



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Caracterización funcional del gen *AtGRDP1*  
durante el crecimiento y desarrollo de  
*Arabidopsis thaliana***

Tesis que presenta

**Carlos Vladimir Muro Medina**

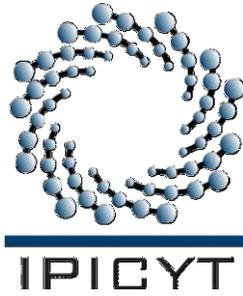
Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto 2014



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización funcional del gen *AtGRDP1* durante el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana***” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Carlos Vladimir Muro Medina** y aprobada el **12 de Agosto de 2014** 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 Jiménez Bremont

Director de la tesis

---

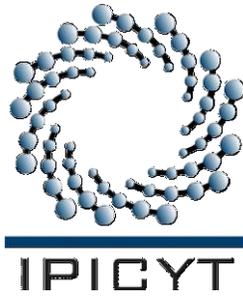
Dra. Martha Leticia Santos Martínez

Comité Tutorial

---

Dr. Samuel Lara González

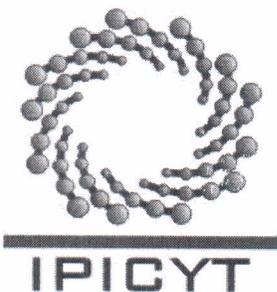
Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Estudios Moleculares de Respuesta a Estrés en Plantas, de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 490410) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# 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 120 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de septiembre del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Carlos Vladimir Muro Medina**

sobre la Tesis intitulada:

***Caracterización funcional del gen AtGRDP1 durante el crecimiento y desarrollo de Arabidopsis thaliana***

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

El Jurado, después de deliberar, determinó

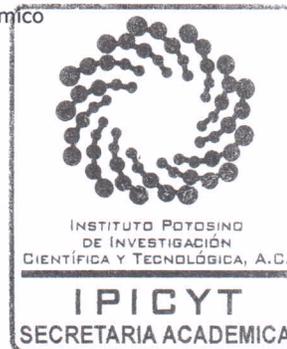
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:43 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de septiembre de 2014.

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

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

Esta tesis está dedicada a mis padres y a mi tita.

## Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias, con beca número de registro 490410.

Al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica** por el apoyo institucional y la oportunidad de hacer posible la realización de la Maestría en ciencias en Biología Molecular.

Al **Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont** por la confianza y por haber permitido mi incorporación a su grupo de investigación. Así como sus enseñanzas en clases.

A la **Dra. Aida Rodríguez** por su apoyo, su paciencia y sus enseñanzas en los experimentos de laboratorio, así como sus oportunas sugerencias en el trabajo.

A mi Comité tutorial; **Dra. Martha Leticia Santos Martínez** y al **Dr. Samuel Lara González** por sus aportaciones a mi trabajo de tesis y a los trabajos realizados durante la Maestría.

A la **M. C. Alicia Becerra Flora** por su apoyo técnico y administrativo durante mi estancia en el laboratorio 7.

A mis compañeros del laboratorio; **Aida, Itzell, Adriana, Israel, Mago, Diana, Jocelin, Ana, Luz, Fatima** y **Silvia**.

A la **Dra. Gladis Judith Labrada Delgado** y a la **M. C. Ana Iris Peña Maldonado** por su asistencia técnica en el microscopio electrónico e-SEM del laboratorio LINAN.

A **Mireya** por su gran apoyo y apremiable compañía durante la Maestría.

A mis **compañeros de generación** y a los **profesores de la división**, por el tiempo en clases y por el tiempo fuera de ellas; aprendí de todos.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	lv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Resultados	5
Discusión	10
Conclusión	16
Materiales y Métodos	17
Referencias	23
Figuras	30
Anexos	39

## Lista de tablas

- Tabla 1.** Cruzas de las líneas mutantes *Atgrdp1*, *Atgrdp2*, y sobre expresante OE6 contra línea CycB1 y mutantes *Atgrdp1* y *Atgrdp2*. 28
- Tabla 2.** Construcciones de las versiones DUF, RRM, Splicing alternativo (*saAtGRDP1*) y versión completa *AtGRDP1*. 29

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Desarrollo de plántulas de las líneas; Col-0, mutante y sobreexpresante.	30
<b>Figura 2.</b> Evaluación del crecimiento de las líneas Col-0, mutante (Atgrdp1) y sobreexpresante (OE6) en sustrato semi-hidropónico a las cuatro semanas.	31
<b>Figura 3.</b> Evaluación del crecimiento de las líneas Col-0, mutante (Atgrdp1) y sobreexpresante (OE6) en sustrato semi-hidropónico a las cinco semanas	32
<b>Figura 4.</b> Fotografías de las líneas reporteras que contienen el promotor de <i>AtGRDP1</i> fusionado a GUS ( <i>pAtGRDP1::GUS</i> ).	33
<b>Figura 5.</b> Gráficas de número de tricomas y microfotografías de las líneas de las hojas 1, 3 y 5 de las líneas Col-0, <i>Atgrdp1</i> y OE6.	34
<b>Figura 6.</b> Gráficas de expresión relativa para <i>AtGRDP1</i> y <i>saAtGRDP1</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> en diferentes estadios de desarrollo	35
<b>Figura 7.</b> Gráficas de expresión relativa en donde se compara <i>AtGRDP1</i> vs <i>saAtGRDP1</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> a los 18, 21 y 26 días de desarrollo.	36
<b>Figura 8.</b> Gráficas de expresión relativa en donde se compara <i>AtGRDP1</i> vs <i>saAtGRDP1</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> a los 28 y 45 días de desarrollo.	37
<b>Figura 9.</b> Gráfica de expresión relativa en donde se compara <i>AtGRDP1</i> vs <i>saAtGRDP1</i> durante el desarrollo de la flor y de la silicua.	38

## Anexos

**Anexo 1.** Versión de splicing alternativo del gen *AtGRDP1*

38

## Resumen

### Caracterización funcional del gen *AtGRDP1* durante el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

*AtGRDP1* es un gen que presenta un dominio de función desconocida DUF 1399 en el extremo N-terminal, un dominio putativo de unión a RNA en el centro de la proteína y un dominio rico en glicinas en el C-terminal. Se demostró que la sobreexpresión de este gen en plántulas de *Arabidopsis thaliana* les confiere tolerancia a estrés salino y osmótico. Además, se propone que podría estar participando en la señalización del ácido abscísico (ABA), esto debido al fenotipo de insensibilidad al ABA (ABI; ABA-insensitive) observado en las líneas sobre-expresoras y de hipersensibilidad para la línea mutante. En esta tesis reportamos la expresión del gen *AtGRDP1* durante el desarrollo de *Arabidopsis*, observando una mayor expresión en raíz, roseta, hoja caulinar y silicuas. En estudios más específicos de la expresión de este gen, se utilizó una línea reportera que contiene el promotor de *AtGRDP1* fusionado al gen reportero GUS, se identificó una expresión tejido-específica en tricomas de la hoja de roseta, en el receptáculo de la silicua y en los estambres. También se reportó, que las líneas sobreexpresantes (*35S::AtGRDP1*) presentan un crecimiento más acelerado cuando se compara con la mutante insercional (*Atgrdp1*) y parental Columbia-0 (Col-0), tanto en estadios tempranos como de planta adulta. Además se caracterizó la expresión de *AtGRDP1* y su versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) durante el desarrollo de *Arabidopsis*, en plantas de 18, 21, 26, 28 y 45 días, adicionalmente se evaluó el perfil transcripcional durante el desarrollo de la flor y la silicua, y se demostró que a ese nivel *saAtGRDP1* está presente y muestra una expresión diferencial a *AtGRDP1*. En este estudio, presentamos datos interesantes sobre la expresión del gen *AtGRDP1* en diferentes tejidos y etapas del desarrollo de la planta, y además demostramos que la versión de splicing alternativo *saAtGRDP1* se expresa principalmente en la parte aérea de plantas adultas de *Arabidopsis*.

**PALABRAS CLAVE.** Expresión diferencial, desarrollo, splicing alternativo, proteínas ricas en glicinas, tricomas

## Abstract

### Functional characterization of the *AtGRDP1* gene during growth and development of *Arabidopsis thaliana*

*AtGRDP1* is a novel gene that contains a DUF1399 domain of unknown function at the N-terminal end, a putative RNA binding motif in the middle of the protein and a glycine rich motif in the C-terminal end. It has been demonstrated that overexpression of *AtGRDP1* in plants provide tolerance to stress against salt and osmotic treatments. *AtGRDP1* is proposed to be involved on ABA signaling pathway as overexpression lines showed an ABA-insensitive phenotype (ABI) while the mutant was hypersensitive. Here we show that *AtGRDP1* gene is mainly expressed in roots, rosette leaves, cauline leaf and siliques. Expression studies with a reporter line that carry *AtGRDP1* promoter fused to GUS showed a tissue-specific expression pattern on rosette leaf trichomes, silique receptacle and stamens. Furthermore, we characterized *AtGRDP1* and its alternative spliced version (*asAtGRDP1*) expression during *Arabidopsis* development in plants of 18, 21, 26, 28 and 45 days, as well as during flower and silique development. These results showed that in a transcriptional level *asAtGRDP1* is present and shows a differential expression that *AtGRDP1*. In this work, we present interesting information about *AtGRDP1* gene expression in different tissues and different developmental stages. Also we show that the alternative splicing version of *AtGRDP1* gene, *asAtGRDP1*, presents an expression in aerial part in *Arabidopsis* adult plants.

KEY WORDS. Differential expression, development, alternative splicing, glycine rich proteins, trichomes

## INTRODUCCIÓN

En plantas, el desarrollo es la suma de los procesos de división, elongación y diferenciación celular que ocurren desde la formación del embrión hasta la senescencia. Este intrincado proceso está modulado, en gran parte, por la expresión orquestada de genes, su regulación y la interacción de las proteínas que codifican; esto en respuesta a los sistemas de señalización mediados por cascadas de fosforilación (en la célula), y al transporte y concentración de hormonas (en la planta y en la célula) (Peleg & Blumwald; 2011). Esta señalización, “finalmente”, activará a factores de transcripción que sucesivamente activarán o reprimirán la expresión de genes, que a su vez podrán modular el proceso. Todo este sistema tiene como finalidad mantener la homeostasis celular para que el desarrollo se complete y se genere descendencia biológica. En plantas, esto es particularmente importante ya que al ser organismos sésiles, tienen que hacer frente a cualquier condición o variación ambiental adversa que inhiba su desarrollo; como son los diversos tipos de estrés (Ahuja et al., 2010). Así, las plantas continuamente están modulando la expresión génica, además de la síntesis y modificación de sus proteínas (Mazzucotelli et al., 2008).

Entre el conjunto de genes implicados en la modulación del desarrollo y la respuesta al estrés están aquellos que codifican proteínas hidrofílicas como las LEAs (late embryogenesis abundant) siendo las más estudiadas de este grupo las dehidrinas (Hara M., 2010). Enzimas requeridas para la síntesis de osmoprotectores como lo son prolina y azúcares. Y factores de transcripción como AREBs (ABA-responsive element-binding proteins), DREBs (dehydration-responsive element binding proteins), ABIs (ABA insensitive), WRKYs, NACs, TGAs, MYBs (Nakashima et al., 2012; Vaahtera & Brosché, 2011) y proteínas con actividad de chaperona, como la proteína rica en glicinas AtGRP7 de *Arabidopsis thaliana* (Schmidt et al., 2010).

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) se caracterizan por secuencias repetidas de residuos de glicinas dispuestos en motivos  $(\text{Gly})_n\text{-X}$ , así como su alto contenido de los mismos (hasta un 70%) (Mousavi & Hotta, 2005). Estas proteínas se clasifican

de acuerdo a su estructura general; tomando en cuenta el arreglo de sus repeticiones de residuos de glicina y sus regiones conservadas (Zottich et al., 2013). Las GRPs presentan una expresión tejido específico y se ha reportado que están involucradas en el desarrollo en plantas. Se ha propuesto que la proteína de frijol PvGRP1.8 actúa como agente aglutinante para la deposición de constituyentes de la pared celular (Keller et al., 1988) y con el crecimiento del protoxilema (Ryser et al., 1997). En hojas y tallo de plantas de petunia los niveles de expresión de *PtGRP1* declinan conforme el tejido se desarrolla, y a nivel de proteína, PtGRP1 se localiza en la interfase membrana/pared celular, por lo que se asocia con la elongación celular (Condit, 1993). En *Arabidopsis*, de Oliveira et al. (1990) caracterizó por Northern-blot cinco GRPs (que denominó AtGRP-1, -2, -3, -4 y -5) expresadas tejido-específicamente en raíz, tallo, hojas, silicua inmadura y flores. Consecutivamente el mismo grupo (de Oliveira et al., 1993) reportó tres GRPs (denominadas AtGRP-6, -7 y -8) que se expresan exclusivamente en flor y son reguladas en el desarrollo de la misma. Posteriormente se describió que las proteínas de unión a RNA AtGRP7 y AtGRP8 están involucradas en la floración y actúan como reguladores ciclo circadiano (Schöning et al. 2008). Adicionalmente a estas GRPs canónicas, Bocca et al., (2005) reportó en el transcriptoma de *Eucalyptus* transcritos que codifican proteínas con solo un dominio corto rico en glicinas (GRDPs). Recientemente, en nuestro grupo de investigación se reportó que el gen de *Arabidopsis AtGRDP1* codifica para una proteína con un dominio corto rico en glicinas. *AtGRDP1* y su parálogo *AtGRDP2* son parte de una nueva familia, la cual se sugiere está presente en otros grupos de plantas, que contienen un dominio de función desconocida DUF1399 en el extremo amino, un motivo putativo de unión a RNA (RNP) y un dominio rico en glicinas (GRD) en el extremo carboxilo terminal. *AtGRDP1* está involucrado en la resistencia al estrés abiótico y se sugiere que podría estar regulando algunos factores de transcripción de la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Además hay evidencias que señalan que *AtGRDP1* podría tener un papel en el desarrollo, ya que las líneas sobreexpresantes de este gen presentan semillas más grandes, mientras que la mutante insercional las genera más pequeñas

(Rodríguez-Hernández, Tesis doctoral). Otra característica importante del gen *AtGRDP1* es que presenta otra versión del transcrito, la cual es generada por splicing alternativo cuando se retiene el sexto intrón. Esta retención de intrón, presenta un codón de paro prematuro, por lo que se generaría una versión más pequeña de la proteína (Anexo 1).

El splicing alternativo de los pre-mRNA es un mecanismo esencial para incrementar la plasticidad del transcriptoma y la diversidad del proteoma, generando múltiples isoformas de las proteínas (Filichkin, et al., 2008), o como mecanismo de auto regulación. Los genes *AtGRP7* y *AtGRP8* presentan versiones de splicing alternativo, de las cuales se ha propuesto un papel regulatorio. Estas proteínas parálogas se auto regulan negativamente a nivel post-transcripcional. Cuando son abundantes, reconocen su propio pre-mRNA (o el de su homólogo) provocando la retención de la mitad del intrón hacia el 5' con un codón de paro prematuro, haciendo que el transcrito sea degradado vía "nonsense-mediated decay" (NMD) (Schöning et al. 2008).

En esta Tesis reportamos que el gen *AtGRDP1* se expresa a lo largo del desarrollo de *Arabidopsis*, acentuada en tejidos como raíz, hoja de roseta, hoja caulinar y silicuas. Es evidente que las líneas sobreexpresantes de este gen muestran un crecimiento más acelerado que la línea parental Col-0 y la mutante insercional (*Atgrdp1*). Los datos de expresión con el gen reportero GUS fusionado con el promotor de *AtGRDP1* señalan su expresión en tricomas, silicua y estambres. Ahora sabemos que la versión de splicing alternativo de *AtGRDP1* (*saAtGRDP1*, la cual origina una versión más corta de la proteína de 586 aa, sin el carboxilo terminal; anexo 1) se expresa durante el desarrollo de la planta, principalmente en hoja caulinar, flor/botón y silicua inmadura, en plantas adultas de *Arabidopsis*. Además esta versión de splicing muestra una expresión diferencial a la versión completa del gen *AtGRDP1*. Esta expresión diferencial también se refleja en el desarrollo de la flor y la silicua. En etapas de botón/flor *saAtGRDP1* predomina, mientras que durante la elongación de la silicua se reduce su expresión y destaca la versión completa de *AtGRDP1*. Es de gran interés saber

cómo estas dos versiones interactúan y se regulan, para dar lugar al correcto desarrollo de la planta.

## RESULTADOS

### **El gen *AtGRDP1* está involucrado en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana***

Con el fin de comprender más acerca de este interesante gen y su papel durante el desarrollo utilizamos la línea mutante insercional (*Atgrdp1*), una línea sobreexpresante (OE6) y el ecotipo Columbia-0 (Col-0) como línea parental para el análisis del fenotipo. Se evaluaron plántulas de dos semanas de edad de cada línea crecidas en medio MS. En esta etapa, de forma muy clara, la línea OE6 presenta un fenotipo de mayor tamaño, tanto en la raíz como en la parte aérea (Figura 1a). Al hacer las determinaciones de peso fresco y longitud de raíz se refleja lo observado a nivel del fenotipo (Figura 1b), esto en comparación con la línea Col-0. Es interesante apreciar que el fenotipo de la línea mutante se percibe como en un punto intermedio, con representantes más desarrollados que Col-0 y otros más pequeños (Figura 1a), cuando se midió la raíz y se pesaron las plántulas, esta línea resultó ser la más afectada en el desarrollo (Figura 1b). Esto indica de forma general que la línea mutante tiende a desarrollarse menos que las plántulas de la línea Col-0, que muestran un tamaño uniforme tanto en las rosetas como en longitud de sus raíces (Figura 1a).

Cuando estas líneas alcanzan las cuatro semanas de edad en maceta con sustrato semi-hidropónico, la línea sobreexpresante (OE6) mostró un mayor desarrollo en comparación con la línea parental Col-0, dato que coincide, y de forma significativa, con el mayor peso fresco alcanzado por esta línea (Figura 2). Continuando con la tendencia observada en las plántulas de dos semanas, la línea mutante (*Atgrdp1*) presentó un peso fresco menor que la Col-0, aunque no de manera significativa. A nivel de fenotipo esta diferencia no fue evidente (Figura 2). A las cinco semanas de edad, en maceta con sustrato semi-hidropónico, el fenotipo de las líneas fue un poco más homogéneo entre ellas, todas han elongado el tallo principal y han desarrollado tallos secundarios (Figura 3). Sin embargo, es apreciable que la línea OE6 presenta una mayor longitud del tallo principal al igual que de tallo secundario cuando es comparada con Col-0. La planta de la línea mutante fue visiblemente la menos desarrollada de las tres

líneas. Al obtener las mediciones del peso fresco se ve reflejado lo observado en el fenotipo (Figura 3), la línea sobreexpresante (OE6) presenta mayor peso fresco de manera significativa y las plantas mutantes muestran menor peso comparándolas con la línea parental Col-0 (Figura 3).

### **Evaluación de la línea reportera del promotor del gen *AtGRDP1* fusionado al gen *GUS* (*pAtGRDP1::GUS*)**

El patrón de expresión del gen *AtGRDP1* se evaluó utilizando líneas reporteras que expresa al gen reportero *GUS* ( $\beta$ -glucuronidasa) bajo el control del promotor del gen *AtGRDP1* (2000 pb río arriba del ATG). La tinción histoquímica de las dos líneas analizadas reveló que había una expresión en los tricomas de las hojas de roseta, en el receptáculo de la silicua y en estambres (Figura 4). El patrón de expresión observado se presenta en órganos y estructuras muy específicas, además se encontró en etapas del desarrollo más avanzadas de la planta, de ahí que se presente en estambres y silicuas, cuando la planta está por completar su ciclo de vida.

### **Análisis del número y morfología de los tricomas de hojas de la línea *Atgrdp1*, sobreexpresantes OE6 y Col-0**

Se tomaron microfotografías utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) de la primera, tercera y quinta hoja de la roseta de plantas de Col-0, mutante *Atgrdp1* y sobreexpresante OE6 para observar morfología y número de tricomas por hoja y por línea, utilizando plantas de una y dos semanas en tierra. La morfología de los tricomas no se ve modificada en ninguna de las líneas al ser comparadas con Col-0 (Figura 5d). En la primera hoja de la roseta existe una ligera tendencia de menor número de tricomas para las líneas mutante y OE6 con respecto a Col-0 (Figura 5a). El número de tricomas en la hoja número tres es muy parejo entre la mutante y Col-0, mientras que la línea OE6 tiende a presentar un número menor de ellos en comparación con Col-0 (Figura 5b). En la quinta hoja, la tendencia se revierte al ser la mutante y OE6 las que presentan mayor número de

tricomas en la hoja (Figura 5c). Sin embargo estos datos no mostraron significancia estadística.

***AtGRDP1* y su versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) se expresan principalmente en plantas maduras de *Arabidopsis thaliana*.**

El gen *AtGRDP1* presenta otra versión del transcrito, la cual es generada por splicing alternativo cuando se retiene el sexto intrón. Esta retención de intrón, presenta un codón de paro prematuro, por lo que se generaría una versión más pequeña de la proteína. La expresión tejido-específica de *AtGRDP1* y su versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) fueron evaluadas mediante qRT-PCR en diferentes etapas del desarrollo de plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) a los 18, 21, 26, 28 y 45 días de edad, en plantas crecidas en tierra. Los niveles de expresión más elevados para *AtGRDP1* se detectaron en raíz en plantas de 18 días de edad, en roseta a los 28 días y en hoja caulinar y silicuas en general a los 45 días (Figura 6a). Por otro lado, la versión de splicing *saAtGRDP1* fue detectada en tallo, hoja caulinar, flor/botón y silicua inmadura en plantas de 45 días de edad (Figura 6b). En las figuras 7 y 8, se muestran los datos tanto de la expresión de la versión completa *AtGRDP1* como de la versión de splicing. Al comparar la expresión de ambas versiones en plantas de 18 días de edad observamos que la versión completa del gen *AtGRDP1* presenta una significativa expresión en raíz, mientras que la versión de retención de intrón *saAtGRDP1* no se detectó; para la roseta ambas versiones se inducen, pero la versión completa fue la más abundante (Figura 7a). En plantas de 21 días de edad, el patrón fue similar que lo observado en plantas de 18 días, *AtGRDP1* se expresa de manera significativa más que *saAtGRDP1* en raíz y roseta, mientras que aquí *saAtGRDP1* si es detectado en raíz (Figura 7b). En plantas de 26 días se midió en tejidos como tallo, hoja caulinar, flores y botones (además de raíz y roseta) la versión completa del gen *AtGRDP1*, que se encontró significativamente más inducido en raíz, roseta y hoja caulinar, siendo en raíz donde la mayor expresión fue detectada. En tallo la diferencia no fue muy notoria entre ambos transcritos. La versión *saAtGRDP1*, en esta etapa, se encuentra más inducida que *AtGRDP1* en flor/botón (Figura 7c). A

los 28 días, la versión completa *AtGRDP1* se presenta más inducido, de manera significativa, en todos los tejidos. En roseta se observa la inducción más alta, seguida por raíz cuya expresión fue bastante similar que en las plantas de 26 días de edad. Para la versión *saAtGRDP1* se observó más inducido en raíz, y su expresión en flores/botones y hoja caulinar mostrada a los 26 días desaparece a los 28 días. En general, la expresión de la versión *saAtGRDP1* se mantiene en los mismos niveles a los días 26 y 28 en el resto de los tejidos (Figura 7c y 8a). En la etapa más avanzada del desarrollo, a los 45 días, ambos transcritos no muestran señal en raíz. En roseta solo es detectada la versión completa de *AtGRDP1*. Interesantemente la versión *saAtGRDP1* presenta una extraordinaria expresión en el resto de los tejidos, y se encuentra por primera vez inducida por arriba de *AtGRDP1*, revirtiendo la tendencia vista en los tejidos y tiempos anteriores, a excepción de flor/botón de los 26 días (Figura 8b). En hoja caulinar, *saAtGRDP1* alcanza el punto de expresión más fuerte, alrededor de veinte veces más que la versión completa de *AtGRDP1*. En tallo, la inducción de *saAtGRDP1* es cerca de diez veces por encima de la versión completa *AtGRDP1*, mientras que en flor/botón la diferencia no fue tan grande (Figura 8b). A los 45 días se analizaron dos nuevos tejidos; silicua inmadura y silicua madura. En silicuas inmaduras *saAtGRDP1* se muestra alrededor de veinte veces más inducido que *AtGRDP1*, mientras que en silicuas maduras *AtGRDP1* presenta una inducción significativamente mayor que *saAtGRDP1* (Figura 8b). En todos los tiempos analizados es a los 45 días donde ambos transcritos presentan una mayor inducción en tallo, hoja caulinar y en flor/botón (Figura 6a y b). Por su parte *AtGRDP1* es más inducido en raíz a los 18 días y en roseta a los 28 días, mientras que *saAtGRDP1* prácticamente no se induce de manera importante ni en raíz o roseta en ninguno de los tiempos analizados. La versión de splicing alternativo de *AtGRDP1* (*saAtGRDP1*) presenta una expresión prácticamente exclusiva en plantas maduras de *Arabidopsis*.

### **Expresión diferencial entre la versión completa de *AtGRDP1* y la versión de splicing alternativo *saAtGRDP1* en el desarrollo de la silicua.**

Hemos encontrado una expresión diferencial de *AtGRDP1* y *saAtGRDP1* durante el desarrollo de la silicua, desde el botón hasta la elongación de la silicua (Figura 9). En botones florales detectamos ambos transcritos, pero la versión de splicing *saAtGRDP1* es quien presenta una mayor expresión, el doble que la versión completa *AtGRDP1*. En flores, la expresión de ambas versiones aumenta con respecto a lo observado en botones y se mantiene *saAtGRDP1* por encima de *AtGRDP1* de forma significativa. Una vez la flor comienza a perder sus verticilos florales (cáliz y corola) y el pistilo comienza a elongarse para dar lugar a lo que será la silicua (Silicua 0.3-0.5 cm) observamos una drástica disminución de ambos transcritos, un poco más de la versión *saAtGRDP1* que la completa, aunque esta diferencia no es significativa. De forma interesante, cuando la silicua continúa elongándose (Silicua 0.7-0.9 cm) prácticamente desaparece la expresión de la versión de splicing alternativo, revirtiendo la tendencia encontrada; *saAtGRDP1* más inducido que *AtGRDP1* (Figura 9). En silicuas de 1.0-1.5 cm la expresión de la versión completa de *AtGRDP1* fue alrededor de tres veces mayor que la versión de splicing alternativo *saAtGRDP1*. Finalmente en silicuas completamente elongadas (>2 cm) se observa una significativa diferencia en la expresión de *AtGRDP1* sobre *saAtGRDP1* (Figura 9), por lo que la expresión de la versión completa del gen *AtGRDP1* parece estar asociada a la silicua en proceso de elongación.

## DISCUSIÓN

El gen *AtGRDP1* codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas, que además contiene un dominio DUF 1399, y un posible motivo putativo de unión a RNA (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Se han reportado, proteínas ricas en glicina (GRPs) canónicas las cuales presentan un alto porcentaje de glicinas, de entre al 40 al 70%, con arreglos de glicina repetidos en la forma (Gly)<sub>n</sub>-X (Sachetto-Martins et al., 2000; Mousavi & Hotta, 2005) a los cuales se debe parte de su clasificación (Mangeon et al., 2010b).

### **El gen *AtGRDP1* está involucrado en el desarrollo de *Arabidopsis***

El análisis del fenotipo mostrado en el desarrollo de las líneas transgénicas, como la línea mutante *Atgrdp1* y la línea sobreexpresante del gen *AtGRDP1* (OE6; 35S::*AtGRDP1*) muestra que la línea OE6 presenta un crecimiento más acelerado, reflejado en fenotipo de roseta, longitud de raíz y peso fresco a nivel de plántula (Figura 1a y b). Interesante, el parálogo de *AtGRDP1*; el gen *AtGRDP2* presenta un fenotipo muy similar en plántula, donde la sobre-expresión muestra un crecimiento más vigoroso. Por otro lado cuando analizan una mutante insercional, así como una línea silenciada por micro RNA del gen *AtGRDP2* observaron plántulas con crecimiento lento (Ortega-Amaro et al., en revisión). Estos datos concuerdan con la línea mutante insercional del gen (*Atgrdp1*). Se ha reportado que diversas GRPs canónicas están involucradas en el desarrollo de plantas, como la línea mutante para el gen *AtGRP5* (*grp-5-1*), la cual presenta plántulas de *Arabidopsis* más pequeñas, con una raíz más corta (Mangeon et al., 2009). Incluso en monocotiledóneas como arroz se ha reportado que una línea mutante del gen GRP (*OsDG2*) genera plántulas más pequeñas, y se describió que está alterando la expresión de los genes del desarrollo del cloroplasto (Jian et al., 2014). En nuestro estudio plantas adultas de *Arabidopsis* de cuatro y cinco semanas que sobre-expresan el gen *AtGRDP1* muestran un mayor desarrollo, con tallos más elongados y mayor peso fresco, mientras que la línea mutante se observa más pequeña, con menor peso fresco en comparación a las plantas parentales Col-0 (Figura 2 y 3). Lo mismo ocurre con su parálogo *AtGRDP2*,

plantas visiblemente más grandes en la sobreexpresante y más pequeñas en la mutante, incluso cuando lo expresan de forma heteróloga en plantas de lechuga (Ortega-Amaro et al., en revisión). Si analizamos GRPs canónicas en *Arabidopsis*, estas presentan fenotipos variados en plantas adultas. Por ejemplo, en el ecotipo C24, la sobre-expresión de *AtGRP5* genera plantas más desarrolladas, con hojas más grandes y tallos más elongados, mientras que su silenciamiento da como resultado plantas que no elongan tallo principal, aun a las siete semanas (Mangeon et al., 2009). Por otro lado, el silenciamiento de *AtGRP2*, también en ecotipo C24, genera plantas más vigorosas, con tallos muy elongados, ramificados y con presencia de silicuas, mientras que la línea parental aún no genera tallo primario en el mismo tiempo (Fusaro et al., 2007).

**La línea del promotor de *AtGRDP1* fusionada a GUS reporta expresión en tricomas, receptáculo de silicua y estambres.**

Las líneas que contienen la construcción del promotor de *AtGRDP1* fusionado al gen reportero GUS muestran una señal en tricomas de hoja de roseta, en el receptáculo de la silicua y en estambres (Figura 4), al compararlo con el patrón de expresión de su parólogo *AtGRDP2* este presenta un patrón diferente, con algunas similitudes. *AtGRDP2* se expresa en lo que es el estilo del gineceo mientras el botón esta verde, conforme la flor madura, la señal pasa al septo de la silicua (antes estilo) y conforme la silicua madura la señal pasa a lo que antes era el estigma y el receptáculo de la silicua (Ortega-Amaro et al., en revisión), aquí la similitud, *AtGRDP1* se expresa en el receptáculo de la silicua. De manera interesante *AtGRP2* (GRP canónica) presenta una señal en el receptáculo de la silicua muy similar a la observada para *AtGRDP1*, además presenta señal en los estambres, en lo que parece los sacos polínicos (Fusaro et al., 2007), mientras que en *AtGRDP1* la señal de los estambres se aprecia detrás de los sacos polínicos y en el filamento. Existe un poco de similitud en el patrón de expresión observado en el filamento de los estambres con el patrón observado en el gen *AtGRP5* (GRP canónica), solo que en esta última la señal es muy intensa (Mangeon et al., 2010a) en comparación con la tenue señal observada en las

líneas *AtGRDP1* (Figura 4). De lo anterior, la expresión que se observa en flores y botones en *AtGRDP1* es causa de los estambres (masculinos), no se observa en órganos femeninos (gineceo). En *AtGRDP2* al parecer no hay expresión en tricomas. Si analizamos los promotores de los genes *AtGRDP1* y *AtGRDP2* *in silico* se observan algunas regiones regulatorias en común, pero su número y combinación con otras los hace diferentes (datos no mostrados).

En cuanto a la señal de GUS regulada por el promotor de *AtGRDP1* presente en tricomas, se ha reportado en un grupo particular de genes; los que participan en su biogénesis: *ENHANCER OF TRY AND CPC1 (ETC1)*, *TRIPTYCHON (TRY)*, *CAPRICE (CPC)* y *TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (TTG2)*. *ETC1* se presenta en las primeras etapas del desarrollo del tricoma (Kirik et al., 2004), cuando el primordio de la hoja empieza a elongarse. La señal de *AtGRDP1* la hemos observado en tricomas maduros, en esta etapa los genes *TRY* (Pesch & Hülskamp, 2011), *TTG2* (Johnson et al., 2002) y *CPC* (Koshino-Kimura et al., 2005) presentan una expresión fuerte en tricomas maduros, aunque para el gen *AtGRDP1*, la expresión fue muy tenue (Figura 4). Cabe destacar que cuando analizaron el promotor de *CPC*, encontraron una región a la que denominaron CWB, la cual es responsable de la expresión específica en tricomas, dentro de esta región hay dos cajas; *CPCMB1* y *CPCMB2*, en estas se une el factor de transcripción tipo MYB *WER* (Koshino-Kimura et al., 2005). Alineando el promotor de *AtGRDP1* con el de *CPC*, se encontró que este podría tener una región *CPCMB1*, la cual podría ser responsable de la expresión del reportero GUS en tricomas. Es necesario seguir con la caracterización de la línea *pAtGRDP1::GUS*, para ver si existen otros tejidos que muestran señal, en otras etapas del desarrollo así como bajo inductores de estrés.

### **Morfología y número de tricomas en las líneas *Atgrdp1* y OE6**

Debido al dato de expresión del gen reportero GUS en tricomas en las líneas *pAtGRDP1::GUS 7A* y *7B* (Figura 4) se analizó si existía diferencia en la morfología y/o el número de tricomas en las líneas que mutante (*Atgrdp1*) y sobreexpresante (OE6). No encontramos variación morfológica de los tricomas

(Figura 5d) y al analizar el número de estos en cada línea, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las hojas observadas. Se ha reportado que la línea mutante de *ETC1* (*etc1-1*) no tiene efecto alguno en el número de tricomas comparada con la línea parental, sin embargo su sobreexpresión si muestra un número reducido de ellos (Kirik et al., 2004). A pesar de que no encontramos diferencias estadísticamente significativas, si comparamos los valores de las medias de hoja 3, la línea sobreexpresante OE6 presenta menor número de tricomas en comparación a la mutante y la Col-0; y para la hoja 5, tanto la mutante como la sobreexpresantes, presentan valores de medias más altos que la línea parental Col-0; sin embargo, se necesita realizar experimentos futuros con un número de muestras mayor (mas hojas).

***AtGRDP1* y su versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) se expresan diferencialmente durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.**

*AtGRDP1* presenta una expresión regulada durante el desarrollo de *Arabidopsis*. Al realizar un perfil transcripcional del gen *AtGRDP1* en los diferentes tejidos se encontró más inducido en raíz, roseta vegetativa, hoja caulinar y silicua inmadura (Figura 6a). Dato que concuerda con lo reportado en la base de datos de microarreglos de *Arabidopsis* (Winter et al., 2007: *Arabidopsis* eFP Browser; [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca)) donde se presenta una expresión relativa para *AtGRDP1* en raíz, en roseta después de la transición de la floración, hoja caulinar, silicua inmadura y raíz. Por otro lado, su parólogo *AtGRDP2* presenta una elevada expresión en hoja caulinar, flor/botón y silicua inmadura (Ortega-Amaro et al., en revisión). A pesar de que existe similitud con la expresión de *AtGRDP1* analizada en este trabajo en ciertos tejidos como en hoja caulinar y silicua inmadura con el gen *AtGRDP2*, no lo es así en los niveles de expresión y en la etapa de desarrollo. *AtGRDP1* se presenta principalmente expresado en hoja caulinar de plantas maduras de 45 días (Figura 6a), mientras *AtGRDP2* lo hace en plantas de 28 días, además de que los niveles de expresión relativa en *AtGRDP1* son de alrededor de 0.25, los de *AtGRDP2* son de aproximadamente 0.044. En el caso de silicua inmadura, ambos muestran su mayor expresión en plantas de 45d, pero el nivel de

expresión es de 0.045 en *AtGRDP2*, y para el gen *AtGRDP1* es aproximadamente de 0.15.

Al medir la expresión de la versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) observamos que se presenta de manera muy inducida en tallo, hoja caulinar, flor/botón y silicua inmadura (Figura 6b). Al comparar con más detalle la expresión de *AtGRDP1* vs *saAtGRDP1* en los distintos tiempos, se observó que a los 18 días la expresión de *saAtGRDP1* en raíz no fue detectada, mientras que la versión completa de *AtGRDP1* presenta su expresión más alta en raíz en comparación a los otros tejidos (Figura 7a y 6a). En roseta se encuentran ambos transcritos, pero fue significativamente mayor la expresión de la versión completa *AtGRDP1* (Figura 7a). Llama la atención que en el resto de los tiempos (21, 26, 28 y 45 días) el patrón de expresión para raíz y roseta fue el mismo (excepto en 45 días raíz, donde ambos apenas se detectan); la expresión de la versión completa *AtGRDP1* se observó superior a la versión de splicing *saAtGRDP1* (Figuras 7b-c y 8a-b). En 26 y 28 días, *AtGRDP1* se muestra predominante en tallo y hoja caulinar, es interesante resaltar que en flor/botón la tendencia se revierte por primera vez a los 26 días, donde la versión *saAtGRDP1* está más inducida (Figura 7c y 8a). En plantas de 45 días donde ocurren los cambios más sorprendentes. La expresión de *saAtGRDP1* alcanza los niveles más álgidos y se encuentra mucho más inducido en tallo y hoja caulinar. En esta misma etapa donde ya hay silicuas, tanto maduras e inmaduras (Figura 8b). Se encontró que en silicua inmadura *saAtGRDP1* está alrededor de treinta veces más inducido que la versión completa del gen *AtGRDP1*, de forma interesante, se encontró por debajo de *AtGRDP1* cuando la silicua alcanza su madurez (Figura 8b). Sumado a lo anterior se puede inferir que la versión completa del gen *AtGRDP1* se expresa más ampliamente en distintas etapas del desarrollo de *Arabidopsis*, mientras que la versión de splicing *saAtGRDP1* se expresa preferencialmente en etapas avanzadas del desarrollo, además de que es un transcrito prácticamente ausente de la raíz y de la roseta, de acuerdo a los niveles de expresión que se detectaron.

Se ha reportado la expresión de GRP's canónicas de *Arabidopsis* en la mayoría de los tejidos de la planta. Desde los primeros años en que se comenzaron a caracterizar, de Oliveira et al. (1990) caracterizó por northern-blot cinco GRPs (que denominó AtGRP-1, -2, -3, -4 y -5) expresadas tejido-específicamente en raíz, tallo, hojas, silicua inmadura y flores. En cuanto a las versiones de splicing alternativo en las GRPs, se ha descrito una versión para el gen *AtGRP7* de *Arabidopsis*. Dicha variante se genera por medio de la retención de la mitad del primer intrón del transcrito, lo que genera un codón de paro prematuro, y así una putativa versión más corta de la proteína AtGRP7. Interesantemente se ha propuesto que la proteína AtGRP7 participa en el procesamiento de su propia versión de splicing alternativo uniéndose a su propio pre-mRNA (Staiger et al. 2003). Los autores proponen que este "feedback loop" entre la proteína AtGRP7 y su transcrito es un mecanismo para controlar los niveles de su pre-mRNA.

### ***AtGRDP1* y *saAtGRDP1* están presentes en el desarrollo de la flor y elongación de la silicua**

*AtGRDP1* y *saAtGRDP1* presentan una transición en su expresión durante el desarrollo de la flor y la elongación de la silicua (Figura 9). Incluyendo botón, la apertura de la flor, y la pérdida de los verticilos florales es la expresión de la versión de splicing *saAtGRDP1* la que predomina, mientras que cuando la silicua comienza a elongarse y ensancharse ocurre una marcada transición en donde el transcrito de *saAtGRDP1* se reduce y aumenta *AtGRDP1* (Figura 9). Ya que la formación y maduración de la semilla inicia cuando la silicua comienza a elongarse, esto podría relacionarse con el mayor tamaño encontrado en las semillas de la línea *35S::AtGRDP1*.

## CONCLUSION

Esta tesis revelo que el gen *AtGRDP1* está involucrado en el desarrollo de *A. thaliana*, ya que la línea que sobre-expresa el gen (OE6; 35S::*AtGRDP1*) presentó un crecimiento más rápido que la línea mutante (*Atgrdp1*) y que la línea parental Col-0, esto tanto en plántulas como en plantas adultas. Por otra parte, el perfil transcripcional del gen *AtGRDP1* presentó expresión durante todo el desarrollo general de *Arabidopsis*, mientras que la versión de splicing alternativo *saAtGRDP1* se mostró expresado preferencialmente en etapas avanzadas del desarrollo de la planta, además esta versión está prácticamente ausente de la raíz y de la roseta.

Tanto la versión completa del gen *AtGRDP1* como su versión de splicing alternativo *saAtGRDP1* están presentes en el desarrollo de la flor y la silicua, presentando una transición donde *saAtGRDP1* está más inducido que *AtGRDP1* en botón y flor. Conforme la silicua comienza a elongarse la versión completa de *AtGRDP1* se induce mientras que la expresión de la versión *saAtGRDP1* decrece. La señal de GUS de las líneas reporteras del promotor del gen *AtGRDP1* en el estambre y en el receptáculo de la silicua, sumado a lo anterior, nos podría indicar que la versión de splicing alternativo *saAtGRDP1* podría ser la que se expresa en estambres, mientras que la versión completa de *AtGRDP1* podría ser la que se expresa en silicua.

Estos hallazgos aportan evidencias claves del papel del gen *AtGRDP1* y su versión de splicing alternativo en el desarrollo de *A. thaliana*.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Condiciones de crecimiento**

Todas las semillas utilizadas en el trabajo fueron esterilizadas por 8 minutos con cloro al 20% en agitación (1650 rpm/8 min). Posteriormente éstas fueron vernalizadas por 48h/4°C. Semillas asépticas y vernalizadas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri con medio MS 0.5X (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, USA), sucrosa y 1.5% de agar (Murashige and Skoog, 1962). Las placas con las semillas se colocaron en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **Mediciones de la raíz principal y peso fresco de plántulas**

Semillas de *A. thaliana* de las líneas Col-0, mutante *Atgrdp1* y sobreexpresante OE6 (*35S::AtGRDP1*) fueron germinadas y crecidas en placas de Petri 140X15 con medio MS 0.5X por dos semanas. Estimación de la longitud de raíz fue determinada con una escala analítica. En cada caja se incluyeron cinco semillas de cada línea (15 en total por caja) con diez repeticiones (50 plántulas de cada línea) El peso fresco de las plántulas se determinó en grupo de cinco con una balanza analítica. La significancia estadística fue estimada mediante ANOVA de una vía y una prueba posterior de Tukey's usando el programa GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, California, USA).

### **Determinaciones de peso fresco de plantas adultas**

Plántulas de 10 días de las distintas líneas (Col-0, *Atgrdp1* y OE6) fueron pasadas a maceta con un sustrato semi-hidropónico (2:1 arena: perlita) y sub-irrigadas con solución Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) cada dos días. Las plantas crecieron en una cámara de crecimiento a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Después de alcanzar cuatro y cinco semanas de edad, se tomó la planta con todo y raíz y se pesó cada planta individualmente en una balanza analítica. Se pesaron cuatro plantas de cada línea, en cada grupo de edad. La significancia estadística fue estimada mediante ANOVA de una vía y una prueba

posterior de Tukey's usando el programa GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, California, USA).

### **Extracción de ácidos nucleicos de tejidos de *A. thaliana***

La extracción de RNA de los distintos tejidos fue realizada usando el reactivo Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante; las muestras fueron almacenadas a -70°C para análisis posteriores. Para la remoción de DNA genómico remanente del RNA, las muestras fueron tratadas con DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, USA). La síntesis de cDNA fue llevada a cabo con la enzima Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acuerdo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue almacenado a -20°C para su posterior uso.

### **RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) de las variantes del gen *AtGRDP1***

Contenido total de RNA de diferentes tejidos de *A. thaliana* fue obtenido mediante el método descrito arriba. El contenido remanente de DNA fue removido con DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, USA). La concentración de RNA fue medida en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies) antes y después del tratamiento con DNaseI. La síntesis de cDNA y el RT-PCR cuantitativo fueron realizados con un experimento de un-paso usando el kit iScript™ One-Step RT-PCR con SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). La reacción fue hecha en volumen total de reacción de 10 µl que contenían 25 ng de RNA total como templado, 5 µl de Power SYBR Green RT-PCR Mix (2X), 200 nM de cada oligonucleótido y 0.08 µl del RT Enzyme Mix (125X); usando el sistema de detección StepOne Real-Time PCR con el software StepOne v2.1 (Applied Biosystems, USA). Las condiciones del termociclador fueron de 30 min a 48°C (síntesis de cDNA), 10 min a 95°C (activación de la polimerasa AmpliTaq Gold DNA) seguido por 40 ciclos de PCR de 15 s a 95°C (desnaturalización) y un minuto a 60°C (alineación y extensión). La melting curve fue hecha con ciclos de 15 s a 95°C (desnaturalización), 15 s a 60°C (alineamiento) y 15 s a 95 °C (desnaturalización), incrementando la temperatura 0.3 °C por ciclo. Para cada

muestra se usaron tres replicas. La cuantificación se basó en el valor del threshold, con el nivel de expresión de las versiones de *AtGRDP1* relativo al valor de threshold del gen de ubiquitina 5 (UBQ5) (Livak & Schmittgen, 2001). Los primers utilizados para el análisis de la versión completa de *AtGRDP1* fueron: UTR3-F 5'AAATGGAGGCGGTTGCGGT3' y UTR3-R 5'CAGATCCTCACAGTCTTTGGC3', para la versión de splicing alternativo se usaron Fw22qRTSp 5'TGCTGGACTCGAAATGGTCAC3' y Rv22qRTSp 5'CATTGAACTGGGTTACATTGTCA 3'. Para el gen de ubiquitina 5 se utilizaron; UBQ5-F 5'TCGACGCTTCATCTCGTCCT3' y UBQ5-R 5'CGCTGAACCTTTCCAGATCC3'

### **Análisis Histoquímico**

Patrones de expresión de plantas de *Arabidopsis* de 48 días de edad que contenían la fusión transcripcional *pAtGRDP1::GUS-GFP* fueron analizados mediante la tinción histoquímica de GUS. Los tejidos se incubaron toda la noche con el buffer de tinción (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucuronidasa 0.5 mg/mL, fosfato de sodio 100 mM pH 7.0, ferrocianuro de potasio 0.5 mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM, 0.1% (v/v) Triton X-100: EDTA 10 mM) a 37°C. Posteriormente el tejido se sometió a un proceso de destinción descrito por Malamy and Benfey (1997) con algunas modificaciones. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Moticam 2500 de 5.0 megapíxeles acoplada a un microscopio MOTIC modelo BA-300 y procesadas con el software MOTIC versión 2.0.

### **Microfotografías de hojas para conteo y observación de tricomas mediante microscopia electrónica de barrido en modo ambiental (eSEM)**

Para analizar el número de tricomas que presentaba cada línea (Col-0, mutante *Atgrdp1* y sobreexpresante OE6) en las primeras etapas del desarrollo, se pasaron plántulas de cada línea de diez días de edad a tierra. Se formaron tres grupos; hoja 1, hoja 3 y hoja 5. En el grupo hoja 1; una vez la plántula desarrollaba las primeras dos hojas verdaderas se escindía una de ellas y se montaba para observación. Para el grupo hoja 3 se esperó hasta que las plántulas desarrollaran

cuatro hojas verdaderas y para el grupo hoja 5 se esperó a que estas desarrollaran seis hojas verdaderas para tomar la hoja 3 y la hoja 5, respectivamente. Se tomaron siete repeticiones de cada hoja en cada línea. Las microfotografías fueron tomadas en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (eSEMQUANTA 200 FEI, Low Vacuum/Water) con la presión de la cámara en bajo vacío (10 a 130 Pa) y un voltaje de 25.0 kV. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y un análisis posterior de Tukey's para la significancia estadística con el programa GraphPad Prism version 5.0b (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

### **Generación de líneas sobreexpresantes de *Arabidopsis thaliana***

Se generaron versiones del gen AtGRDP1 llamadas; DUF, RRM y Splicing (splicing alternativo), además de las versiones que incluían el ORF de AtGRDP1 y su versión de Splicing alternativo para ser fusionadas al gen reportero GFP (Green Fluorescent Protein). Las versiones DUF, RRM y Splicing fueron amplificadas a partir de cDNA de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad usando una DNA polimeraza de alta fidelidad (Hot Star HiFidelity Polymerase Kit: Qiagen, Hilden, Germany) y los primers; Fw22ATG 5'-ATGGATAAGGAGAAGGATCATG-3' / RvDUF 5'-TCAAGCTCATAAGGTTTCATC-3' para la versión DUF, FwRRM 5'-ATGGTGAAGCTCATTGGTAAAGTG-3' / RvRRM 5'-TCACATTATTTTCTGTGCGCAGCAA-3' para la versión RRM, mientras que para la versión de Splicing se utilizaron; Fw22ATG 5'-ATGGATAAGGAGAAGGATCATG-3' y RvCorta22 5'-TTACTGGAATAAAATGGTGGGAATATAC-3'. Para las versiones fusionadas a GFP fueron; Fw22ATG 5'-ATGGATAAGGAGAAGGATCATG-3' / Rv22-pEnter 5'-TGCTGCTTTCACCATGTTTCCG-3' para la versión completa (ORF AtGRDP1) y Fw22ATG 5'-ATGGATAAGGAGAAGGATCATG-3' / Rv22corta-pEnter 5'-CTGGAATAAAATGGTGGGAATATACC-3' para la versión de splicing alternativo. Los productos amplificados fueron clonados en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA). Posteriormente, las

versiones DUF, RRM y Splicing en el vector de entrada fueron recombinadas en el vector destino pMDC32 que contiene el promotor constitutivo CaMV 35S. Las versiones que serían fusionadas GFP (ORF AtGRDP1 y Splicing alternativo) contenidas en el vector de entrada se recombinaron en el vector pEarley gate 103 para lograr la fusión de la GFP hacia el tres prima. En ambos casos se utilizó el sistema de recombinación Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las construcciones pMDC32-DUF, pMDC32-RRM, pMDC32-Splicing, así como pEarley-AtGRDP1:GFP y pEarley-Splicing:GFP fueron transferidas a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 por electroporación. Posteriormente se transformaron plantas de *Arabidopsis* Col-0 y mutante insercional (*Atgrdp1*) mediante el método de “floral dip” (Zhang *et al.*, 2006). Ver tabla 2.

### **Cruzas de las líneas sobreexpresante (OE6) y mutante (*Atgrdp1*) del gen *AtGRDP1*.**

Para realizar las cruzas de la línea OE6 y mutante, se tomaron plantas adultas de alrededor de cuatro a cinco semanas en tierra, plantas que presentaban tanto botones verdes, como flores. Ya que *Arabidopsis* tiene la propiedad de auto fecundarse, en la planta que fungió como receptora (♀) se quitaron, con mucho cuidado, los verticilos florales (sépalos y pétalos) de los botones verdes sin abrir hasta dejar el verticilo femenino (pistilo) expuesto e intacto. De la planta donadora de polen (♂) se cortó la flor ya abierta, y con los estambres expuestos se procedió a fecundar los pistilos antes descubiertos, todo esto bajo un estereoscopio MOTIC modelo SMZ-143. Las combinaciones de las cruzas entre las líneas se enlistan en la tabla 1. De todas las combinaciones posibles se logró desarrollo de silicua y semilla.

### **Construcción de los plásmidos con el gen *AtGRDP1* y su versión de splicing alternativo en el vector pTRC99a**

Tanto para la versión completa y su versión de splicing alternativo se utilizó cDNA de plántulas de 15 días de edad y se amplificó con DNA polimerasa de alta

fidelidad (Hot Star HiFidelity Polymerase Kit: Qiagen, Hilden, Germany) utilizando los primers: Fw22NcoI: 5'-CATGCCATGGATAAGGAGAAGGATCATGAAGTG-3' y RvSallUTR3': 5'-ACGCGTCGACCAGATCCTCACAGTCTTTGGC-3', para la versión completa. Mientras que para la versión se splicing alternativo se utilizó el mismo forward (Fw22NcoI) con el reverso; Rv22SplicingSall 5'-TCGCGTCGACTTACTGGAATAAAATGGTGGGAATATACCACT-3'. El amplicon se purificó de gel con el kit de columnas Promega® (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System). Posteriormente se digirieron los amplicones purificados y el vector vacío con las enzimas de restricción NcoI (New England BioLabs Inc.) y Sall (Invotrogen, Carlsbad, CA, USA) De acuerdo a las condiciones de los fabricantes. Finalmente los fragmentos y el vector digerido se ligaron con la T4 DNA ligasa (New England BioLabs Inc.) con las sugerencias del fabricante. Para validar las construcciones se utilizaron los primers; FwpTRC99A 5'-GCGCCGACATCATAACGGT-3' y RvpTRC99A 5'-CACTTCTGAGTTCGGCATGG-3' en combinación con los utilizados para amplificar las versiones.

## REFERENCIAS

Ahuja I, de Vos RCH, Bones AM & Hall RD (2010) Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* (15):12; 1360-1385).

Bocca SN, Magioli C, Mangeon A, Junqueira RM, Cardeal V, Margis R & Sachetto-Martins G (2005) Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the Eucalyptus expressed sequence tag database (ForEST). *Genetics and Molecular Biology* 28: 608-624.

Condit CM (1993) Developmental expression and localization of petunia glycine-rich protein 1. *Plant Cell* 5: 277-288.

de Oliveira DE, Seurinck J, Inzé D, Van Montagu M & Botterman J (1990) Differential Expression of Five Arabidopsis Genes Encoding Glycine-Rich Proteins. *The Plant Cell* 2: 427-436

de Oliveira DE, Franco LO, Simoens C, Seurinck J, Coppieters J, Botterman J & Van Montagu M (1993) Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins. *The Plant Journal* 3(4): 495-507.

Filichkin A S, Priest H D, Givan S A, Shen R, Bryant W D, Fox S E, Wong W & Mockler T C (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 20:45–58.

Fusaro AF, Bocca SN, Braz RRL, Barrôco RM, Magioli C, Jorge VC, Coutinho TC, Rangel-Lima CM, De Rycke R, Inzé D, Engler G & Sachetto-Martins G (2007) AtGRP2, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta* 225:1339–1351

Hara M (2010) The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signaling & Behavior* 5: 503-508.

Hoagland, DR, DI Arnon (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.

Jiang Q, Ma XJ, Gong XD, Zhang JH, Teng S, Xu JL, Lin DZ, Don YJ (2014) The rice *OsDG2* encoding a glycine-rich protein is involved in the regulation of chloroplast development during early seedling stage. *Plant Cell Rep* 33:733–744.

Johnson CS, Kolevski B & Smyth DR (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor. *The Plant Cell* 14: 1359–1375.

Keller B, Sauer N & Lamb CJ (1988) Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *The EMBO J.* 7:, 3625-3633.

Kirik V, Simon M, Huelskamp M & Schiefelbein J (2004) The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis. *Developmental Biology* 268: 506 – 513

Koshino-Kimura Y, Wada T, Tachibana T, Tsugeki R, Ishiguro S & Okada K (2005) Regulation of CAPRICE transcription by MYB Proteins for Root Epidermis Differentiation in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 46(6): 817–826

Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25: 402-408.

Mangeon A, Magioli C, Menezes-Salgueiro AD, Cardeal V, de Oliveira C & Galvao VC (2009) AtGRP5, a vacuole-located glycine-rich protein involved in cell elongation. *Planta* 230: 253-265.

Mangeon A, Magioli C, Tarré E, Cardeal V, Araujo C, Falkenbach E, Rocha CAB, Rangel-Lima C & Sachetto-Martins G (2010a) The tissue expression pattern of the AtGRP5 regulatory region is controlled by a combination of positive and negative elements. *Plant Cell Rep* 29:461–471

Mangeon A, Junqueira RM & Sachetto-Martins G (2010b) Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Sig. Behav.* 5: 99-104.

Mazzucotelli E, Mastrangelo A M, Crosatti C, Guerra D, Stanca A M, Cattivelli L (2008) Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science* 174: 420–431.

Mousavi A & Hotta Y (2005) Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Applied Biochem Biotechnol* 120: 169-174.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.

Nakashima K, Takasaki H, Mizoi K, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819: 97–103.

Ortega-Amaro MA, Rodríguez-Hernández AA, Rodríguez-Kessler M, Hernández-Lucero E, Rosales MS, Ibáñez-Salazar A, Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont JF (2014) Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, alters plant growth and development. En preparación.

Peleg Z & Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2011 (14):290–295.

Pesch M & Hülskamp M (2011) Role of TRIPTYCHON in trichome patterning in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 11:130

Rodríguez-Hernández AA, Ortega-Amaro MA, Delgado-Sanchez P, Salinas J & Jimenez-Bremont JF (2014) *AtGRDP1* gene encoding a Glycine-Rich Domain protein is involved in germination and responds to ABA signaling. *Plant Mol Biol Rep*. DOI 10.1007/s11105-014-0714-4.

Rodríguez-Hernández AA (2014) Caracterización funcional y molecular de AtGRDP1 un nuevo gen implicado en la respuesta a ABA y estrés abiótico. Tesis Doctoral.

Ryser U, Schorderet M, Zhao GF, Studer D, Ruel K, Hauf G & Keller B (1997) Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J* 12: 97-111.

Sachetto-Martins G, Franco LO & de Oliveira DE (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Bioc Biophys Acta* 1492: 1-14.

Schmidt F, Marnef A, Cheung MK, Wilson I, Hancock J, Staiger D & Ladomery M (2009) A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced *Arabidopsis thaliana* RNA-binding proteins ATGRP7 and ATGRP8. *Mol Biol Rep* 37:839–845.

Schöning JC, Streitner C, Meyer IM, Gao Y & Staiger D (2008) Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 36 (22): 6977–6987.

Staiger D, Zecca L, Wieczorek DA, Apel K, Eckstein L (2003) The clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J* 2003 33:361-371.

Vaahtera L & Brosché M (2011) More than the sum of its parts – How to achieve a specific transcriptional response to abiotic stress. *Plant Science* 180: 421–430.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV & Provart NJ (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2(8): e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW & Chua NH (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 1: 641-646.

Zottich U, Da Cunha M, Carvalho AO, Dias GB, Casarin N, Vasconcelos IM & Gomes VM (2013) An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with

sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 3509–3516.

## Tablas

Tabla 1. Cruzas de las líneas mutantes *Atgrdp1*, *Atgrdp2*, y sobreexpresante OE6 contra línea reportera CycB1 y mutantes *Atgrdp1* y *Atgrdp2*.

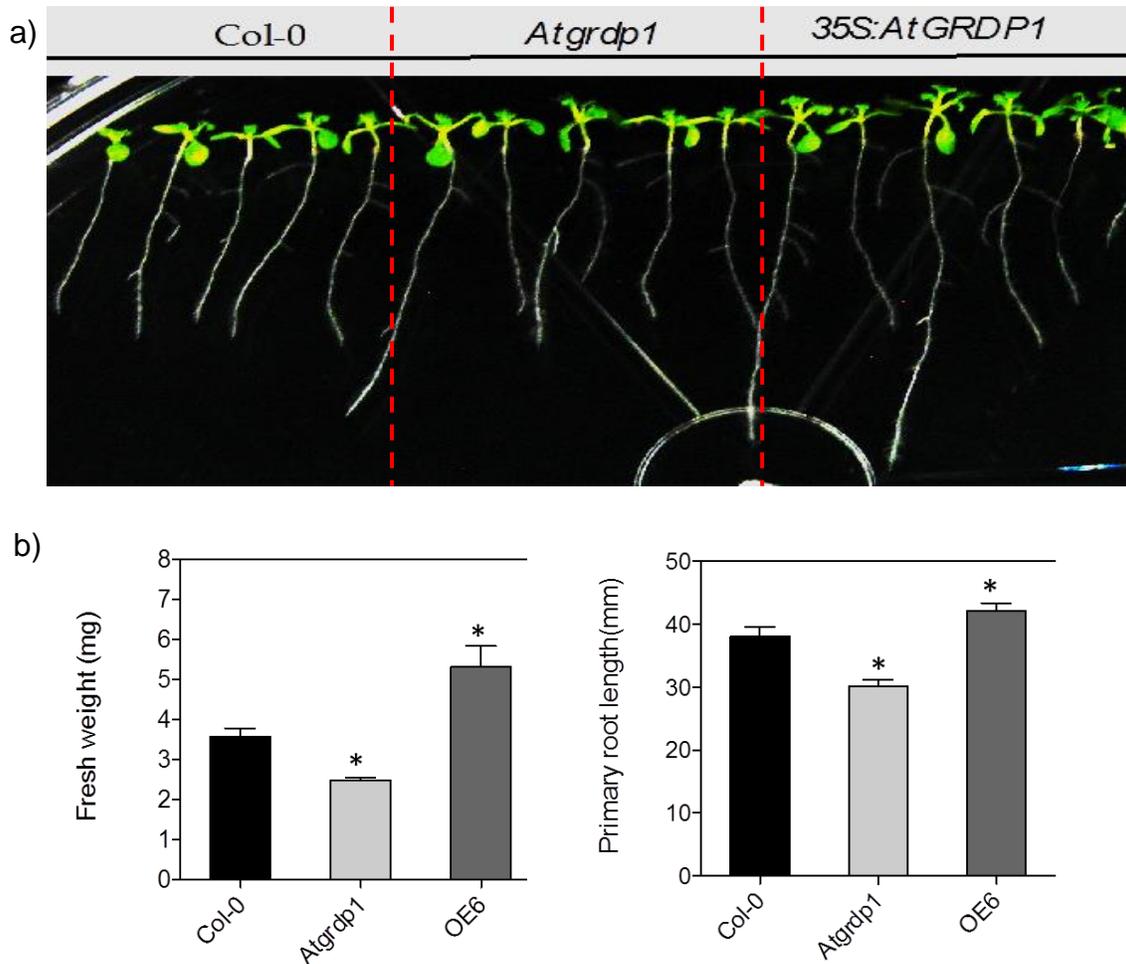
<b>Cruzas:</b>	
♀(polen)	♂(estigma)
<i>Atgrdp2</i> (mutante; parálogo de <i>AtGRDP1</i> )	CycB1
<i>Atgrdp1</i> (mutante)	CycB1
<i>Atgrdp1</i>	<i>Atgrdp2</i>
<i>Atgrdp2</i>	<i>Atgrdp1</i>
OE6 (sobreexpresante de <i>Atgrdp1</i> )	CycB1

Tabla 2. Construcciones de las versiones DUF, RRM, Splicing alternativo (*saAtGRDP1*) y versión completa *AtGRDP1*.

<b>Construcciones</b>		
<b>Vector</b>	<b>Versión</b>	<b>Propósito</b>
pMDC32	DUF	Sobre-expresión en planta ( <i>35S::DUF</i> )
pMDC32	RRM	Sobre-expresión en planta ( <i>35S::RRM</i> )
pMDC32	Splicing alternativo ( <i>saAtGRDP1</i> )	Sobre-expresión en planta ( <i>35S::saAtGRDP1</i> )
pTrc99a	Splicing alternativo ( <i>saAtGRDP1</i> )	Promotor inducible; ensayos de chaperona en <i>E.coli</i> BX04 y LR211
pTrc99a	Versión completa ( <i>AtGRDP1</i> )	Promotor inducible; ensayos de chaperona en <i>E.coli</i> BX04 y LR211
pEarleyGate-103	Splicing alternativo ( <i>saAtGRDP1</i> )	Fusión traduccional ( <i>35S::saAtGRDP1:GFP</i> )
pEarleyGate-103	Versión completa ( <i>AtGRDP1</i> )	Fusión traduccional ( <i>35S::AtGRDP1:GFP</i> )

## Figuras

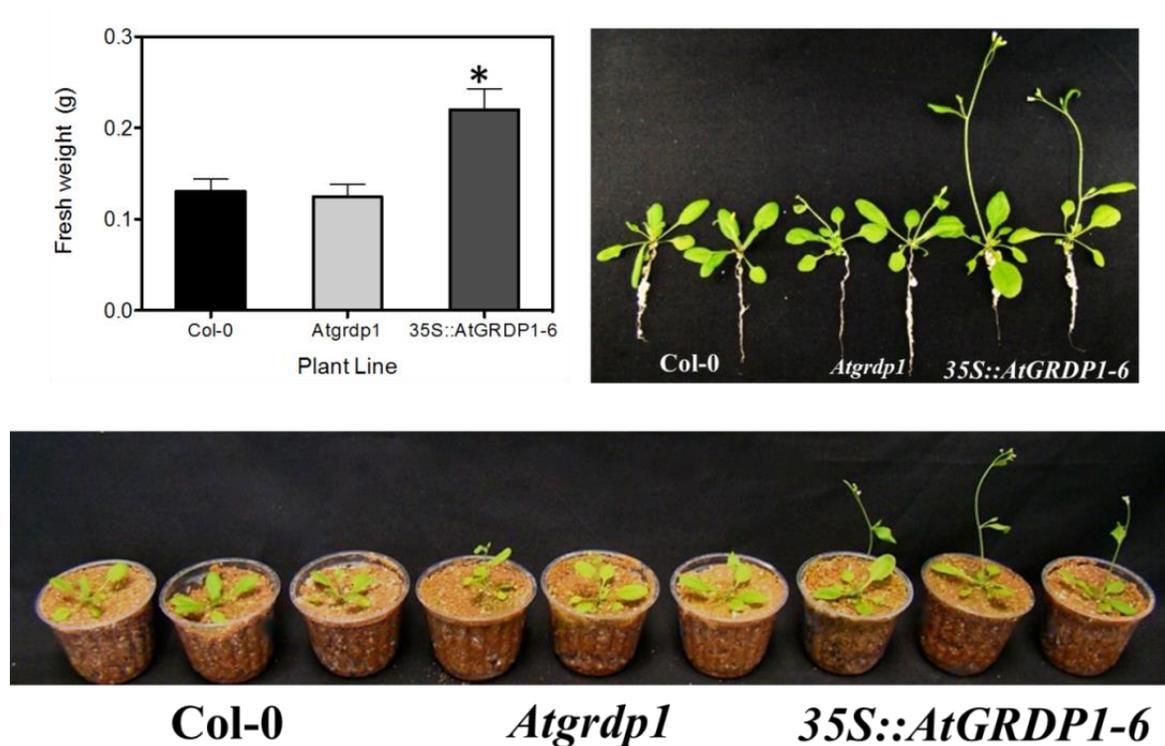
Figura 1



**Figura 1. Desarrollo de plántulas de las líneas; Col-0, mutante y sobreexpresante.**

a) Foto representativa de las plántulas de dos semanas de *Arabidopsis thaliana* líneas; Col-0, mutante (*Atgrdp1*) y sobreexpresante (OE6). b) Graficas del peso fresco y longitud de raíz de cada una de las líneas. Las barras representan la media del error estándar ( $\pm$  SE). Asteriscos representan diferencia significativa  $p < 0.05$  Tukey's test.

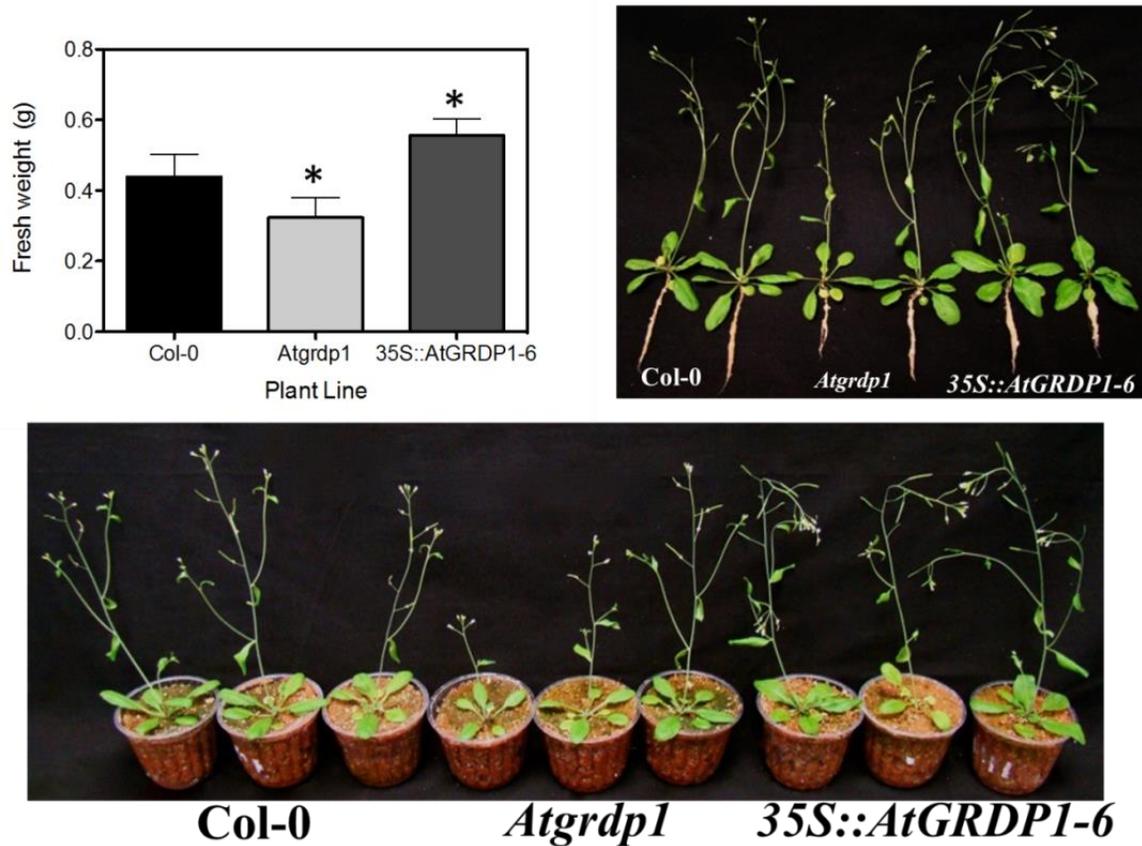
Figura 2



**Figura 2. Evaluación del crecimiento de las líneas Col-0, mutante (*Atgrdp1*) y sobreexpresante (OE6) en sustrato semi-hidropónico a las cuatro semanas.**

Fotografías representativas de plantas de *Arabidopsis* y grafica de peso fresco y de las líneas Col-0, mutantes y OE6 en plantas de cuatro semanas de edad crecidas en un sustrato semi-hidropónico. Las barras representan la media del error estándar ( $\pm$  SE). Asteriscos representan diferencia significativa  $p < 0.05$  Tukey's test.

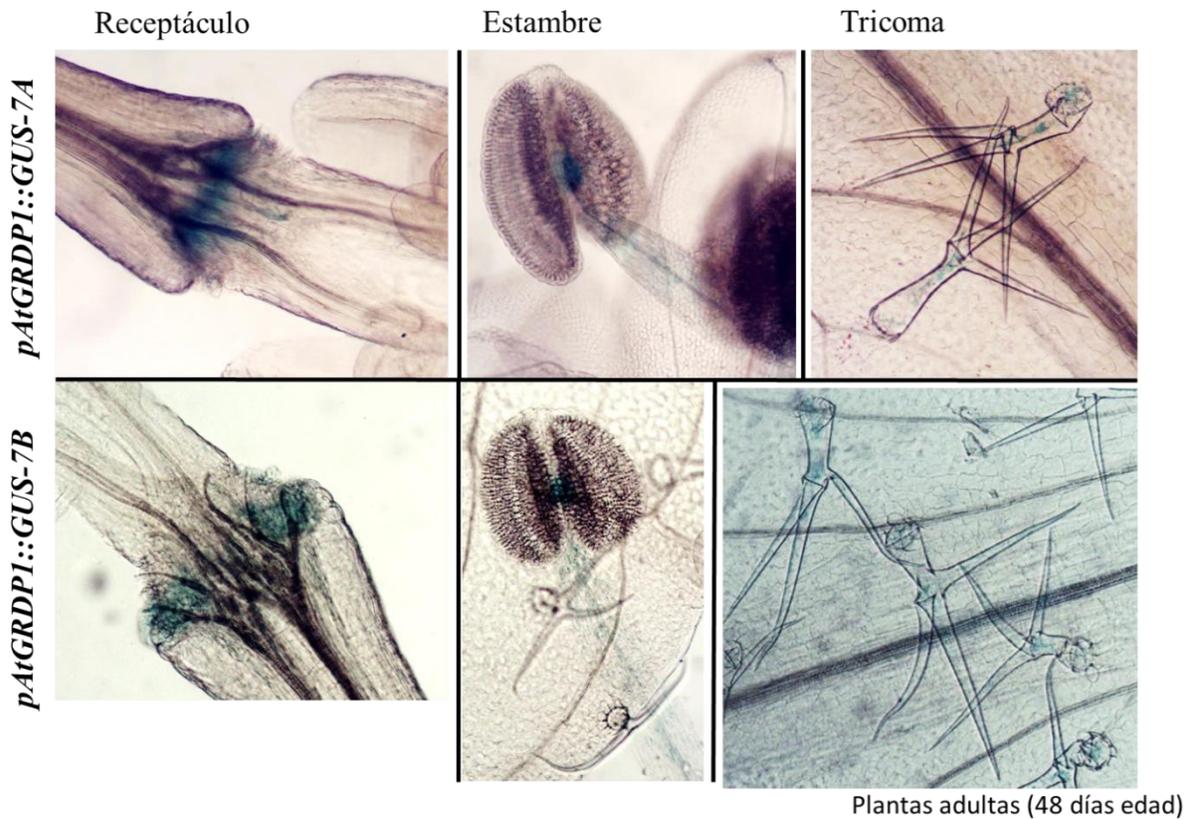
Figura 3



**Figura 3. Evaluación del crecimiento de las líneas Col-0, mutante (*Atgrdp1*) y sobreexpresante (OE6) en sustrato semi-hidropónico a las cinco semanas.**

Plantas de cinco semanas representativas del experimento y gráfica de peso fresco y de las líneas analizadas a las cinco semanas de edad crecidas en un sustrato semi-hidropónico. Las barras representan la media del error estándar ( $\pm$  SE). Asteriscos representan diferencia significativa  $p < 0.05$  Tukey's test.

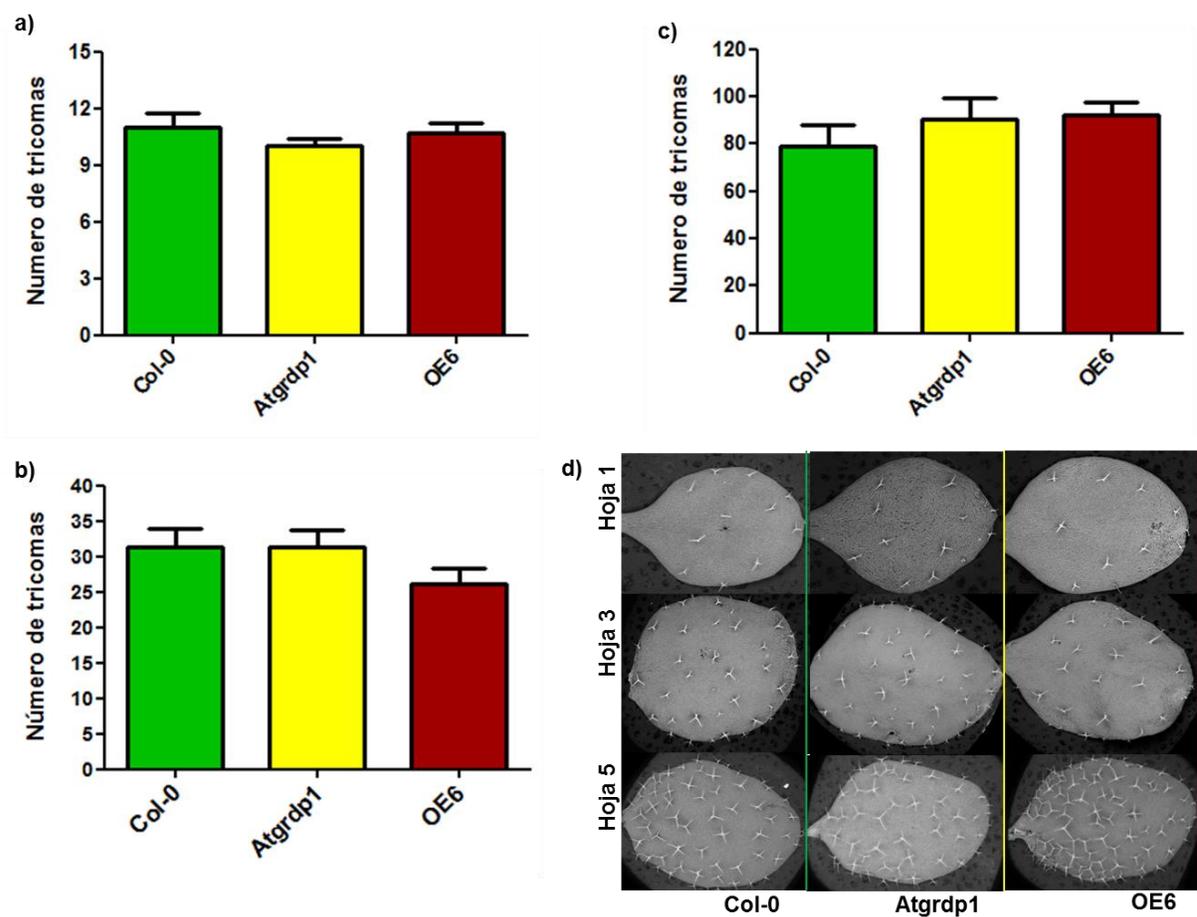
Figura 4



**Figura 4. Fotografías de las líneas reporteras que contienen el promotor de *AtGRDP1* fusionado a GUS (*pAtGRDP1::GUS*).**

Fotografías representativas de las líneas reporteras *pAtGRDP1::GUS-7A* (Arriba) y *pAtGRDP1::GUS-7B* (Abajo) de plantas adultas de 48 días de edad. De izquierda a derecha, expresión de GUS en receptáculo de silicua, estambre y tricoma.

Figura 5



**Figura 5. Gráficas de número de tricomas y microfotografías de las líneas de las hojas 1, 3 y 5 de las líneas Col-0, Atgrdp1 y OE6.**

Gráficas; a) Numero de tricomas en la hoja 1; b) número de tricomas en la hoja 3; c) número de tricomas en la hoja 5. d) Macrofotografías representativas de las hojas 1, 3 y 5 para cada línea.

Figura 6

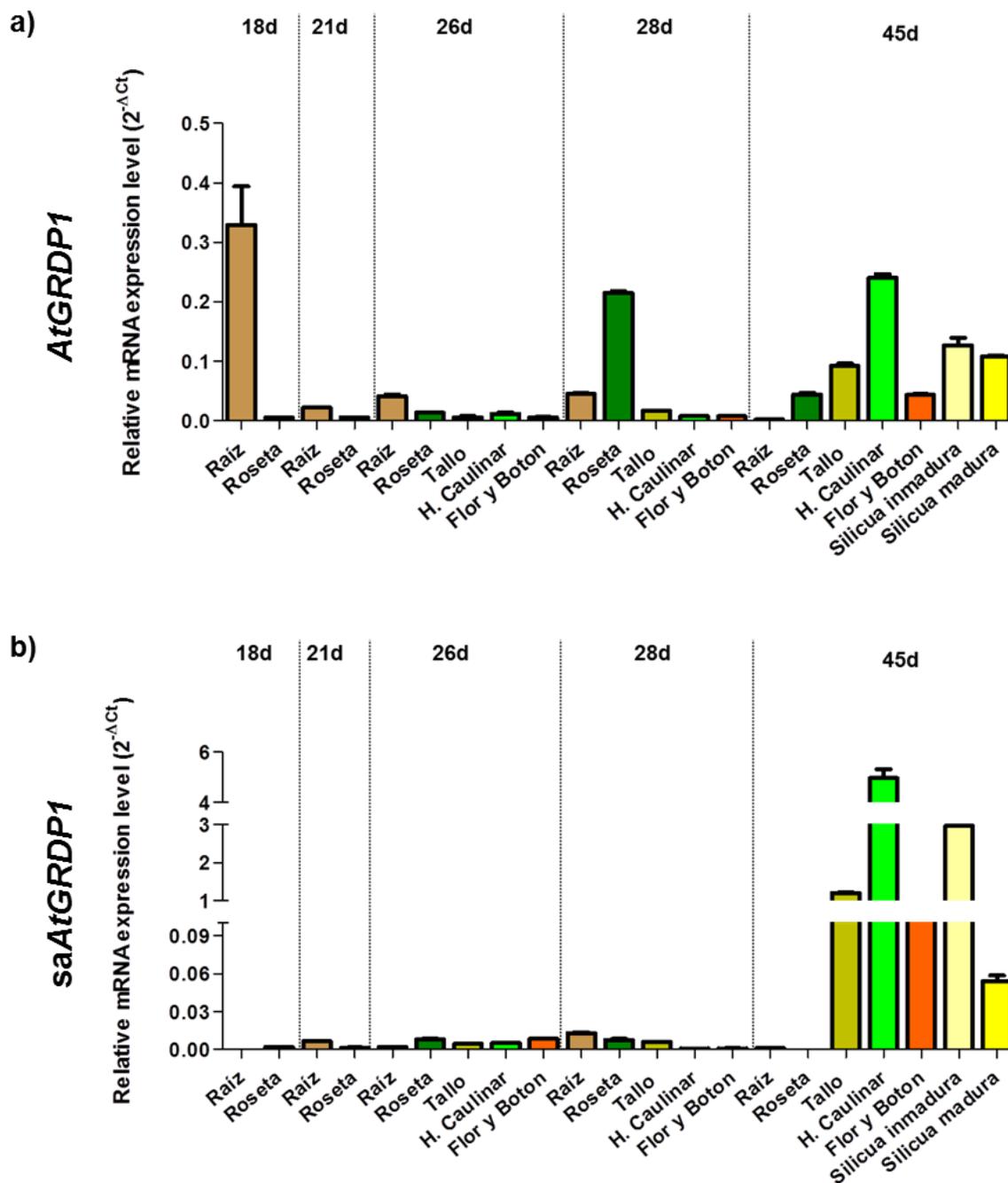


Figura 6. Gráficas de expresión relativa para *AtGRDP1* y *saAtGRDP1* en plantas de *Arabidopsis* en diferentes estadios de desarrollo.

a) Expresión relativa de *AtGRDP1* en plantas con 18, 21, 26, 28 y 45 días de desarrollo. En el eje de las x los tejidos de la planta presentes en esa etapa del desarrollo. b) Expresión relativa de *saAtGRDP1* en los mismos tiempos y tejidos.

Figura 7

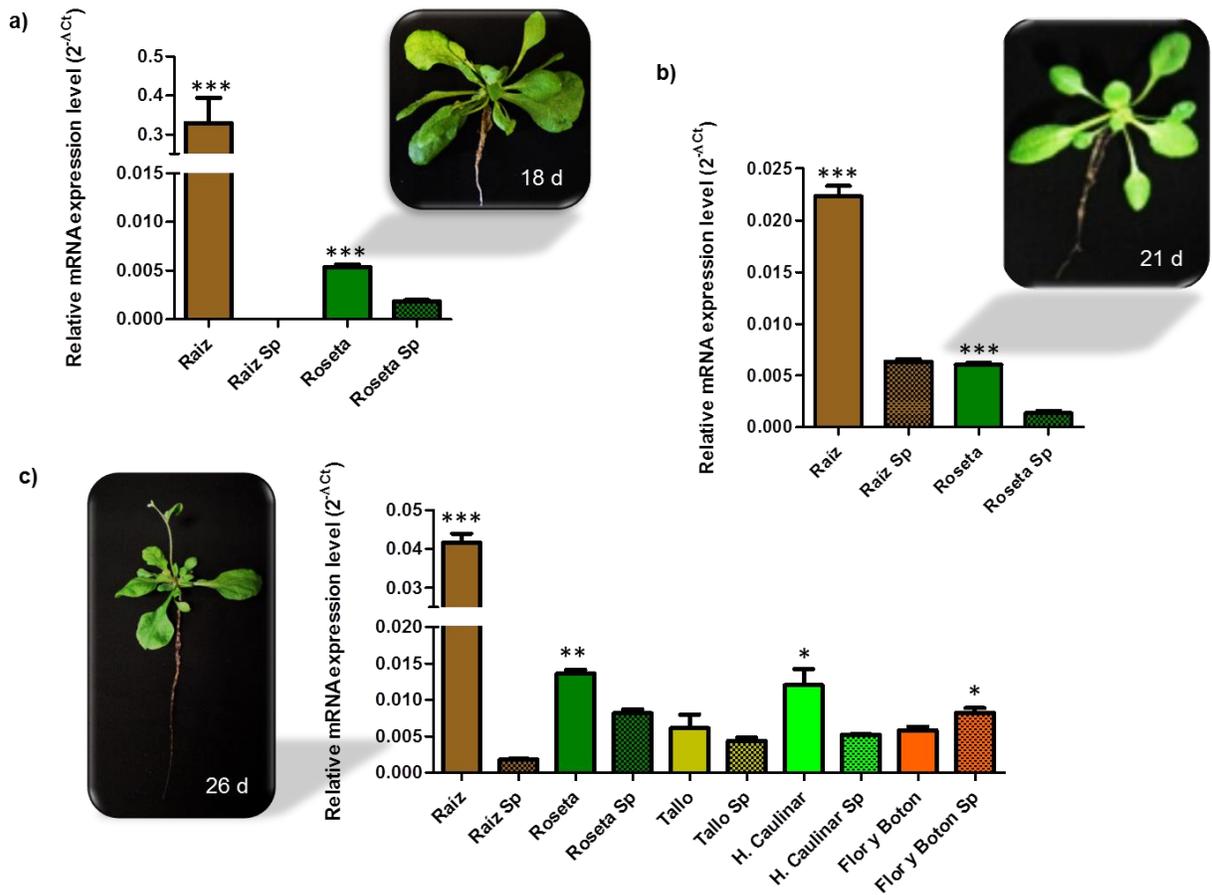
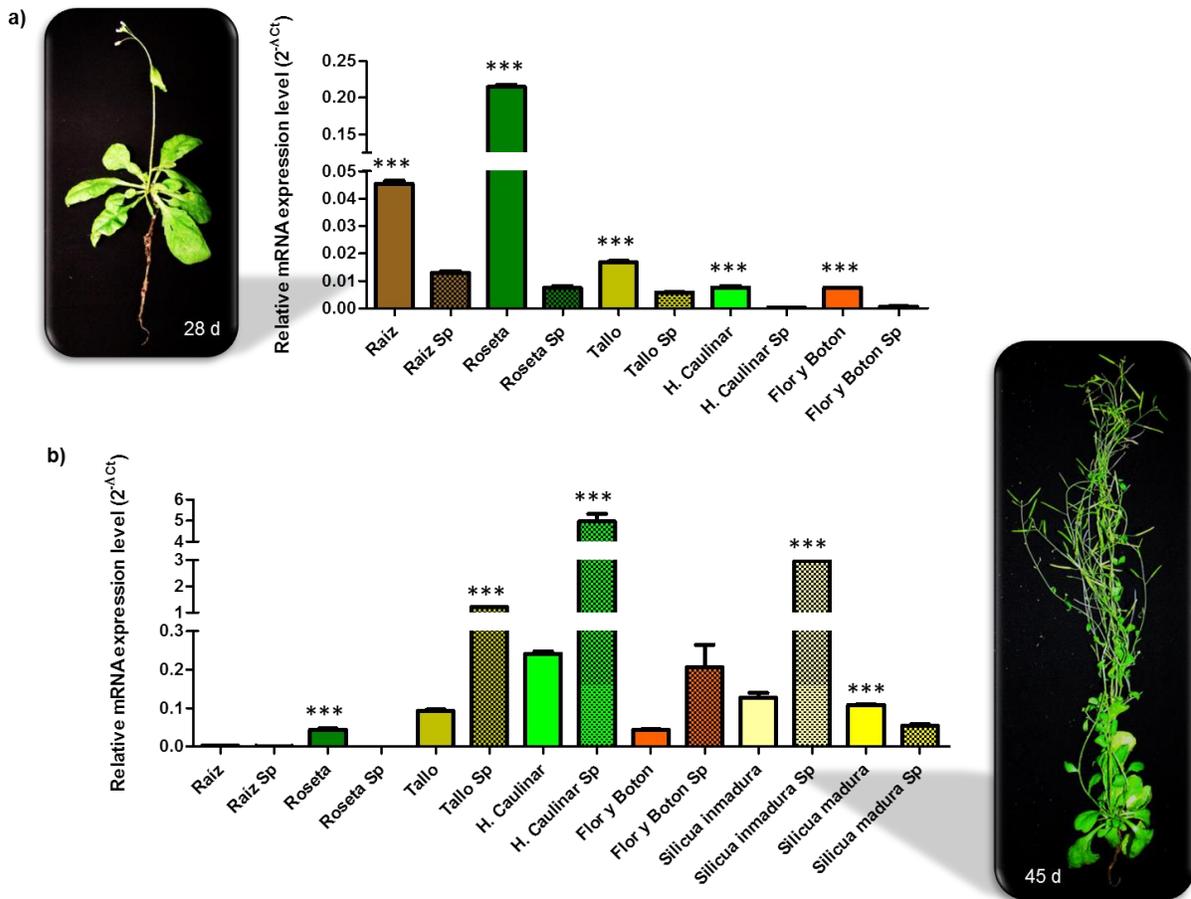


Figura 7. Gráficas de expresión relativa en donde se compara *AtGRDP1* vs *saAtGRDP1* en plantas de *Arabidopsis* a los 18, 21 y 26 días de desarrollo.

Expresión relativa de *AtGRDP1* vs su versión de splicing alternativo; *saAtGRDP1* en a) plantas con 18 días de desarrollo a los; b) 21 días y c) 26 días. La versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) está representada con las letras Sp. Las barras representan la media del error estándar ( $\pm$  SE). Asteriscos representan diferencia significativa  $p < 0.05$ . Prueba; t de student no pareada.

Figura 8



**Figura 8. Gráficas de expresión relativa en donde se compara *AtGRDP1* vs *saAtGRDP1* en plantas de *Arabidopsis* a los 28 y 45 días de desarrollo.**

Expresión relativa de *AtGRDP1* vs *saAtGRDP1* en; a) plantas con 28 días de desarrollo y b) 45 días. La versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) está representada con las letras Sp. Las barras representan la media del error estándar ( $\pm$  SE). Asteriscos representan diferencia significativa  $p < 0.05$ . Prueba; t de student no pareada.

Figura 9

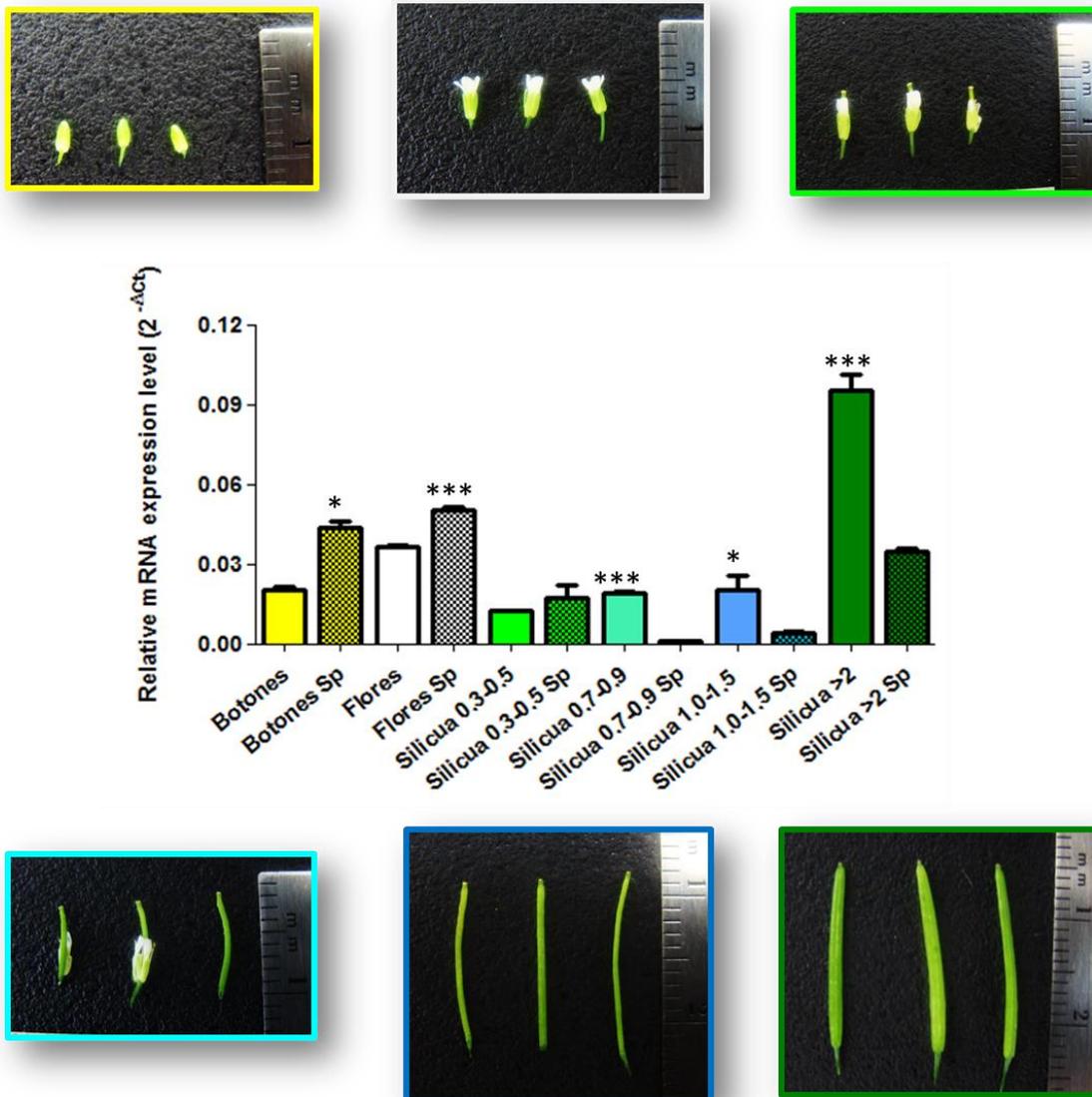
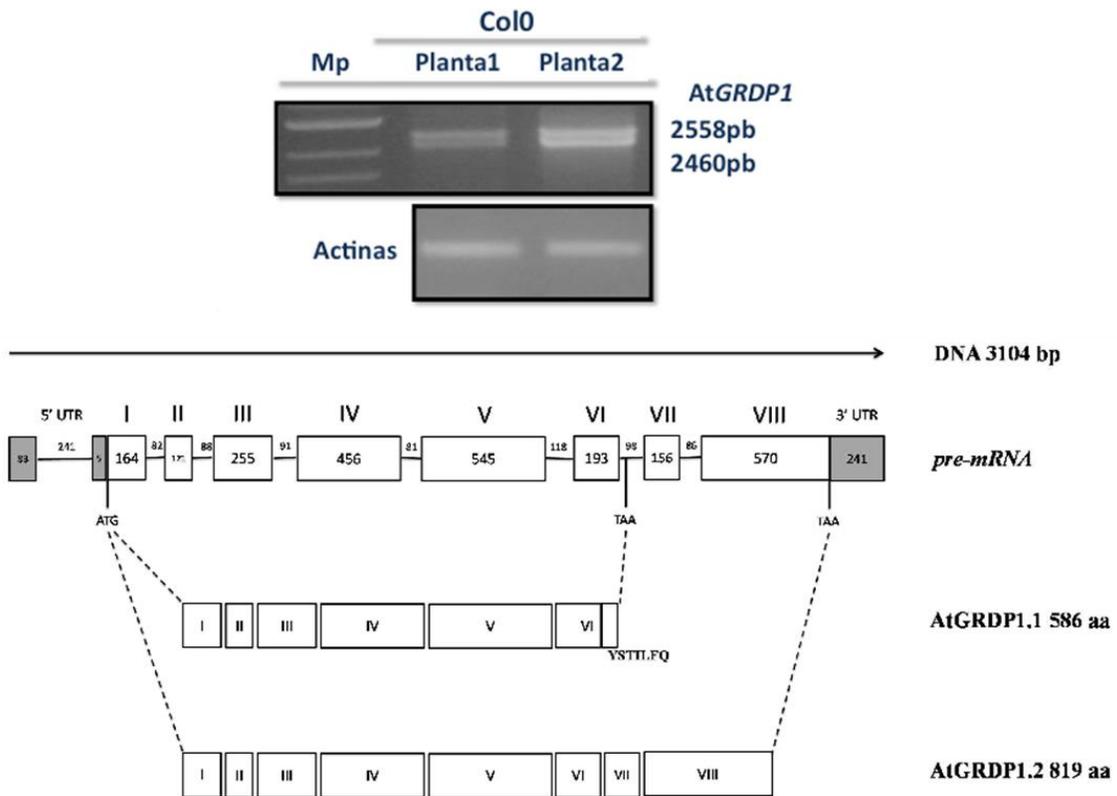


Figura 9. Gráfica de expresión relativa en donde se compara *AtGRDP1* vs *saAtGRDP1* durante el desarrollo de la flor y de la silicua.

Expresión relativa de *AtGRDP1* vs *saAtGRDP1* durante el desarrollo de la flor y de la silicua. La versión de splicing alternativo (*saAtGRDP1*) está representada con las letras Sp. Las medidas de las silicuas están en centímetros. Las barras representan la media del error estándar ( $\pm$  SE). Asteriscos representan diferencia significativa  $p < 0.05$ . Prueba; t de student no pareada.

## ANEXOS

### Anexo 1



#### Anexo 1. Versión de splicing alternativo del gen *AtGRDP1*.

Arriba: Gel de agarosa que muestra las isoformas del gen *AtGRDP1*. Versión de splicing (*saAtGRDP1*) por retención de intrón; 2558pb, versión completa; 2460pb. Control de carga; Actinas. Abajo: Figura representativa del pre-mRNA de *AtGRDP1* con sus ocho exones y siete intrones. Versión de las proteínas de splicing alternativo *saAtGRDP1* (586 aa) y versión completa *AtGRDP1* (819 aa).