación de MpDELLA permanece constante independientemente del estado de fosforilación de las Ser identificadas como diana de MpSnRK1. Sin embargo, la interacción entre MpDELLA y MpSLY fue considerablemente más fuerte en el caso de la versión fosfomimética que con la silvestre o la fosfonula (Figura 5b). Este resultado sugiere que la fosforilación de MpDELLA por MpSnRK1 podría favorecer la interacción con MpSLY, quizá acelerando su degradación.

4.3 Efectos de la pérdida y ganancia de función de *MpKIN10* sobre el desarrollo de *Marchantia polymorpha*

Con el fin de analizar el fenotipo de falta de función MpSnRK1, decidimos editar mediante CRISPR/Cas9 el gen *MpKIN10*. Se analizaron un total de 15 muestras después de hacer la transformación de *Marchantia*. A partir de los alineamientos se identificaron varios alelos mutantes, entre los que destacan tres líneas (*Mpkin10-1CR*, *Mpkin10-2CR* y *Mpkin10-3CR*) con mutaciones que generan codones de parada prematuros en diferentes posiciones de la proteína (figura 6).

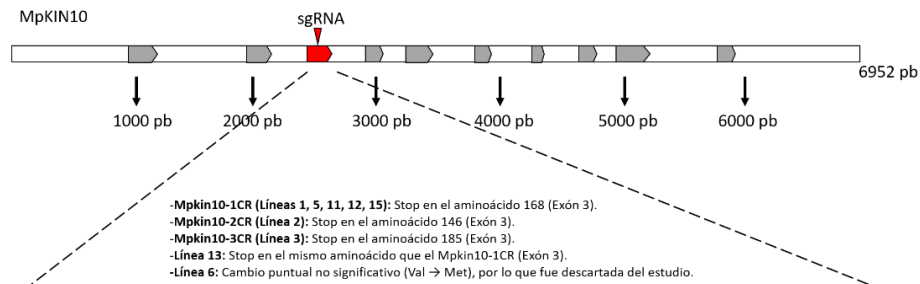


Figura 6: Esquema del gen *MpKIN10* mostrando exones (cajas grises), intrones (cajas blancas) y la posición del sgRNA (rojo). Las mutaciones generaron codones de parada en el exón 3, dando lugar a tres grupos principales: *Mpkin10-1CR* (aa 168), *Mpkin10-2CR* (aa 146) y *Mpkin10-3CR* (aa 185).

Como se ha comentado en el apartado de materiales y métodos, se realizaron medidas del área de los diferentes grupos de mutantes CRISPR de *MpKIN10* en las semanas 1, 2 y 3 de crecimiento. Al analizar que los mutantes mostraban copas alteradas se midió el número de copas y el área de las mismas. En *Marchantia*, la ramificación se organiza a partir de los meristemos apicales (indicados en azul en la figura 7 a), que son los centros de crecimiento en el extremo del talo.

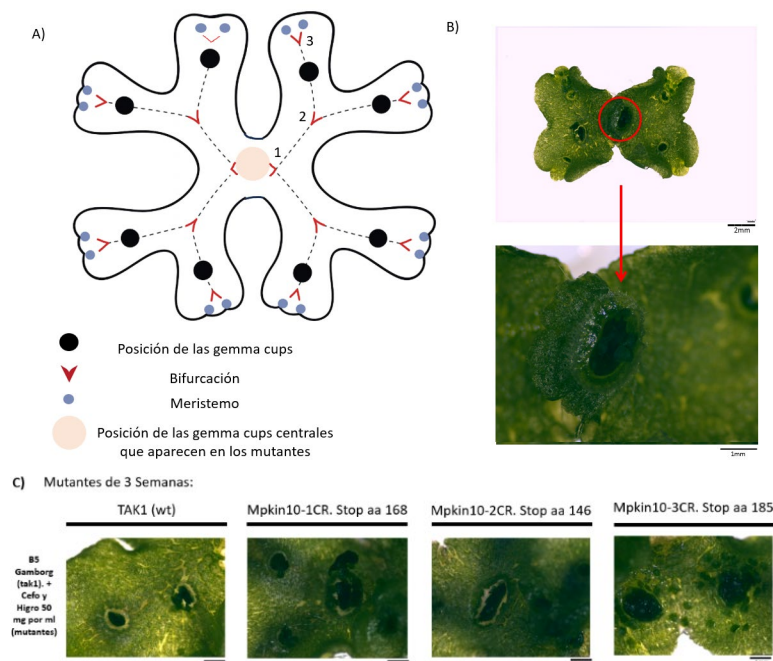


Figura 7. Alteraciones en la disposición de las copas en los mutantes de *MpKIN10*. (A) Esquema del patrón de ramificación en *Marchantia*, mostrando los meristemos apicales (azul), las bifurcaciones dicotómicas (flechas rojas) y la posición habitual de las copas (círculos negros). (B) Ejemplo de una gemma cup central observada en los mutantes. (C) Comparación de plantas de tres semanas: línea silvestre Tak-1 y mutantes de *MpKIN10*.

Durante el desarrollo, cada meristemo produce un eje de crecimiento que, tras un periodo de elongación, se bifurca de manera dicotómica (flechas rojas en la figura 7 a). Este patrón de bifurcación genera dos nuevos lóbulos, cada uno con su propio meristemo, lo que explica la característica simetría radial de la planta. En la parte A de la figura, los números 1, 2 y 3 reflejan el orden en el que se van produciendo las bifurcaciones del talo, siguiendo la misma lógica descrita por (Komatsu et al. 2023). La primera bifurcación (1) da lugar a los dos lóbulos iniciales, en cuyos márgenes aparecen los primeros meristemas. Posteriormente, una segunda bifurcación (2) duplica el número de lóbulos y permite la formación de nuevas copas. Finalmente, la tercera bifurcación (3) repite el proceso y establece un patrón reiterativo que asegura la disposición periférica y secuencial de las copas.

En los mutantes CRISPR generados en este trabajo se observaron copas centrales (círculo naranja en la figura 7 A), situadas en la región próxima al punto de ramificación principal del talo, un lugar donde no suelen aparecer en las plantas Tak-1. En la figura 7, B se muestra un ejemplo de una de estas copas centrales. El fenotipo de los distintos mutantes llamaba la atención en especial porque parecía que estos eran más pequeños y tenían más copas que las plantas silvestres Tak-1, como se contempla en algunas fotos de las plantas de tres semanas de edad (figura 7, c).

Además de las líneas mutantes generadas mediante CRISPR, también se analizaron líneas sobreexpresoras de *MpKIN10* en fondo silvestre Tak-1 y en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG. Aunque la caracterización detallada de estas líneas se describió en apartados anteriores, resulta relevante mencionarlás aquí para contextualizar el conjunto de estrategias utilizadas. La comparación de su fenotipo con Tak-1 y con las líneas mutantes CRISPR permite observar de forma complementaria cómo tanto la pérdida como la ganancia de función de MpKIN10 alteran el desarrollo de *Marchantia*.

Como ya se ha comentado, se diseñaron sobreexpresoras en fondo silvestre Tak-1. Se pretendía comparar estas plantas con el crecimiento normal de las plantas Tak-1 para ver qué efecto tiene la sobreexpresión de MpKIN10 en el desarrollo de *Marchantia*.

Las plantas en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG ofrecen la posibilidad de realizar, en el futuro, ensayos de western blot empleando anticuerpos anti-FLAG y anti-SnRK1. Se podrían comparar los niveles de acumulación de MpKIN10 con los de la proteína DELLA y con los observados en las plantas Tak-1, permitiendo correlacionar la sobreexpresión con cambios en la regulación de estas proteínas.

El segundo objetivo de generar estas líneas sobreexpresoras en un fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG era comprobar si aumentar los niveles de MpKIN10 podía reducir los efectos negativos provocados por el exceso de MpDELLA. Cuando hay demasiada MpDELLA, la planta crece peor y presenta un desarrollo anómalo. MpKIN10 actúa como una especie de “etiqueta” que marca MpDELLA para que pueda eliminarse más fácilmente. Por eso, al sobreexpresar MpKIN10, se esperaba que parte de la MpDELLA acumulada se degradara y que, como consecuencia, el fenotipo anómalo fuera menos intenso. En cambio, en plantas silvestres (Tak-1), donde MpDELLA no se acumula en exceso, el efecto de MpKIN10 debería ser menos evidente.

Como veremos en apartados posteriores, finalmente se observó el contrario de lo que se esperaba: las plantas sobreexpresoras en fondo EF: MpDELLA crecieron con un fenotipo más anómalo, sin desarrollo de copas incluso a las tres semanas de edad. En el caso de las sobreexpresoras en fondo silvestre se apreció en cambio, como las plantas eran más grandes que las Tak-1.

4.4. Caracterización de las mutantes

4.4.1 Número de copas por semana.

4.4.1.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre

En cuanto a las sobreexpresoras en fondo silvestre, observamos en la figura 8 a que las plantas con más *MpKIN10* tienen menos número de copas que las plantas Tak1 en las tres semanas en las que se realizó el fenotipado (ver figura 8). Se dan diferencias significativas entre Tak-1 y el grupo *MpKIN10* oEX 2.

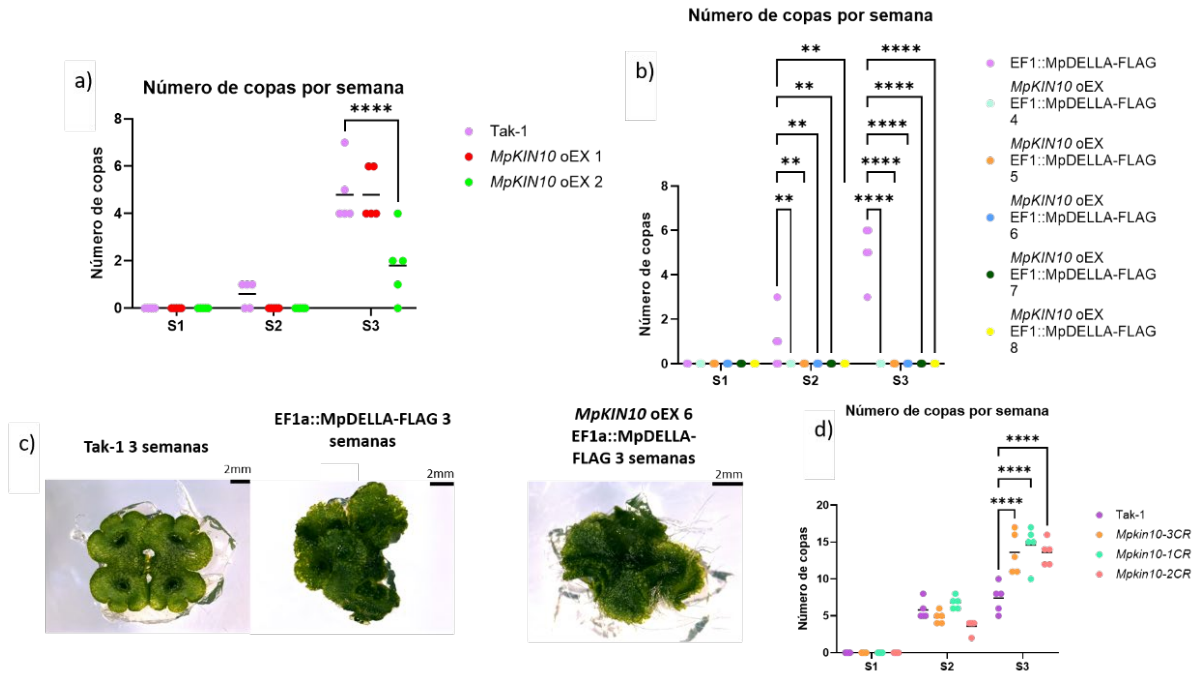


Figura 8: (a) Número de copas de las sobreexpresoras *MpKIN10* en fondo Tak-1. (b) Número de copas de las sobreexpresoras en fondo EF1α::MpDELLA-FLAG. (c) Fotos de plantas Tak-1, EF1α::MpDELLA-FLAG y *MpKIN10* oEX EF1α::MpDELLA-FLAG. (d) Número de copas de las mutantes de pérdida de función. Los asteriscos indican niveles de significancia estadística. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Solo se muestran asteriscos en las diferencias estadísticamente significativas.

4.4.1.2 Mutantes sobreexpresoras en fondo EF1α::MpDELLA-FLAG

Como se aprecia en la figura 7 b, en las *Marchantias* fondo EF1α::MpDELLA-FLAG se aprecia un comportamiento similar. En este caso vemos que las mutantes no presentan copas a las tres semanas de edad. Esto se debe al fenotipo de las mismas. En la figura 7 c se pueden apreciar las diferencias entre las plantas Tak-1 (figura 7c 1) y las plantas EF1α::MpDELLA-FLAG (figura 7c 2), que en comparación con las últimas, sufren alteraciones en su desarrollo, mostrando una forma irregular, sin división en lóbulos bien identificados. En la figura 7 c se observa el fenotipo de las sobreexpresoras en fondo EF1α::MpDELLA-FLAG, que muestran crecimiento irregular sin copas.

4.4.1.3 Mutantes pérdida de función *MpKIN10*

En el caso de las mutantes de pérdida de función, se aprecia como, a diferencia de las mutantes sobreexpresoras, las mutantes de pérdida de función si que muestran un comportamiento más cercano al de las plantas Tak-1. En este sentido, a las 2 semanas las mutantes en general muestran un número de copas similar a las Tak-1. Únicamente el *Mpkin10-2CR* muestra diferencias significativas respecto del grupo control. Este grupo es el

que menos MpKIN10 funcional tiene y el que, en general, muestra un fenotipo más alejado a Tak-1. En cambio, en la semana 3 del tratamiento, se aprecia como todos los grupos tienen un número de copas significativamente más alto que el control.

4.4.2 Área de las plantas por semana.

4.4.2.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre

Como se aprecia en la figura 9 a, generalmente estas plantas son más grandes que las Tak-1. El grupo *MpKIN10* oEX 1 en particular si que es significativamente más grande que el grupo control, a diferencia del grupo *MpKIN10* oEX 2, que si que es de un tamaño más similar al grupo Tak1. Como se ve en la figura 9 b, las plantas de este grupo además presentan poros más grandes que las plantas Tak-1.

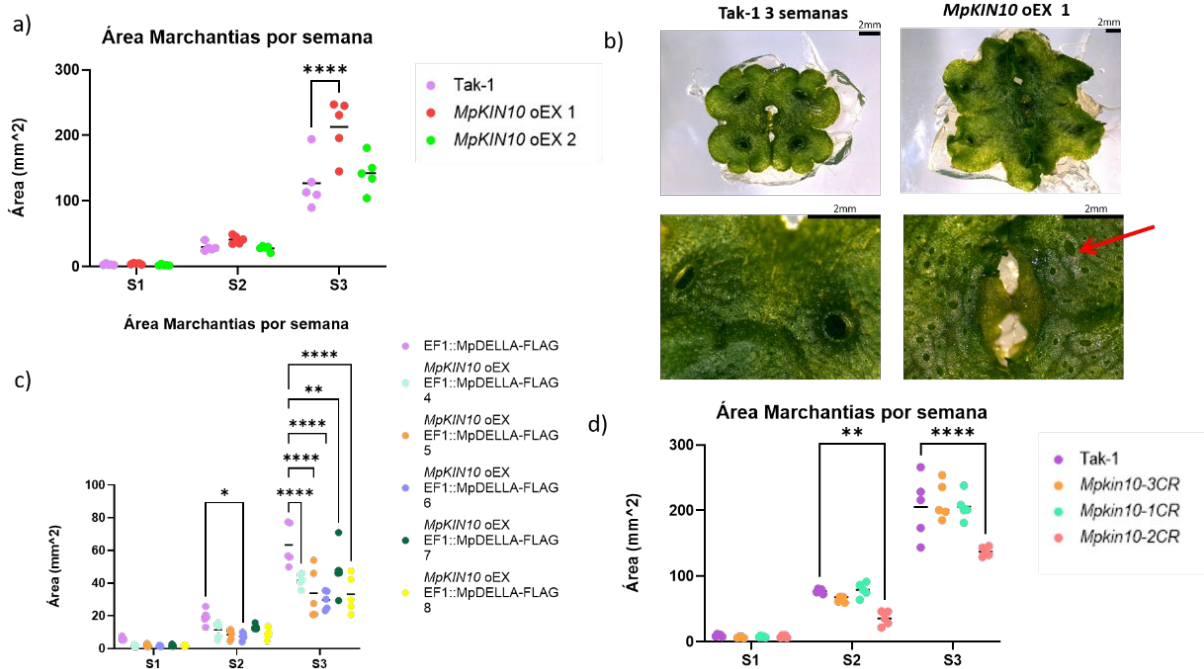


Figura 9: Análisis del área de las mutantes (mm²). (a) Área de las sobreexpresoras *MpKIN10* en fondo Tak-1. (c) Área de las sobreexpresoras en fondo EF1α::MpDELLA-FLAG. (c) Fotos de plantas Tak1 y *MpKIN10* oEX 1. (d) Área de las mutantes de pérdida de función. Solo se muestran asteriscos en las diferencias estadísticamente significativas y los asteriscos indican los mismos niveles de significancia estadística que en gráficas anteriores.

4.4.2.2 Mutantes sobreexpresoras en fondo EF1α::MpDELLA-FLAG

En el caso de estos mutantes se aprecia cómo los controles EF1α::MpDELLA-FLAG on de manera general más grandes que las sobreexpresoras de fondo EF1α::MpDELLA-FLAG. El fenotipo general del grupo control en este caso ya es bastante pequeño. Cuando estas plantas sobreexpresan *MpKIN10* el fenotipo es más alterado, dando lugar a plantas más pequeñas en estos casos (ver figura 8, c).

4.4.2.3 Mutantes pérdida de función *MpKIN10*

En las mutantes CRISPR de *MpKIN10*, los fenotipos más diferentes del grupo control los muestra una vez más el *Mpkin10-2CR* (figura 8 d). Como en los otros casos, en la primera semana no se ven cambios de los grupos analizados respecto del control, pero en la segunda

semana, las mutantes de *Mpkin10-2CR* ya muestran un área significativamente menor. Esta diferencia se ve todavía más grande en la tercera semana, en la que el *Mpkin10-2CR* también es el único que es significativamente más pequeño que el grupo control.

4.4.3 Copas/Área mutantes por semana.

4.4.3.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre

Cuando normalizamos las medidas de número de copas y área y creamos la variable copas/área, observamos en general lo que hemos visto anteriormente. En las sobreexpresoras en fondo Tak-1, ambos grupos muestran un fenotipo más grande y con menos copas en la semana 3, con diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos estudiados (figura 10 a). Las sobreexpresoras en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG no presentaban copas, por lo que no se ha podido realizar este análisis.

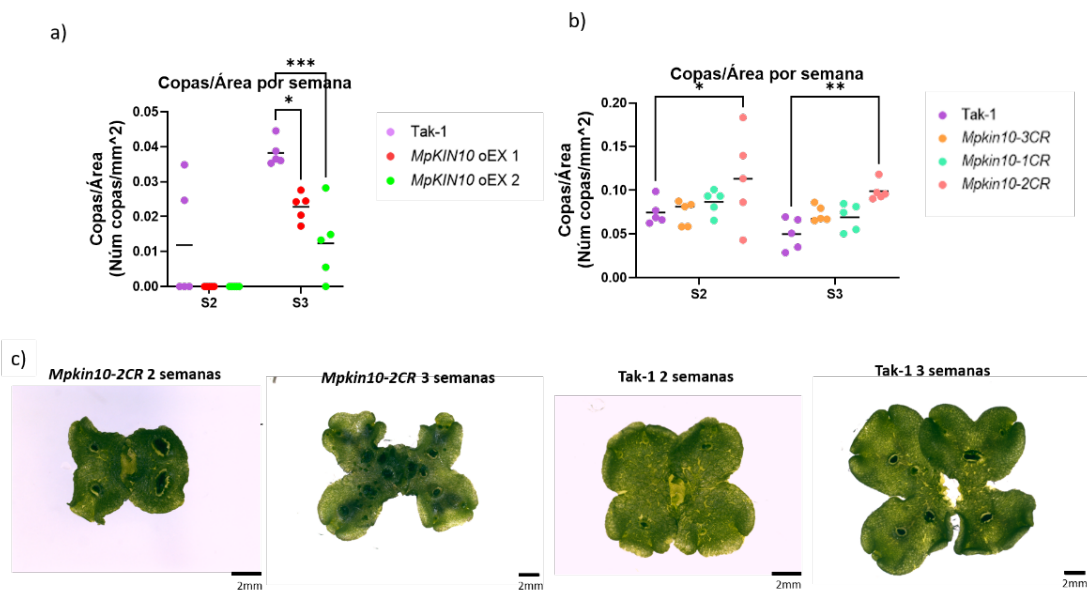


Figura 10: Análisis del número de copas por área de las mutantes (mm²). (a) Copas por área de las sobreexpresoras *MpKIN10* en fondo Tak-1. (b) Copas por área de las sobreexpresoras de las mutantes de pérdida de función. (c) Fotos de *Marchantias* del *Mpkin10-2CR* y Tak-1 de dos y tres semanas de edad. Solo se muestran asteriscos en las diferencias estadísticamente significativas y los asteriscos indican los mismos niveles de significancia estadística que en gráficas anteriores.

4.4.3.2 Mutantes pérdida de función *MpKIN10*

En el caso de las mutantes CRISPR se observa en las semanas 2 y 3 que el *Mpkin10-2CR* es más pequeño y tiene más copas que el control, mostrando diferencias estadísticamente significativas (figura 9 b). En cambio, el resto de grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en este aspecto (figura 9 c).

4.4.4 Área de las copas de los mutantes en la tercera semana.

4.4.4.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre

Al medir el área de las copas de las sobreexpresoras en fondo Tak-1 se observa como las *MpKIN10* oEX 1 tienen copas significativamente más pequeñas que las del grupo control (figura 11 a). En este ensayo no se incluyen los datos para *MpKIN10* oEX 2 porque esta línea

no cumplió los requisitos establecidos de poder tener hasta 20 copas medibles para hacer las medidas. En la figura 11 b se observa la diferencia general del área de las copas entre Tak-1 y *MpKIN10* oEX 1. Se vuelve a apreciar como algunos poros en *MpKIN10* oEX 1 son más grandes que los de Tak1.

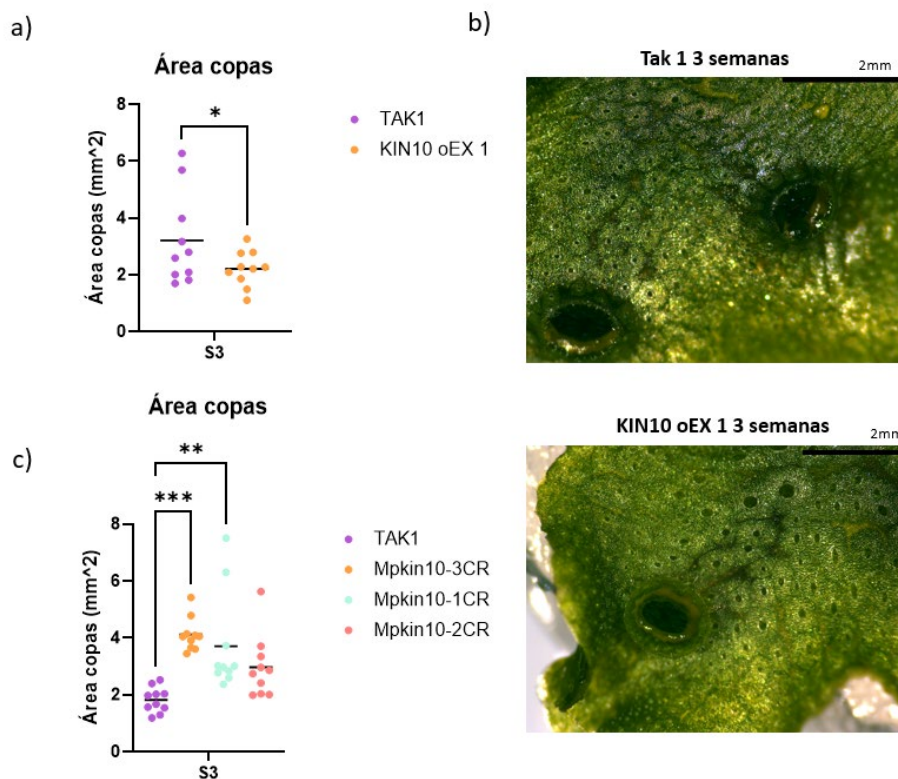


Figura 11: Análisis del área de las copas de las mutantes (mm²) con 3 semanas de edad. (a) Copas por área de las sobreexpresoras *MpKIN10* en fondo Tak-1. (b) Fotos de las copas de plantas Tak-1 y *MpKIN10* oEX 1 de tres semanas de edad. (c) Copas por área de las sobreexpresoras de las mutantes de pérdida de función. Solo se muestran asteriscos en las diferencias estadísticamente significativas y los asteriscos indican los mismos niveles de significancia estadística que en gráficas anteriores.

4.4.4.2 Mutantes pérdida de función *MpKIN10*

En la figura 11 c se observa como de manera general las copas son más grandes en los mutantes que en el grupo control. Esta tendencia sin embargo solo es estadísticamente significativa para los grupos 3 y 1 y curiosamente las copas del Mpk10-2CR, que es el que menos *MpKIN10* funcional tiene y en general muestra el fenotipo más diferente, no muestra diferencias estadísticamente significativas.

4.4.5 Área de los mutantes creciendo 1 semana en DCMU 1 µM

4.4.5.1 Mutantes sobreexpresoras en fondo silvestre

El DCMU es un inhibidor de la fotosíntesis que se emplea para simular situaciones de ayuno energético. De acuerdo con esto, plantas silvestres tratadas con DCMU son más pequeñas que las no tratadas. Al analizar el área de las mutantes de una semana de edad creciendo en B5 con DCMU 1 µM en fondo silvestre se observa como las sobreexpresoras son en general más grandes que las plantas Tak-1 (figura 12 a y b). En tratamientos con esta concentración

de DCMU las diferencias son significativas respecto los grupos control que crecen en medio sin DCMU, pero no se observan diferencias significativas respecto el rupo Tak-1. No podemos decir claramente que sean plantas significativamente más grandes que Tak1.

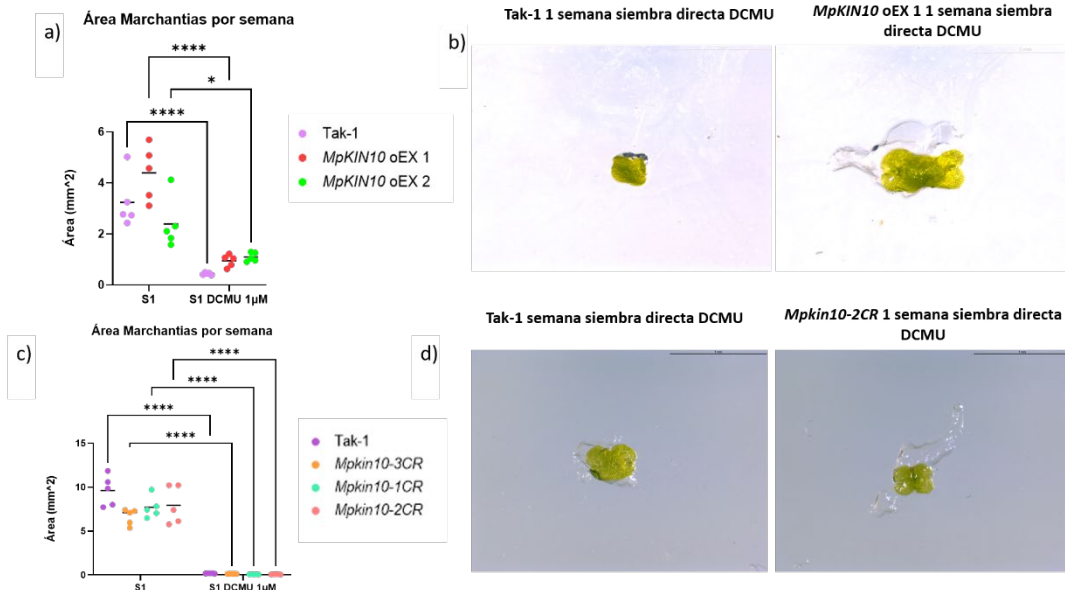


Figura 12: Análisis del área de las copas de las mutantes (mm²) con 1 semana de edad en placas de DCMU 1 µM. (a) Área de las sobreexpresoras *MpKIN10* en fondo Tak-1. (b) Fotos de las plantas Tak-1 y *MpKIN10* oEX 1 de una semana creciendo en DCMU. (c) Área de las mutantes de pérdida de función. (d) Fotos de Tak-1 y mutantes del *Mpkin10-2CR* de una semana creciendo en DCMU. Solo se muestran asteriscos en las diferencias estadísticamente significativas y los asteriscos indican los mismos niveles de significancia estadística que en gráficas anteriores.

4.4.5.2 Mutantes pérdida de función *MpKIN10*

Las mutantes CRISPR mostraron un crecimiento parejo al de las plantas Tak-1. Aún así como se observa en la figura 12 c, todos los grupos eran significativamente más pequeños que los grupos que crecían en medio B5 sin DCMU. Cuando sí se aplicaba este tratamiento la tendencia general era ver que las mutantes eran más pequeñas que el grupo Tak-1. Sin embargo, las diferencias no salieron significativas entre grupos en tratamiento DCMU 1 µM (figura 12 c y d).

Estas condiciones se midieron para placas de DCMU 2 µM y se observó que las gemas Tak1 no germinaban, mientras que a una semana de edad las mutantes CRISPR sí germinaban. Estos datos no se muestran en el trabajo porque las plantas analizadas crecieron contaminadas. De cara al futuro podría ser interesante repetir estos tratamientos con concentraciones diferentes de DCMU y analizar como se comportan las plantas.

5. Discusión

5.1 Interacción de las versiones MpDELLA, MpDELLA SxD y MpDELLA SxAcon MpSLY, MpCOP1 y MpMED15

Los ensayos Y2H confirman que MpDELLA interacciona con MpSLY y MpMED15, mientras que no se detectó interacción con MpCOP1. La principal diferencia entre las variantes se observa en MpSLY, donde MpDELLA SxD mantiene un crecimiento más fuerte en medios restrictivos, lo que sugiere que la fosforilación puede favorecer su reconocimiento y, posiblemente, su degradación.

En el caso de MpCOP1, ninguna de las combinaciones de MpDELLA con MpCOP1 mostró crecimiento mayor que el control negativo, por lo que no es posible concluir que exista interacción en las condiciones ensayadas.

Por último, la interacción con MpMED15 se mantiene estable en todas las variantes, lo que sugiere que la fosforilación no afecta a su capacidad de actuar como coactivador transcripcional. En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la fosforilación de MpDELLA modula de forma selectiva ciertas interacciones sin alterar otras funciones conservadas

5.2 Posibles papeles de MpKIN10 en el área, número de copas y área de las copas.

Los fenotipos obtenidos en las líneas mutantes y sobreexpresoras de *MpKIN10* sugieren que esta quinasa desempeña un papel importante en el control del crecimiento vegetativo y en la formación de copas en *M. polymorpha*. Las diferencias observadas en el número y tamaño de las copas, junto con las variaciones en el área total de las plantas, apuntan a que MpKIN10 podría estar involucrada en la integración de señales relacionadas con el metabolismo energético con procesos de desarrollo.

El hecho de que las plantas sobreexpresoras en fondo Tak-1 presenten mayor crecimiento y más copas indica que MpKIN10 podría favorecer el desarrollo bajo condiciones favorables, probablemente al activar rutas de crecimiento y estimular la actividad de los meristemos. La disminución de copas y área en las líneas de pérdida de función sugiere que MpKIN10 es necesaria para mantener un desarrollo vegetativo y reproductivo adecuado.

Las diferencias en el tamaño de las copas también pueden reflejar un ajuste diferente en la asignación de recursos entre crecimiento y reproducción, ya que estas estructuras dependen directamente del estado energético de la planta. En este sentido, MpKIN10 podría actuar como un regulador que adapta el desarrollo en función de la disponibilidad de recursos, un papel similar al descrito para la subunidad catalítica de SnRK1 en otras especies.

Los resultados apoyan que MpKIN10 podría coordinar el crecimiento vegetativo y la formación de copas a través de mecanismos ligados a la regulación energética, contribuyendo a ajustar la estrategia reproductiva de la planta frente a distintas condiciones.

6. Conclusiones

Este trabajo aporta nueva información sobre el papel de MpDELLA y MpKIN10 en *M. polymorpha*.

1. La fosforilación de MpDELLA parece reforzar su interacción con MpSLY sin alterar la unión a MED15, lo que sugiere un efecto específico sobre su estabilidad.
2. MpKIN10 influye en el crecimiento vegetativo y la formación de copas, actuando como un regulador positivo: su sobreexpresión potencia el desarrollo, mientras que la pérdida de función lo reduce.
3. Estos resultados apuntan a que MpKIN10 y MpDELLA participan en la integración de señales energéticas y de desarrollo, mecanismos probablemente conservados en plantas basales.

7. Líneas futuras

Aunque este trabajo ha permitido avanzar en la comprensión de la función de MpDELLA y MpKIN10 en *Marchantia polymorpha*, todavía quedan varias preguntas abiertas que podrían abordarse en próximos experimentos.

Una de las ideas más directas es realizar western blots en las líneas mutantes en fondo EF1 α ::MpDELLA-FLAG para comprobar si los cambios fenotípicos observados se corresponden con alteraciones en la acumulación o movilidad de MpDELLA. Esto permitiría evaluar si las mutaciones de *MpKIN10* influyen directamente sobre los niveles o el estado de modificación postraduccional de MpDELLA.

Otra posibilidad interesante sería cultivar las mutantes bajo luz roja lejana (far-red) para analizar cómo responden a esta condición y si son capaces de formar estructuras sexuales. También podrían explorarse diferentes condiciones de crecimiento o tratamientos que modifiquen el estado energético de la planta (como déficit de sacarosa, tratamientos con DCMU o Torin) para determinar si MpKIN10 regula la estabilidad de MpDELLA en función del contexto metabólico. Como se ha comentado anteriormente, se podría explorar como cambia el comportamiento de los mutantes al aplicar diferentes concentraciones de DCMU, ya que en la elaboración de este mismo trabajo se observó con dosis de 2 μ M que las mutantes CRISPR MpKIN10 germinaban tras una semana, mientras que las Tak-1 no llegaban a germinar, pero no se pudo llegar a una conclusión sólida debido a la contaminación de las líneas.

Además, sería útil complementar estos enfoques con análisis de expresión génica para ver si las diferencias fenotípicas se acompañan de cambios transcripcionales. Por último, técnicas como la inmunoprecipitación o ensayos de interacción in vivo podrían ayudar a confirmar de forma más precisa los mecanismos moleculares implicados.

8. Referencias bibliográficas

- Alabadí, D., & Sun, T.-P. (2025). *Green Revolution DELLA proteins: Functional analysis and regulatory mechanisms*. *Annual Review of Plant Biology*, 76(1), 373–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-053124-050732>
- Baena-González, E., & Hanson, J. (2017). Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.008>
- Blanco-Touriñán, N., Legris, M., Minguet, E. G., Costigliolo Rojas, C., Laufs, P., & Blázquez, M. A. (2022). COP1 destabilizes DELLA proteins in Arabidopsis independently of gibberellins to regulate plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 119(4), e2116565119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116565119>
- Broeckx, T., Hulsmans, S., & Rolland, F. (2016). The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6215–6252. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw416>
- Delaux, P.-M., Hetherington, A. J., Coudert, Y., Delwiche, C., Dunand, C., Gould, S., ... de Vries, J. (2019). *Reconstructing trait evolution in plant evo-devo studies*. *Current Biology*, 29(21), R1110–R1118. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.044>
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (1989). Transforming yeast with DNA. *Methods in Enzymology*, 194, 281–300. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Harris, B. J., Clark, J. W., Schrepf, D., Szöllősi, G. J., Donoghue, P. C. J., Hetherington, A. M., & Williams, T. A. (2022). *Divergent evolutionary trajectories of bryophytes and tracheophytes from a complex common ancestor of land plants*. *Nature Ecology & Evolution*, 6(11), 1634–1643. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01930-3>
- Hernández-García, J., Serrano-Mislata, A., Lozano-Quiles, M., Urbez, C., Nohales, M. A., Blanco-Touriñán, N., Peng, H., Ledesma-Amaro, R., & Blázquez, M. A. (2024). DELLA proteins recruit the Mediator complex subunit MED15 to coactivate transcription in land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 121(16), e2319163121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2319163121>
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., & Kohchi, T. (2015). *Development of Gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE*, 10(9), e0138876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138876>
- Jiménez Cañete, N. (2023). Estudio de la interacción entre SLEEPY1 y DELLA en Marchantia polymorpha. Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología, Universitat Politècnica de València.
- Kato, H., Yasui, Y., & Ishizaki, K. (2020). Gemma cup and gemma development in Marchantia polymorpha. *New Phytologist*, 227(3), 590–605. <https://doi.org/10.1111/nph.16576>
- Komatsu, A., Kodama, K., Mizuno, Y., Fujibayashi, M., Naramoto, S., & Kyojuka, J. (23). Control of vegetative reproduction in *Marchantia polymorpha* by the KAI2-ligand signaling pathway. *Current Biology*, 33(7), 1196–1210.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.02.022>
- Serrano-Mislata, A., González-González, N., & Alabadí, D. (2021). DELLA proteins regulate growth in response to gibberellins by controlling cell proliferation in the plant meristem. *Current Biology*, 31(15), 3433–3443.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.010>

- Shani, E., Hedden, P., & Sun, T.-P. (2024). *Highlights in gibberellin research: A tale of the dwarf and the slender*. *Plant Physiology*, 195(1), 111-134. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae044>
- Suzuki, H., Harrison, C. J., Shimamura, M., Kohchi, T., & Nishihama, R. (2020). Positional cues regulate dorsal organ formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Journal of Plant Research*, 133, 311–321. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01180-5>
- Tomé, F., Nägele, T., Adamo, M., Garg, A., Marco-Illorca, C., Nukarinen, E., Pedrotti, L., Peviani, A., Simeunovic, A., Tatkiewicz, A., Tomar, M., & Gamm, M. (2014). The low energy signaling network. *Frontiers in Plant Science*, 5, 353. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00353>
- Wang, F., & Deng, X. W. (2011). Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Research*, 21, 1286–1294. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.118>
- Yasui, Y., Tsukamoto, S., Sugaya, T., Nishihama, R., Wang, Q., Kato, H., Yamato, K. T., Fukaki, H., Mimura, T., Kubo, H., Theres, K., Kohchi, T., & Ishizaki, K. (2019). GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1, an Ortholog of Axillary Meristem Regulators, Is Essential in Vegetative Reproduction in *Marchantia polymorpha*. *Current Biology*, 29(23), 3987–3995.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.004>
- Yu, L., et al. (2023). Comprehensive analysis of SnRK gene family and expression patterns under abiotic stresses in cotton. *BMC Plant Biology*, 23, 45. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04077-9>
- Zhang, X., Zhao, B., Sun, Y., & Feng, Y. (2022). *Effects of gibberellins on important agronomic traits of horticultural plants*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 978223. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978223>
- Zhu, H., et al. (2023). Evolution of the TOR–SnRK signaling axis in green plants: Conservation and divergence across lineages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201, 107590. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107590>
- Zegers, J. M. S., Irisarri, I., de Vries, S., & de Vries, J. (2024). *Evolving circuitries in plant signalling cascades*. *Journal of Cell Science*, 137(17), jcs261712. <https://doi.org/10.1242/jcs.261712>

Anexo

Tabla 1: Plásmidos utilizados a lo largo del tfm.

NOMBRE DEL CONSTRUCTO	MAPA (.pdf)	RESISTENCIA (Bacterias/Levadura)	FUNCIÓN
MpDELLA 221 (silvestre)	Ver mapa	Kanamicina	Vector de entrada (pEN221) con la secuencia silvestre de MpDELLA; usado como intermediario para mutagénesis y clonaje Gateway.
MpDELLA-SxA 221	Ver mapa	Kanamicina	Vector de entrada (pEN221) con MpDELLA mutada (SxA, no fosforilable); intermediario para clonaje Gateway hacia pGADT7.
MpDELLA-SxD 221	Ver mapa	Kanamicina	Vector de entrada (pEN221) con MpDELLA mutada (SxD, fosfomimética); intermediario para clonaje Gateway hacia pGADT7.
pGADT7-GW (vacío)	Ver mapa	Carbenicilina / Auxotrofia (Leu)	Vector Y2H con dominio de activación de Gal4; control negativo y base para clonar MpDELLA.
MpDELLA_pGADT7 (silvestre)	Ver mapa	Carbenicilina / Auxotrofia (Leu)	MpDELLA silvestre fusionada al dominio de activación de Gal4; ensayo Y2H.
MpDELLA-SxA_pGADT7	Ver mapa	Carbenicilina / Auxotrofia (Leu)	MpDELLA mutada SxA fusionada al dominio de activación de Gal4; ensayo Y2H.
MpDELLA-SxD_pGADT7	Ver mapa	Carbenicilina / Auxotrofia (Leu)	MpDELLA mutada SxD fusionada al dominio de activación de Gal4; ensayo Y2H.
MpSLY_pGBKT7	Ver mapa	Kanamicina / Auxotrofia (Trp)	MpSLY fusionada al dominio de unión al DNA de Gal4; Y2H.

NOMBRE DEL CONSTRUCTO	MAPA (.pdf)	RESISTENCIA (Bacterias/Levadura)	FUNCIÓN
MpMED15_pGBKT7	Ver mapa	Kanamicina / Auxotrofia (Trp)	MpMED15 fusionada al dominio de unión al DNA de Gal4; Y2H.
MpCOP1_ pGBKT7	Ver mapa	Kanamicina /Auxotrofia (Trp)	MpCOP1 fusionada al dominio de unión al DNA de Gal4; Y2H
MpKIN10_pMpGWB108	Ver mapa	Kanamicina (<i>E.coli</i> / <i>Agrobacterium</i>), Higromicina (<i>Marchantia</i>)	Sobreexpresión constitutiva de <i>MpKIN10</i> bajo promotor EF1 con citrina para validar la expresión en <i>Marchantia</i> .
MpKIN10-1_pMpGEen03	Ver mapa	Kanamicina (<i>E.coli</i> / <i>Agrobacterium</i>), Higromicina (<i>Marchantia</i>)	Vector CRISPR con gRNA dirigido contra MpKIN10. Usado junto con Cas9 para generar los mutantes de pérdida de función de <i>MpKIN10</i> en <i>Marchantia</i> .

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados a lo largo del tfm.

Nº	NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	LONGITUD (nt)	FUNCIÓN
1	Citrine_YPF_RV	TCGCCGGACA CGCTGAACTT GTG	22	Oligo reverso del gen marcador Citrina; empleado junto a mms_kin10_fw para validar la inserción en sobreexpresoras de MpKIN10.
2	mms_kin10_fw	GGGGACAAG TTTGTACAAA AAAGCAGGC TTCATGGAGA ACGTCAATGG TG	42	Oligo directo específico de MpKIN10; utilizado en la PCR diagnóstica de líneas sobreexpresoras EF:MpKIN10 (fondos silvestre y EF1α::MpDELLA-FLAG).
3	MMS193genoKINg 2fw	CCATCTGTCTC GCATTAACCA T	23	Oligo forward para genotipar mutantes CRISPR de <i>MpKIN10</i> obtenidas con la guía 2.
4	MMS194genoKINg 2rv	GCCGTTCCAT GTTTGGCATA	20	Oligo reverse para genotipar mutantes CRISPR de <i>MpKIN10</i> (guía 2).
5	MMS_KIN10_fw	GGGGACAAG TTTGTACAAA AAAGCAGGC TTCATGGAGA ACGTCAATGG TG	42	Amplificación completa del ORF <i>MpKIN10</i> con sitio attB1 para clonación Gateway (entrada en vector pEN221 y posterior transferencia a pGWB108).
6	MMS_KIN10_rv	GGGGACCAC TTTGTACAAG AAAGCTGGG TC...TAAATTC AGCAGACGA CCAGA	43	Amplificación completa del ORF <i>MpKIN10</i> con sitio attB2 para clonación Gateway.
7	gRNA2fw-MpKIN10	CTCGGGAGTA TTGCCATCAG ACAA	24	Secuencia forward de la guía 2 CRISPR diseñada contra MpKIN10.
8	gRNA2rv-MpKIN10	AAACTGTTGC TATGGCAATA CTCC	24	Secuencia reverse de la guía 2 CRISPR diseñada contra MpKIN10.
9	gRNA1fw-MpKIN10	CTCGACTTCA TCGCAGGAA GATCA	24	Secuencia forward de la guía 1 CRISPR diseñada contra MpKIN10.
10	gRNA1rv-MpKIN10	AAACTGATCT TCCTGCGATG AAGT	24	Secuencia reverse de la guía 1 CRISPR diseñada contra MpKIN10.

11	MpDELLA SxA-FW	CAGCATCTGC AGCGCGAGA CCTCACAGGA GGAGTCACTT CTC	43	Oligo forward para mutagénesis dirigida: construcción de MpDELLA SxA (serinas sustituidas por alanina).
12	MpDELLA SxA-RV	CGGCTGCAG ATGCTGCGGG ACGGGCACG AACTCG	36	Oligo reverse para mutagénesis dirigida: construcción de MpDELLA SxA.
13	MMS195 MPDSxD-221	ACGACTCTGA CGCCGACCAC CTCACAGGA GGAGTCACTT CTC	43	Oligo forward para mutagénesis dirigida: construcción de MpDELLA SxD (serinas sustituidas por ácido aspártico).
14	MMS196 MPDSxD-221	CGGCGTCAG AGTCGTCCGG GACGGGCAC GAA	31	Oligo reverse para mutagénesis dirigida: construcción de MpDELLA SxD.