

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**La sobreexpresión de *AtGRDP2*, una nueva proteína  
con un dominio rico en glicinas, acelera el crecimiento  
de las plantas y mejora la tolerancia al estrés**

Tesis que presenta

**M.C. María Azucena Ortega Amaro**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

San Luis Potosí, S.L.P., abril de 2015



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**La sobreexpresión de *AtGRDP2*, una nueva proteína con un dominio rico en glicinas, acelera el crecimiento de las plantas y mejora la tolerancia al estrés**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por la **M.C Maria Azucena Ortega Amaro** y aprobada el **30 de abril de 2015** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

Dr. Juan Francisco Jimenez Bremont  
Director de la tesis

---

Dr. Angel Gabriel Alpuche Solis  
Miembro del Comité Tutorial

---

Dra. Martha Leticia Santos Martinez  
Miembro del Comité Tutorial

---

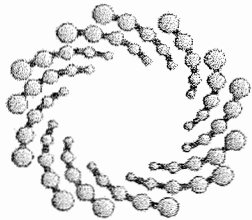
Dr. Sergio Rosales Mendoza  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de hongos y de plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jimenez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con numero de registro 228028 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 077 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de abril del año 2015, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Sergio Rosales Mendoza</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**María Azucena Ortega Amaro**

sobre la Tesis intitulada:

*La sobreexpresión de AtGRDP2, una nueva proteína con un dominio rico en glicinas, acelera el crecimiento de las plantas y mejora la tolerancia al estrés*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de abril de 2015.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico





## Dedicatorias

*A mi madre por nunca me ha dejado sola...*

*A mi Papa y a mis hermanos de los que siempre he recibido  
amor y comprensión*

*A mis tíos Laura y Jose Luis por su gran apoyo*

*A Ismael y Emilio los que siempre me dieron fuerza para  
continuar, los amo*

## **Agradecimientos**

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, director de esta tesis y de quien admiro su pasión por la ciencia. Muchas gracias por su confianza, orientación y por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

A la Dra. Margarita Rodríguez-Kessler por su amistad, apoyo y por todas las importantes aportaciones a este trabajo.

A la Dra Leticia Santos, al Dr. Angel Alpuche y al Dr. Sergio Rosales, miembros del comité tutorial, por sus sugerencias en cada seminario de avance y por la revisión del escrito.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora, por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de esta tesis.

A Lucy, gran amiga y compañera en esta etapa tan importante de nuestras vidas.

A Luz, Pablo, Fatima, Silvia y Jorge por su amistad y por su gran compañerismo en el laboratorio.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
<b>I. Introducción</b>	
1.1 Estrés en plantas	1
1.2 Salinidad	3
1.2.1 Tolerancia de las plantas a la salinidad	5
1.3 Proteínas ricas en glicina (GRPs)	8
1.3.1 Clasificación de las proteínas ricas en glicina en plantas	9
1.3.2 RRM-GRPs: proteínas de unión a RNA con un dominio rico en glicinas	11
1.3.3 GRPs involucradas en el desarrollo de las plantas	14
1.4 Proteínas de unión a RNA con un motivo rico en glicinas (GR-RBPs) involucradas en la formación de gránulos de RNA	15
1.5 Auxinas	17
1.5.1 Transporte y señalización de auxinas	19
1.6 Genes de función desconocida en plantas	21
<b>II. Antecedente directo</b>	22
<b>III. Objetivo</b>	23
<b>IV. CAPITULO I</b>	
La sobreexpresión de AtGRDP2, una nueva proteína con un dominio rico en glicinas, acelera el crecimiento de la planta y mejora la tolerancia al estrés	24
<b>V. Discusion</b>	41

<b>VI. Referencias bibliograficas</b>	47
<b>VII. Anexos</b>	
Anexo 1 Expresión transitoria del gen <i>AtGRDP2</i> de <i>A. thaliana</i> en raíces de frijol	51
Anexo 2 Materiales y metodos	54

## **Lista de tablas**

1. Composición de la solución de Hoagland 1X	58
--	----

## Lista de figuras

1. Esquema de la respuesta molecular de las plantas al estrés abiótico	7
2. Representación esquemática de la clasificación de las proteínas ricas en glicina de plantas	10
3. Diagrama esquemático de las clases de las proteínas de unión a RNA de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
4. Transporte polar de auxinas	20
5. Transformación transitoria de frijol con la cepa de <i>A. rhizogenes</i> K-599 y con <i>A. rhizogenes</i> -AtGRDP2	52
6. Ensayo de salinidad utilizando plantas compuestas de frijol que expresan el gen <i>AtGRDP2</i> de <i>Arabidopsis</i> .	53
7. Mapa de vector <i>pCR8/GW/TOPO</i>	59
8. Mapa de vector destino <i>pCMD32</i>	60
9. Mapa de vector destino <i>pKGWFS7</i>	61

## **Anexos**

1. Expresión transitoria del gen <i>AtGRDP2</i> de <i>A. thaliana</i> en raíces de frijol	51
2. Materiales y metodos	54

## RESUMEN

**“La sobreexpresión de *AtGRDP2*, una nueva proteína con un dominio rico en glicinas, acelera el crecimiento de las plantas y mejora la tolerancia al estrés”**

Más del 20% de las tierras de cultivo en el mundo están afectadas por el estrés salino. Niveles tóxicos de sal en la planta reducen la capacidad para captar el agua provocando una rápida reducción en la tasa de crecimiento. Los mecanismos de tolerancia al estrés son multifactoriales e incluyen la expresión de ciertos grupos de genes, que conllevan a la acumulación de proteínas relacionadas al estrés y de solutos compatibles involucrados en la protección celular. En este sentido, las proteínas ricas en glicina (GRPs) han sido involucradas en procesos importantes como la regulación transcripcional, señalización, interacción proteína-proteína, desarrollo y en la respuesta al estrés biótico y abiótico. En este trabajo se llevó a cabo la caracterización funcional del gen *AtGRDP2* (*Arabidopsis thaliana Glycine Rich Domain Protein*) que contiene un dominio DUF1399 y un motivo putativo de unión a RNA (RRM). Las líneas mutantes del gen *AtGRDP2* en *Arabidopsis* mostraron una mayor sensibilidad al estrés salino y un retraso en el crecimiento de las plantas. Interesantemente, al sobreexpresar el gen *AtGRDP2* en *Arabidopsis* y lechuga, se promueve el desarrollo de las plantas así como la tolerancia al estrés salino. Análisis de la expresión de genes relacionados con el estrés, muestran una inducción de estos genes en la línea sobreexpresante en comparación con la mutante y la línea parental (Col-0). A partir de que la desregulación de *AtGRDP2* produce alteraciones en el desarrollo, se encontró que los niveles de ácido indol acético (IAA) están diferencialmente acumulados en los diferentes fondos genéticos, así como alteraciones en la expresión de genes implicados en la señalización de auxinas y floración. Aunado a esto la línea reportera *pAtGRDP2::GFP-GUS* mostro un incremento en la señal de GUS en la unión raíz-hipocótilo y en la zona de diferenciación de la raíz, en plantas tratadas con IAA. Nuestros datos sugieren que *AtGRDP2* está implicado en el desarrollo y la respuesta al estrés salino de *Arabidopsis*.

**Palabras clave:** Proteínas ricas en glicina, auxinas, *Lactuca sativa*



## ABSTRACT

### **“Overexpression of *AtGRDP2*, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance”**

It is estimated that 20% of irrigated farmlands in the world is affected by salinity. Toxic levels of salt reduce the ability of plants to take up water, and this quickly causes reductions in growth rate. The stress tolerance mechanisms are multifactorial and include the expression of certain sets of genes, leading to the accumulation of stress-related proteins and compatible solutes involved in cellular protection. In this sense, glycine-rich proteins (GRPs) have been involved in important processes such as transcriptional regulation, signaling, protein-protein interaction, development and response to biotic and abiotic stress. We present the functional characterization of *AtGRDP2* gene (*Arabidopsis thaliana* Glycine Rich Domain Protein) that contains a DUF1399 domain and a putative RNA binding motif (RRM). *Arabidopsis AtGRDP2* mutant lines showed increased sensitivity to salinity and delayed growth of plants. Interestingly, the *AtGRDP2* overexpression in *Arabidopsis* and lettuce, promotes the plant development and salt stress tolerance. Analysis of the expression of stress-related genes, show an induction in the overexpressing line compared to the *Atgrdp2-1* mutant and parental line (col-0). Since, the *AtGRDP2* deregulation produces alterations in development, it was found that levels of indole acetic acid (IAA) are differentially accumulated in different genetic backgrounds, as well as alterations in the expression of genes involved in auxin signaling. In this sense, p*AtGRDP2*::GFP-GUS line reporter showed an increase GUS signal in the root-hypocotyl junction and near the root differentiation zone, under IAA treatment. Our data suggest that *AtGRDP2* is involved in the development and response to salt stress in *Arabidopsis*.

**Key words:** Glycine rich proteins, auxin, *Lactuca sativa*

## I. INTRODUCCION

### 1.1 Estrés en plantas

Las actividades antropogénicas están implicadas fuertemente en el uso y la degradación de los recursos naturales (Ahmad y Azooz, 2013). Las variaciones actuales en el medio ambiente afectan de una manera importante a la agricultura, debido a que las plantas terrestres no presentan movilidad que les permita protegerse del ritmo estacional del clima y de los cambios que está sufriendo el planeta; o escaparse de suelos contaminados, suelos pobres en nutrientes y carentes de agua. Además, datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que para el año 2050 a nivel mundial la demanda de alimentos aumentará un 70%, mientras que para los países en desarrollo se calcula que el aumento alcanzará el 100% en comparación con la producción actual. Este aumento de la demanda de alimentos, ejercerá una presión sin precedentes en muchos sistemas de producción agrícola en todo el mundo. Por lo tanto, se requiere una optimización de los recursos que se generan y obtienen en los campos de cultivo, de los ríos y mares, así como mejorar las prácticas de producción agrícola.

Las plantas al ser organismos sésiles son incapaces de escapar de las condiciones adversas que afectan su crecimiento y desarrollo. Por lo que las plantas necesitan para su desarrollo al menos de factores como el agua, la luz como fuente de energía, el CO<sub>2</sub> (fuente de carbono) y de minerales. Es por ello que han desarrollado múltiples mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos, que les permiten responder rápidamente y tolerar a diversas condiciones ambientales desfavorables o de estrés (Rao, 2006).

La salinidad, la sequía y las temperaturas extremas son los factores de estrés abiótico más importantes, ya que reducen considerablemente el crecimiento de las plantas (Cramer *et al.*, 2011). Estos agobios en las plantas, tienen un

impacto importante en la distribución geográfica, la supervivencia y en el rendimiento de los cultivos. Estudios en cultivos de plantas de interés comercial, estiman que las pérdidas por condiciones ambientales desfavorables afectan alrededor de 2/3 partes de la producción total.

A nivel celular durante un estrés abiótico, en particular cuando incrementan los niveles de sal, de inicio se genera un desajuste osmótico debido a la entrada de una alta concentración de solutos a la célula, que a su vez limitan la cantidad de agua. Después la acumulación iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  generan un estrés iónico, el cual interfiere en la síntesis de proteínas y en la actividad enzimática. Finalmente, el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) conllevan a un estrés oxidativo, dañando la fluidez de la membrana celular. A este nivel ocurre un desorden nutricional y la tasa fotosintética se ve afectada severamente (Munns *et al.*, 2006).

Además, procesos como la expansión y elongación celular, se ven altamente afectados en procesos de estrés osmótico generados en consecuencia de la alta salinidad (Munns, 2002). Reportes indican que el ciclo celular es interrumpido durante las fases iniciales del estrés salino, en células localizadas en el meristemo apical de la raíz principal, donde la actividad de cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1) se ve afectada (West *et al.*, 2004, Ortega-Amaro *et al.*, 2012). Respecto a las cinasas *CDC2aAt* and *CycA2;1*, su expresión se ve reprimida durante el estrés salino, en zonas donde es importante la formación de las raíces laterales. En conjunto, todos estos efectos del estrés abiótico reducen el crecimiento de la raíces principal y laterales, el desarrollo y la supervivencia de las plantas.

Las respuestas de las plantas al estrés varían dependiendo del tipo y duración del agobio al que están sometidas. Además de que difieren en sus capacidades de percepción y de señalización, algunas plantas pueden tolerar el estrés al aumentar la producción y acumulación de osmolitos (moléculas que ayudan a mantener el equilibrio osmótico) así como enzimas antioxidantes que protegen la integridad de la membrana (Wahid *et al.*, 2007). Como consecuencia del estrés se sintetizan proteínas de protección como por ejemplo las proteínas de

choque térmico (por sus siglas en inglés HSP) y las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (por sus siglas en inglés LEA). Las HSP, principalmente participan en el correcto plegamiento de proteínas y ayudan a mantener la conformación funcional y estructural en situaciones de estrés, mientras que las proteínas del tipo LEA actúan como moléculas de unión a agua, secuestran iones y estabilizan macromoléculas (Thomashow, 1999).

A nivel fisiológico, las plantas cierran sus estomas para mantener el potencial hídrico y reducen la tasa de crecimiento para ahorrar y redistribuir de manera más eficiente las bajas concentraciones de nutrientes (Skirycz, y Inzé, 2010). Esta reducción en la tasa de crecimiento se presenta en las fases iniciales del estrés, es por ello que varios autores lo definen como una respuesta adaptativa y no como una consecuencia de la limitación de los nutrientes, ya que se tiene evidencia que la fotosíntesis en esa etapa no está afectada severamente (Skirycz *et al.*, 2010).

## 1.2 Salinidad

La salinidad del suelo es uno de los principales estreses abióticos que afecta negativamente la productividad de los cultivos. Este problema se ve agravado por las sequías, el uso de agua para el riego de mala calidad, la disminución de la humedad relativa, la radiación solar y las altas temperaturas (Hussain *et al.* 2008). Además, la aparición de suelos salinos no se limita a las condiciones del desierto, los suelos salinos se pueden encontrar en diferentes altitudes, desde debajo del nivel del mar (por ejemplo, alrededor del Mar Muerto) hasta en montañas que se elevan por encima de los 5,000 metros como la meseta del Tíbet (Singh y Chatrath, 2001).

En los últimos 30 años diversos autores se han esforzado por estimar la magnitud de los suelos afectados por salinidad a nivel mundial. En el año 2008, Munns y Tester reportaron que los cultivos agrícolas estaban afectados hasta en un 20% por este tipo de estrés. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud

(OMS) de las 230 millones de hectáreas (Ha) de cultivo de riego, 45 millones corresponden a suelos salinos. Se estima que las pérdidas anuales de cultivos haciende a los 1.5 millones de Ha, por lo que se pierden aproximadamente 11 mil millones de dólares en producción agrícola. Para la producción de maíz, México ocupa el 5º. lugar en producción agrícola, siendo los principales productores Estados Unidos y China. En México, 30% de los 5.5 millones de Ha de riego están afectadas por altos niveles de sales y se estima que por año, este problema aumenta entre 1 y 2% en las tierras de riego (Díaz *et al.*, 2001, INIFAP/SAGARPA).

Para algunas plantas el sodio ( $\text{Na}^+$ ) es considerado un micronutriente esencial (Brownelland y Crossland, 1972). Sin embargo, el exceso de iones  $\text{Na}^+$  y cloro ( $\text{Cl}^-$ ) así como cloruro y sulfato de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) son los responsables de la salinidad del suelo. Algunos reportes se refieren al termino sodicidad cuando existe un alta concentración de iones de  $\text{Na}^+$ , mientras que la salinidad es un exceso de sales totales como:  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$  y  $\text{SO}_2^{4-}$ , incluyendo el NaCl (Taiz y Zeiger, 2002). Se considera un suelo salino aquel que posee concentraciones de NaCl mayores a 40 mM, lo que genera una presión osmótica de 0.2 MPa. (Munns y Tester, 2008). La salinidad del suelo puede determinarse a partir de la medición de la conductividad eléctrica (EC), que dependiendo del sensor puede ser de una muestra de suelo disuelto en agua ( $\text{EC}_w$ ), una pasta saturada de suelo ( $\text{EC}_p$ ) o directamente del suelo ( $\text{EC}_a$ ) del campo de cultivo. La CE es equivalente a la concentración total de sales en una muestra, y se reporta como decisiemens por metro (dS/m). Un suelo normal posee valores de EC entre 2 a 4 dS/m, mientras que una alta salinidad puede generar valores de EC mayores a los 24 dS/m (FAO, 1999).

Altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  provocan que en las raíces se genere una falta de potasio, este fenómeno se da debido a la similitud en la naturaleza química de ambas moléculas ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) (Zhu, 2007), pero esta deficiencia de potasio afecta la turgencia celular, el potencial de membrana y la actividad enzimática. Además, desde etapas tempranas de estrés se produce una disminución en la tasa de crecimiento de la raíz (Munss, 2002).

Las hojas y la parte aérea de la planta también sufren una baja en la tasa de crecimiento durante el estrés salino, al parecer en consecuencia de la inhibición del transporte  $\text{Ca}^{2+}$  dada en la raíz (Lauchli y Grattan, 2007). El estrés salino induce la síntesis de ácido abscísico (ABA), este se transporta a las células guarda y conlleva al cierre estomático. Como resultado de cierre de los estomas, se disminuye la tasa fotosintética y se genera un estrés oxidativo (Zhu, 2007.)

### **1.2.1 Tolerancia de las plantas a la salinidad**

Como ya se describió la elevada concentración de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  son los principales factores que alteran el equilibrio nutricional y generan los efectos negativos de la salinidad en las plantas (Sairam y Tyagi, 2004). Munns (2002) describe que una de las afectaciones iniciales de la salinidad en las plantas es la reducción de la captación de agua lo que produce un desajuste osmótico y una disminución en la toma de nutrientes. Al llegar a niveles tóxicos, la planta reduce la tasa fotosintética y el área foliar y provocando así una senescencia prematura. Finalmente, se inhibe la tasa de división celular y se acelera la muerte de la planta.

La mayoría de las plantas utilizadas como cultivos de interés comercial son consideradas glicófitas, ya que su desarrollo se ve afectado en concentraciones arriba de 100-200 mM de NaCl. Por lo contrario, las plantas halófitas pueden tolerar una salinidad entre 300-400 mM, estas plantas con poca diversidad taxonómica se encuentran en zonas costeras y áridas (Taiz y Zeiger, 2002).

Los mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad involucran cambios en la expresión génica y en el metabolismo celular. El objetivo de estos mecanismos es prevenir y/o reparar el daño celular, restableciendo las condiciones de homeostasis osmótica e iónica que le permitan continuar con el crecimiento, aunque éste se produzca a una menor velocidad.

Para mantener concentraciones bajas de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma, las plantas excluyen o forman compartimentos (vacuolas) con dicho catión (Zhu, 2002). La vía de exportación SOS, es activada por los altos niveles de calcio generados durante

el estrés salino, así la cascada termina por encender a SOS1, una proteína de membrana plasmática que funciona como anti-transportador de Na<sup>+</sup> (Zhu, 2002).

La medición del contenido de iones en plantas halófitas y glicófitas después de un tratamiento de estrés salino, reveló que las plantas halófitas tienden a acumular más sales que las glicófitas, concluyendo así que las plantas halófitas están más especializadas en formar vacuolas para almacenar y separar las sales del citoplasma de la célula (Zhu, 2007). En cuanto a la exclusión del Na<sup>+</sup>, las plantas glicófitas son menos eficientes en la exclusión que las halófitas. En algunas plantas halófitas se ha reportado que las sales son expulsadas mediante células especializadas llamadas glándulas de sal, que exponen las sales en la superficie de las hojas (Zhu, 2007).

Respecto al metabolismo, las plantas sometidas a estrés acumulan compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Estos incluyen aminoácidos como glutamato y prolina, betaínas (glicin- o alanin-betaína), algunos polialcoholes e inositoles. Estos osmolitos compatibles contribuyen al ajuste osmótico, secuestrando iones (Zhu, 2007).

La respuesta molecular de las plantas al estrés (Figura 1), incluye la percepción y traducción de la señal mediante osmosensores, un control transcripcional que se desarrolla por mediante la activación de unas proteínas que codifican para factores de transcripción, que a su vez van a activar genes que codifican para proteínas y enzimas que producirán metabolitos que pueden restablecer la homeostasis celular en respuesta al estrés (Hirayama y Shinozaki, 2010; Wang 2003).

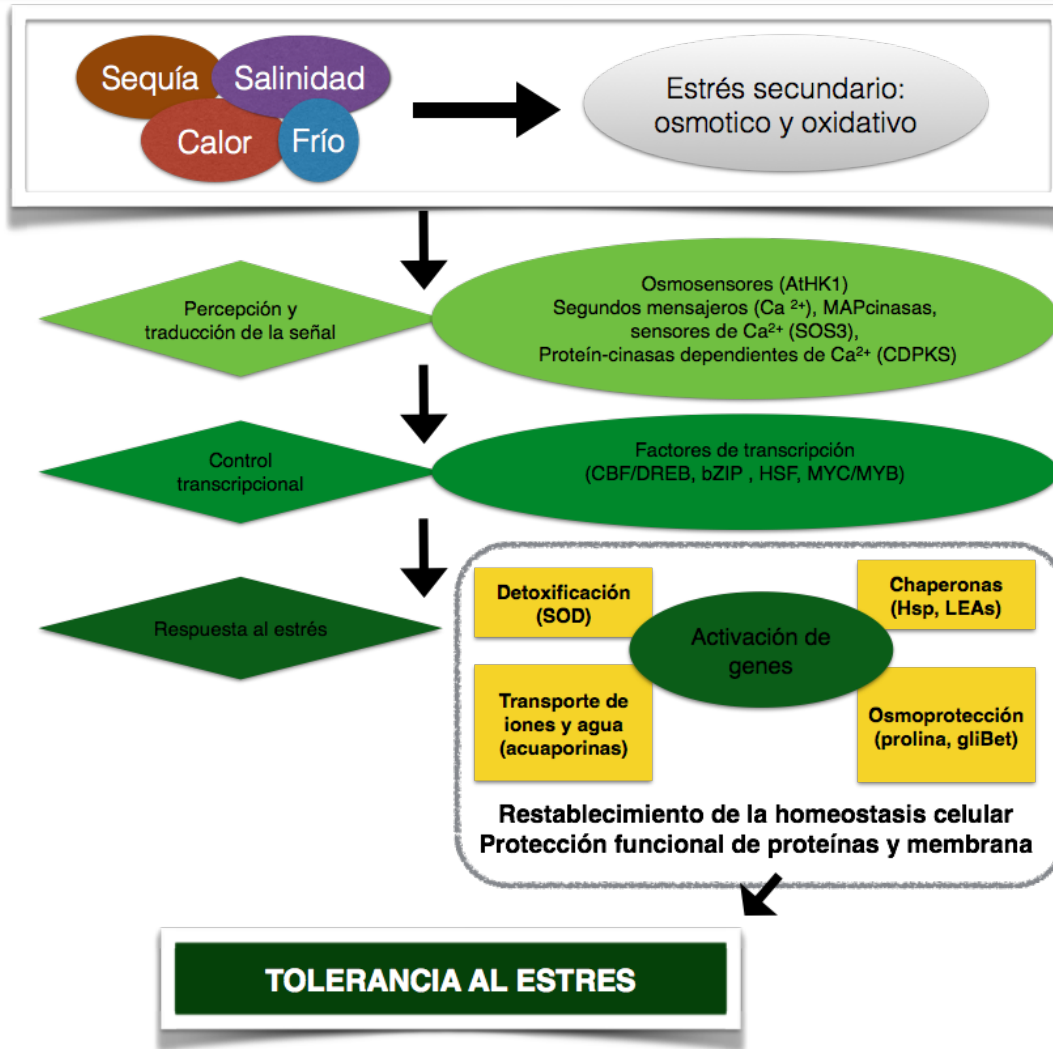


Figura 1. Esquema de la respuesta molecular de las plantas al estrés abiótico.  
 Imagen tomada y modificada de Wang *et al.*, 2003.

Se han descrito proteínas de protección celular involucradas durante el estrés como: proteínas de choque térmico, dehidrinas, proteínas transportadoras, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEAs), entre otras. Dentro de este grupo de genes que responden a estrés cabe resaltar a las proteínas ricas en glicina (GRPs) las cuales recientemente se les ha dado un papel importante en la tolerancia al estrés biótico y abiótico en plantas, además de que se ha reportado que son reguladas a nivel transcripcional por estos tipos de estrés (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).



### 1.3 Proteínas ricas en glicina (GRPs)

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) poseen alrededor de un 40 a un 70% de glicinas (Gly), donde la presencia de secuencias repetitivas o firmas de residuos (Gly)<sub>n</sub>-X dan lugar a la formación de un dominio, donde la X frecuentemente representa los aminoácidos alanina, serina o cisteína (Sachetto-Martins *et al.*, 2000; Mousavi y Hotta, 2005). Estos motivos ricos en glicina se ha sugerido que están involucrados en la interacción proteína-proteína (Steinert *et al.* 1991).

Proteínas con estas firmas ricas en glicina han sido reportadas en una amplia variedad de organismos unicelulares y multicelulares, incluyendo cianobacterias, bacterias, mamíferos, hongos, y plantas (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). A partir de la cianobacteria *Scytonema* MKU106 se purificó un péptido rico en glicinas que actúa como bio-pesticida en contra de plagas que atacan las plantas de algodón (Sathiyamoorthy y Shanmugasundaram, 1996). En el nematodo *Schistosoma mansoni*, las GRPs constituyen un componente importante de las cáscaras del huevo (Pena *et al.*, 1990). Mientras que en el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* se reportó que durante las etapas tempranas de la infección se induce la expresión de un gen que codifica para una proteína con dos dominios ricos en glicina (Pieterse *et al.*, 1994).

En plantas los primeros reportes relacionados con GRPs fueron en petunia (Condit y Meagher, 1986), en frijol (Keller *et al.*, 1988), en maíz (Gómez *et al.*, 1988), y en tabaco (van Kan *et al.*, 1988). Recientemente, se han identificado más de 150 diferentes genes que codifican para proteínas GRPs en genomas de plantas como *Arabidopsis* (Fusaro y Sachetto-Martins, 2007), caña de azúcar (Fusaro *et al.*, 2001) y eucalipto (Bocca *et al.*, 2005), así como en la planta medicinal *Curcuma longa* L. (Kar *et al.*, 2012).

Interesantemente, la expresión de genes que codifican para proteínas GRPs es modulada a nivel transcripcional por estrés abiótico. Además, la expresión puede ser tejido-específico y dependiente de la etapa de desarrollo de la planta

(Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Lo anterior sugiere la participación de estas proteínas en procesos importantes de la célula vegetal.

### 1.3.1 Clasificación de las proteínas ricas en glicina en plantas

Se ha propuesto una clasificación para esta superfamilia de GRPs en plantas (Figura 2), la cual se basa en la estructura general de la proteína, la distribución de los repetidos de glicina, así como la presencia de motivos y/o dominios conservados en la proteína (Sachetto-Martins *et al.*, 2000; Mangeon *et al.*, 2010).

Las primeras tres clases estructurales se basan en la disposición de las glicinas (firmas) de los dominio rico en glicina, es decir, clase I:  $(GGX)_n$ , clase II:  $(GGXXXGG)_n$ , y clase III:  $(GXGX)_n$ , respectivamente. Las GRP agrupadas en la clase I, al contener un péptido señal se cree que tienen una función estructural debido a su localización en la pared celular, un ejemplo es la GRP-1 de petunia (Cassab, 1998).

La clase II además del péptido señal, se caracterizan por presentar un dominio rico en cisteínas. Las GRPs que se encuentran en la clase III, poseen el menor contenido de glicinas que los grupos anteriores, pero al poseer un dominio conservado de oleosina se ha descrito su participación en la formación y prevención de la deshidratación del polen, como es el caso de la proteína AtGRP7 (también nombrada como AtGRP17/AtOGB3) (Mayfield y Preuss, 2000).

El grupo IV se caracteriza por poseer motivos y dominios adicionales, como uno o dos motivos de reconocimiento de RNA (RRM) y un dominio de choque de frío (CSD), ambos implicados en la unión a RNA. Además, se ha observado que presentan uno o dos dominios de dedo de zinc, y un dominio rico en cisteína (Bocca *et al.*, 2005; Mangeon *et al.*, 2010).

La clase V fue propuesta por Mangeon *et al.* 2010, debido a proteínas identificadas en Eucalipto (Bocca *et al.*, 2005) con un alto contenido de glicinas pero con patrones mixtos dentro del motivo, y que presentan firmas como la

siguiente: GGX/GXGX. Además miembros de esta clase, se observó que pueden presentar un péptido señal.

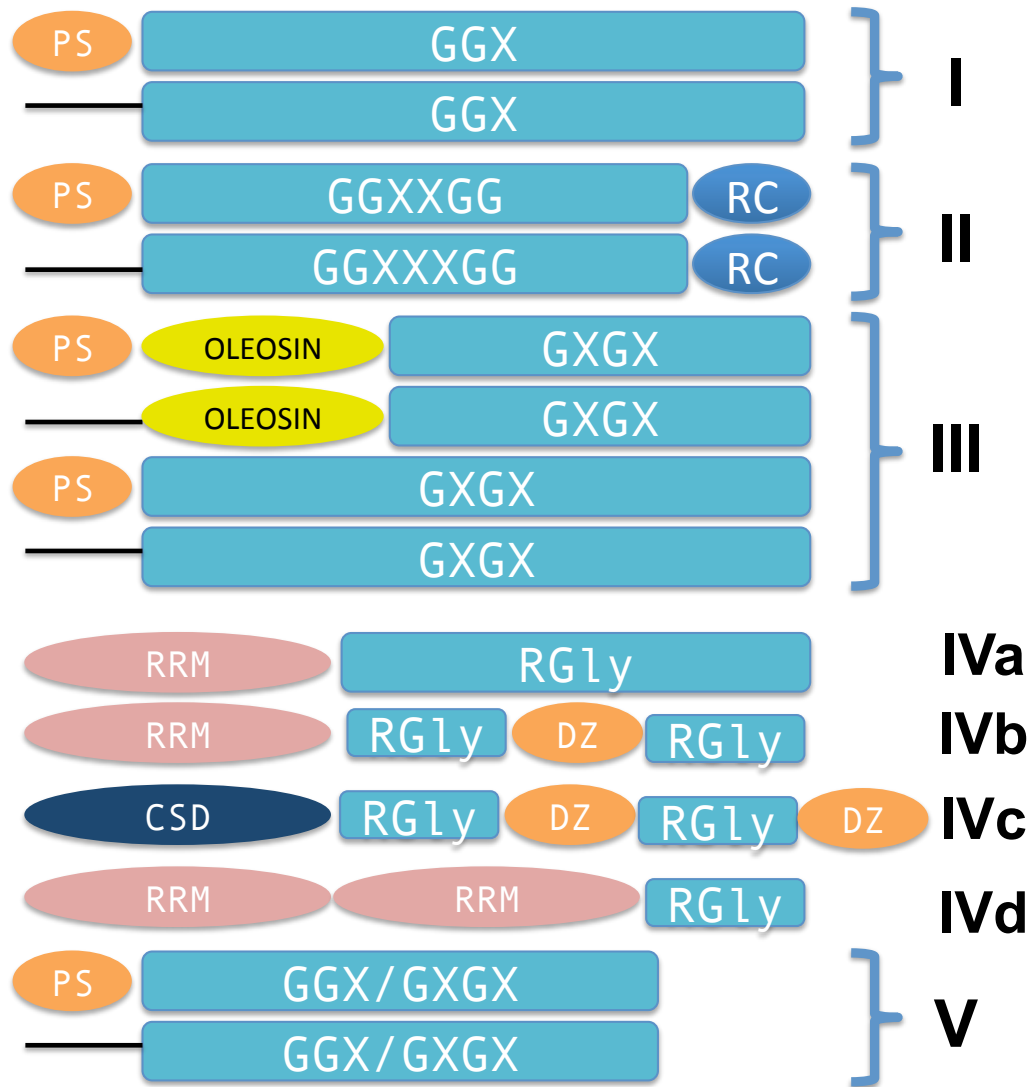


Figura 2. Representación esquemática de la clasificación de las proteínas ricas en glicina de plantas. Donde PS: péptido señal; RC: motivo rico en cisteínas; RRM: motivo de unión a RNA; DZ: motivo de dedo de zinc; CSD: dominio de choque de frío; RGly: motivo rico en glicinas. En números romanos se indican las diferentes clases. Imagen obtenida y modificada de Mangeon *et al.* 2010.

Además de las proteínas GRP canónicas descritas anteriormente, Bocca *et al.*, (2005) en un estudio del transcriptoma de Eucalipto reportó la presencia de transcritos con un dominio rico en glicinas (GRDPs) que codifican a proteínas con una región corta de glicinas. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se reportó el gen *AtGRDP1*, el cual codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas corto, que desempeña un papel regulador en la señalización de la fitohormona ABA y en la tolerancia al estrés abiótico (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014).

Hasta ahora son pocas las proteínas GRPs de plantas que se han caracterizado, a pesar de que estas proteínas parecen desempeñar papeles importantes en la regulación de la transcripción, transducción de señales, la interacción proteína-proteína, el desarrollo vegetal y la respuesta al estrés (Bocca *et al.*, 2005). Distintas GRPs de la clase IV, en particular las de unión a RNA (RRM-GRPs) son moduladas bajo condiciones de estrés abiótico, además que se ha reportado su participación en etapas cruciales de la floración y el desarrollo (Mangeon *et al.*, 2010).

### **1.3.2 RRM-GRPs: proteínas de unión a RNA con un dominio rico en glicinas**

Las moléculas de RNA son sintetizadas en forma de cadena sencilla, pero para llevar a cabo las diversas funciones algunas de estas moléculas tienen que adoptar una estructura tridimensional. El plegamiento del RNA, inicia con la formación de una estructura secundaria de doble hélice a través de uniones de bases del tipo WC (Watson-Crick). Estos elementos de estructura secundaria cortos después se organizan en el espacio para formar las diversas estructuras terciarias (Brion y Westhof, 1997). Estos cambios conformacionales, así como el transporte le dan a las moléculas de RNA la posibilidad de lograr y regular rápidamente las funciones que lleva a cabo en la célula. Existen evidencias genéticas que respaldan la participación de proteínas en el plegamiento correcto y

transporte del RNA (Semrad y Schroeder, 1998). Actualmente este número de proteínas con actividad de chaperonas de RNA va en aumento, así como el número de ensayos y sistemas para detectar su actividad (Rajkowitsch *et al.*, 2005). Las proteínas de unión a RNA (RBPs), al unirse rápidamente después de la transcripción hasta el proceso de traducción logran proteger, organizar y preparar al mRNA para las modificaciones post-transcripcionales. Es decir, participan en el splicing del pre-mRNA, transporte del núcleo al citoplasma, estabilidad, traducción, entre otros (Dreyfuss *et al.*, 1993; Simpson y Filipowicz, 1996).

Las RBPs de plantas poseen motivos de unión, como el motivo de unión a RNA (RRM) y un dominio rico en glicinas, así como dominios auxiliares característicos como una caja DEAD/DEAH, un dominio de choque de frío, repetidos PUF, un motivo de dedo de zinc, un dominio homólogo K, y motivo rico en serina/arginina, como se muestra en la Figura 3 (Burd y Dreyfuss, 1994; Lorkovic y Barta, 2002; Ambrosone *et al.*, 2012). Estos dominios auxiliares están involucrados en la interacción proteína-proteína, marcaje de proteínas y unión a ácidos nucleicos.

Gómez-Porras *et al.*, 2011, proponen la presencia de 227 genes que codifican para proteínas que contienen uno o más motivos RRM canónicos en *Arabidopsis thaliana*, mientras que para arroz (*Oriza sativa*) han identificado alrededor de 250 genes (Ambrosone *et al.*, 2012).

Además, de la participación en el metabolismo y transporte del RNA, las RBPs son clave para la señalización hormonal e inmunidad en respuesta al estrés biótico (Woloshen *et al.*, 2011), así como para la adaptación y respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés abiótico (Ambrosone *et al.*, 2012; Ciuzan *et al.*, 2015). Como se mencionó anteriormente, dentro de la clase IV de las proteínas GRPs se encuentran proteínas que contienen uno o varios dominios RRM hacia el N-terminal (Lorkovic y Barta, 2002).

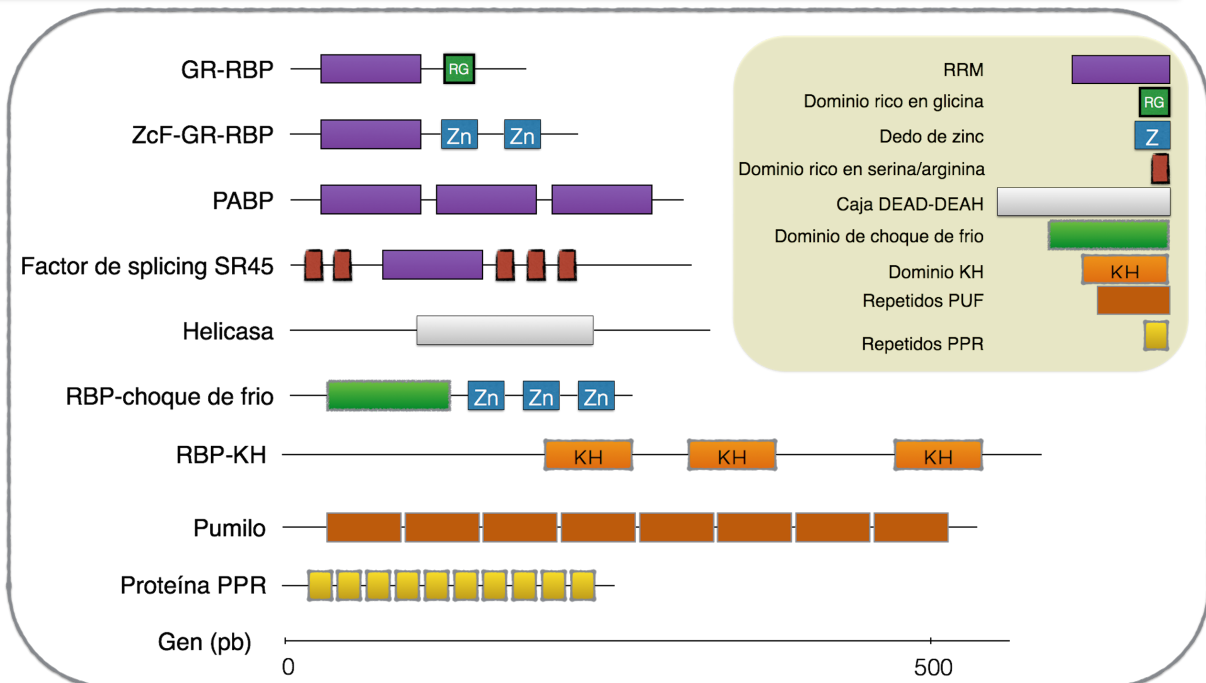


Figura 3. Diagrama esquemático de las clases de las proteínas de unión a RNA de *Arabidopsis thaliana*. Imagen modificada y tomada de Musidlak *et al.*, 2014.

En este sentido, la actividad de unión a RNA se ha demostrado bioquímicamente, como por ejemplo la proteína GR-RBP4/GRP4/AtRGB4 es capaz de unirse a RNA, ssDNA y dsDNA (Kwak *et al.*, 2005). También, mediante otros ensayos como espectroscopia de correlación de fluorescencia, se encontró que AtRBG7 se une tanto a DNA de cadena sencilla (ssDNA) como a RNA y que se requiere como mínimo la secuencia 5'-UUCUGG-3' para el reconocimiento (Schüttpelz *et al.*, 2008).

Además, para las proteínas de *Arabidopsis* GR-RBP2/GRP2, GRP7 y AtRZL1a se demostró la actividad de chaperona mediante ensayos de complementación bajo estrés por frío en la mutante de *Escherichia coli* BX04. Asimismo, la actividad de anti-terminación fue analizada utilizando la cepa de *E. coli* RL211, donde la resistencia a cloranfenicol indica que las GRPs son capaces de unirse a la estructura secundaria del RNA que contiene el terminador *trpL* seguido del gen de resistencia a cloranfenicol. Confirmando la actividad de chaperonas de RNA bajo condiciones de estrés por frío (Kim *et al.*, 2006, Kim *et*

*al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Así se ha demostrado la participación de proteínas GRPs, tanto en la unión con ácidos nucleicos así como su relación con la tolerancia al estrés abiótico al ser sobreexpresadas en plantas como *Arabidopsis* y arroz (Kwak *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014).

Interesantemente, para las proteínas AtGRP7 y AtGRP8 se ha descrito un mecanismo de autorregulación post-transcripcional, mediado por un splicing alternativo (Schöning *et al.*, 2008). Cuando los niveles de la proteína AtGRP7 aumentan, estas se unen a su propio pre-mRNA, induciendo la generación de una variante de splicing, la cual retiene la mitad de su único intrón. Esta versión de splicing al contener un codón de termino prematuro en la región del intrón retenida es degradada vía la ruta de la degradación de mRNA mediada por mutaciones terminadoras (del inglés “nonsense-mediated decay” o NMD) (Schmal *et al.*, 2013). Este mecanismo, al detectar mutaciones que generen codones de terminación prematuros evita la producción de proteínas no funcionales o truncas. En plantas, la vía inicia con el reconocimiento de un complejo EJC (similar al identificado en animales) que se une al mRNA durante el splicing, y este no debería estar presente al iniciar la traducción (Nyikó' *et al.*, 2013) desencadenando así la degradación del mRNA.

### **1.3.3 GRPs involucradas en el desarrollo de las plantas**

Las primeras GRPs fueron caracterizadas por su patrón de expresión en los diferentes estadios de la planta, así como por su localización celular (Condit *et al.*, 1987; Keller *et al.*, 1988).

En particular, los niveles de expresión del gen *PtGRP1* de petunia se asociaron con el crecimiento de elongación celular, pero en los tallos y las hojas, los niveles de expresión disminuyeron conforme avanza la etapa de desarrollo del tejido. En cuanto a localización, la proteína PtGRP1 fue ubicada en la interfase de la pared celular y la membrana, asociándola con funciones de plasticidad (Condit, 1993).

El gen de frijol *PvGRP1.8* se ha propuesto que actúa como un agente aglutinante para la deposición de constituyentes de la pared celular (Keller *et al.*, 1988) y se ha asociado con el crecimiento del protoxilema (Ryser *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis* la sobreexpresión de *AtGRP5*, un gen que codifica para una proteína rica en glicina localizada en vacuolas, demostró que las plantas presentan raíces más largas, en específico mayor elongación en el eje de la inflorescencia; los autores sugirieron que este gen desempeña un papel importante en el crecimiento de órganos mediante la promoción de procesos de elongación celular (Mangeon *et al.* 2009).

Por otro lado Mayfield y Preuss (2000), demostraron que GRP17, proteína rica en glicinas con un motivo de oleosina, es un componente de la capa de polen necesario para la iniciación rápida de la polinización en *Arabidopsis*. Otra proteína con un motivo de oleosina, AtOGB3 es requerida para la hidratación del polen (Mayfield y Preuss, 2000). Además, la proteína de unión a RNA, AtGRP7 ha sido implicada en la promoción de la transición floral en *Arabidopsis* a través de la vía autónoma (Streitner *et al.* 2008). Asimismo, las proteínas AtGRP7 y AtGRP8 participan en la regulación del ciclo circadiano en *Arabidopsis* (Schöning *et al.*, 2008).

Finalmente, se sugiere que la presencia del dominio rico en glicinas puede ser el responsable de que estas proteínas participen en un complejo multiproteico, así como el modular la plasticidad y adquirir diferentes tipos conformacionales, esto con el fin de llevar a cabo funciones tanto a nivel postranscripcional y traduccional (Sachetto-Martins *et al.*, 2000; Mangeon *et al.*, 2010).

#### **1.4 Proteínas de unión a RNA con un motivo rico en glicinas (GR-RBPs) involucradas en la formación de gránulos de RNA**

La regulación de la expresión génica es un punto de control clave para la respuesta de las plantas a condiciones ambientales adversas, mientras que el



proceso de la traducción se ve afectado severamente durante condiciones de estrés. En este sentido, en el citoplasma de células eucariontes se han identificado complejos que se encargan de proteger a los mRNAs, formados principalmente por proteínas de unión a RNA. Estos complejos son comúnmente llamados gránulos de estrés (SG), que recientemente se les ha dado un papel importante en la regulación post-transcripcional y su modulación bajo estrés (Anderson y Kedersha, 2006). Los cuerpos de procesamiento (PBs), también formados principalmente por proteínas de unión a RNA, se les ha dado un papel en la degradación y arresto de la traducción durante el desarrollo y la adaptación al estrés (Maldonado-Bonilla, 2014).

En modelos eucariontes de animales y de levadura, se ha descrito la composición molecular de los gránulos de estrés (SG), así además del poli(A)<sup>+</sup> mRNA, están presentes varias subunidades ribosomales 40S, proteínas de unión a poli(A) y factores de iniciación (eIFs). También, coexisten con moléculas que responden a estímulos de estrés como proteínas de unión de RNA, helicasas de RNA, y los reguladores de la traducción y degradación del mRNA (Anderson y Kedersha, 2008). Lo anterior sugiere que estas estructuras se encargan de proteger al mRNA en situaciones de estrés celular.

Para los PBs, se ha descrito que están compuestos por proteínas de degradación 5' a 3' del mRNA, proteínas 4E de unión al cap, subunidades del procesamiento del cap, mRNA y proteínas de unión a RNA. Las funciones llevadas a cabo por los PBs son la represión de la traducción y degradación del mRNA, mediante vías como: corte de cap (decapping) del mRNA, degradación mediada sin sentido (NMD) y degradación mediada por el sRNA (small RNA-mediated decay) (Xu and Chua, 2011).

Particularmente, en plantas los PBs contienen la proteína Varicosa (VCS) que es homóloga a la proteína Hedls encontrada en los cuerpos de procesamiento de humano, además las proteínas de Arabidopsis Decapping 1 y Decapping 2 (DCP1 y DCP2), que presentan alta homología con las identificadas en levadura, son utilizadas comúnmente como marcadores de PBs en plantas (Xu and Chua, 2011). En condiciones de estrés por calor, el factor de iniciación de la traducción E

(eIF4E) y Rbp47b un componente de la maquinaria de splicing se encontraron en los SG de Arabidopsis (Lorkovic *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2008). Finalmente, varios autores han demostrado con mutantes simples en los genes que codifican para *DCP1*, *DCP2*, *DCP5* y *VCS*, que estos son indispensables para el desarrollo post-embrionario en Arabidopsis, esto debido a que son elementos esenciales en el complejo de corte del cap del mRNA, responsable de la autorregulación característica de estos genes (Xu and Chua, 2011).

## 1.5 Auxinas

En los últimos años, se ha documentado que algunas hormonas vegetales como las auxinas que regulan muchos aspectos de crecimiento de las plantas, también modulan la expresión de genes que codifican para proteínas ricas en glicina (GRPs) (Reddy y Poovaiah, 1987; Úrbez *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2013).

Desde 1980, Darwin sospechaba la presencia de un compuesto químico en el coleóptilo de alpiste (*Phalaris canariensis*) que modulaba el crecimiento, pero hasta 1926 Frits Went dilucidó que la sustancia responsable era un compuesto del tipo auxina. De ahí que el nombre de auxinas del griego “*auxein*” significa aumentar o crecer. Estas moléculas de señalización se producen en concentraciones muy bajas pero aun así tienen un efecto clave en el desarrollo de las plantas. Por otra parte, tanto las auxinas y como las citocininas difieren de las otras hormonas vegetales ya que son indispensables para la viabilidad celular (Taiz y Zeiger, 2002).

La auxina identificada principalmente en las plantas es el ácido indol acético (IAA), siendo la más abundante y relevante a nivel fisiológico. Los diversos procesos de desarrollo controlados por las auxinas, son el alargamiento del tallo, la dominancia apical, la iniciación del crecimiento de las raíces, el desarrollo del fruto y el tropismo. La biosíntesis de IAA es a partir del aminoácido triptófano y se asocia con tejidos que se dividen y crecen rápidamente, especialmente en el meristemo radicular (RAM) y el meristemo apical (SAM) (Taiz y Zeiger, 2002).

Para las plantas, se han reportado dos vías principales de biosíntesis de IAA, una es la dependiente de triptófano y la otra es la independiente de triptófano. En la biosíntesis independiente de triptófano, el precursor es un indol-3-glicerol fosfato o una molécula de indol, pero bioquímicamente se sabe poco de esta vía (Mano y Nemoto, 2012).

Particularmente, en *Arabidopsis* la síntesis de IAA es mediada por la enzima triptófano aminotransferasa (TAA), la cual se encarga de remover un grupo amino del triptófano y así generar el indol-3-piruvato. Después la enzima YUCCA-flavin monooxigenasa (YUC) cataliza una descarboxilación oxidativa del indol-3-piruvato para producir IAA (Mashiguchi *et al.*, 2011, Zhao, 2014).

El IAA puede estar en forma libre y en forma conjugada. El IAA libre es la forma activa de la auxina, y las auxinas conjugadas se consideran formas de almacenamiento o productos intermediarios destinados a la degradación (Korasick *et al.*, 2013).

En las plantas superiores se han identificado tres formas principales de conjugados de auxinas, como: (i) conjugados de ésteres de bajo peso molecular que pueden contener carbohidratos en su estructura, (ii) conjugados de amidas de bajo peso molecular con aminoácidos, y (iii) conjugados de alto peso molecular con péptidos y proteínas unidos mediante un enlace amida (Korasick *et al.*, 2013).

Generalmente, las formas conjugadas de auxinas son consideradas inactivas, y la liberación de IAA se lleva a cabo mediante una reacción de hidrólisis para generar la auxina activa (Bajguz y Piotrowska, 2009; Ludwig-Müller, 2011). La composición de los conjugados de IAA es variable entre las diferentes especies de plantas, por ejemplo en maíz predominan los conjugados con azúcares ligados a ésteres, mientras que para *Arabidopsis* y otras plantas dicotiledóneas almacenan los conjugados con aminoácidos (Bajguz y Piotrowska, 2009). La conjugación de IAA con aspartato y glutamato se considera una etiqueta para la degradación vía proteosoma 26S, en respuesta a altas concentraciones de auxinas en la planta (Wolters y Jürgens, 2009). Se ha propuesto que la conjugación de auxinas pueden servir como almacenamiento, transporte, compartimentación, impedir alcanzar

niveles tóxicos de IAA libre y protección contra la degradación (Korasick *et al.*, 2013).

### 1.5.1 Transporte y señalización de auxinas

Debido a que la biosíntesis de IAA es de manera localizada, desde los años 70's se propuso una hipótesis quimiosmótica para el transporte de auxinas (Raven, 1975). El transporte polar de auxinas de célula a célula, es mediado por un gradiente de pH. En la pared celular (apoplasto) existe un pH ácido de 5.5 que provoca que las moléculas de IAA se encuentren de forma ionizada ( $\text{IAA}^-$ ) y protonada (IAA-H). Las moléculas de IAA-H entran a la célula a través de la membrana plasmática mediante un transporte pasivo hacia el citoplasma, el pH de 7 hace que la molécula protonada de IAA se disocie impidiendo así la salida del ion  $\text{IAA}^-$  mediante difusión simple. Para este caso, se necesitan canales de flujo como los PINs y algunos MDR/PGPS (del inglés multi-drug-resistant/P-glycoprotein) los cuales se encargan de expulsar el IAA de la célula. Los transportadores AUX1 (auxin-responsive) son los encargados de internalizar las moléculas de IAA- del apoplasto al interior de la célula (Vieten *et al.*, 2007).

A su vez, en condiciones de bajas concentraciones celulares de IAA, esta proteína AUX1 esta unida a los factores de respuesta a auxinas (ARFs), donde este complejo (AUX1-ARF) regula negativamente a los genes de respuesta a auxinas. Mientras que cuando entran moléculas de IAA a la célula se unen a AUX1, estas son percibidas por la familia de receptores TIR y ABF, las cuales generan una poliubiquitinación, haciendo del complejo un blanco de degradación vía proteosoma 26, evitando así la unión con los ARFs, liberándolos hacia al núcleo, y de esta manera se activara la respuesta de genes a auxinas (Lau *et al.*, 2008).

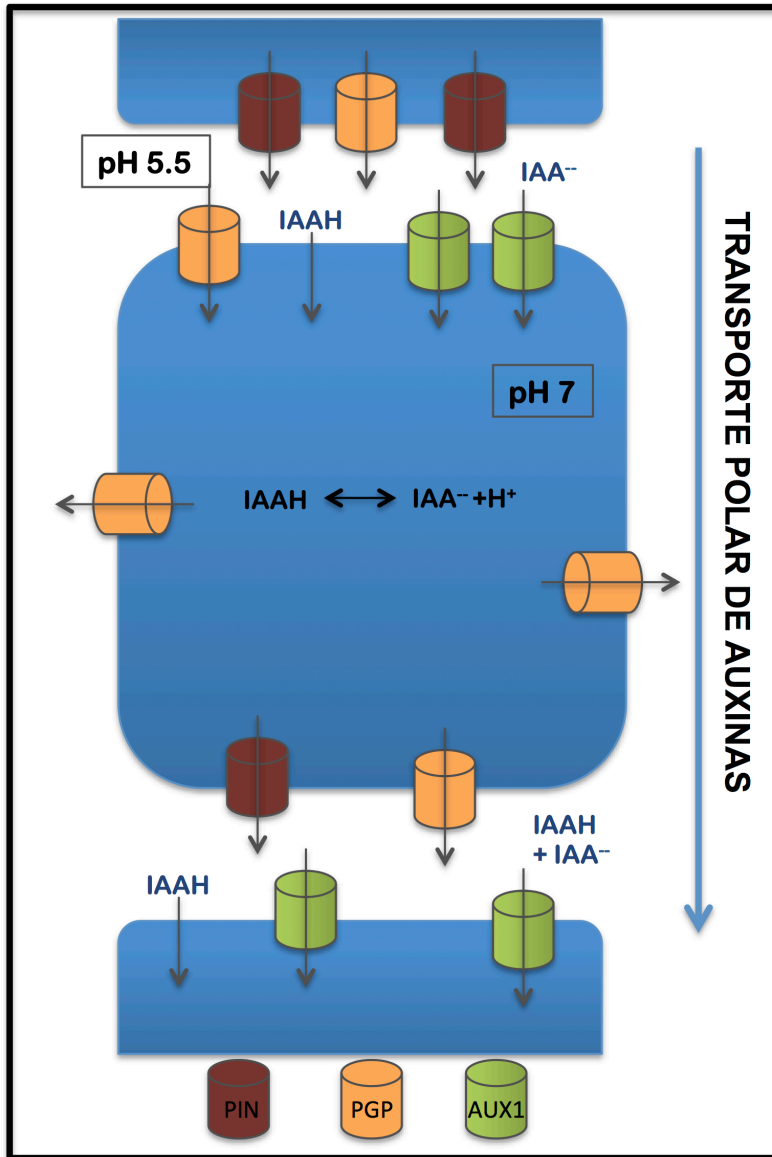


Figura 4. Transporte polar de auxinas.  
Imagen tomada y modificada de Vieten et al., 2007

## 1.6 Genes de función desconocida en plantas

Solo un bajo porcentaje de genes en diversos genomas de plantas y animales han sido completamente caracterizados con respecto a sus funciones celulares. En plantas se estima que cerca del 50% de los productos génicos codifican para proteínas de función desconocida (Hanson *et al.*, 2011). En *Arabidopsis*, se calcula que cerca del 30% de sus proteínas son de función desconocida, ya sea al poseer dominios DUF (del inglés domain of unknown function) o pertenecer a la familia UPF (del inglés, uncharacterized protein family) (Punta *et al.*, 2012).

Debido a que las variedades de plantas de interés comercial son sensibles a estrés, surge la necesidad de aislar y caracterizar genes que aún no se conoce su función, pero que estén involucrados en los mecanismos de respuesta al estrés. La generación de plantas modificadas genéticamente donde se sobreexpresan genes involucrados en respuesta a estrés abiótico ha dado como resultado fenotipos de tolerancia al estrés. Por ejemplo, plantas que sobreexpresan proteínas serina/arginina (estas son RNA binding proteins?) que están involucradas en el proceso de splicing alternativo, son capaces de conferir una alta tolerancia a cloruro sodio y litio (Forment *et al.*, 2002).

En este sentido, el caracterizar genes de función desconocida que están involucrados en la respuesta a estrés abiótico, además de dar información sobre el mecanismo de acción puede ser clave para la generación de plantas tolerantes a las condiciones ambientales desfavorables que sufre el planeta.

## II. ANTECEDENTE DIRECTO

Las bibliotecas sustractivas han sido utilizadas ampliamente para la identificación de genes expresados de manera diferencial en condiciones específicas (Diatchenko *et al.*, 1996). En distintas especies de plantas, los marcadores de secuencia expresada o EST (del inglés expressed sequence tag) obtenidos de dicha técnica han servido para identificar genes de función desconocida, que podrían estar implicados en la tolerancia al estrés ambiental. En el trabajo de Hernández-Lucero *et al.*, 2013, se generó una biblioteca sustractiva de cDNA utilizando la variedad de frijol Pinto Villa. Esta variedad de frijol fue caracterizada previamente como tolerante a estrés hídrico y salino (Rosales-Serna *et al.*, 2004, Jiménez-Bremont *et al.*, 2006, Hernández-Lucero *et al.*, 2008). Se encontraron 67 unigenes potencialmente inducidos en las hojas de frijol a los 2 y 5 días del tratamiento con 200 mM de NaCl. Se analizó la acumulación del transcrito mediante qRT-PCR de seis genes relacionados con el estrés. Interesantemente, se encontraron cambios en los niveles de expresión del gen *PvGRDP1*. En hojas a los 2 y 5 días de tratamiento salino hubo una inducción, en comparación con el control sin estrés. De acuerdo a la base de datos del NCBI en el genoma de la planta *Arabidopsis thaliana*, nosotros identificamos dos posibles ortólogos de *PvGRDP1* en *Arabidopsis*, *AtGRDP1* y *AtGRDP2*.

En el presente trabajo de tesis se seleccionó el ortólogo *AtGRDP2*, una proteína rica en glicinas de función desconocida, para su caracterización molecular y funcional.

### III. OBJETIVO

Caracterizar molecular y funcionalmente el gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana*, y determinar su papel en el desarrollo y en el estrés.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análisis *in silico* de los dominios presentes en la proteína AtGRDP2.
- Caracterización molecular de la línea de T-DNA (SAIL387\_D04) para la obtención de la línea mutante insercional homocigota *Atgrdp2-1* en *Arabidopsis*.
- Generación de líneas silenciadas de *Arabidopsis* del gen *AtGRDP2* mediante la expresión de un microRNA artificial (*amiR*).
- Generación de líneas sobreexpresantes del gen *AtGRDP2* (*35S::AtGRDP2*) en plantas de *Arabidopsis thaliana* y lechuga (*Lactuca sativa* var Green Wave).
- Generación y caracterización de la línea reportera para el promotor del gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis*, mediante la fusión del promotor AtGRDP2 con los genes reporteros GUS y GFP.
- Caracterización fenotípica en las diferentes etapas del desarrollo en los fondos mutantes y sobreexpresantes del gen *AtGRDP2*, tanto en plantas de *Arabidopsis* como de lechuga.
- Caracterización de las líneas mutantes y sobreexpresantes del gen *AtGRDP2* en *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés salino, así como de las líneas sobreexpresantes en plantas de lechuga.
- Cuantificación de los niveles de ácido indol acético en las líneas de *Arabidopsis* mutantes y sobreexpresantes del gen *AtGRDP2*.
- Análisis transcripcional mediante qRT-PCR de genes relacionados con estrés abiótico y con la respuesta a auxinas, en el fondo mutante *Atgrdp2-1* y sobreexpresante del gen *AtGRDP2* en plántulas de *Arabidopsis*.



## IV. CAPITULO I

### **La sobreexpresión de *AtGRDP2*, una nueva proteína con un dominio rico en glicinas, acelera el crecimiento de la planta y mejora la tolerancia al estrés**

María A. Ortega-Amaro, Aída A. Rodríguez-Hernández, Margarita Rodríguez-Kessler, Eloísa Hernández-Lucero, Sergio Rosales-Mendoza, Alejandro Ibáñez-Salazar, Pablo Delgado-Sánchez and Juan F. Jiménez-Bremont

Frontiers in Plant Science\* | Plant Physiology

January 2015 | Volume 5 | Article 782 |

\* Revista con acceso libre para la consulta de los artículos científicos



# Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance

María A. Ortega-Amaro<sup>1</sup>, Aída A. Rodríguez-Hernández<sup>1</sup>, Margarita Rodríguez-Kessler<sup>2</sup>, Eloísa Hernández-Lucero<sup>1</sup>, Sergio Rosales-Mendoza<sup>3</sup>, Alejandro Ibáñez-Salazar<sup>3</sup>, Pablo Delgado-Sánchez<sup>4</sup> and Juan F. Jiménez-Bremont<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, San Luis Potosí, México

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

<sup>4</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

## Edited by:

Andrea Pitzschke, University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Austria

## Reviewed by:

Guillaume Pilot, Virginia Tech, USA  
Elke Barbez, University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Austria

## \*Correspondence:

Juan F. Jiménez-Bremont, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, Camino a la Presa de San José 2055, C.P. 78216, AP 3-74 Tangamanga, San Luis Potosí, México  
e-mail: jbremon@ipicyt.edu.mx

Proteins with glycine-rich signatures have been reported in a wide variety of organisms including plants, mammals, fungi, and bacteria. Plant glycine-rich protein genes exhibit developmental and tissue-specific expression patterns. Herein, we present the characterization of the *AtGRDP2* gene using Arabidopsis null and knockdown mutants and, Arabidopsis and lettuce over-expression lines. *AtGRDP2* encodes a short glycine-rich domain protein, containing a DUF1399 domain and a putative RNA recognition motif (RRM). *AtGRDP2* transcript is mainly expressed in Arabidopsis floral organs, and its deregulation in Arabidopsis *Atgrdp2* mutants and *35S::AtGRDP2* over-expression lines produces alterations in development. The *35S::AtGRDP2* over-expression lines grow faster than the WT, while the *Atgrdp2* mutants have a delay in growth and development. The over-expression lines accumulate higher levels of indole-3-acetic acid and, have alterations in the expression pattern of *ARF6*, *ARF8*, and *miR167* regulators of floral development and auxin signaling. Under salt stress conditions, *35S::AtGRDP2* over-expression lines displayed higher tolerance and increased expression of stress marker genes. Likewise, transgenic lettuce plants over-expressing the *AtGRDP2* gene manifest increased growth rate and early flowering time. Our data reveal an important role for *AtGRDP2* in Arabidopsis development and stress response, and suggest a connection between *AtGRDP2* and auxin signaling.

**Keywords:** glycine-rich domain protein, *Arabidopsis thaliana*, *Lactuca sativa*, development, indole-3-acetic acid, salt stress

## INTRODUCTION

Glycine-rich proteins (GRPs) are characterized by a high content of glycine (40–70%) and repetitive sequence of residues arranged in (Gly)<sub>n</sub>-X motifs (Sachetto-Martins et al., 2000; Mousavi and Hotta, 2005). Proteins with particular glycine-rich regions have been reported in a wide variety of organisms including plants (Sachetto-Martins et al., 2000). Plant GRP genes exhibit developmentally regulated and tissue-specific expression patterns; these patterns are also regulated by abiotic and biotic factors (Sachetto-Martins et al., 2000).

The plant GRP family is classified according to its general structure. Currently, five groups have been suggested, according to the arrangement of the repeated glycine signatures as well as the presence of conserved motifs and domains (Sachetto-Martins et al., 2000; Mangeon et al., 2010). The first three classes and the fifth are based on the arrangement of the glycine-rich domain, i.e., (I) GGX, (II) GGXXXGG, (III) GXGX, and (V) GGX/GXGX, respectively; they also contain a signal peptide, oleosin, or cysteine-rich domain. The group IV is based

on the presence of additional motifs and domains such as RNA recognition motif (RRM), cold shock and zinc finger domains, and a cysteine-rich domain, among others (Bocca et al., 2005; Mangeon et al., 2010). Until now, few plant GRPs have been characterized; these proteins appear to play important roles in transcriptional regulation, signal transduction, protein-protein interaction, development, and stress responses (Bocca et al., 2005).

GRPs are involved in developmental processes in plants. The bean PvGRP1.8 has been proposed to act as an agglutinating agent for deposition of cell wall constituents (Keller et al., 1988) and it has been associated with protoxylem growth (Ryser et al., 1997). In stems and leaves of Petunia plants, the levels of *PtGRP1* gene decline with the developmental age of the tissue. In particular, *PtGRP1* gene expression levels were associated to expansive growth, and the *PtGRP1* protein was localized in the cell wall/membrane interphase (Condit, 1993). In the past years, it has been documented that some plant hormones that regulate many aspects of plant growth, development and stress responses

modulate the expression of GRP genes (Reddy and Poovaiah, 1987; Urbez et al., 2006; Long et al., 2013).

In addition to the canonical GRPs, Bocca et al. (2005) reported the presence of glycine-rich domain proteins (GRDPs) transcripts in *Eucalyptus*, which encode proteins with a short glycine-rich domain. Recently, we reported the *AtGRDP1* gene, encoding a short glycine-rich domain protein, which plays a regulatory role in ABA signaling and abiotic stress tolerance (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

To deepen our understanding in GRDPs, herein we present the characterization of *AtGRDP2* gene, paralog of *AtGRDP1*. Arabidopsis plants that overexpress the *AtGRDP2* gene were obtained. These plants grow faster and flower earlier than the WT, while *Atgrdp2* knockout and knockdown mutants have a delay in growth and development. The over-expression of *AtGRDP2* in lettuce plants also conduces to increased growth rate and early flowering time. In Arabidopsis, *AtGRDP2* gene is highly expressed in floral organs, and is auxin-responsive. We further show that *35S::AtGRDP2* overexpression lines accumulate higher levels of indole-3-acetic acid, which might explain their fast growth. We analyzed central regulators in auxin signaling such as *ARF2*, *ARF6*, *ARF8*, *AUX1*, and *miR167*, and found that these genes are differentially expressed in *Atgrdp2-1* mutant and *35S::AtGRDP2* overexpression lines. Under salt stress conditions, seedlings of *35S::AtGRDP2* lines displayed higher tolerance and increased expression of stress marker genes. Our data reveal an important role for *AtGRDP2* in Arabidopsis development and stress responses, possibly through an auxin-dependent mechanism.

## MATERIALS AND METHODS

### PLANT MATERIAL AND GROWTH CONDITIONS

The mutant and transgenic lines used in this study were generated in the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia 0 (Col-0) background. Arabidopsis seeds of each line were surface-sterilized for 10 min with 40% (v/v) chlorine solution and rinsed six times in sterile distilled water. Aseptic stratified seeds (2 days at 4°C), were germinated and grown on agar plates containing 0.5x Murashige and Skoog (MS) medium, pH 5.7, 0.5% (w/v) sucrose, and 1.2% (w/v) agar (Murashige and Skoog, 1962). Plates were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 16 h (13,000 luxes) / 8 h, light/dark cycle at a temperature of 22 ± 2°C. Plants were grown in plastic pots with a mixture of Sunshine Mix#3 commercial substrate and vermiculite (3:1), under environmental controlled conditions.

Seeds of *Lactuca sativa* L. (WT) and seeds of *35S::AtGRDP2* transgenic lettuce plants were sterilized with 20% (v/v) chlorine solution for 10 min, and rinsed five times in sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated in Petri dishes containing 0.5x MS medium. Plates were kept at 4°C for 2 days and then incubated at 22 ± 2°C for 7 days in a growth chamber under a 16 h light/8 h dark photoperiod. Afterwards, plants were transferred to soil pots in a growth chamber at 25 ± 2°C with a 16 h light/8 h dark photoperiod.

### IDENTIFICATION OF THE T-DNA INSERTIONAL MUTANT LINE (*Atgrdp2-1*)

The T-DNA mutant line Sail\_387\_D04 for the *AtGRDP2* gene (At4g37900) was acquired from the Salk Institute Genome

Analysis Laboratory ([www.signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress](http://www.signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress); Alonso et al., 2003). Absence of *AtGRDP2* expression in T-DNA mutant line was confirmed by semi-quantitative RT-PCR using the Sail387D04-F and Sail387D04-R primers (Table S1). cDNA synthesis was carried out using 1 µg of total RNA and the SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen). The *Actin 8* gene (At1g49240) was amplified as loading control using the ACT8-F and ACT8-R primers (Table S1).

### VECTORS FOR *AtGRDP2* OVEREXPRESSION AND GENE SILENCING

*AtGRDP2* ORF was amplified from cDNA of 15 day-old Arabidopsis plants with Hot Star HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using the primers: AtGRDP2-ORF-F and AtGRDP2-ORF-R primers (Table S1). The product of 2377 bp was cloned into the pCR8/GW/TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and was sequenced using the M13-F and AtGRDP2-ORF-R primers. The entry clone was recombined into the destination vector pMDC32 using the Gateway LR Clonase Enzyme mix (Invitrogen) to generate *pMDC32-GRDP2* vector.

To silence the *AtGRDP2* gene, an artificial miRNA *pAmiR-AtGRDP2* vector from Thermo Fisher Scientific Inc. was acquired (Waltham, MA, USA). This vector contains 27 bp of the *AtGRDP2* gene between the *miR319a* harpin sequence embedded in their genomic context, 35S CaMV promoter, and the BASTA resistance (Schwab et al., 2006).

### TRANSFORMATION OF ARABIDOPSIS AND LETTUCE

The vectors *pMDC32-GRDP2* and *pAmiR-AtGRDP2* were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 strain by electroporation, and transformed into *A. thaliana* Col-0 plants by the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Afterwards, seeds were harvested for selection under a specific plant selection marker. Hygromycin was used at 50 µg/mL for *pMDC32-GRDP2* selection. Ten independent *35S::AtGRDP2* lines were obtained, and four T3 homozygous lines were used for further analysis. For *pAmiR-AtGRDP2* selection, 1-week-old germinated seedlings were sprayed using a 0.25 g/L BASTA (Finale®, Bayer Cropscience, Monheim, Germany). Five independent *amiR-AtGRDP2* T3 homozygous lines were obtained.

Lettuce plants carrying the *AtGRDP2* gene were generated by *Agrobacterium*-mediated transformation, following Curtis et al. (1994) method with some modifications (Martinez-Gonzalez et al., 2011). Nine lettuce transgenic lines were obtained in F1 generation, and the presence of the transgene was confirmed by PCR. T3 homozygous seedlings of three transgenic plants were used for further analysis.

### QUANTITATIVE RT-PCR (qRT-PCR) OF *AtGRDP2* GENE IN ARABIDOPSIS Col-0 PLANTS

Total RNA was obtained from different tissues of 18, 21, 26, 28, and 45 days old *A. thaliana* Col-0 plants. *AtGRDP2* expression levels were estimated by qRT-PCR as described below using the following primers: AtGRDP2-F and AtGRDP2-R (Table S1). For each tissue, three biological replicates were analyzed with their respective technical replicates. Each biological replicate consisted in groups of 10 seedlings.

### EXPRESSION ANALYSIS OF MUTANT AND OVEREXPRESSION LINES BY qRT-PCR

Arabidopsis RNA extractions were done with 100–200 mg of plant material following the Concert™ Plant RNA Reagent protocol (Invitrogen). Each mRNA biological replicate consisted in groups of 10 plants per line. Contamination of genomic DNA was eliminated by treatment with DNase I (Invitrogen). *AtGRDP2* expression levels in Arabidopsis *amiR* and *35S::AtGRDP2* overexpression lines was estimated from 15 days old plants, using the primers: AtGRDP2-F and AtGRDP2-R (Table S1). cDNA synthesis and quantitative PCR analyses were done in a 10  $\mu$ L reaction mixture containing 50 ng of total RNA as template using the Power SYBR® Green RNA-to-CT™ One-Step Kit (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions consisted of 30 min at 48°C (cDNA synthesis), 10 min at 95°C (activation of AmpliTaq Gold® DNA polymerase), followed by 40 PCR cycles of 15 s at 95°C (denature) and 1 min at 60°C (anneal/extend). Melting curves were performed by cycles of 15 s at 95°C (denature), 15 at 60°C (anneal) and 15 s at 95°C (denature), increasing the temperature each 0.3°C. The cycle number at threshold (Ct value) was used for calculations of relative mRNA expression levels. The Ct value of each target gene was normalized by subtraction of the Ct value from the Arabidopsis *ubiquitin 5* (*At3g62250*) gene. The fold change in gene expression relative to control samples (Col-0) was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). For each sample, three biological replicates were analyzed with their respective technical replicates.

Lettuce RNA extractions were done with 100–200 mg of plant material following the Concert™ Plant RNA Reagent protocol (Invitrogen). Contamination of genomic DNA was eliminated by treatment with DNase I (Invitrogen). *AtGRDP2* expression levels in transgenic lettuce were also estimated from 15 days old plants, using the AtGRDP2-F and AtGRDP2-R primers (Table S1). Relative gene expression levels of *AtGRDP2* gene in transgenic lettuce are presented as  $2^{-\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct_{AtGRDP2} - Ct_{LsUBQ5}$ . For the amplification of the lettuce *LsUBQ5* gene, the *LsUBQ5-F* and *LsUBQ5-Rv* primers were used (Table S1). For each sample, three biological replicates were analyzed with their respective technical replicates.

### ANALYSIS OF *AtGRDP2* PROMOTER::GUS-GFP EXPRESSION

The *AtGRDP2* promoter region (2 kb upstream of the start codon) was PCR-amplified from the Arabidopsis genomic DNA. Amplification was carried out with primers ATPROM37fw and ATPROM37rv (Table S1). The fragment was cloned into pCR®8/GW/TOPO® entry vector (Invitrogen) and fused by recombination to the GUS-GFP reporter genes in the pKG-WFS7 binary vector (Karimi et al., 2002). *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 strain harboring the *AtGRDP2* promoter::GUS-GFP construction was used for Arabidopsis transformation, as described before. Five independent transgenic lines were selected on 50  $\mu$ g/mL kanamycin. T3 homozygous seedlings were used for GUS histochemical analysis as described below.

### HISTOCHEMICAL ANALYSIS IN ARABIDOPSIS *pAtGRDP2::GUS-GFP* REPORTER LINES

Expression patterns of the 45 day-old Arabidopsis *pAtGRDP2::GUS-GFP* reporter lines were analyzed. For GUS

staining, two independent lines (*pAtGRDP2::GUS-GFP-1* and *pAtGRDP2::GUS-GFP-2*) were used, following the protocol described previously (Ortega-Amaro et al., 2012). For each marker line, 10 transgenic plants were analyzed. A representative plant was chosen and photographed using MOTIC model BA-300 microscope and processed with MOTIC software (version 2.0) using a 5.0 megapixels camera. The anatomy of Arabidopsis flower was described according to Roeder and Yanofsky (2006). All experiments were repeated at least twice obtaining similar results.

### MEASUREMENT OF FLOWERING TIME

Flowering time in Arabidopsis in both short (8 h/16 h light/dark cycle) and long (16 h/8 h light/dark cycle) day conditions was estimated by recording the number of days after sowing in which the inflorescence reached 1 cm in length; in addition, at the same time the rosette leaves were counted. Flowering time in lettuce plants was recorded daily as of the appearance of the floral bud, and data were graphically represented as the percentage of plants with floral tissues.

### HISTOCHEMICAL ANALYSIS IN ARABIDOPSIS *pAtGRDP2::GFP-GUS* LINES UNDER IAA TREATMENTS

Seven day-old *pAtGRDP2::GFP-GUS-1* and *pAtGRDP2::GFP-GUS-2* seedlings grown in 0.5x MS plates were transferred to 0.5x MS liquid medium supplemented with 0, 1, and 10  $\mu$ M IAA and, incubated for 3 and 6 h in a grown chamber under controlled conditions.

For each marker line and for each treatment, 10 transgenic plants with three replicates were analyzed. After each treatment, seedlings were subjected to GUS histochemical analysis as described before. Images of *pAtGRDP2::GFP-GUS-1* and *pAtGRDP2::GFP-GUS-2* lines were recorded. A representative plant was chosen and photographed using Leica microscope at 10X magnification and recorded using the Leica Application Suite 3.0.0 software.

### IAA CONTENT ON ARABIDOPSIS BY ELISA ASSAY

For IAA estimation 30 day-old *A. thaliana* Col-0, *Atgrdp2-1*, and *amiR-1* mutants and *AtGRDP2* over-expression lines were used. The extract was obtained from 1 g of ground plant tissue, and incubated overnight in 80% methanol at 4°C. Methyl groups were added by the addition of 1.3  $\mu$ L trimethylsilyldiazomethane. Next, the samples and the IAA standard were processed by the manufacturer's protocol (Phytodetek® IAA Test Kit, Agdia, USA). Absorbance values at 405 nm were obtained using a BioTek ELx800 microplate reader, and then the concentration of IAA was calculated based on standard curve. Standard curve and IAA estimation in Arabidopsis extracts (1:20 dilution) were performed on three biological replicates with their respective technical replicates.

### EXPRESSION OF AUXIN RELATED GENES IN ARABIDOPSIS

The expression level of auxin related genes in the Col-0, *Atgrdp2-1*, and *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression lines was analyzed by qRT-PCR. The auxin related genes *ARF6* (At1g30330), *ARF8* (At5g37020), *ARF2* (At5g62000), *AUX1* (At2g38120) were measured in 21 days old plants. For the estimation of *miR167*

(At3g04765) expression levels, 1  $\mu$ g of total RNA was used for small RNA polyadenylation process and cDNA production following the NCode miRNA cDNA synthesis kit (Invitrogen) manufacture directions. qPCR was performed with SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo scientific) protocol. Quantitation was based on a cycle threshold value (Livak and Schmittgen, 2001). Specific primers for each gene are indicated in table S1. For each sample, three biological replicates were analyzed with their respective technical replicates. Each biological replicate consisted in groups of 10 seedlings. In case of ratios lower than 1, the inverse of the ratio was estimated and the sign was changed.

#### MEASUREMENT OF MAIN ROOT SIZE AND FRESH WEIGHT OF SEEDLINGS

*A. thaliana* seeds of the Col-0, the *Atgrdp2-1* and *amiR-1* mutants, and the *35S::AtGRDP2* overexpression lines were grown on 0.5x MS plates for 14 days. Estimation of main root size (cm) was determined by measuring the length of 30 plant roots of each line. Fresh weight (mg) of seedlings was obtained on an analytical scale and the values obtained represent means of three groups of 10 seedlings for line. Estimation of lettuce (WT and transgenic plants) main root size (cm), stem length (cm) and fresh weight (mg) was obtained from 9 seedlings of each line. Statistical significance among data was estimated by One-way-ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test, using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, California, USA). The experiment was repeated three times with similar results.

#### ARABIDOPSIS SALINITY STRESS ASSAY IN VITRO

Fourteen days-old Arabidopsis Col-0, *Atgrdp2-1* and overexpression lines (*35S::AtGRDP2*) grown on MS 0.5x, were transferred into 0.5x MS plates supplemented with 0 or 150 mM NaCl. After 7 days of stress, the main root size of untreated and treated plantlets was estimated measuring 30 roots of each line. The relative root length was calculated (treated with 150 mM NaCl/untreated). Fresh weight (mg) of seedlings was obtained on an analytical scale and the values obtained represent means of three groups of 10 seedlings of each line. The relative fresh weight was calculated (treated with 150 mM NaCl/untreated). After 7 days of salt stress, groups of 10 seedlings of each line were transferred to three pots with soil mixture substrate, grown under controlled conditions (22  $\pm$  2°C; 16 h light/8 h dark photoperiod) and irrigated every 3 days, to observe post-stress recovery. Plant survival rate was calculated by counting the number of plants that survived in each pot, after a period of 14 days. The experiment was repeated three times with similar results.

#### LETTUCE SALINITY STRESS ASSAY IN VITRO

Lettuce seeds of WT and transgenic plants were germinated on MS medium supplemented with 0 and 150 mM NaCl. After 21 days of treatment, data of root length and fresh weight were recorded. Estimation of lettuce (WT and transgenic plants) main root length and fresh weight was obtained from 9 seedlings of each line. The relative root length was calculated (treated with 150 mM NaCl/untreated). These stress experiments were repeated three times obtaining similar results.

#### EXPRESSION OF SALT STRESS RELATED GENES IN ARABIDOPSIS

Fourteen days old Col-0, *Atgrdp2-1* and *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression line, grown on 0.5x MS plates were used. Ten seedlings of each line in triplicate manner were transferred to 0.5x MS medium with 0, 125, and 150 mM NaCl and, incubated for 1 and 3 days in a growth chamber under controlled conditions. After, plantlets of each treatment were frozen in liquid nitrogen and total RNA extraction was performed as described before. RNA was used for expression analysis of *RD29B* (At5g52300), *EM6* (At2g40170), and *ABF4* (At3g1929) genes by qRT-PCR. Specific primers are indicated in Table S1. For each sample, three biological replicates were analyzed with their respective technical replicates. Each biological replicate consisted of groups of 10 seedlings. In case of ratios lower than 1, the inverse of the ratio was estimated and the sign was changed.

#### MEASUREMENT OF CHLOROPHYLL AND CAROTENOIDS CONTENT IN LETTUCE PLANTS

The chlorophylls *a*, *b*, total chlorophyll, and carotenoids contents were obtained from 30, 60, and 90 days old WT and transgenic lettuce plants. Three samples (leaf disc) of four plants of each line were collected. The pigments were extracted according to the procedure of Hendry and Price (1993). Samples of 50 mg fresh weight were macerated with 1 mL 80% acetone. These samples were centrifuged at 3000 g for 2 min and the absorbance of each supernatant was determined with the following wavelengths: 645 and 663 nm for chlorophylls *a* and *b*, and at 470 nm for total carotenoids, using a spectrophotometer (Thermo Scientific®, Model Spectronic Genesys 10 Bio).

#### SEQUENCE ANALYSIS

Comparisons and protein sequence alignments were carried out using the CLUSTAL W and the T-Coffee programs at the EBI database (www.ebi.ac.uk). The amino acid sequences of the AtGRDP2 (At4g37900) protein and selected plant orthologous and *A. thaliana* paralogous proteins containing the DUF1399 domain were aligned using the T-Coffee Multiple Sequence Alignment Tool of the EBI database using default values (Notredame et al., 2000). The aligned sequences were subjected to re-sampling with replacement (1000 bootstrap) using the Seqboot program and subsequently analyzed by a distance method in the PHYLIP 3.67 package (Felsenstein, 1989). The distance matrix was calculated with the Protdist program using the Henikoff/Tillier Probability Matrix from Blocks (PMB, Veerassamy et al., 2003). The resultant matrices were then transformed into multiple trees by the Neighbor Joining program and summarized by the program Consense (both programs of the PHYLIP 3.67 package) (Felsenstein, 1989). The majority rule consensus tree was edited with the MEGA version 5.0 program (Tamura et al., 2011).

## RESULTS

#### ARABIDOPSIS *AtGRDP2* GENE ENCODES A GLYCINE-RICH DOMAIN PROTEIN

The *AtGRDP2* (*Arabidopsis thaliana* glycine-rich domain protein 2) gene encodes a glycine-rich domain protein. The *AtGRDP2* (At4g37900) gene is located in chromosome 4, and its genomic



organization consists of five exons and four introns. The *AtGRDP2* cDNA is 2428 bp in length containing an open reading frame (ORF) of 2364 pb that encodes a protein of 787 aa. Protein sequence analyses revealed a domain of unknown function (DUF1399), a putative RNA binding motif (RNP), and a glycine-rich domain (GRD) in the *AtGRDP2* protein (Figure S1A). The DUF1399 domain is located in the N-terminus and consists of 142 aa. The putative RNA binding motif (KGSCFLPM) is placed in the central region of the protein, and it is equivalent to RNP-1 (ribonucleoprotein-1) present in proteins with RNA chaperone activity (Lorković and Barta, 2002). The glycine-rich domain is found in the C-terminus (aa 713–766); this domain also contains interspersed cysteine residues (Figure S1A). Comparison of phylogenetically related GRDPs reveals that the three domains found in *AtGRDP2* are conserved in the orthologous proteins analyzed (Figures S1, S2). *AtGRDP2* is grouped with orthologous GRDPs of dicot plants (Figure S1B), mainly with proteins from the *Brassicaceae* species. A consensus glycine region [CG]GGGCGG[GC], elucidated by MEME program (Bailey and Elkan, 1994), was identified among the *AtGRDP2* orthologs (Figures S1A, S2).

In the *A. thaliana* genome, in addition to *AtGRDP2*, we have identified three additional genes encoding proteins that also contain the DUF1399 domain, named *AtGRDP1* (Rodríguez-Hernández et al., 2014), *At1g56230*, and *At4g37682*. The *AtGRDP1* protein also contains the RNP-1 and glycine rich-region domains, while the *At1g56230* and *At4g37682* encoded proteins lack these domains (Figure S1C).

#### ***AtGRDP2* IS EXPRESSED THROUGHOUT ARABIDOPSIS DEVELOPMENT**

*AtGRDP2* tissue-specific expression pattern was evaluated by qRT-PCR at different developmental stages, in *A. thaliana* ecotype Col-0 plants of 18, 21, 26, 28, and 45 days old (Figures 1A,B). The highest *AtGRDP2* expression levels were found in rosette leaves, in inflorescence tissues such as cauline leaves, buds, flowers, and in immature siliques (Figure 1A). In rosette and cauline leaves, the highest expression was detected in 28-day-old plants. In flowers, the maximum expression of *AtGRDP2* was noticed at day 45; although expression in buds and flowers was detected as of day 26. Furthermore, *AtGRDP2* gene expression was maintained in immature siliques, but expression fell toward baseline values in mature siliques (Figure 1A).

*AtGRDP2* expression in floral tissues was also evaluated using Arabidopsis reporter lines expressing the GFP-GUS fusion under the control of the *AtGRDP2* promoter (2000 bp) (Figure 1C). GUS histochemical assays confirmed *AtGRDP2* expression in flower organs and immature siliques (Figure 1C). GUS expression was detected on the stigmas (St), at the top of the ovary (Ov), internode region (I), and in floral buds and fertilized siliques (Fs).

#### ***AtGRDP2* GENE IS INVOLVED IN ARABIDOPSIS DEVELOPMENT**

To address the biological functions of *AtGRDP2* gene in plant growth and development, mutant and over-expression lines were characterized. The T-DNA homozygous line (Sail\_387D04) was analyzed for the absence of *AtGRDP2* transcript, confirming that the Sail\_387D04 line is a null allele (Figure S3). The *amiRAtGRDP2-1* line (−1.7-fold repression), and

four Arabidopsis lines over-expressing the *AtGRDP2* gene (35S::*AtGRDP2-OE2* 4.8-fold, *-OE4* 21.6-fold, *-OE1* 102.6-fold, and *-OE3* 451.3-fold) were selected for subsequent analyses (Figure S3D).

Growth rate was evaluated in 2-week-old Arabidopsis *Atgrdp2* mutants and *AtGRDP2* over-expression lines. At this stage, seedlings of knockout and knockdown lines exhibited smaller sizes than those of WT plantlets (Figure 2A), reflected in their root length and fresh weight (Figures 2B,C). Interestingly, the *AtGRDP2* over-expression lines presented an opposite phenotype, resulting in a higher growth rate in comparison to WT seedlings, in both the aerial part and the roots (Figure 2A). The increased growth rate observed in 35S::*AtGRDP2-OE3* plantlets could be attributed to a higher accumulation of *AtGRDP2* transcript in this line (Figure S3). Since deregulation of *AtGRDP2* gene results in plant growth alterations, we analyzed the flowering time under long- and short-day conditions (Figures 2D–I). In long-day conditions, *AtGRDP2* over-expression lines showed faster development and early flowering in comparison with the WT (Figures 2D,E). Instead, the knockout and knockdown lines showed late flowering phenotype (Figures 2D,E). At day 34, the percentages of plants with inflorescences were as follows: >80% in the *AtGRDP2* over-expression lines, 66% in the WT, 46.6% in the knockdown line and 40% in the knockout line. Regarding the number of rosette leaves, no significant differences were observed in most of the analyzed lines. The exception was in the 35S::*AtGRDP2-OE1* which had more rosette leaves (Figure 2F).

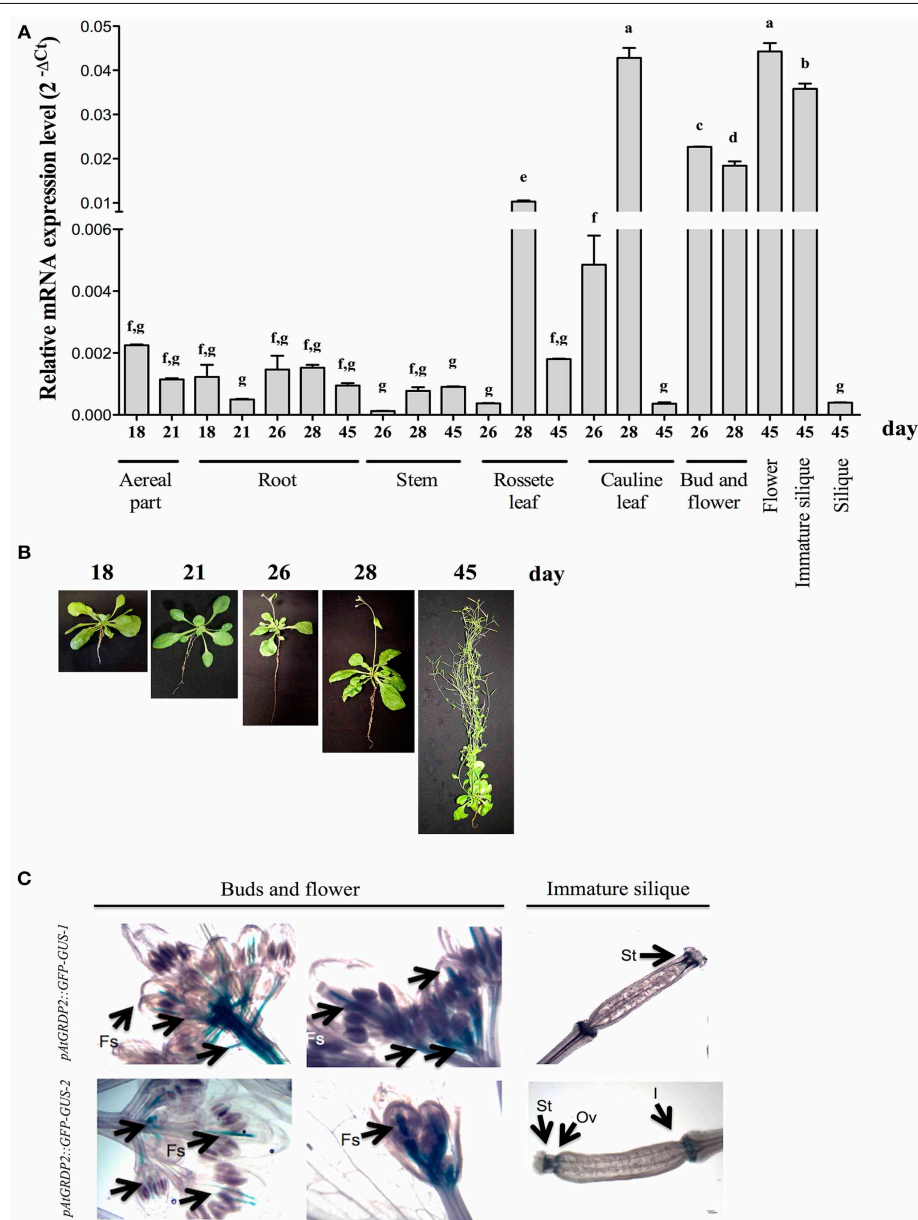
Flowering time experiments under short-day conditions exhibited similar behavior to that observed in plants grown in long-days. The *AtGRDP2* over-expression lines showed early flowering in comparison with WT plants, knockout and knockdown lines (Figures 2G–I). Finally, no differences in the number of rosette leaves at the flowering time were found between WT and the analyzed lines (Figure 2I).

All previous experiments showed that the *Atgrdp2-1* and *amiR-1* lines have a delay in development; it might be possible that hormonal pathways controlling development are affected. Interestingly, Goda et al. (2004) reported that the *AtGRDP2* belongs to a group of genes specifically regulated by indole-3-acetic acid (IAA). We analyzed IAA levels in WT, mutant and overexpression lines (Figure 3A), and we observed that the 35S::*AtGRDP2-OE2* and *-OE4* over-expression lines accumulated the highest IAA levels (Figure 3A). Furthermore, the effect of auxins on *AtGRDP2* gene expression was evaluated in the *pAtGRDP2::GFP-GUS-1* reporter line. GUS histochemical analyses were carried out in 7 day-old *pAtGRDP2::GFP-GUS-1* and *-2* transgenic lines treated with 0, 1, and 10 μM IAA for 3 and 6 h (Figure 3B). Plant treatments with IAA show increases in GUS signal in the root-hypocotyl junction (collet), and in the root differentiation zone in comparison to non-treated plants. In addition, IAA induces GUS signal in the root elongation zone; however, no signal is detected in root meristematic zone in control and treated seedlings (Figure 3B).

*AtGRDP2* appears to be an auxin-regulated gene, and the difference in IAA concentrations might be responsible for the accelerated growth rate phenotype observed in *AtGRDP2*

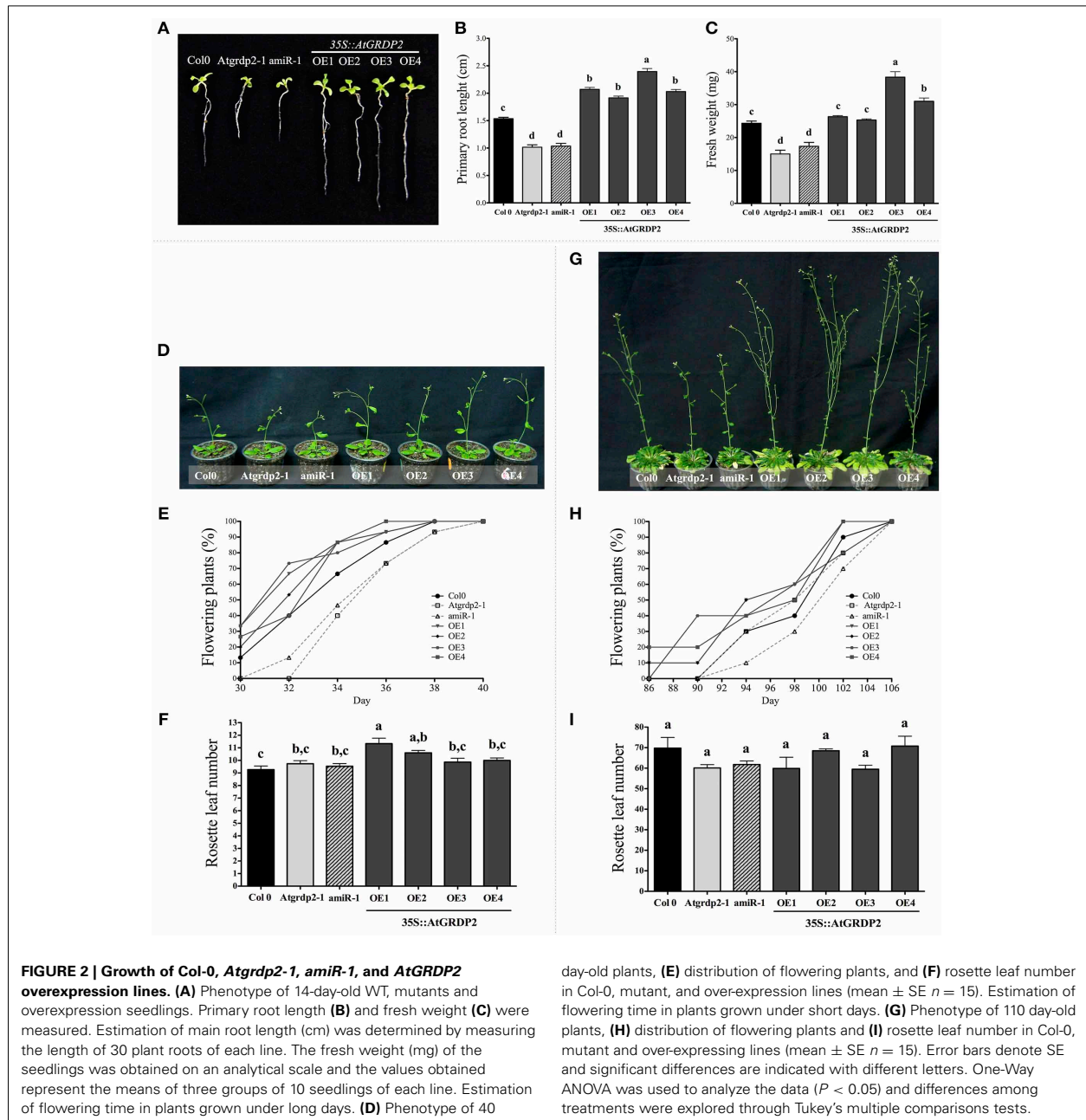
overexpression lines. The relation between auxins and *AtGRDP2* gene was also explored by measuring the expression of Auxin Response Factors (*ARF2*, *ARF6*, *ARF8*), *miR167*, and the auxin transporter *AUX1* by qRT-PCR. Interestingly, the *ARF6*, *ARF8*,

and *AUX1* genes are induced in the *35S::AtGRDP2-OE3* line and repressed in the *Atgrdp2-1* mutant (Figure 3C); opposite to *ARF2* which is induced in the *Atgrdp2-1* line. The *miR167*, which is a negative regulator of *ARF6* and *ARF8*



**FIGURE 1 | *AtGRDP2* is expressed throughout Arabidopsis development.** (A) qRT-PCR analysis was performed in Arabidopsis Col-0 tissues obtained from different developmental stages. Quantitation of the *AtGRDP2* gene, expressed as relative mRNA expression levels ( $2^{-\Delta C_t}$ ), was calculated after normalization to the Arabidopsis *UBQ5* gene. For each sample, three biological replicates were analyzed with their respective technical replicates. Letters

indicate significant differences between samples according to Tukey's multiple comparison tests at  $P < 0.05$ . (B) Photographs show representative Arabidopsis plant at 18, 21, 26, 28 and 45 days. (C) Representative images of GUS histochemical staining of 45-day-old transgenic lines *AtGRDP2::GFP-GUS-1* and -2 in buds, flowers and immature siliques; fertilized siliques (Fs), stigmas (St), internode region (I), and ovary (Ov) are indicated.



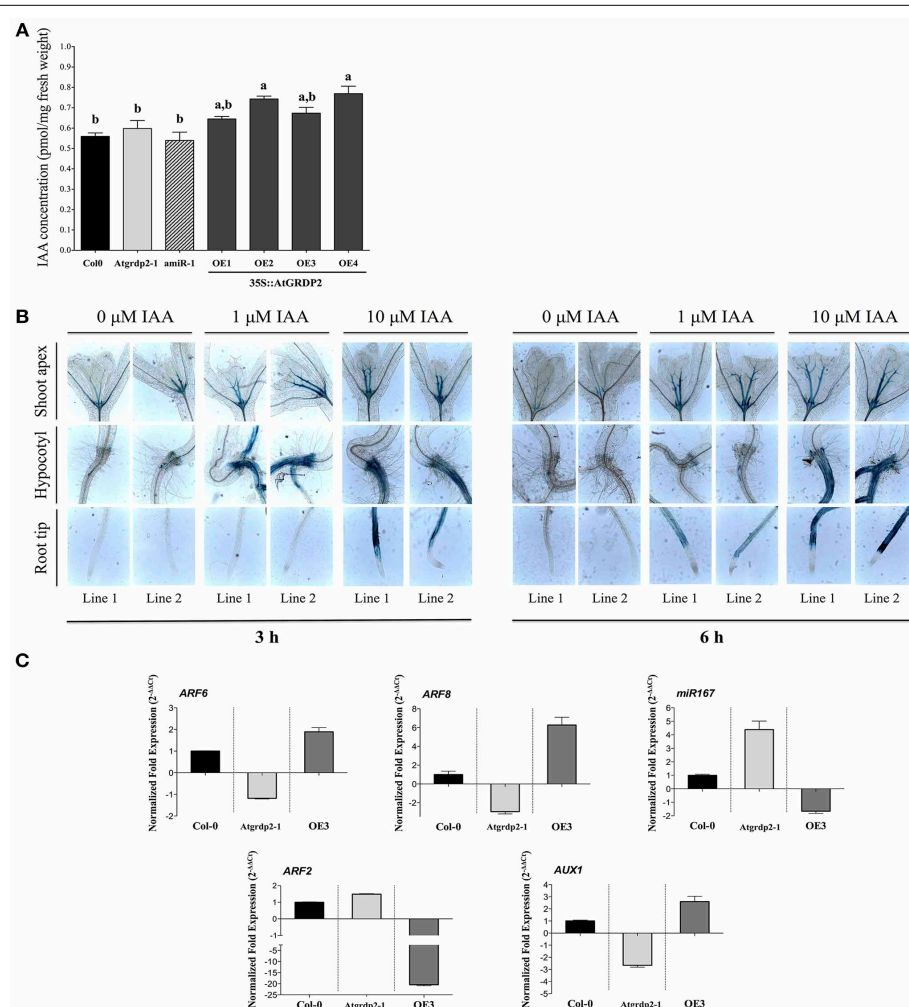
transcription factors, was found up-regulated in the *Atgrdp2* mutant, and decreased in *35S::AtGRDP2* overexpression line (Figure 3C).

#### OVEREXPRESSION OF *AtGRDP2* IN ARABIDOPSIS IMPROVES RECOVERY AFTER SALT STRESS

Two-week old Arabidopsis Col-0, *Atgrdp2* mutants and overexpression lines were grown 7 days in 150 mM NaCl (Figure 4A).

An evident salt stress sensitivity phenotype was observed in the mutant lines (Figure 4A). The relative primary root growth was slower for *Atgrdp2-1* and *amiR-1* compared with WT. The relative fresh weight was higher for *35S::AtGRDP2*-OE overexpression lines (Figures 4B,D). After salt stress treatments, plantlets were transferred into sterile soil and the survival rate was calculated following a 7 days period of recovery. Plant survival rates indicate that more than 50% of the overexpression lines recovered





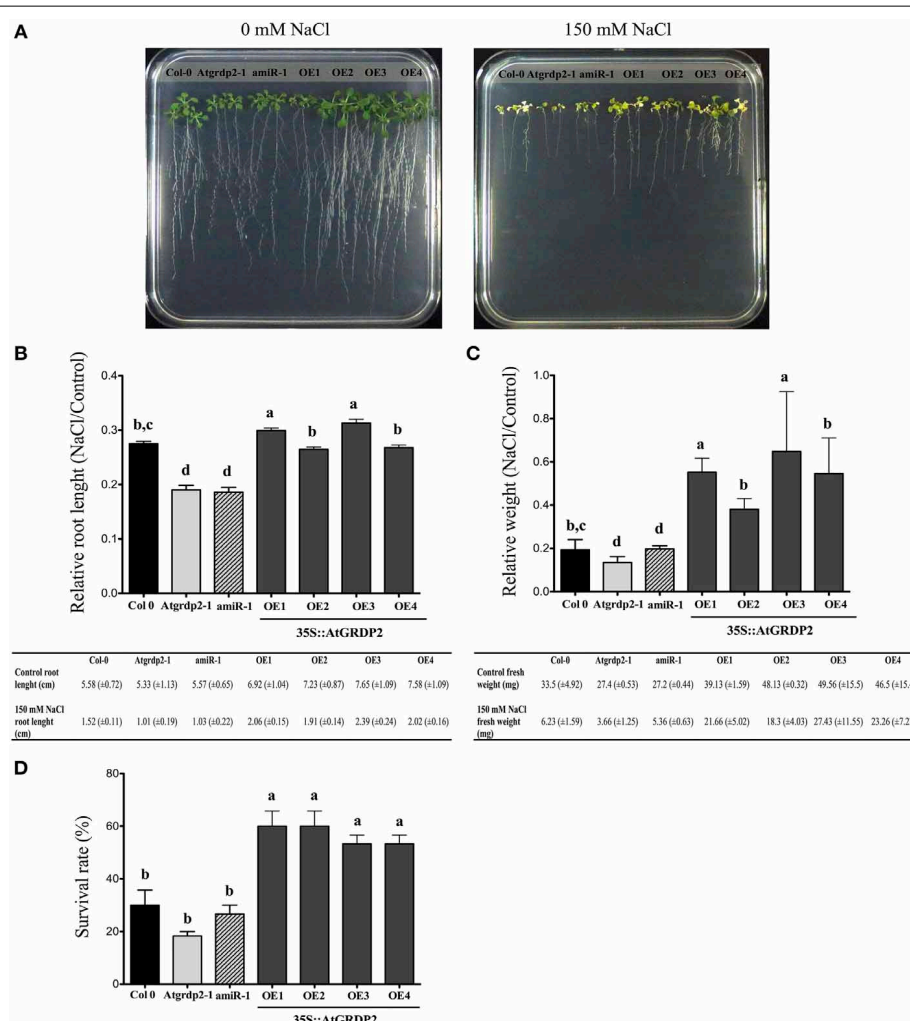
**FIGURE 3 | (A)** IAA content in Col-0, *Atgrdp2-1*, *amiR-1*, and *AtGRDP2-OE1*, *OE2*, *OE3*, and *OE4* overexpression lines. Twenty-one days old plants were used for IAA quantification. The experiment was performed on three biological replicates with their respective three technical replicates. Different letters indicate significant differences between samples according to Tukey's multiple comparison tests at  $P < 0.05$ . **(B)** Modulation of *pAtGRDP2::GFP-GUS* expression patterns by IAA. Seven day-old seedlings were treated with 0, 1, and 10  $\mu$ M of IAA for 3 and 6 h. Images show representative individuals of two independent lines of *pAtGRDP2::GFP-GUS* (line 1 and 2). Images were

taken on a Leica microscope at 10X magnification and recorded using the Leica Application Suite 3.0.0 software. **(C)** Expression analysis of auxin-related genes. qRT-PCR was performed in 15 day-old seedlings of Col-0, *Atgrdp2-1*, and *-OE3* overexpression line. Ten seedlings of each line per triplicate were used. For the qRT-PCR analysis it was used SYBR green dye, with the respective technical replicates. Normalized fold change was calculated comparing the target gene expression with a control (Col-0), after normalization to the Arabidopsis *UBQ5* gene using the  $(2^{-\Delta\Delta Ct})$  method. In case of ratios lower than 1, the inverse of the ratio was estimated and the sign was changed.

while only 20% of *Atgrdp2-1* was able to survive (**Figure 4C**). Our data show clear salt stress tolerance in *AtGRDP2* overexpression lines.

Furthermore, genes known to be induced by abiotic stress were analyzed by qRT-PCR in 15 day-old Col-0, *Atgrdp2-1* mutant and *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression lines grown 1 and 3 days under 125 and 150 mM NaCl. Expression levels of the selected genes: Responsive to Desiccation 29B (*RD29B*), Arabidopsis Early

Methionine-Labeled 6 (*EM6/LEA*) and ABRE Binding Factor 4 (*ABF4*) are shown in **Figure 5**. These genes are ABA responsive and are mainly induced by stress conditions that involve cellular dehydration. In the *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression line, *EM6*, *ABF4*, and *RD29B* genes were up-regulated under salt treatments at both times in comparison to WT plants. In contrast, all the analyzed genes were repressed in *Atgrdp2-1* (**Figure 5**).



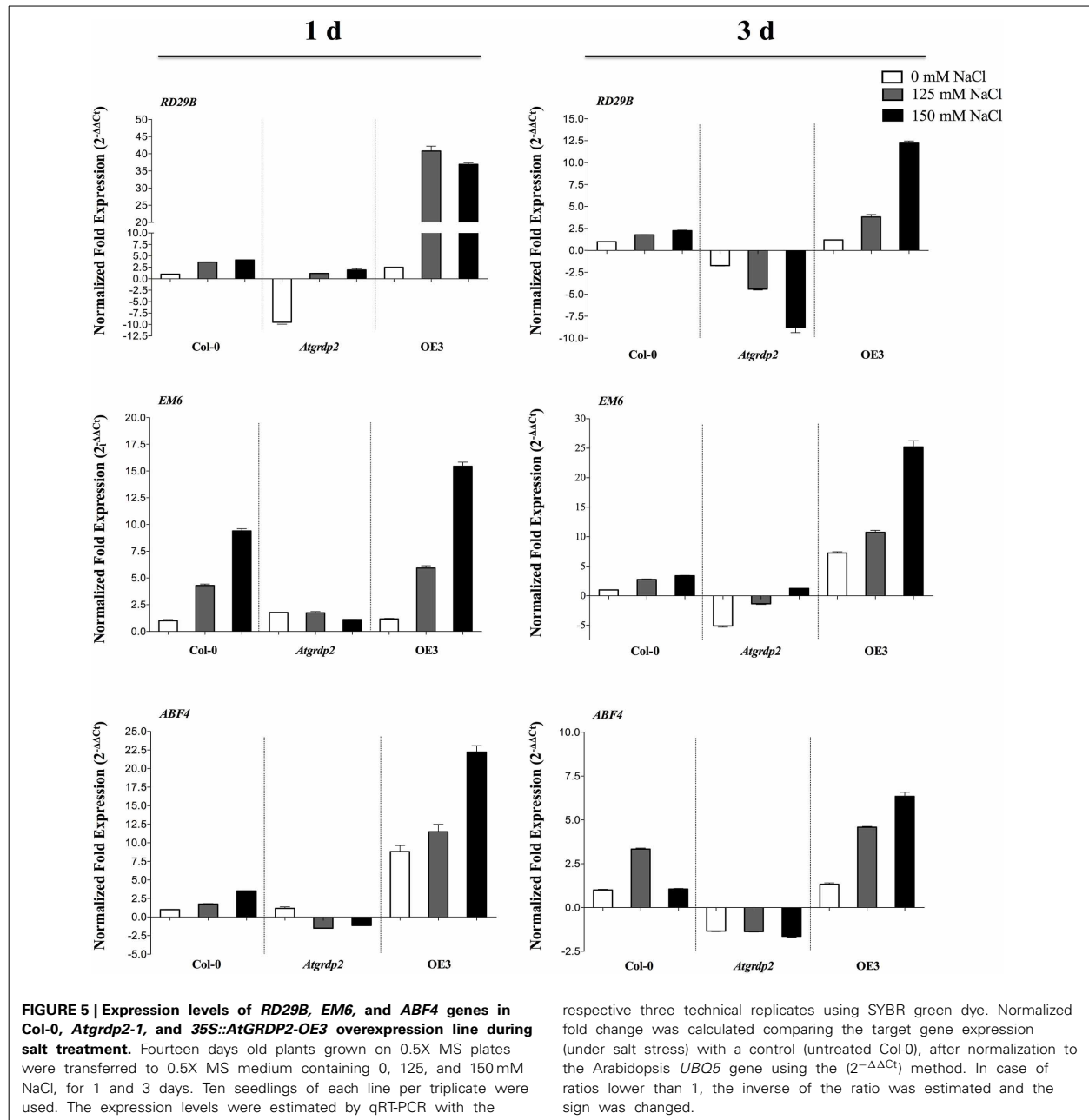
**FIGURE 4 | Effect of salt stress on Arabidopsis Col-0, *Atgrdp2-1*, *amiR-1*, and *AtGRDP2* overexpression lines. (A)** Photographs of Arabidopsis (21 day-old) seedlings grown in 0.5x MS medium with 0 and 150 mM NaCl for 7 days **(B)** Data of primary root length, and relative root length (treated with 150 mM NaCl/untreated) for each line was represented graphically. **(C)** Data of fresh weight, and relative fresh

weight (treated with 150 mM NaCl/untreated) for each line was represented graphically. **(D)** Survival rate of the Col-0, *Atgrdp2-1*, *amiR-1*, and *AtGRDP2* overexpression lines after 7 days of salt stress recovery. Data are mean  $\pm$  SE ( $n = 10$ ) from three replicates. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among lines were explored through Tukey's multiple comparisons tests.

#### ***AtGRDP2* OVEREXPRESSION IN LETTUCE ALTERS GROWTH, DEVELOPMENT, AND FLOWERING TIME**

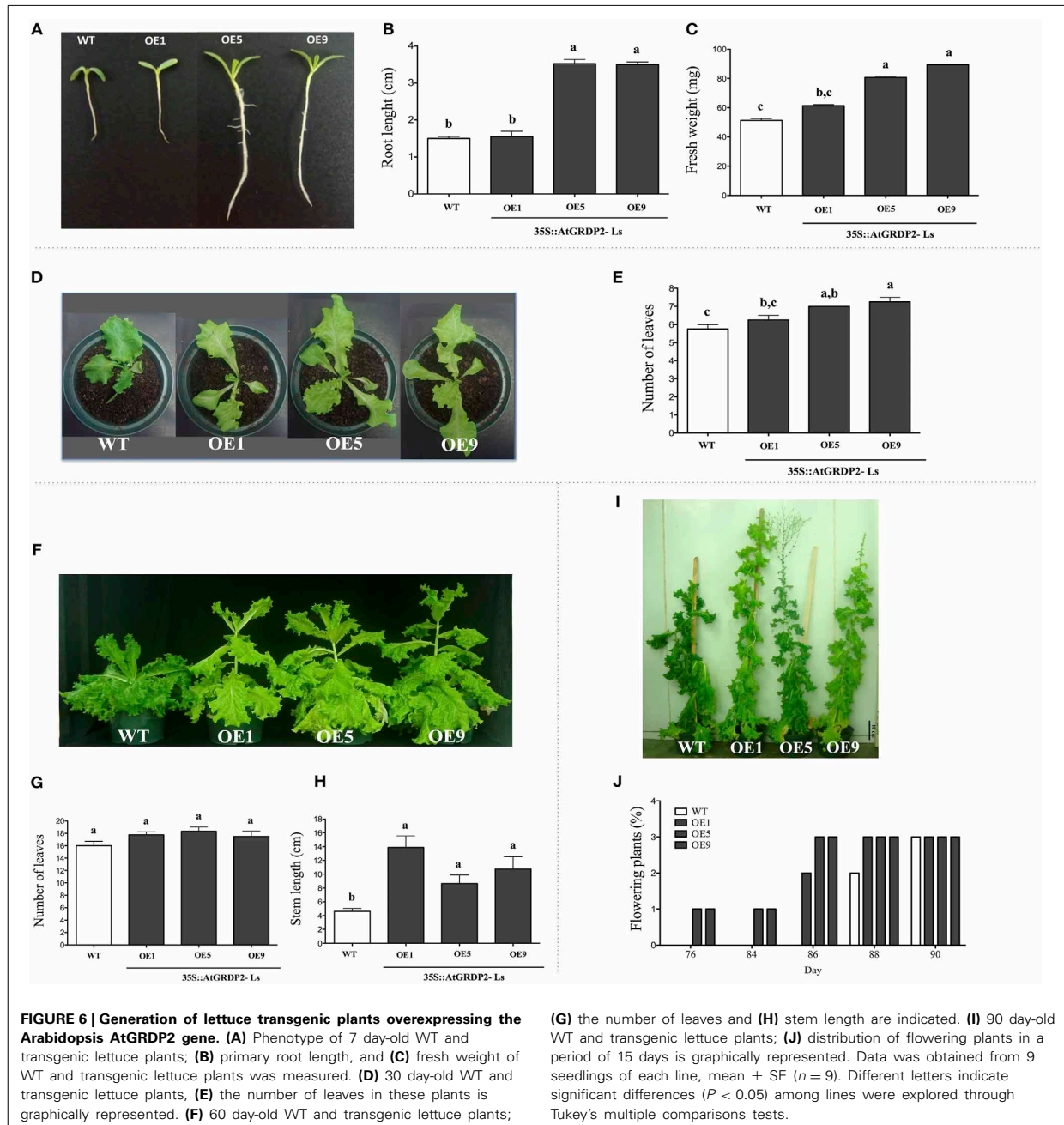
Transgenic lettuce T3 homozygous lines that overexpress the *AtGRDP2* gene were generated, and *AtGRDP2* expression was estimated by qRT-PCR, observing different levels of *AtGRDP2* transcript in the lettuce *35S::AtGRDP2-Ls1*, *-Ls5*, and *-Ls9* lines. In WT lettuce, *AtGRDP2* expression was not detected as expected (Figure S3E). Overexpression of *AtGRDP2* gene positively affects the growth rate of lettuce plants at early stages of development (7 day-old plants; Figure 6A). The *35S::AtGRDP2-Ls5* and *-Ls9* exhibited faster growth, developed higher fresh weight and longer primary roots than WT plants (Figures 6A–C). In contrast,

the *35S::AtGRDP2-Ls1* line, was phenotypically similar to the WT, with no statistical differences in fresh weight and primary root length (Figures 6A–C). The increased growth rate phenotype correlates with *AtGRDP2* gene expression in the lettuce transgenic lines (Figure 6A and Figure S3E). After, the transgenic and WT lettuce plantlets were grown in soil. As previously observed, 30 day-old plants of the *35S::AtGRDP2-Ls5* and *-Ls9* maintained the highest growth rates, and developed more leaves (Figure 6D). 60 day-old lettuce *AtGRDP2* overexpression lines (*-Ls1*, *-Ls5*, and *-Ls9*) were higher than WT lettuces, reflected in their stem length (Figures 6F–H). No differences were observed in the number of leaves among transgenic and WT at this stage



of development (Figures 6F–H). Owing the accelerated growth rate of *AtGRDP2* transgenic lettuce lines, flowering time was also analyzed (Figures 6I,J). As expected, inflorescence development was accelerated in the transgenic lines. The *35S::AtGRDP2-Ls5* and *-Ls9* transgenic lettuce plants flowered 76 days after sowing, 12 days before the WT, while in the *35S::AtGRDP2-Ls1* plants the difference was minor, 2 days before WT flowering time (Figures 6I,J).

One interesting feature of the lettuce *35S::AtGRDP2* transgenic plants is the presence of light green leaves, in contrast to the dark green color observed in WT lettuce in all the developmental stages analyzed (Figure 6). For this reason, the chlorophyll content was estimated. No significant differences were observed in the total chlorophyll content between WT and transgenic plants (Figure S4). However, the chlorophyll *a/b* ratio was altered in transgenic plants, due to a higher chlorophyll *b* content (Figure S4).



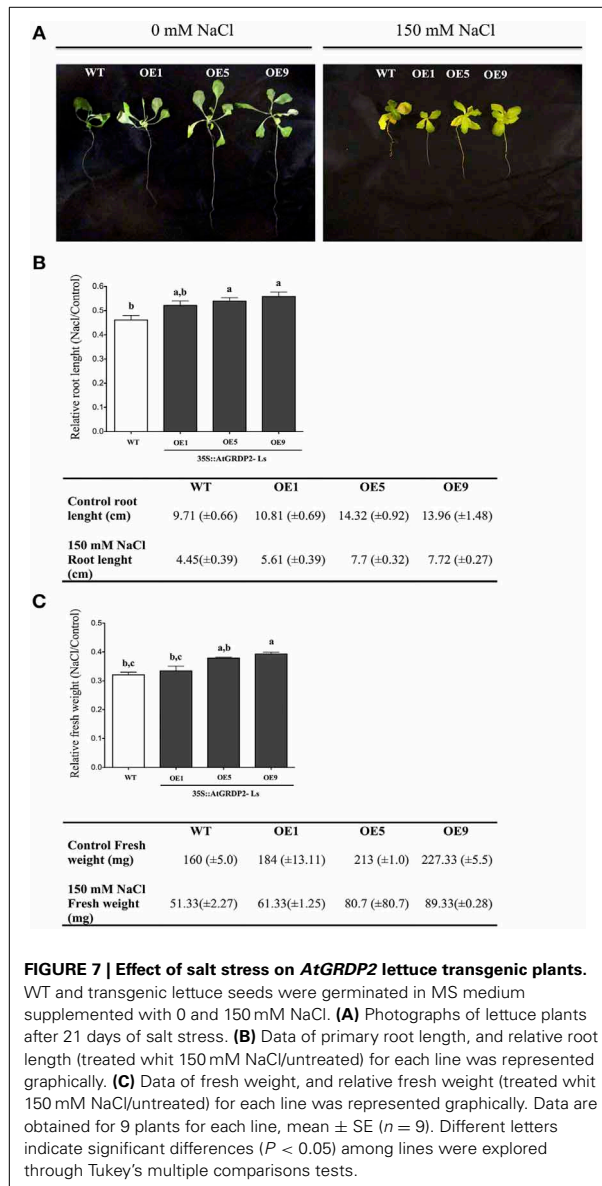
Furthermore, carotenoids content was measured. It was found that transgenic plants diminish their carotenoid content with age, i.e., 90 day-old-transgenic plants show up to 57% less carotenoids than WT lettuce plants (Figure S4C).

Finally, the response to salinity stress was evaluated in lettuce *AtGRDP2* overexpression lines (Figure 7) grown under 150 mM NaCl for 21 days. At this time, salt tolerance was noticed in the

overexpression lines; which had longer roots and increased fresh weight in comparison to WT plants (Figures 7B,C).

## DISCUSSION

In this study, we describe for the first time the *AtGRDP2* gene, which belongs to the DUF1399-GRDP family. *AtGRDP2* encodes a non-canonical glycine-rich protein of unknown function



containing a DUF1399 domain, a putative RNA-binding motif and a glycine-rich domain. The three domains present in *AtGRDP2* are conserved in other plant orthologous proteins (Figure S1). The Arabidopsis genome has three additional genes encoding proteins with a DUF1399 domain *AtGRDP1*, *At4g37682*, and *At1g56230* (Rodríguez-Hernández et al., 2014). *AtGRDP1* is involved in abiotic stress response and ABA signaling (Rodríguez-Hernández et al., 2014), while the latter are of unknown function. *AtGRDP2* and *AtGRDP1* seem to be paralogs (Rodríguez-Hernández et al., 2014), and show microsynteny (Kevei et al., 2005). The *At4g37682* and *At1g56230* proteins do not contain glycine-rich and RNP motifs, and

share 46% and 15% identity respectively, with *AtGRDP2* protein.

The canonical glycine rich proteins contain a high glycine percentage (from 40 to 70%), with arranged (Gly)<sub>n</sub>-X repetitions (Sachetto-Martins et al., 2000; Mousavi and Hotta, 2005). Besides the canonical GRPs, there are glycine-rich domain proteins (GRDPs), containing a short glycine-rich region. Several transcripts encoding GRDPs have been reported in *Eucalyptus* (Bocca et al., 2005), and recently our research group reported the *Phaseolus vulgaris PvGRDP1* gene, and the Arabidopsis *AtGRDP1* gene, which are induced under abiotic stress (Hernández-Lucero et al., 2014; Rodríguez-Hernández et al., 2014). The Arabidopsis *AtGRDP2* gene is developmentally regulated, with particularly high mRNA expression levels in buds, flowers, and immature siliques. In accordance, the Arabidopsis microarray database (Arabidopsis eFP Browser, www.bar.utoronto.ca) reports that *AtGRDP2* transcript is induced during stages 9, 10, 11, and 12 of flower development (Schmid et al., 2005). The expression of some canonical plant GRPs has been reported in floral organs. The oleosin-like protein GRP17 was identified as a component of the *A. thaliana* pollen coat required for rapid initiation of pollination (Mayfield and Preuss, 2000). Another characterized GRP, the *AtOGB3* that has an oleosin domain, is required for pollen hydration (Mayfield and Preuss, 2000). Transcripts of Arabidopsis GRPs (*AtGRP1* and *AtGRP2*) were found to be abundant in flowers (de Oliveira et al., 1990). These studies suggest that proteins with glycine-rich regions play a role in flower organs development.

We found phenotypes of higher growth rates and development into vigorous plants in Arabidopsis and lettuce *AtGRDP2* overexpression lines, in contrast to the Arabidopsis *Atgrdp2-1*, which show an opposite behavior. The observed phenotypes are in accordance with different levels of *AtGRDP2* transcript accumulation, e.g., the *35S::AtGRDP2-OE3* line exhibited the longest primary roots, the highest fresh weight, and the highest transcript levels. In addition, flowering time was estimated under long- and short-day conditions, and it was found that Arabidopsis *AtGRDP2* overexpression lines flowered earlier than the parental plants. The *Atgrdp2-1* seedlings display a delayed flowering phenotype compared to WT plants. Our data show that *AtGRDP2* gene is involved in Arabidopsis growth and development. In accordance, the Arabidopsis AtGenExpress microarray database show *AtGRDP2* expression in shoot apex, inflorescence and apical meristems. Some reports related canonical GRPs to developmental processes. The vacuole-located glycine-rich protein *AtGRP5* plays a role in organ growth possibly by promoting cell elongation processes (Mangeon et al., 2009). *AtGRP5* overexpression generated plants with longer roots and enhanced elongation of the inflorescence axis. Likewise, *AtGRP7* (an RNA-binding protein) promotes floral transition in Arabidopsis through the autonomous pathway (Streitner et al., 2008).

Interestingly, the accelerated growth phenotype was noticed in both Arabidopsis and lettuce transgenic plants at different stages of development (seedling stage, vegetative, and reproductive growth). Deregulation of *AtGRDP2* gene levels affects growth and development, possibly due to hormonal changes. We found that Arabidopsis *AtGRDP2* overexpression lines show increased



levels of the auxin indole-3-acetic acid (IAA). Unexpectedly, the *Atgrdp2-1* maintain similar levels of IAA as the WT. It might be that the other genes of the Arabidopsis DUF1399 family, mainly the AtGRDP1 paralog have functional redundancy with AtGRDP2. Auxins control several fundamental aspects of the plant development, such as cell division, cell expansion, pattern formation, root development, and apical dominance, and also environmental responses such as photo- and gravitropism (Berleth and Sachs, 2001; Woodward and Bartel, 2005). Microarray data published by Goda et al. (2004) revealed that the *AtGRDP2* belongs to a group of genes specifically regulated by IAA. Consistent with these observations, we found auxin response elements (ARF binding sites) in the *AtGRDP2* promoter (Figure S5), and IAA treatments of *AtGRDP2::GFP-GUS-1* seedlings show increased GUS expression in the root-hypocotyl junction and in the root differentiation zone.

Furthermore, we evaluated the expression of ARF transcription factors in Col-0, *Atgrdp2-1* and *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression lines. ARFs bind to auxin response promoter elements and mediate auxin dependent gene expression (Guilfoyle and Hagen, 2007). The lack and constitutive overexpression of *AtGRDP2* alters the expression of *ARF6* and *ARF8* regulators of floral development, showing an induction of both genes in *35S::AtGRDP2-OE3* line, and a repression in the *Atgrdp2-1*. *ARF6* and *ARF8* are finely tuned by *miR167*, and the overexpression of *miR167* mimics *arf6/arf8* phenotypes of flowering delay (Wu et al., 2006; Rubio-Somoza and Weigel, 2013). *miR167* is induced in *Atgrdp2-1* and repressed in *35S::AtGRDP2-OE3* lines. *miR167*, *ARF6*, and *ARF8* form part of a regulatory network that is essential for flower organ maturation and root development in Arabidopsis (Curaba et al., 2014). The expression patterns observed for *miR167*, *ARF6*, and *ARF8* might explain the phenotypes of delayed or accelerated flowering observed in the *Atgrdp2-1* mutant and overexpression lines. Another important auxin-regulated gene is *AUX1*, which encodes an auxin influx facilitator protein involved in polar auxin transport (Kramer and Bennett, 2006; Paponov et al., 2008). In the *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression line, higher *AUX1* transcript levels are detected, suggesting a major auxin influx in these lines.

Recent studies refer a connection between auxin response and abiotic stress, by crosstalk with ABA signaling (Du et al., 2012, 2013). We observed that the *35S::AtGRDP2* overexpression lines with increased auxin levels are also more tolerant to salt stress. Conversely, *Atgrdp2-1* lines were susceptible to salt stress, and most mutant lines were unable to survive after stress treatments. In accordance, microarray data show that the *AtGRDP2* gene is induced by salt stress in Arabidopsis roots (Ma et al., 2006). Recently, we reported that the common bean *PvGRDP1* gene, orthologous to Arabidopsis *AtGRDP2* gene, was induced in leaves by salt stress at 2 and 5 days, but was down-regulated in stems after 2 days of treatment (Hernández-Lucero et al., 2014). The expression pattern of some stress marker genes was monitored between the *Atgrdp2-1* and *35S::AtGRDP2-OE3* overexpression lines under salt stress. We selected the transcription factor *ABF4* (ABRE Binding Factor 4), *Em6* (LEA-1), and *RD29B* (Responsive to Desiccation 29B) genes, which are induced by diverse abiotic stresses including salinity (Uno et al., 2000;

Kang et al., 2002; Hundertmark and Hinch, 2008). Our results showed that salt treatment down-regulated most marker genes in the *Atgrdp2-1* line, in contrast to the increased expression noticed in the *35S::AtGRDP2-OE3* line at 1 and 3 days of salt stress. Shi et al. (2014) propose that auxin might contribute in the positive regulation of drought stress resistance, through regulation of root architecture, ABA-responsive genes expression, ROS metabolism, and metabolic homeostasis. They found that endogenous and exogenous auxin positively modulated the expression levels of multiple abiotic stress-related genes such as *RAB18*, *RD22*, *RD29A*, *RD29B*, *DREB2A*, and *DREB2B*. These data are in accordance with our observations in *AtGRDP2* overexpression lines that accumulate IAA, express higher levels of stress responsive genes, and become salt stress tolerant. As well, down regulation of *ARF2* in *35S::AtGRDP2-OE3* line might be related to stress tolerance. On the other hand, a slight induction of *ARF2* gene was observed in *Atgrdp2-1* background. *arf2* mutants have a delay in leaf senescence and are more resistant to oxidative stress (Lim et al., 2010).

It has been reported that *AtGRDP1* gene, paralog to *AtGRDP2*, is modulated to several abiotic stress, including salt treatment. The *Atgrdp1* mutant line was sensible to salt and osmotic stress during germination and cotyledon development, whereas *35S::AtGRDP1* over-expressing lines resulted in increased tolerance to abiotic stress. In addition, *35S::AtGRDP1* over-expressing lines were more resistant to ABA, resembling to well-known ABI phenotype, whereas disruption of the *AtGRDP1* gene resulted in ABA hypersensitivity (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

*AtGRDP2* transgenic lettuce lines showed several interesting phenotypes, i.e., plants grow faster, tolerate salt stress, have lower content of carotenoids, and the chlorophyll *a/b* ratio is altered. Recently, Du et al. (2013) proposed that the balance of carotenoid, ABA and auxin homeostasis is critical for rice development and stress responses. Since lettuce is a high-value leafy vegetable grown commercially worldwide, transformed lines might have implications in the development of improved phenotypes given the high demand and the susceptibility of this crop to dehydration and salt stress (Martínez-González et al., 2011; Kerbiriou et al., 2013; Kim et al., 2013).

It has been reported that canonical GRPs containing an RRM-GRPs can be modulated under abiotic stress (Kang et al., 2013; Yang et al., 2014). Such is the case of the Arabidopsis glycine-rich RNA-binding protein 2 (GRP2) that is involved in salt and cold stress tolerance during germination and seedling growth (Kim et al., 2007). Transgenic tobacco plants overexpressing the *Limonium bicolor* GRP gene are tolerant to salt stress, possibly due to increased superoxide dismutase and catalase activities and proline content (Wang et al., 2012). As well, overexpression of *AtGRP2* and *AtGRP7* in rice confers drought stress tolerance (Yang et al., 2014).

Herein, we present fast-growing Arabidopsis and lettuce transgenic plants that overexpress the *AtGRDP2* gene. *AtGRDP2* belongs to a novel family of Arabidopsis proteins containing the DUF1399 domain. *AtGRDP2* gene is developmentally regulated showing particular expression patterns in Arabidopsis floral organs. It was found that *AtGRDP2* is an auxin-regulated gene. Deregulation of *AtGRDP2* in Arabidopsis mutant and

overexpression lines affects the expression of key regulators of floral development (*ARF6*, *ARF8*, and *miR167*), leading to delay or acceleration of flowering in Arabidopsis. Increased auxin levels in *AtGRDP2* overexpression lines were correlated with salt stress tolerance and up-regulation of markers of stress response. Our data reveal an important role for *AtGRDP2* in plant growth and development, possibly through an auxin dependent mechanism.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by CONACYT (Investigación Ciencia Básica 2008-103106) funding.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fpls.2014.00782/abstract>

**Figure S1 | The Arabidopsis Glycine Rich Domain Protein 2 (AtGRDP2).** (A) Schematic representation of AtGRDP2 domains: DUF1399, RNP-1, and GRD. The amino acid sequence of each domain is indicated within rectangles. (B) Unrooted phylogenetic tree of AtGRDP2 orthologous proteins and Arabidopsis proteins containing the DUF1399 domain (At2g22660, At1g56230, and At4g37682). The phylogenetic tree was created by the Neighbor Joining method of the PHYLIP 3.67 package (Felsenstein, 1989). Bootstrap support values out of 1000 pseudoreplicates of the data set and values are provided as percentages at the corresponding nodes when >50%. Phytozome accession numbers are as follows: Al, (*Arabidopsis lyrata*, 353047); Cr, (*Capsella rubella*, Carubv10004166m); Th, (*Theellungiella hallophila*, Thhalv10024448m); Br, (*Brassica rapa*, Bra010619); Cp (*Carica papaya*, 755.1); Ls (*Linum usitatissimum*, Lus10019239); Pt (*Populus trichocarpa*, POPTR\_0015s04140.1); Me (*Manihot esculenta*, cassava4.1\_002413m); Rc (*Ricinus communis*, 28333.m000558); Eg (*Eucalyptus grandis*, Eucgr.100602.1); Ppa (*Prunus persica*, ppa001356m); Mt (*Medicago truncatula*, Medtr5g030890.1); Pv, (*Phaseolus vulgaris*, Phvulv091027346m); Gm (*Glycine max*, Glyma01g02400); Cc (*Citrus clementina*, clementine0.9\_002162m); Cs (*Citrus sinensis*, orange1.1g002907m); Ac (*Aquilegia coerulea*, Aquca\_010\_0041.1); Mg (*Mimulus guttatus*, mgv1a001553m); Os (*Oryza sativa*, Os11g40590); Bd (*Brachypodium distachyon*, Bradi4g13267); Si (*Setaria italica*, Si025845m); Sb (*Sorghum bicolor*, Sb05g025070); and Zm (*Zea mays*, GRMZM26358827\_T01). (C) Schematic representation of the predicted *A. thaliana* DUF1399 proteins, AtGRDP1 (At2g22660), AtGRDP2 (At4g37900), At1g56230, and At4g37682. In the case of the AtGRDP1 and AtGRDP2 proteins, the RNP-1 motif and the glycine-rich domain (GRD) are indicated.

**Figure S2 | Multiple sequence alignment of AtGRDP2 plant orthologous proteins.** Identical residues in the seven proteins are shown in black, and conserved substitutions are in gray. The conserved regions are underlined: the Domain of Unknown Function 1399 (DUF1399), the putative RNA binding motif -1 (RNP-1) and the glycine-rich domain (GRD). Pv (*P. vulgaris*, Phvulv091027346m); Gm (*G. max*, Glyma01g02400); Br (*B. rapa*, Bra010619); Th (*T. hallophila*, Thhalv10024448m); Cr (*C. rubella*, Carubv10004166m); Al (*A. lyrata*, 353047); At (*A. thaliana*, At4g37900).

**Figure S3 | Gene structure and expression of AtGRDP2 gene in Col-0, Atgrdp2-1, amiR-1 knockdown, and 35S::AtGRDP2 over-expression lines.** (A) Schematic representation of T-DNA insertion site (black triangle) at

fourth exon in the Sail\_387D04 mutant line. Exons are shown in black rectangles, and introns in solid lines. RT-PCR analysis of *AtGRDP2* gene in control and *Atgrdp2-1* mutant plants; Actin 8 gene was used as loading control. (B) Schematic representation of the pAmiR-AtGRDP2 vector. LB, left border for T-DNA integration; CaMV 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; attB1 and attB2 sites for recombination; amiR-AtGRDP2, *A. thaliana* GRDP2 artificial microRNA; 3'-OCS, octopine synthase terminator; bar gene as herbicide resistance marker (BASTA); RB, right border for T-DNA integration. qRT-PCR expression levels of AtGRDP2 on three independent amiR-AtGRDP2 lines. (C) Schematic representation of the 35S::AtGRDP2 construct in pMDC32 binary vector. RB, right border for T-DNA integration; 2 × 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; attB1 and attB2 sites for recombination; *AtGRDP2*, *A. thaliana* GRDP2 cDNA; nos T, nopaline synthase terminator region; HPTII, hygromycin resistance gene; LB, left border for T-DNA integration. (D) qRT-PCR expression levels of *AtGRDP2* in the Arabidopsis overexpression lines is represented as normalized fold change, and was calculated comparing the target gene expression with a control (Col-0), after normalization to the Arabidopsis *UBQ5* gene using the  $(2^{-\Delta\Delta Ct})$  method. (E) Relative gene expression levels of *AtGRDP2* gene in transgenic lettuce are presented as  $2^{-\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct_{AtGRDP2} - Ct_{LsUBQ5}$ . Bars represent mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) of two experimental replicates.

**Figure S4 | Chlorophyll and carotenoids content in WT and AtGRDP2 transgenic lettuce lines.** Lettuce plants of 30 (A), 60 (B) and, 90 day-old (C), were analyzed for chlorophyll a and b, and carotenoids content. The relation of chlorophyll a/b was calculated. Data are mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ) with the respective three technical replicates. Letters indicate significant differences between samples according to Tukey's multiple comparison tests at  $P < 0.05$ .

**Figure S5 | Putative auxin-responsive elements on AtGRDP2 promoter by using PLACE analysis.** Promoter of *AtGRDP2* (2000 bp) was analyzed in the PLACE database. In the schematic representation, ARFAT boxes (gray), and SURECOREATSULTR11 boxes (black), and its localization in bp are indicated.

## REFERENCES

- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim C. J., Chen, H., Shinn, P., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653–657. doi: 10.1126/science.1086391
- Bailey, T. L., and Elkan, C. (1994). "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers" in *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* (Menlo Park, CA: AAAI Press), 28–36.
- Berleth, T., and Sachs, T. (2001). Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 57–62. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00136-9
- Bocca, S. N., Magioli, C., Mangeon, A., Junqueira, R. M., Cardeal, V., and Margis, R. (2005). Survey of glycine rich proteins (GRPs) in the *Eucalyptus* expressed sequence tag database (ForEST). *Gen. Mol. Biol.* 28, 608–624. doi: 10.1590/S1415-47572005000400016
- Clough, S. J., and Bent, A. E. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743. doi: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x
- Condit, C. M. (1993). Developmental expression and localization of petunia glycine-rich protein 1. *Plant Cell* 5, 277–288. doi: 10.1105/tpc.5.3.277
- Curaba, J., Singh, M. B., and Bhalla, P. L. (2014). miRNAs in the crosstalk between phytohormone signaling pathways. *J. Exp. Bot.* 65, 1425–1438. doi: 10.1093/jxb/eru002
- Curtis, I. S., Power, J. B., Blackhall, N. W., de Laat, A. M. M., and Davey, M. R. (1994). Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.* 45, 1441–1449. doi: 10.1093/jxb/45.10.1441

- de Oliveira, D. E., Seurinck, J., Inzé, D., Van Montagu, M., and Botterman, J. (1990). Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* 2, 427–436. doi: 10.1105/tpc.2.5.427
- Du, H., Wu, N., Chang, Y., Li, X., Xiao, J., and Xiong, L. (2013). Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 83, 475–488. doi: 10.1007/s11103-013-0103-7
- Du, H., Wu, N., Fu, J., Wang, S., Li, X., Xiao, J., et al. (2012). A GH3 family member, *OsGH3-2*, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *J. Exp. Bot.* 63, 6467–6480. doi: 10.1093/jxb/ers300
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1555–1573. doi: 10.1104/pp.103.034736
- Guilfoyle, T. J., and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 453–460. doi: 10.1016/j.pbi.2007.08.014
- Hendry, G. A. F., and Price, A. H. (1993). “Stress indicators: chlorophylls and carotenoids” in *Methods in Comparative Plant Ecology*, eds G. A. F. Hendry and J. P. Grime (London: Chapman & Hall), 148–152.
- Hernández-Lucero, E., Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, M. A., and Jiménez-Bremont, J. F. (2014). Differential expression of genes for Tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 32, 318–327. doi: 10.1007/s11105-013-0642-8
- Hundertmark, M., and Hincha, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9:118. doi: 10.1186/1471-2164-9-118
- Kang, H., Park, S. J., and Kwak, K. J. (2013). Plant RNA chaperones in stress response. *Trends Plant Sci.* 18, 100–106. doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.004
- Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y., and Kim, S. Y. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14, 343–357. doi: 10.1105/tpc.010362
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3
- Keller, B., Sauer, N., and Lamb, C. J. (1988). Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7, 3625–3633.
- Kerbiriou, P. J., Stomph, T. J., Van Der Putten, P. E. L., Van Bueren, E. T. L., and Struik, P. C. (2013). Shoot growth, root growth and resource capture under limiting water and N supply for two cultivars of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Soil* 371, 281–297. doi: 10.1007/s11104-013-1672-6
- Kevei, Z., Seres, A., Kereszt, A., Kalo, P., Kiss, P., Tóth, G., et al. (2005). Significant microsynteny with new evolutionary highlights is detected between *Arabidopsis* and legume model plants despite the lack of macrosynteny. *Mol. Genet. Genomics* 274, 644–657. doi: 10.1007/s00438-005-0057-9
- Kim, D. H., Xu, Z. Y., and Hwang, I. (2013). *AtHSP17.8* overexpression in transgenic lettuce gives rise to dehydration and salt stress resistance phenotypes through modulation of ABA-mediated signaling. *Plant Cell Rep.* 32, 1953–1963. doi: 10.1007/s00299-013-1506-2
- Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C.-H., Ahn, S. J., Goh, C.-H., et al. (2007). Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant J.* 50, 439–451. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03057.x
- Kramer, E. M., and Bennett, M. J. (2006). Auxin transport: a field in flux. *Trends Plant Sci.* 11, 382–386. doi: 10.1016/j.tplants.2006.06.002
- Lim, P. O., Lee, I. C., Kim, J., Kim, H. J., Ryu, J. S., Woo, H. R., et al. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.* 61, 1419–1430. doi: 10.1093/jxb/erq010
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>[ $\Delta\Delta$ C(T)] method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Long, R., Yang, Q., Kang, J., Zhang, T., Wang, H., Li, M., et al. (2013). Overexpression of a novel salt stress-induced glycine-rich protein gene from alfalfa causes salt and ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 32, 1289–1298. doi: 10.1007/s00299-013-1443-0
- Lorković, Z. J., and Barta, A. (2002). Genomic analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 30, 623–635. doi: 10.1093/nar/30.3.623
- Ma, S., Gong, Q., and Bohnert, H. J. (2006). Dissecting salt stress pathways. *J. Exp. Bot.* 57, 1097–1107. doi: 10.1093/jxb/erj098
- Mangeon, A., Junqueira, R. M., and Sachetto-Martins, G. (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal. Behav.* 5, 99–104. doi: 10.4161/psb.5.2.10336
- Mangeon, A., Magioli, C., Menezes-Salgueiro, A. D., Cardeal, V., de Oliveira, C., and Galvao, V. C. (2009). AtGRP5, a vacuole-located glycine-rich protein involved in cell elongation. *Planta* 230, 253–265. doi: 10.1007/s00425-009-0940-4
- Martinez-Gonzalez, L., Rosales-Mendoza, S., Soria-Guerra, R. E., Moreno-Fierros, L., López-Revilla, R., Korban, S. S., et al. (2011). Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice. *CTOC* 107, 441–449. doi: 10.1007/s11240-011-9994-7
- Mayfield, J. A., and Preuss, D. (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat. Cell Biol.* 2, 128–130. doi: 10.1038/35000084
- Mousavi, A., and Hotta, Y. (2005). Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120, 169–174. doi: 10.1385/ABAB:120:3:169
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042
- Ortega-Amaro, M. A., Rodríguez-Kessler, M., Becerra-Flora, A., and Jiménez-Bremont, J. F. (2012). Modulation of *Arabidopsis* CYCB1 expression patterns by polyamines and salt stress. *Acta Physiol. Plant.* 34, 461–469. doi: 10.1007/s11738-011-0842-5
- Papov, I. A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J. A., et al. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1, 321–337. doi: 10.1093/mp/ssp021
- Reddy, A. S. N., and Poovaiyah, B. W. (1987). Accumulation of a glycine rich protein in auxin-deprived strawberry fruits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 885–891. doi: 10.1016/S0006-291X(87)80153-5
- Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, M. A., Delgado-Sánchez, P., Salinas, J., and Jiménez-Bremont, J. F. (2014). *AtGRDP1* gene encoding a Glycine-Rich Domain protein is involved in germination and responds to ABA signaling. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32, 303–316. doi: 10.1007/s11105-014-0714-4
- Roeder, A. H. K., and Yanofsky, M. F. (2006). “Fruit development in *Arabidopsis*,” in *The Arabidopsis Book*, eds S. C. Somerville and E. M. Myerowitz (Rockville: American Society of Plant Biologist), 1–50.
- Rubio-Somoza, I., and Weigel, D. (2013). Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three microRNAs. *PLoS Genet.* 9:e1003374. doi: 10.1371/journal.pgen.1003374
- Ryser, U., Schorderet, M., Zhao, G.-F., Studer, D., Ruel, K., Hauf, G., et al. (1997). Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J.* 12, 97–111. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.12010097.x
- Sachetto-Martins, G., Franco, L. O., and de Oliveira, D. E. (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochem. Biophys. Acta* 1492, 1–14. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00064-6
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., et al. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis* development. *Nat. Genet.* 37, 501–506. doi: 10.1038/ng1543
- Schwab, R., Ossowski, S., Rieger, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1121–1133. doi: 10.1105/tpc.105.039834
- Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Kejian Ding, K., and Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiol. Biochem.* 82, 209–217. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.06.008
- Streitner, C., Danisman, S., Wehrle, F., Schoning, J. C., Alfano, J. R., and Staiger, D. (2008). The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56, 239–250. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03591.x



- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11632–11637. doi: 10.1073/pnas.190309197
- Urbez, C., Cercós, M., Perez-Amador, M. A., and Juan Carbonell, J. (2006). Expression of *PsGRP1*, a novel glycine rich protein gene of *Pisum sativum*, is induced in developing fruit and seed and by ABA in pistil and root. *Planta* 223, 1292–1302. doi: 10.1007/s00425-005-0178-8
- Veerassamy, S., Smith, A., and Tillier, E. R. M. (2003). A transition probability model for amino acid substitutions from blocks. *J. Comput. Biol.* 10, 997–1010. doi: 10.1089/106652703322756195
- Wang, C., Zhang, D. W., Wang, Y. C., Zheng, L., and Yang, C. P. (2012). A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress. *Mol. Biol. Rep.* 39, 1047–1053. doi: 10.1007/s11033-011-0830-2
- Woodward, A. W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735. doi: 10.1093/aob/mci083
- Wu, M.-F., Tian, Q., and Reed, J. W. (2006). Arabidopsis *microRNA167* controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 133, 4211–4218. doi: 10.1242/dev.02602
- Yang, D. H., Kwak, K. J., Kim, M. K., Park, S. J., Yang, K.-Y., and Kang, H. (2014). Expression of Arabidopsis glycine-rich RNA-binding protein AtGRP2 or AtGRP7 improves grain yield of rice (*Oryza sativa*) under drought stress conditions. *Plant Sci.* 214, 106–112. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.006

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 03 September 2014; accepted: 17 December 2014; published online: 20 January 2015.

Citation: Ortega-Amaro MA, Rodríguez-Hernández AA, Rodríguez-Kessler M, Hernández-Lucero E, Rosales-Mendoza S, Ibáñez-Salazar A, Delgado-Sánchez P and Jiménez-Bremont JF (2015) Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 5:782. doi: 10.3389/fpls.2014.00782

This article was submitted to *Plant Physiology*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2015 Ortega-Amaro, Rodríguez-Hernández, Rodríguez-Kessler, Hernández-Lucero, Rosales-Mendoza, Ibáñez-Salazar, Delgado-Sánchez and Jiménez-Bremont. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## V. DISCUSION

Las plantas son organismos autótrofos de gran importancia para los seres vivos, que constantemente están afectadas por factores ambientales desfavorables. Al ser organismos inmóviles o sésiles no son capaces de escapar a los diferentes tipos de estrés biótico como abiótico, que afectan su crecimiento y desarrollo. Es por ello que han desarrollado múltiples mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos, que les permiten responder rápidamente y tolerar a diversas condiciones ambientales desfavorables o de estrés (Rao, 2006). Uno de los factores que afecta negativamente la productividad de los cultivos es la salinidad. Este problema, ha ido en aumento debido a las sequías, el uso de agua para el riego de mala calidad, la disminución de la humedad relativa, la radiación solar y las altas temperaturas (Hussain *et al.*, 2008). La tolerancia de las plantas a la salinidad involucra cambios en la expresión génica y en el metabolismo celular. Después de los mecanismos de percepción y de control transcripcional, se generan proteínas de respuesta a estrés, las cuales pueden reestablecer la homeostasis celular (Hirayama y Shinozaki, 2010; Wang, 2003). Dentro de estas proteínas de respuesta a estrés se han reportado proteínas de choque térmico, dehidrinas, proteínas transportadoras, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEAs), entre otras. Nuevos actores en la respuesta al estrés están siendo estudiados como las proteínas ricas en glicina (GRPs), las cuales son reguladas a nivel transcripcional bajo diversas condiciones de estrés y desarrollo (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

En este estudio, se describe por primera vez el gen *AtGRDP2* (At4g37900) de *Arabidopsis thaliana* que pertenece a la familia DUF1399-GRDP. El gen *AtGRDP2* codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas. La organización genómica del gen *AtGRDP2* consta de cinco exones y cinco intrones, donde uno de los intrones está localizado en la región 5'UTR. La proteína de 787 aminoácidos codificada por el gen *AtGRDP2*, presenta un Dominio de Función Desconocida DUF1399, un motivo putativo de unión a RNA (RNP) y un dominio

rico en glicinas (GRD). El dominio DUF1399 está localizado en el N-terminal de la proteína (97-239 aa). El motivo RNP está localizado en la región central, y está constituido por los aminoácidos KGSCFLPM, que es equivalente al motive RNP-1 presente en proteínas con actividad de chaperonas de RNA (Lorkovic and Barta, 2002). Hacia el extremo carboxilo se encuentra el dominio rico en glicinas (713-766 aa), el cual también contiene residuos de cisteína intercalados.

En el genoma de *Arabidopsis*, adicionalmente al gen *AtGRDP2* se identificaron tres proteínas que también contienen el dominio DUF1399. Mediante un alineamiento tipo Clustal W (EBI, European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) se encontró que dos de ellas, *At1g56230* and *At4g37682* no cuentan con los dominios RNP y GRD. La proteína codificada por el gen *At2g22660* (nombrada *AtGRDP1* por Rodríguez-Hernández, *et al.*, 2014) comparte los mismos dominios con *AtGRDP2*, y además presentó el porcentaje de identidad más alto (64%) con *AtGRDP2*. Una comparación filogenética con ortólogos a *AtGRDP2* reveló que los tres dominios están conservados y que la *AtGRDP2* se agrupa con las GRDPs de plantas dicotiledóneas. Mediante el programa MEME (Bailey and Elkan, 1994), se elucidó un consenso de glicinas [CG]GGGCGG[GC], que también lo poseen las proteínas ortólogas analizadas.

En un estudio transcripcional en Eucalipto se reportaron secuencias de EST que codifican para proteínas con un motivo rico en glicina corto (Bocca *et al.*, 2005). En nuestro grupo de investigación, Hernández-Lucero *et al.*, 2013 reportó la modulación bajo estrés salino del gen *PvGRDP1* de frijol, así mismo el estudio del gen ortólogo en *Arabidopsis*, demostró que *AtGRDP1*, es inducido bajo estrés abiótico, y además podría ser un nuevo actor en la ruta de señalización de la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014).

El análisis a nivel transcripcional demostró que el gen *AtGRDP2* se expresa en botón, flor y silicuas inmaduras, así como en hojas caulinares. Algunas GRPs de plantas han sido relacionadas con la expresión en órganos florales, tal es el caso de los transcritos de *AtGRP1* y *AtGRP2* (de Oliveira *et al.*, 1990). La proteína GRP17, posee un dominio de oleosina adicional al rico en glicinas, la cual es un componente del polen necesario para la hidratación y la polinización en

*Arabidopsis* (Mayfield y Preuss, 2000). Estos reportes sugieren que las GRPs están implicada en procesos de desarrollo de los órganos florales.

Las líneas de *Arabidopsis* y lechuga que sobreexpresan el gen *AtGRDP2* mostraron mayores tasas de crecimiento y desarrollo, en contraste con las líneas mutantes *Atgrdp2-1* y *amiR-1* que mostraron un fenotipo opuesto en crecimiento. Cabe mencionar que la línea sobreexpresante *35S::AtGRDP2-OE3* mostró las raíces primarias más desarrolladas y el mayor peso fresco, coincidiendo que fue la línea transgénica con los mayores niveles de transcrito del gen *AtGRDP2*. Para el tiempo de floración se encontró que las líneas sobreexpresantes de *AtGRDP2* florecieron antes que la línea parental, mientras que las líneas mutantes presentaron un retraso en la floración en comparación con la línea Col-0. Se han relacionado a algunas proteínas GRPs con el desarrollo, tal es el caso de la proteína de vacuola *AtGRP5*, que posiblemente promueve el proceso de elongación celular (Mangeon *et al.*, 2009). Al sobreexpresar *AtGRP5* en plantas de *Arabidopsis*, estas generan raíces y tallos más largos. Asimismo, *AtGRP7* (una proteína de unión a RNA) promueve la transición floral en *Arabidopsis* a través de la vía autónoma de floración (Streitner *et al.*, 2008).

Cuando se sobreexpresa el gen *AtGRDP2* es notoria la aceleración del crecimiento en las diferentes etapas del desarrollo, tanto en plantas de *Arabidopsis* como de lechuga. Por lo anterior, se propone una posible conexión del gen *AtGRDP2* con hormonas de crecimiento. Al cuantificar los niveles de la auxina ácido índol acético (IAA) en los diferentes fondos genéticos, se encontró que las líneas sobreexpresantes poseen mayores niveles de IAA, en cambio las líneas mutantes poseen niveles muy similares a la parental Col-0. Probablemente, la redundancia genética de estos genes que pertenecen a la familia DUF1399, principalmente el gen parálogo *AtGRDP1*, sea la causa por la que no se encontraron diferencias en el contenido de IAA. Aunado a esto, en un estudio a nivel transcripcional realizado por Goda *et al.*, 2004, se encontró que el gen *AtGRDP2* pertenece a un grupo de genes regulado por IAA. Además, al analizar la secuencia del promotor de *AtGRDP2* se encontraron cajas de respuesta a auxinas o sitios de unión a elementos ARFs y al someter la línea reportera

---

*AtGRDP2::GFP-GUS-1* a tratamientos con IAA se encontró que incrementa la señal del gen reportero GUS en la unión raíz-hipocotilo (collet) y en la zona de diferenciación de la raíz.

Los genes *miR167*, *ARF6* y *ARF8* forman parte de una red reguladora que es esencial para la maduración de los órganos florales y del desarrollo de las raíces en *Arabidopsis* (Curaba *et al.*, 2014). Al analizar la expresión de *ARF6* y *ARF8*, se encontró que estos genes están inducidos en la sobreexpresante *35S::AtGRDP2-OE3* pero reprimidos en el fondo mutante *Atgrdp2-1*. *miR167* es un regulador negativo de *ARF6* y *ARF8*, ya que la sobreexpresión de *miR167* mimetiza el fenotipo de retraso en floración producido por la doble mutante *arf6/arf8*- (Wu *et al.*, 2006; Rubio-Somoza y Weigel, 2013). Interesantemente, la expresión de *miR167* se encontró inducida en la mutante *Atgrdp2-1* y reprimida en la sobreexpresante *35S::AtGRDP2-OE3*, con estos datos podemos inferir que el fenotipo de floración tardía en la mutante podría deberse en parte a los patrones de expresión encontrados en estos tres genes. El gen *AUX1* codifica para una proteína transportadora involucrada en el transporte polar de auxinas (Kramer y Bennett, 2006; Paponov *et al.*, 2008). Al analizar el patrón de expresión de *AUX1*, se encontró que en la línea sobreexpresante *35S::AtGRDP2-OE3*, *AUX1* esta inducido en comparación con Col-0 y la mutante, sugiriendo que existe una entrada mayor de auxina a la célula.

Nuestros datos demuestran que la líneas sobreexpresantes *35S::AtGRDP2* contienen niveles altos de ácido índol acético y además son más tolerantes a estrés salino. En este sentido, se ha reportado una relación entre la respuesta al estrés abiótico y la vía de señalización de auxinas (Du *et al.*, 2012, 2013). Por el contrario las líneas mutantes, *Atgrdp2-1* y *amiR-1* son más sensibles al estrés salino. Datos de un microarreglo hecho en la raíz de *Arabidopsis* bajo estrés salino, muestran que el gen *AtGRDP2* es inducido en esta condición (Ma *et al.*, 2006). Recientemente, en frijol un análisis de expresión del gen *PvGRDP1*, ortólogo al gen *AtGRDP2*, se encontró que bajo condiciones salinas los niveles de transcrito eran modulados en hojas y en tallo dependiendo del tiempo de estrés (Hernández-Lucero *et al.*, 2014). Respecto al gen parólogo *AtGRDP1*, Rodríguez-

Hernández *et al.*, 2014 reportaron que su expresión es modulada por varios tipos de estrés abiótico, incluyendo el estrés salino. En este sentido, un análisis de RT-PCR en plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad sometidas a 150 mM de NaCl, muestran que la expresión del gen *AtGRDP2* aumenta a las 24 h de tratamiento en raíz, mientras que en la parte aérea desde las 6 hasta las 48 h se ve una clara inducción (datos no mostrados). Las líneas mutante *Atgrdp2-1* y sobreexpresante *35S::AtGRDP2-OE3* se sometieron a un estrés salino para analizar la expresión de algunos genes que responden a estrés abiótico, como el factor de transcripción ABF4 (ABRE Binding Factor 4), EM6 (LEA-1) y RD29B (Responsive to Desiccation 29B). En general se encontró que los genes en el fondo mutante se encuentran reprimidos aun cuando están en condiciones de estrés, lo contrario para la línea sobreexpresante donde los niveles de transcrito son superiores a los encontrados en el fondo silvestre (Col-0). En relación con lo anterior, cuando se aumenta la concentración de IAA, se modula positivamente la expresión de genes de respuesta a estrés como *RAB18*, *RD22*, *RD29A*, *RD29B*, *DREB2A* y *DREB2B* (Shi *et al.*, 2014). Respecto al análisis del transcrito de *ARF2* en los diferentes fondos genéticos de *AtGRDP2* se encontró que está ligeramente reprimido en la sobreexpresante *35S::AtGRDP2-OE3*, este resultado sugiere una relación con la tolerancia al estrés, ya que mutantes *arf2-* son más resistentes al estrés oxidativo y tienen un retraso en la senescencia (Lim *et al.*, 2010).

Las GRPs que contienen motivos de unión a RNA (RRM) pueden ser moduladas por estrés abiótico (Kang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Por ejemplo, la proteína GRP2 tiene un papel importante en la tolerancia a estrés salino y por frío durante la germinación y el desarrollo de *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2007). En plantas de tabaco al sobreexpresar una GRP de *Limonium bicolor* las plantas se vuelven tolerantes a tratamientos salinos, debido al aumento de la actividad superóxido dismutasa y catalasa así como la acumulación de prolina (Wang *et al.*, 2012). De igual manera, la sobreexpresión de *AtGRP2* y *AtGRP7* en plantas de arroz confiere tolerancia al estrés por sequía (Yang *et al.*, 2014).

El análisis de la actividad de unión a RNA de la proteína GRP2 en la cepa de *E. coli* BX04, sugiere que esta proteína tiene una actividad de chaperona de RNA

durante el proceso de adaptación al estrés por frío (Kim *et al.*, 2007). Ensayos de actividad de la proteína AtGRDP1 demostraron que posee actividad de chaperona de RNA al complementar la mutante de *E. coli* BX04 (*datos no publicados*), en contraste, una versión trunca de la proteína (sin dominio rico en glicinas) no posee esta actividad. Para la proteína AtGRDP2 ensayos de actividad de unión a RNA serán muy valiosos para descifrar si esta proteína también tiene esa actividad.

El fenotipo encontrado al sobreexpresar el gen *AtGRDP2* en lechuga resulta interesante ya que las plantas se desarrollan más rápido y toleran el estrés salino. Este cultivo es de alto valor comercial a nivel mundial, pero es susceptible a la deshidratación y al estrés salino (Martínez-González *et al.*, 2011; Kerbiriou *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013), siendo las líneas sobreexpresantes una alternativa para la alta demanda del cultivo así como la mejora a la tolerancia al estrés abiótico.

En conclusión, los resultados presentados demuestran que la sobreexpresión del gen *AtGRDP2* acelera el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* y de lechuga, posiblemente a través de un mecanismo dependiente de auxinas. Se demostró que la desregulación del gen *AtGRDP2*, afecta los niveles transcripcionales de genes relacionados con la vía de auxinas así como de respuesta a estrés abiótico, lo que genera un retraso o aceleración de procesos como la floración y el desarrollo de las plantas.

---

**VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Ambrosone A., Costa A., Leone A., Grillo S. (2012) Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. *Plant Sci.* 182:12-18.
- Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L (2002) Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res.* 30:1427-64.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2006) RNA granules. *J. Cell Biol.* 172:803-808.
- Brion, P., Westhof, E. (1997) Hierarchy and dynamics of RNA folding *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26,113-137.
- Brownelland P.F., Crossland C.J. (1972) The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 49, 794-797.
- C.M.J.Pieterse,P.vanWest,H.M.Verbakel,P.W.H.M.Brasse; G.C.M. van der Berg-Velthuis, F. Govers, *Gene* 138 (1994) 67^77.
- Condit, C.M., Meagher, R.B. (1986) A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* 323, 178-181.
- Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6025-6030.
- Gòmez, J., Sanchez-Martíner, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puig-domenech, P., and Pages, M. (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334:262-264.
- Hernandez-Lucero, E., Rodriguez-Hernandez, A.A., Ortega-Amaro, M.A. and Jimenez-Bremont, J.F. (2014) Differential expression of genes for Tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 32:318-327.



- J.S. Kim, H.J. Jung, H.J. Lee, K.A. Kim, C.-H. Goh, Y. Woo, S.H. Oh, Y.S. Han, H. Kang (2008) Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55:455-466.
- Keller, B., Sauer, N., and Lamb, C.J. (1988) Glycine-rich cell wall proteins in bean: Gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7:3625-3633.
- Kwak KJ, Kim YO, Kang H. (2005) Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration or cold stress. *J Exp Bot.* 56:3007-16.
- Ludwig-Müller J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62:1757-1773.
- Mano, Y., Nemoto, K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, Page 1 of 20 doi:10.1093/jxb/ers091.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T. *et al.* (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108:18512-18517.
- Mayfield JA, Preuss D. (2000) Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat Cell Biol.* 2:128-30.
- Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment.* 25:239-250.
- Munns R. y Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-81.
- Nyiko´ T., Farkas Kere´nyi1, Levente Szabadkai1, Anna H. Benkovics1, Pe´ter Major1, Bogla´rka Sonkoly1, Zsuzsanna Me´rai1,2,3, Endre Barta1, Emilia Niemiec4, Joanna Kufel4 and Da´niel Silhavy (2013) Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex
- Pena S.D.J., Macedo A.M., Braga V.M.M., Rumjanek F.D., Simpson A.J.G., (1990) *Nucleic Acids Res.* 18 7466.

- Raven, J.A. (1975) Transport of indole acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol.* 74:163-172.
- Sathiyamoorthy P., Shanmugasundaram S. (1996) Preparation of cyanobacterial peptide toxin as a biopesticide against cotton pests. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 46:511-513.
- Schüttpelz M, Schoning JC, Doose S, Neuweiler H, Peters E, Staiger D, et al. (2008) Changes in conformational dynamics of mRNA upon AtGRP7 binding studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 130:9507-13.
- Semrad, K. and Schroeder, R. (1998) A ribosomal function is necessary for efficient splicing of the T4 phage thymidylate synthase intron in vivo *Genes Dev.* 12:1327-1337.
- Skirycz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, Andriankaja M, Van Aken O, Van Breusegem F, Fernie AR, Inzé D: (2010) Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol.* 152:226-244.
- Skirycz, A. y Inzé, D. (2010) More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* 21:197-203.
- Taiz L. y E. Zeiger. (2002) *Plant Physiology.* 3rd Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, MA. U.S.A
- van Kan, J.A.L., Cornelissen, B.J.C., and BOI, J.F. (1988). A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:107-112.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperature towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.

- Weber, C., Nover, L., and Fauth, M. (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* 56: 517-530.
- West, G., Inzé, D., Gerrit T.S. Beemster, G.T.S (2004) Cell Cycle Modulation in the Response of the Primary Root of Arabidopsis to Salt Stress. *Plant Physiol.* 135:1050-1058.
- Woloshen, V., Huang, S., and Li, X. (2011). RNA-binding proteins in plant immunity *J. Pathog.* 2011:278697.
- Xu, J., and Chua, N.H. (2011). Processing bodies and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:88-93.
- Y. Kim, S.J. Park, B. Jang, C.-H. Jung, S.J. Ahn, C.-H. Goh, K. Cho, O. Han, H. Kang (2007) Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in Arabidopsis thaliana under abiotic stress conditions, *Plant J.* 50:439-451.
- Zhao, Y. (2014) Auxin Biosynthesis. The Arabidopsis Book © 2014 American Society of Plant Biologists
- Zhu, J.-K. (2007). Plant Salt Stress: John Wiley & Sons, L

---

## VII. ANEXOS

### **ANEXO 1. Expresión transitoria del gen *AtGRDP2* de *A. thaliana* en raíces de frijol**

Con el fin de examinar la posible función del gen *AtGRDP2* de *A. thaliana* en el desarrollo y la respuesta al estrés salino en frijol, se generaron plantas compuestas de frijol (raíces transgénicas) mediante la transformación con la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* K599, la cual induce la producción de un nuevo set de raíces peludas (Hairy-roots) que sobreexpresan el gen de interés (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

La cepa de *A. rhizogenes* K599 y la cepa de *A. rhizogenes* transformada con el vector pMDC32-*AtGRDP2* fueron utilizadas para inducir la formación de raíces transgénicas en las plántulas de frijol de la variedad negro Jamapa. En la figura X se observa que las plantas de frijol que sobreexpresan el gen *AtGRDP2* de *A. thaliana* en las raíces transgénicas presentan mayor peso seco en raíz y en parte aérea (principalmente en la raíz) que las plantas control de frijol con raíces peludas (transformadas solo con la cepa K599). Interesantemente, se observo que las plantas de frijol con raíces que sobreexpresan el gen *AtGRDP2* de *A. thaliana* presentan raíces más crecidas y desarrolladas, logrando un peso de casi 3 veces mayor a los controles de plantas de frijol compuestas que no sobreexpresan el gen *AtGRDP2*.

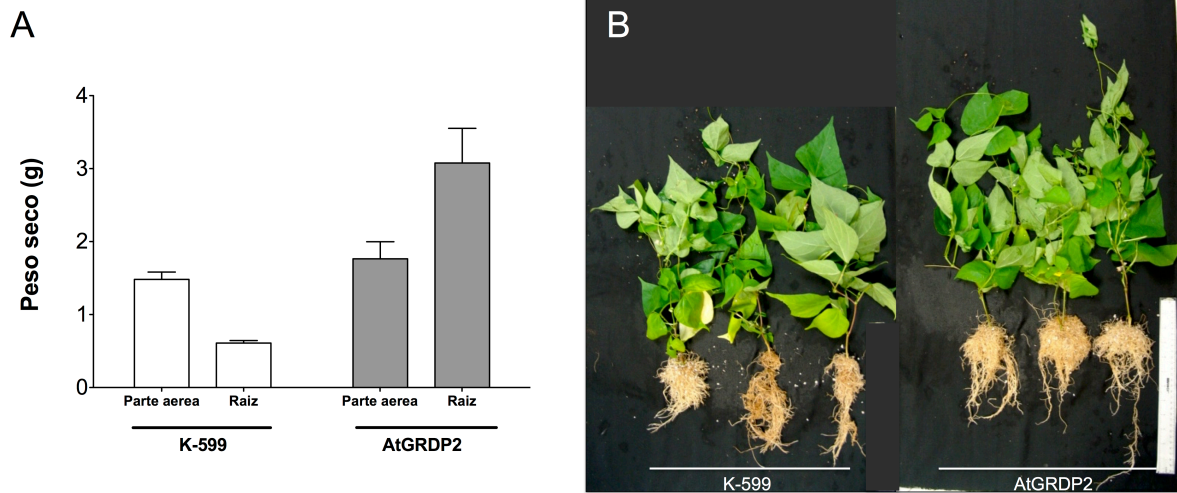


Figura 5. Transformación transitoria de frijol con la cepa de *A. rhizogenes* K-599 y con *A. rhizogenes*-AtGRDP2. A. Grafica de peso seco separando los datos de raíz y parte aérea (n=3), las barras corresponden al error estándar. B Imagen del experimento, donde el control *A. rhizogenes* K599 es comparado con las plantas que contienen el gen *AtGRDP2* (*A. rhizogenes* K599 ORF *AtGRDP2*).

Una vez generadas las raíces transgénicas se procedió a someter las plantas a un estrés salino gradual iniciando con 10 días a 150 mM de NaCl y seguido de 7 días con 200 mM de NaCl. Al final del tratamiento se procedió a medir el peso seco de las plantas. Los datos demuestran que las plantas que sobreexpresan el gen *AtGRDP2* poseen mayor peso seco tanto en raíz como en parte aérea en comparación con las plantas transformadas solo con la cepa de *A. rhizogenes* K-599 (Figura X)

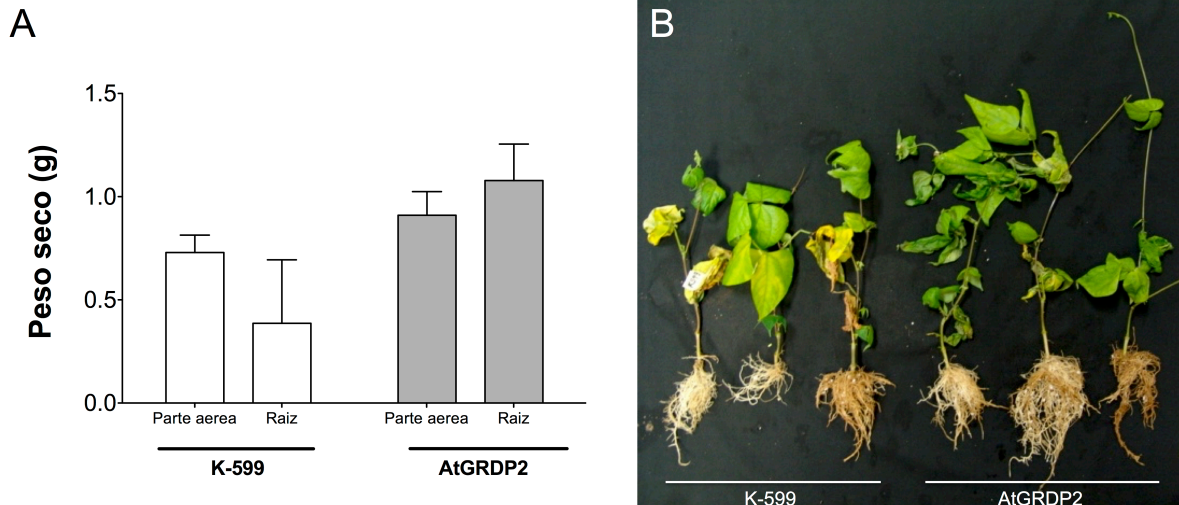


Figura 6 Ensayo de salinidad utilizando plantas compuestas de frijol que expresan el gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis*. Se utilizo la variedad de frijol Negro Jamapa y al cabo de 7 días de la inducción de las hairy roots se procedió a evaluar las plantas bajo estrés salino gradual, iniciando con 150mM de NaCl por 10 días seguido de 200mM de NaCl por 7 días. A. Grafica de peso seco correspondiente al experimento bajo estrés salino gradual separando los datos de raíz y parte aérea (n=3), las barras corresponden al error estándar. B Imagen tomada al final del experimento, donde el control *A. rhizogenes* K599 es comparado con las plantas que contienen el gen *AtGRDP2* (*A. rhizogenes* K599 ORF *AtGRDP2*).

Los resultados anteriores sugieren que la sobreexpresión de *AtGRDP2* tiene un posible papel no solo bajo estrés salino sino también en el desarrollo y crecimiento de la raíces de plantas, siendo un buen candidato para la transformación de plantas de interés comercial.

## **ANEXO 2. MATERIALES Y METODOS**

### **MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

#### ***Arabidopsis thaliana***

Para las líneas de *Arabidopsis thaliana* caracterizadas (mutante *Atgrdp2-1*) y generadas (knockdown *amiR* y sobreexpresantes *35S::AtGRDP2*) en este trabajo se utilizó el ecotipo Columbia 0 (Col-0). La línea mutante insercional Sail\_387D04 para el gen *AtGRDP2* fue adquirida del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), de la Universidad del Estado de Ohio. Las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas con una solución de cloro al 40% por 5 min, y lavadas seis veces con agua destilada estéril. Se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS 0.5X (Murashige y Skoog, 1962), con un pH 5.7, 1.5% de sacarosa (p/v) y 1.2% de agar (p/v). La vernalización fue por 2 días a 4°C. Posteriormente, se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de luz de 16 horas. (13,000 luxes) y oscuridad de 8 horas., a una temperatura de 22 ± 2°C. Para el crecimiento en maceta, se utilizó la mezcla de Sunshine Mix#3 con vermiculita y perlita en una proporción 3:1:1, bajo las condiciones controladas mencionadas anteriormente.

#### ***Lactuca sativa***

Para la generación de plantas transgénicas de lechuga que sobreexpresan el gen *AtGRDP2* se trabajó con la variedad Green Wave (Takii Seed Co. Ltd., Japan). Las semillas fueron esterilizadas con una solución de cloro al 20% por 10 min, y lavadas seis veces con agua destilada estéril. Se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS 0.5X. La vernalización fue por 2 días a 4°C. Posteriormente, se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de luz de 16 horas y oscuridad de 8 horas, a una temperatura de 22 ± 1°C. Para el crecimiento en maceta, se utilizó la mezcla de Sunshine Mix#3, bajo las condiciones controladas mencionadas anteriormente.

### ***Phaseolus vulgaris***

La variedad negro Jamapa de frijol fue utilizada para la inducción de “raíces peludas” (hairy roots) en este estudio. Las semillas de frijol fueron esterilizadas con etanol al 100% durante 1 min, después de un lavado con agua estéril se trataron con hipoclorito de sodio al 50% durante 10 min, en agitación constante y lavadas 5 veces con agua destilada estéril. La germinación se llevo a cabo en charolas conteniendo papel húmedo y cubiertas de la luz por dos días. Los germinados se transfirieron a macetas de plástico que contenían la mezcla de Sunshine Mix #3, y se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de luz de 16 horas y oscuridad de 8 horas, a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## **MICROORGANISMOS**

### ***Escherichia coli***

La cepa Top 10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) se utilizó para clonar y replicar plásmidos con alto número de copias de manera estable. El crecimiento de esta cepa fue en el medio Luria Bertani (LB) compuesto de: 1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) de NaCl y 1.5% agar grado bacteriológico (para el caso de cultivo sólido). La generación de células competentes se realizo mediante el método de cloruro de calcio (CITA). La transformación de las células competentes se realizo mediante choque térmico (CITA). Después de la selección en el antibiótico correspondiente para cada vector se realizo la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly 1979).

### ***Agrobacterium tumefaciens***

Se empleó la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 (Deblaere *et al.*, 1985) para la transformación estable de plantas de Arabidopsis. Se prepararon células competentes *A. tumefaciens* para su posterior transformación por electroporación. La selección de colonias transformantes se realizo en placas de medio LB, conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de rifampicina y el antibiótico específico para la selección del plásmido de interés. Las placas fueron incubadas



por 2 días a 28°C.

### ***Agrobacterium rhizogenes***

Para la transformación transitoria de raíces de frijol se utilizo la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* K-599 (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Para transformar el vector pMDC32-ORF37 mediante electroporación se preparon células competentes de la cepa. La selección de colonias transformantes se realizo en placas de medio LB, conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Las placas fueron incubadas por 2 días a 28°C.

## **METODOS DE TRANSFORMACION DE PLANTAS**

### ***Arabidopsis thaliana***

La transformación genética de *A. thaliana* se realizo empleando el método de inmersión floral descrito por Zhang y col. (2006). Se preparo la solución de transformación con la cepa de *A. tumefaciens* a una densidad óptica (OD) de 0.6, medio MS y 70 ul de Silwett L-77. En maceta se crecieron 16 plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 durante 6 semanas aproximadamente, hasta el desarrollo de botones florales. El método de inmersión, consiste en sumergir las plantas en la solución de transformación de *A. tumefaciens* durante 15 segundos, enseguida se colocan de manera horizontal y en obscuridad por 1 día. Transcurrido este tiempo, las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento con condiciones de luz y temperatura controladas hasta la obtención de semillas.

### ***Lactuca sativa***

Las plantas de lechuga transgénicas para el gen *AtGRDP2* se generaron mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo el método descrito por Curtis y cols. (2006), con algunas modificaciones. Las semillas de lechuga se germinaron en medio MS 1X bajo condiciones asépticas hasta obtener plántulas de 7 días. Los cotiledones fueron cortados y se hirieron con un bisturí para sumergirlos en una suspensión de la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* transformado con el vector pMDC32-*AtGRDP2*, durante 10 minutos.

Los cotiledones se co-cultivaron durante 2 días en medio MS 1X suplementado con 0.05 mg/L de ácido naftalenacético (NAA), 0.25 mg/l de cinetina, 2 mg/L de ácido 4-diclorofenoxiacético y 2 g/L de caseína. Después los explantes se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en el medio de selección 1 durante 30 días (MS 1X suplementado con 1 mg/l de NAA, 0.5 mg/L de 6-benciladenina (BA), 50 mg/L de higromicina y 500 mg/L de cefotaxima. Los explantes se transfirieron al medio de selección 2 (MS 1X suplementado con 0.05 mg/l de NAA, 0.2 mg/L de BA, 50 mg/L de higromicina y 250 mg/L de cefotaxima), se subcultivaron dos veces cada 30 días y los tejidos resistentes a higromicina se transfirieron al medio de enraizamiento (MS 1X suplementado con 50 mg/L de higromicina y 250 mg/L de cefotaxima). Después del proceso de regeneración las plántulas se transplantaron a maceta y se incubaron en una cámara de crecimiento (16 horas de luz y 8 horas de obscuridad, a una temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) hasta obtener semilla. Generaciones posteriores fueron seleccionadas en medio MS 1X suplementado con 50 mg/L de higromicina. Se obtuvieron nueve líneas transgénicas y se realizó el ensayo de PCR para confirmar la inserción del transgén en las generaciones T1, T2 y T3. Las semillas homocigotas de tres líneas (*35S::AtGRDP2-Ls1*, *-Ls5* y *-LS9*) fueron utilizadas para los análisis posteriores.

### ***Phaseolus vulgaris***

Para la transformación transitoria y producción de raíces peludas (hairy roots) en plantas de frijol, se utilizó el método descrito por Estrada-Navarrete y cols. (2006). Se utilizó la cepa de *A. rhizogenes* K-599 transformada con el vector *pMDC32-AtGRDP2*. Se trasplantaron germinados de frijol a maceta, después de 5 días a cada planta se le inocularon aproximadamente 5-10  $\mu\text{l}$  de *A. rhizogenes* K-599, mediante inyección directamente en los nodos cotiledonarios, asegurando que la aguja cruzara los haces vasculares. Las plantas aproximadamente a los 7 días comenzaron a mostrar síntomas de tumores, y al cabo de 12 días de nuevas raíces peludas en el sitio de inoculación. La raíz primaria fue cortada hasta 1 cm por debajo del sitio de infección, y las plantas con las raíces inducidas fueron transferidas a macetas con un sistema semi-hidroponico (sustrato arena/perlita

3:1, sub-irrigado con la solución nutritiva de Hoagland 0.5X), se cubrieron con bolsas de plástico para mantener la humedad y facilitar la aclimatación en la cámara de crecimiento (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). La cubierta de plástico fue removida después de 4 días. Las plantas fueron irrigadas con una solución de Hoagland 0.5X (Hoagland y Arnon, 1950) cada 3 días, en la tabla X se describe la composición de la solución stock de Hoagland 1X.

Solución	Contenido	Para 1 L de Hoagland 1X
A	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M	1 ml
B	$\text{KNO}_3$ 1M	6 ml
C	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	4 ml
D	$\text{MgSO}_4$ 1M	2 ml
Micronutrientes	*	1 ml
Solución de Hierro	**	0.25 ml

TABLA 1. Composición de la solución de Hoagland 1X

\*Micronutrientes, 1 L de solución stock contiene:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2.86 mg),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.81 mg),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.22 mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.08 mg),  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.02 mg).

\*\* Solución stock de hierro:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.089 M o bien equivalente al 2.5%), EDTA (0.07 M), pH 7.1. La preparación original de Hoagland contenía 1 mL de solución de tartrato de hierro al 5%, a diferencia de la empleada que contiene sulfato de hierro al 2.5%.

## VECTORES

### Vector de entrada *pCR8/GW/TOPO*

Plásmido bacteriano que facilita la clonación de productos de PCR en un solo paso (TOPO® Cloning) y además mediante la tecnología Gateway® se pueden transferir clonas a un vector destino del mismo sistema, por medio de los sitios de recombinación *attL1* y *attL2i*, para poder expresar un gen de interés. En este caso, se amplificó el ORF completo del gen *AtGRDP2* que consta de 2460 pb. Además, posee un tamaño de 2,817 pb, contiene un sitio pUC *ORI* para su autoreplicación,

y un cassette de resistencia a espectinomicina (50 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para determinar la orientación del inserto, las clonas pueden ser fácilmente secuenciadas ya que contiene sitios de unión a oligonucleótidos específicos localizados flanqueando el producto de clonación (Figura X). La ligación del producto de PCR en el vector *pCR8/GW/TOPO* se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, la reacción se incubó toda la noche a temperatura ambiente, para ser transformados 2 µl de reacción en células de competentes de *E. coli* y amplificar el plásmido.

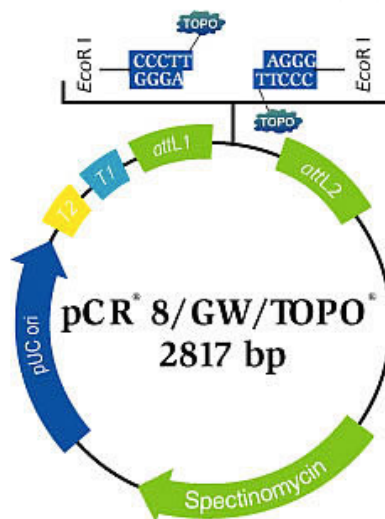


Figura 7. Mapa de vector *pCR8/GW/TOPO*

### Vector destino *pMDC32*

Plásmido de origen bacteriano con un tamaño de 11,752 pb, este vector es utilizado como vector destino ya que contiene el promotor viral 35S de CaMV (virus cauliflower mosaic) por lo que es utilizado para la sobreexpresión de genes en plantas, además contiene los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* por medio de los cuales se permite la previa recombinación con un vector de entrada. El ORF del gen *AtGRDP2* clonado en el vector de entrada *pCR8/GW/TOPO* fue utilizado para la recombinación con el vector *pMDC32* que contiene los sitios *attR1* y *attR2*. Para la selección de recombinantes este vector contiene un cassette de resistencia a kanamicina (50 µg/ml) y otro a higromicina (50 µg/ml), este último permite la selección de plantas transformadas por medio de *Agrobacterium*

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

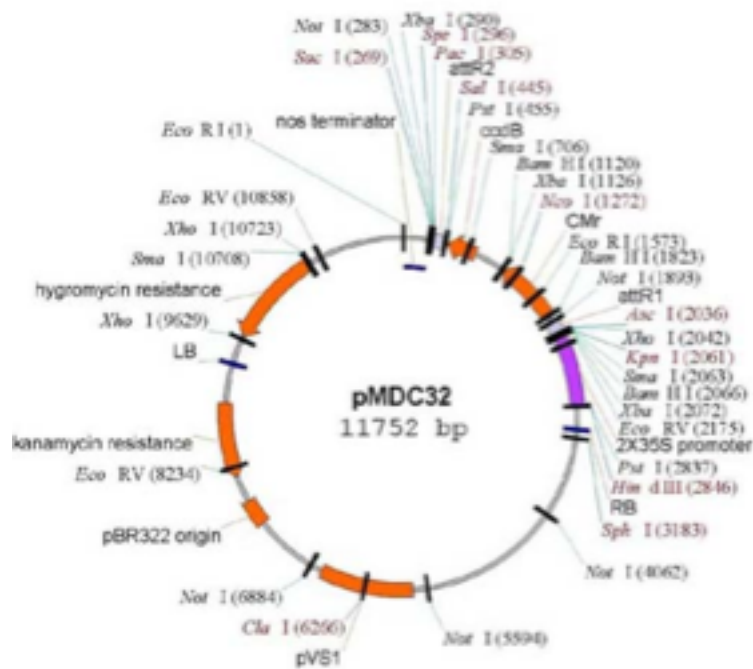


Figura 8. Mapa de vector destino *pCMD32*.

### Vector destino pKGWFS7

Plásmido utilizado para fusionar el gen reportero GUS-GFP al promotor del gen *AtGRDP2*. Para esta fusión, se extrajo DNA de *Arabidopsis* mediante el método de CTAB, posteriormente se amplificó mediante PCR 2000 pb río arriba del ATG del gen *AtGRDP2*, y el fragmento se clonó en el vector *pCR8/GW/TOPO*. Esta construcción fue recombinada al vector pKGWFS7 que contiene los sitios *attR1* y *attR2*. Para la selección de recombinantes este vector contiene un cassette de resistencia a espectinomicina (100 µg/ml) y otro a kanamicina (50 µg/ml), este último permite la selección de plantas transformadas por medio de *Agrobacterium* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

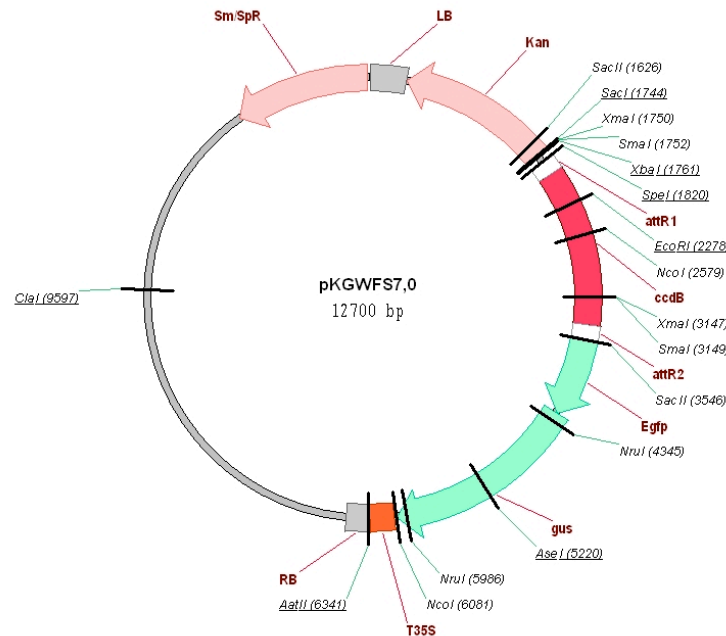


Figura 9. Mapa de vector destino *pKGWFS7*.

## Recombinación

Para la reacción de recombinación, esta se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), por lo que se agregó 1  $\mu$ l (100-300 ng/ $\mu$ l) de vector de entrada (*pCR8/GW-TOPO*), 1  $\mu$ l (150 ng/ $\mu$ L) de vector destino (*pMDC32* o *pKGWFS7*), 2  $\mu$ l de buffer 5X LR clonasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2  $\mu$ l LR clonasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) adicionando agua miliQ para un volumen total de 20  $\mu$ l. Se incubó la reacción por 4 h a temperatura ambiente para posteriormente transformar en células electrocompetentes de *E.coli*.

## ANALISIS MEDIANTE qRT-PCR

Para analizar los niveles de expresión del gen *AtGRDP2* en las líneas generadas en este trabajo, así como la expresión de genes en respuesta a estrés y relacionados con la vía de auxinas, se extrajo el RNA total de las plántulas de *Arabidopsis* de las diferentes líneas generadas utilizando el reactivo Concert® (Invitrogen). En seguida, para eliminar el DNA contaminante el RNA total fue tratado con DNasa I (Invitrogen) y cuantificado en un espectrómetro NanoDrop

ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies). Los experimentos de tiempo real de RT-PCR se realizaron en una mezcla de 10  $\mu$ l de reacción compuesta de 5  $\mu$ l del Mix RT.PCR Power SYBR® Green (2x), 200 nM de cada oligonucleótido, 50 ng de RNA y 0.08  $\mu$ L del Mix de Enzima RT (125X) de StepOne RT-PCR, siguiendo las sugerencias del fabricante (Applied Biosystems) y usando el Sistema de Detección StepOne Real-Time PCR y el Software v2.1 StepOne (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos consistieron de 30 min a 48 °C (síntesis de cDNA), 10 minutos a 95 °C (activación de AmpliTaq Gold® ADN polimerasa) seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturalización, y de alineamiento y extensión de 1 min a 60 °C.

### **EXPERIMENTO *IN VITRO* DE ESTRÉS SALINO**

Semillas previamente esterilizadas y sincronizadas a 4°C por dos días , de la línea parental Col-0, las líneas mutante y sobreexpresantes del gen *AtGRDP2*, fueron esterilizadas y sembradas en medio MS 0.5x, para después ser incubadas por 15 días en una cámara de crecimiento con condiciones de luz y temperatura controlada. Seguido de esto, las plántulas de *Arabidopsis* fueron transferidas a cajas con medio MS 0.5x suplementado con 150 mM de NaCl. A los 7 días de estrés se evaluó el daño producido por la sal midiendo la raíz principal, el peso fresco y comparando el fenotipo de desarrollo de las líneas mutantes con la línea parental y con el medio MS control. Posteriormente, estas plántulas fueron transferidas a tierra estéril para al cabo de una semana evaluar el porcentaje de sobrevivencia de cada línea.

Semillas de lechuga fueron previamente esterilizadas y sincronizadas por días a 4°C, fueron sembradas en medio MS 0.5x suplementado con 150 mM de NaCl, al cabo de 21 días se evaluó el daño producido por la sal midiendo la raíz principal, el peso fresco y comparando el fenotipo de desarrollo de las líneas mutantes con la línea parental y con el medio MS control.

### **ENSAYO DE RECUPERACIÓN**

Para analizar el grado de supervivencia posterior al tratamiento salino, las

líneas mutantes y sobreexpresantes del gen *AtGRDP2* y ecotipo Col-0 se trasplantaron en maceta. Para ello se preparó sustrato hortícola en una proporción de vermiculita, perlita y peat moss (Sunshine mix #3) en relación 1:1:3, respectivamente. Las condiciones de crecimiento fue un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 22°C, una intensidad de luz de 3,000 luxes y una humedad relativa del 50% hasta alcanzar 7 días en esta condición. Pasado este tiempo se cuantificó el porcentaje de recuperación.

### **ANALISIS HISTOQUIMICO DE GUS**

Para el análisis histoquímico de la actividad de GUS (Jefferson, 1987), las plántulas de *Arabidopsis* después del tratamiento correspondiente con IAA fueron incubadas a 37°C toda la noche con el buffer de reacción para GUS (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucuronidasa 0.5 mg/mL en fosfato de sodio 100 mM, pH 7). Posteriormente, fueron sometidas a un proceso de aclaración de tejido según lo descrito por Malamy y Benfey (1997). Para cada línea y cada tratamiento se utilizaron al menos 10 plántulas. Las imágenes fueron generadas empleando los microscopios MOTIC modelo BA-300, LEICA modelo CH-9435 y en un estereoscopio MOTIC modelo SM2-168, y procesadas mediante el software MOTIC versión 4.0.

### **ESTIMACION DE ACIDO INDOL ACETICO**

Para obtener el extracto vegetal, 1 g de plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron trituradas con nitrógeno líquido, después se les agrego metanol al 80% y se incubaron a 4°C toda la noche. Después el extracto fue metilado mediante la adición de 1.3  $\mu$ l de trimetildiazometano e incubado por 30 min. a temperatura ambiente. En seguida, la muestras y el estándar de ácido indol acético (IAA) fueron procesados de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Phytodetek<sup>®</sup> IAA Test Kit, Agdia, USA). El estándar de IAA fue diluido de manera serial (5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78 y 0 picomoles/ml de IAA) y las muestras se diluyeron 1:20, y se añadieron 100  $\mu$ l en cada pozo de la placa de ELISA. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas BioTek ELx800 y se calculo



la concentración de IAA de las muestras basándose en un curva estándar (n=3). La curva estándar y los extractos vegetales se analizaron por triplicado con dos replicas biológicas obteniendo resultados similares.

### **CONTENIDO DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES**

Plantas de lechuga de 30, 60 y 90 días fueron utilizadas para estimar la concentración de clorofilas a, b y total, así como los carotenoides. Para cada determinación, de cada línea se tomaron 3 discos de una hoja. Los pigmentos fueron extraídos de acuerdo al procedimiento descrito por Hendry y Price (1993). Las muestras con un peso fresco entre 50 a 100 mg fueron colocadas en tubos eppendorf protegidas de la luz, después el tejido fue triturado con 1 ml de una solución fría de acetona al 80%. Los extractos fueron centrifugados a 3000 g por 2 min y el sobrenadante se paso a un tubo eppendorf limpio. Se midió la absorbancia de las sobrenadantes a 645 y 663 nm para las clorofilas a y b, para los carotenoides se utilizo la absorbancia a 470 nm, en un espectrómetro Thermo Scientific®, Modelo Spectronic Genesys 10 Bio.