



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis de la expresión del gen *AtGRDP2* de
Arabidopsis thaliana bajo estrés abiótico y la
aplicación de hormonas**

Tesis que presenta
Genessis Montalvo Guevara
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis de la expresión del gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés abiótico y la aplicación de hormonas**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Genesis Montalvo Guevara** y aprobada el **29 de septiembre de 2021** 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

Dr. Cesare Moisés Ovando Vázquez
Miembro del Comité Tutoral

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Miembro del Comité Tutoral

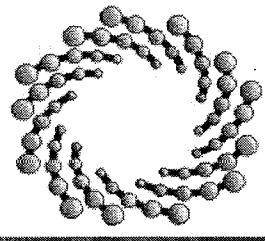


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y 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. CVU. 931497 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Esta tesis recibió apoyo del Proyecto de Ciencia Básica titulado “Caracterización de la proteína de unión a RNA *AtGRDP2* de *Arabidopsis* bajo estrés por frío” (A1-S-25233).



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 225 del Libro Segundo 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 11 días del mes de noviembre del año 2021, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Dr. Cesaré Moises Ovando Vázquez
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Presidente
Secretario
Sinodal

IPICYT
IPICYT
IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Genessis Montalvo Guevara

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de la expresión del gen AtGRDP2 de Arabidopsis thaliana bajo estrés abiótico y la aplicación de hormonas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

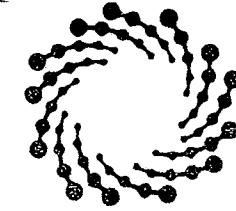
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:15 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 11 días del mes de noviembre de 2021.

Marcial Bonilla
Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



IPICYT

SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

Esta tesis está dedicada:

A mi madre que ha estado incondicionalmente a mi lado, en los malos y buenos momentos. Siempre sosteniéndome al caer y apoyando cada sueño que he tenido. Gracias por estar siempre para mí.

A mi abuelo que siempre creyó en que un día sería una mujer ejemplar y exitosa. Espero que donde quiera que este, pueda ver mis triunfos y este orgulloso de mi. A mi tía Esme que es como una segunda madre, siempre dispuesta a brindarme su apoyo. Sin ella no hubiera podido concluir esta etapa de mi vida.

A mi hermana que a pesar de llevar una vida ocupada siempre encontró un momento para tenderme su mano. Gracias hermanita.

A mi abuelita que siempre me ha apoyado a lo largo de la vida.

A mi primito Gael que siempre me hizo ver que la palabra “rendirse” pierde sentido cuando se tiene fortaleza.

A mi novio por estar siempre cuando mas lo necesite, por ayudarme y darme su apoyo.

A mis perros que, aunque no me entiendan siempre están incondicionalmente a mi lado.

A mis amigos por apoyarme y estar junto a mi cuando lo necesitaba. Gracias.

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme participar en este proyecto. Así como a sus valiosas enseñanzas que me han formado mejor profesionalmente. También quiero agradecer a la Dra. Azucena Ortega Amaro por transmitirme todos sus conocimientos y brindarme su ayuda. Muchas gracias por el apoyo y la paciencia.

Además, agradezco enormemente al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y al Dr. Cesare Moisés Ovando Vázquez, por su dedicación y enseñanzas.

Finalmente, agradezco a la MC. Alicia Becerra por su apoyo en el laboratorio. Y a Daniel Saldaña Torres por su apoyo.

A mi familia por siempre apoyarme.

También agradezco a todos mis profesores por trasmitirme todas sus enseñanzas y formarme como profesionista.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Resumen	ix
Abstract	x
Capítulo I	1
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Materiales y métodos	8
2.1. Condiciones de crecimiento vegetal.	8
2.2. Análisis histoquímico de la β -glucuronidasa (GUS).	8
2.3. Análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS en la línea Pro:GUS-13 de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a estrés abiótico.	8
2.4. Análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS en la línea Pro:GUS-13 de <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo la aplicación de hormonas.	9
2.5. Análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS en la línea Pro:GUS-13 de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a inhibidores de auxinas.	9
2.6. Análisis in silico del promotor del gen <i>AtGRDP2</i> .	10
3. Resultados	11
3.1. Análisis de expresión del gen <i>AtGRDP2</i> mediante la línea reportera que contiene el Promotor de <i>AtGRDP2</i> fusionado a los reporteros GFP-GUS bajo estrés abiótico y hormonas.	11
3.2. Análisis de expresión de la línea reportera Promotor- <i>AtGRDP2::GFP-GUS</i> bajo fitohormonas y estrés por frío a corto, mediano y largo plazo.	12
3.3. Análisis de expresión de la línea reportera Promotor- <i>AtGRDP2::GFP-GUS</i> bajo estrés salino a corto, mediano y largo plazo.	13
3.4. Análisis de la expresión de la línea reportera Promotor- <i>AtGRDP2::GFP-GUS</i> bajo la aplicación de inhibidores de Auxinas.	14
3.5. Análisis de la expresión de la línea reportera Promotor- <i>AtGRDP2::GFP-GUS</i> bajo la aplicación de ABA e inhibidores de Auxinas.	14
3.6. Análisis in silico del promotor del gen <i>AtGRDP2</i> .	16
4. Discusión	17
Agradecimientos	41
Bibliografía	42

Listado de figuras

Fig. 1. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por estrés.	23
Fig. 2. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 en raíces de <i>Arabidopsis</i> por estrés a diferentes tiempos.	25
Fig. 3. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por estrés salino a corto, mediano y largo plazo.	27
Fig. 4. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por inhibidores	28

de auxinas.	
Fig. 5. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por inhibidores de auxinas y ácido abscísico.	31
Fig. 6. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por inhibidores de auxinas y ácido abscísico.	33
Fig. 7. Análisis de las posibles secuencias regulatorias en el promotor de AtGRDP2.	35
Fig. 8. Vías biosintéticas del ácido indolacético (IAA) y sus inhibidores	36

Material suplementario

Suplementaria 1. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 en raíces de <i>Arabidopsis</i> por estrés a diferentes tiempos.	38
Suplementaria 2. Expresión del gen reportero en la línea Pro-GUS-13 en raíces de <i>Arabidopsis</i> por estrés a diferentes tiempos.	40

Capítulo II	47
Resumen	48
1. Introducción	49
2. Materiales y métodos	50
2.1. Condiciones de crecimiento vegetal.	50
2.2. Extracción de ARN total de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
2.3. Síntesis de cDNA de plántulas sometidas a estrés por frío.	50
2.4. Identificación de genes candidatos de las líneas sobreexpresante y mutante del gen AtGRDP2 bajo estrés salino.	51
2.5. Análisis de expresión del gen AtGRDP2 en las líneas mutante y sobreexpresante por qRT-PCR.	51
3. Resultados y discusión	52
3.1. Identificación de genes inducidos de las líneas sobreexpresante y mutante del gen AtGRDP2 bajo estrés salino.	52
3.2. La sobreexpresión del gen AtGRDP2 potencia la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico.	52
4. Conclusión	55
Agradecimientos	64
Bibliografía	65

Lista de tablas

Tabla 1. Genes seleccionados del análisis de microarreglos de AtGRDP2 bajo estrés salino.	56
Tabla 2. Oligos utilizados en el análisis de expresión por qRT-PCR.	57

Lista de figuras

Fig. 1. Análisis de expresión de los genes candidatos en líneas sobreexpresantes y mutantes de AtGRDP2 bajo estrés por frío	58
---	----

Material suplementario

Tabla suplementaria 1. 30 proteínas inducidos en la línea mutante y sobreexpresante del gen AtGRDP2 bajo estrés salino.	59
Suplementaria 1. Selección de 30 genes de microarreglos de la línea mutante y sobreexpresante de AtGRDP2.	63

RESUMEN

Análisis de la expresión del gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés abiótico y la aplicación de hormonas.

El gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana* codifica para una proteína con un dominio rico en glicina involucrada en la respuesta a estrés salino y en crecimiento de la planta. En el capítulo 1 se caracterizó la regulación transcripcional del gen *AtGRDP2* bajo estrés por frío y salino, y la aplicación exógena de hormonas como el ácido abscísico (ABA) y el ácido indolacético (IAA), mediante la fusión transcripcional del promotor de *AtGRDP2* y el gen reportero GUS (*pAtGRDP2::GUS*). Los resultados mostraron un incremento de la señal de GUS en la zona de elongación y las puntas de las raíces de plántulas bajo estrés salino, y una señal de GUS más intensa bajo estrés por frío. De los tratamientos con fitohormonas, el ABA fue el que mostró la mayor inducción del promotor *AtGRDP2*, en comparación con el IAA. Cuando analizamos en la línea *pAtGRDP2::GUS* el efecto de la aplicación de tres inhibidores de auxinas como el ácido N-1-naphthalphthalámico, la L-kynurenina y el ácido 4-fenoxifenil borónico, observamos un ligero aumento en la señal de GUS en las puntas y en la zona de elongación de las raíces a 22°C. Nuestros resultados muestran que el gen *AtGRDP2* responde a estrés abiótico y a fitohormonas. En el capítulo 2, seleccionamos tres genes tales como *TOZ*, *TMPIT-like protein* y *ATHAM* mediante un análisis bioinformático de un microarreglo elaborado de plántulas de la línea sobreexpresante 35S::*AtGRDP2* vs la línea mutante *Atgrdp2* crecidas a 150 mM NaCl por tres días. Nosotros observamos que estos tres genes fueron inducidos bajo estrés por frío (4°C) por 24h en plántulas de la línea sobreexpresante 35S::*AtGRDP2*, en comparación a la línea mutante y a la parental Col-0. Nuestros datos muestran que *AtGRDP2* es un gen de respuesta a estrés abiótico, y que la sobreexpresión favorece el incremento en la expresión de genes bajo estrés por frío.

Palabras Clave: estrés por frío; estrés por salinidad; ácido indolacético: ácido abscísico; microarreglos; expresión génica.

ABSTRACT

AtGRDP2 gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress and hormone application.

The *Arabidopsis thaliana* *AtGRDP2* gene encodes a glycine rich domain protein, involved in salt stress response and plant growth. In chapter one we characterize *AtGRDP2* transcriptional regulation under cold and salinity stress, and the exogenous hormone application such as abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA), through a transcriptional fusion of *AtGRDP2* promoter and GUS reporter gene (*pAtGRDP2::GUS*). Results showed a GUS signal increase on the seedlings root tip and the elongation zone under salinity stress, and more intense GUS signal under cold stress. In phytohormone treatments, ABA triggered the highest *AtGRDP2* promoter induction, compared to IAA. When we analyzed in the *pAtGRDP2::GUS* line the effect of three auxin repressors, N-1-naphthylphthalamic acid, L-kynurenine and Phenoxyphenyl boronic acid, we observed a slight accumulation of GUS signal on the root tips and elongation zone at 22°C. Our result showed that the *AtGRDP2* gene respond to abiotic stress and phytohormones. In chapter two, we selected three genes, such as *TOZ*, *TMPIT-like protein* and *ATHAM*, through a seedlings microarray bioinformatics analysis from the 35S::*AtGRDP2* over-expression line vs *Atgrdp2* mutant line growth at 150 mM NaCl for three days. We observe that these three genes were induced under cold stress (4°C) for 24h on seedlings from the 35S::*AtGRDP2* over-expression line in comparison to *Atgrdp2* mutant and the parental Col-0. Our results showed that *AtGRDP2* is an abiotic-stress responsive gene, and its overexpression leads to increased expression of genes under cold stress.

Keywords: cold stress; salinity; indoleacetic acid; abscisic acid; microarray; genic expression.

CAPÍTULO I

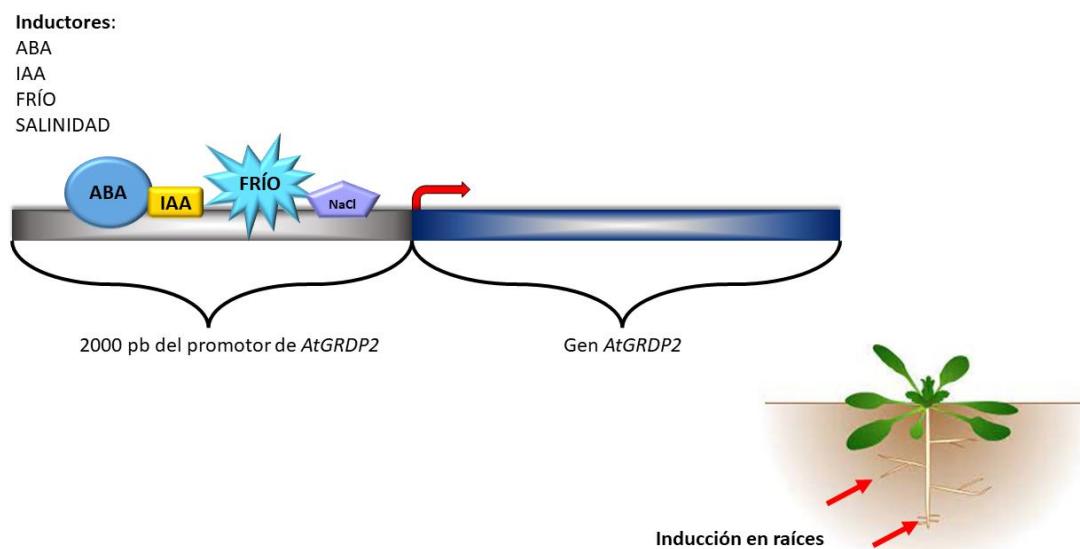
Análisis de la expresión del gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés abiótico y la aplicación de hormonas

Genesis Montalvo-Guevara¹, Azucena Ortega-Amaro¹, Juan Francisco Jiménez-Bremont^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Molecular Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, San Luis Potosí, México

RESUMEN

En este trabajo se realizó la caracterización de la regulación transcripcional del gen *AtGRDP2* bajo estrés por frío y salino, y la aplicación exógena de hormonas como el ácido abscísico (ABA) y el ácido indolacético (IAA). Esto se realizó mediante la fusión transcripcional del promotor de *AtGRDP2* y el gen reportero GUS (p*AtGRDP2::GUS*). Los resultados muestran un incremento de la señal de GUS en las plántulas en las puntas de las raíces y en la zona de elongación bajo estrés salino, y una señal más intensa bajo estrés por frío. De los tratamientos con fitohormonas, el ABA fue el que mostró la mayor inducción del promotor *AtGRDP2*, en comparación con el IAA. Además, analizamos los efectos de tres inhibidores de auxinas en la línea p*AtGRDP2::GUS*, como el ácido N-1-naphthylphthalámico, la L-kynurenina y el ácido 4-fenoxifenil borónico, la aplicación de estos muestra una ligera expresión del gen reportero GUS en las puntas de las raíces y en la zona de elongación a 22°C. Nuestros resultados muestran que el gen *AtGRDP2* responde a estrés abiótico y fitohormonas.



1. INTRODUCCIÓN

Los factores ambientales son los principales determinantes del crecimiento y del desarrollo en las plantas, particularmente aquellos que afectan la disponibilidad del agua como son la sequía y los cambios de temperatura (Janská et al., 2010). Se estima que el 90% de la tierra cultivable del planeta está propensa a experimentar uno o varios tipos de estrés abiótico como las temperaturas extremas, salinidad, sequía, exceso de agua, entre otros, lo que causa un 70% en la perdida de cultivos (Waqas et al., 2019).

El estrés por frío es uno de los factores más limitantes para la productividad de los cultivos, en especial de aquellos que crecen en ambientes tropicales como el arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), tomate (*Solanum lycopersicum*), soya (*Glycine max*) y algodón (*Gossypium hirsutum*) (Ding et al., 2019). El estrés por frío se divide en dos tipos, por enfriamiento (0 a 20°C) y por congelamiento (< 0°C) (Chinnusamy et al., 2007; Kazemi-Shahandashti and Maali-Amiri, 2018). Los principales efectos en las plantas causados por estrés por frío son la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la deshidratación de células y tejidos, cambios en la fluidez y estabilidad de la membrana lipídica (provocado por el aumento en la cantidad de ácidos grasos insaturados) y la ruptura de organelos, esto se origina por una interrupción en la homeostasis. La generación de ERO en las células derivado del estrés abiótico provoca la degradación de macromoléculas esenciales como polisacáridos, lípidos, pigmentos fotosintéticos, y la desnaturalización de enzimas y ácidos nucleicos (Kazemi-Shahandashti and Maali-Amiri, 2018). También las bajas temperaturas alteran el funcionamiento de la cadena de transferencia de electrones en la mitocondria. Las mitocondrias poseen dos vías en la cadena de transporte de electrones (la vía citocromo oxidasa y la vía alternativa de oxidasa), se cree que al someterse a una temperatura baja, se activa la vía alternativa de la oxidasa con el fin de reducir la producción de ERO; sin embargo, este cambio disminuye la producción de ATP (Armstrong et al. 2008).

Por otro lado, el estrés por congelamiento es más demandante para la planta ya que puede causar hasta la muerte de esta. El daño por congelamiento comienza

con la nucleación de hielo extracelular, estos crecen y forman cristales de hielo. Los cristales de hielo se esparcen hacia el apoplasto dañando a la membrana celular, provocando la deshidratación de las células. Una vez ocurrido esto el daño es irreversible (Ding et al., 2019).

Se ha reportado que las plantas tolerantes a estrés por frío presentan diferentes estrategias para poder resistir este tipo de estrés ambiental, como por ejemplo está el caso de una variedad de arroz tolerante a frío (*Oryza sativa japonica*) la cual acumula clorofila, contrario a la variedad sensible de arroz (*O. sativa indica*) (Sanghera et al., 2011). Algunas especies de plantas adaptadas a climas fríos como *Cistus albidus*, *Arctostaphylos uva-ursi* y *Buxus sempervirens*, entre otras, como mecanismo de tolerancia reducen la sensibilidad fotosintética con el objetivo de evitar la disminución en la eficiencia fotosintética, producida al haber una sobre-excitación en los aparatos fotosintéticos durante las temporadas de frío y la alta radiación solar (Silva-Cancino et al., 2012). El frío provoca infertilidad en los granos de polen. Una estrategia de tolerancia al estrés por frío que se ha reportado es la que emplea el cultivar de arroz chino R31 tolerante a frío, el cual mantiene la concentración de almidón en los granos de polen así evitando la infertilidad (Oliver et al., 2005).

Se ha reportado qué diversos factores de transcripción como los pertenecientes a las familias CBF (C-repeat-binding factor, por sus siglas en inglés), MYB (V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog, por sus siglas en inglés), CRF (cytokinin response factors, por sus siglas en inglés) entre otros, juegan un papel fundamental en la respuesta a estrés por frío (An et al., 2018; Zwack et al., 2016). Dichos factores de transcripción inducen la expresión de genes de respuesta al estrés por frío como por ejemplo: dehidrinas (*DHN*, por sus siglas en inglés), "cold-regulated" (COR, por sus siglas en inglés), *heat-shock* (HSP, por sus siglas en inglés), *late embryogenesis abundant* (LEA) (Janská et al., 2010). Y proteínas de unión a ARN pertenecientes a la familia de las proteínas ricas en glicina (GRPs) como AtGRP2 (Fusaro et al., 2007), AtGRP7 y AtGRP4 (Kim et al., 2010). Además de enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasa, glutatióperoxidasa, glutatióreductasa, ascorbato peroxidasa y catalasa que ayudan a reducir los

niveles de ERO y por ende la estabilizan de la membrana plasmática (Janská et al., 2010).

El mecanismo de respuesta a estrés abiótico es una red compleja de reacciones que, además de receptores, factores de transcripción que enciendan la expresión génica, se requiere de la participación de hormonas vegetales para activar la señalización de la respuesta al estrés. Las principales hormonas de defensa en plantas son el ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido salicílico (SA) y jasmonato (JA) (Verma et al., 2016). Se sabe que el ABA regula procesos fisiológicos en el desarrollo de las plantas como la apertura de estomas, el desarrollo de las semillas, la morfogénesis del embrión, la dormancia y el almacenamiento de proteínas y lípidos (Sreenivasulu et al., 2012). Además, esta fitohormona juega un papel clave en la señalización a la respuesta al estrés abiótico (Raghavendra et al., 2010). Existen reportes que aproximadamente el 10% de genes que codifican para proteínas en *Arabidopsis* son regulados por ABA (Fujita et al., 2011). De acuerdo con una investigación realizada en plantas de alfalfa (Long et al., 2013), el gen *MsGRP* que codifica para una proteína rica en glicina, se induce por ABA.

Las proteínas ricas en glicina (GRP, por sus siglas en inglés) juegan un papel importante en plantas sometidas a diversos tipos de estrés (Kim et al., 2010). Las GRPs canónicas poseen más del 20% de glicinas en su contenido total aminoacídico. Estas se dividen de acuerdo a los motivos o dominios que poseen, y se han clasificado en cuatro grupos. Del grupo IV, que son GRP que contienen dominios de unión a ARN, el primer subgrupo cuenta con un motivo de reconocimiento de ácido ribonucleico (ARN) (RRM, por sus siglas en inglés); el segundo subgrupo tiene un motivo RRM y un dedo de zinc tipo CCHC (CysCysHisCys); el tercer subgrupo muestra un dominio de choque por frío y dos o más dedos de zinc; y el cuarto y último subgrupo cuenta con dos motivos RRM (Mangeon et al., 2010).

En nuestro grupo de trabajo se comenzó a estudiar una nueva familia de genes de *Arabidopsis thaliana* conformada por cuatro genes *AtGRDP1* (At2g22660), *AtGRDP2* (At4g37900), At1g56230 y At4g37682, los cuales tienen la característica

de poseer un dominio de función desconocida (DUF1399, por sus siglas en inglés). Recientemente se reportó que los genes *AtGRDP1* y *AtGRDP2* son inducidos bajo estrés abiótico (Ortega-Amaro et al., 2015; Rodríguez-Hernández et al., 2014). Plántulas de *Arabidopsis* sobre-expresoras del gen *AtGRDP1* presentan tolerancia a estrés osmótico y salino, además sus germinados muestran tolerancia a la aplicación exógena de ABA; mientras que las mutantes *Atgrdp1* son sensibles ante estos tipos de estrés y presentan un fenotipo hipersensible a ABA. Este trabajo sugiere que este gen podría participar en la regulación de la señalización de ABA en *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

El gen *AtGRDP2* se encuentra localizado en el cromosoma 4, presenta 5 exones y 4 intrones, tiene una extensión de 2,428 pb y un marco de lectura abierto de 2,364 pb. El gen *AtGRDP2* codifica para una proteína rica en glicina no canónica de 787 aminoácidos. Esta proteína presenta tres regiones principales: 1) un dominio de función desconocida en el N-terminal (DUF1399, por sus siglas en inglés), 2) un motivo putativo de unión a ARN (RNP, por sus siglas en inglés) y 3) un dominio rico en glicinas en el C-terminal (Ortega-Amaro et al., 2015). En el trabajo de Ortega-Amaro et al. (2015) se reportó que el gen *AtGRDP2* se regula por auxinas, ya que al realizar un análisis histoquímico utilizando líneas reporteras que contienen el promotor del gen *AtGRDP2* fusionados transcripcionalmente al gen reportero GUS, observaron que la señal de GUS incrementaba con la aplicación exógena de IAA. Además, encontraron elementos de respuesta a auxinas (sitios de unión ARF) en el promotor. Ellos observaron que plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes del gen *AtGRDP2* presentan un crecimiento acelerado, floración adelantada, fenotipo de tolerancia a estrés salino y una acumulación de ácido indolacético (IAA, por sus siglas en inglés). En un análisis de expresión del gen *AtGRDP2*, utilizamos líneas reporteras (Promotor-*AtGRDP2*::GUS), se observó la coloración azul característica del gen reportero GUS en flores, botones y silicuas inmaduras. Estos resultados podrían explicar el desarrollo acelerado que se observa en las plantas sobreexpresantes del gen *AtGRDP2*.

Debido al fenotipo de tolerancia al estrés abiótico observado en las líneas sobreexpresantes del gen *AtGRDP2*, en el presente capítulo nos enfocamos en

caracterizar la expresión del gen *AtGRDP2* bajo estrés abiótico y por la aplicación de hormonas, mediante la caracterización de la línea reportera del promotor de *AtGRDP2* GUS bajo estrés abiótico como estrés por frío y estrés salino; y la aplicación de las hormonas como el ácido indolacético y el ácido abscísico; además de un análisis con la aplicación de inhibidores de auxinas: ácido 4-fenoxifenyl borónico, L-kynurenine y ácido *N*-1-naftilftalamico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Condiciones de crecimiento vegetal.

Las semillas de la línea pAtGRDP2::GFP-GUS 13 (Pro:GUS-13) (Ortega-Amaro et al., 2015) y DR5 (Ulmasov et al., 1997) fueron esterilizadas por 5 min con hipoclorito de sodio al 20% y se lavaron 5 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles se llevaron a vernalización por 2 días a 4°C. Posterior a esto, las semillas se sembraron en placas con medio Murashige y Skoog (MS) al 0.5x, pH 5.7, 0.5% de sacarosa y 1.2% agar (Murashige and Skoog, 1962). Las placas se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h (13,000 luxes) / 8 h en ciclo de luz/oscuridad a 22°C.

2.2. Análisis histoquímico de la β-glucuronidasa (GUS).

Para el análisis histoquímico de GUS, las plántulas se incubaron a 37°C toda la noche con el buffer de reacción GUS (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indol-b-D-glucuronidasa en 100 mM de fosfato de sodio al pH 7.0). Después se sometieron a un proceso de clarificación como se describe en el trabajo de Malamy and Benefey (1997). Se montaron en glicerol 50%, y se tomaron fotografías de las plantas más representativas (aquellas que presentaban las características de la mayoría) usando el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapixeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).

*2.3. Análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS en la línea Pro:GUS-13 de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés abiótico.*

Para el análisis de estrés abiótico por histoquímica de GUS, se utilizaron plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad en medio líquido MS al 0.5x suplementado con 0 y 150 mM de NaCl y se incubaron por 24, 48 y 72h en una cámara de crecimiento a 22°C y 4°C. Posteriormente las plantas fueron sometidas al análisis histoquímico GUS. Para cada tratamiento se utilizaron 9 plántulas ($n = 9$) en donde se muestra una foto representativa en cada figura. Por lo menos dos experimentos independientes se llevaron a cabo con resultados similares.

*2.4. Análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS en la línea Pro:GUS-13 de *Arabidopsis thaliana* bajo la aplicación de hormonas.*

Para la aplicación exógena de hormonas, se utilizaron plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad en medio líquido MS al 0.5x suplementado con 0, 0.5 μ M, 5 μ M y 10 μ M de ABA, con 10 μ M de IAA, y con una combinación de 5 μ M de ABA y 10 μ M de IAA. Las plántulas de todos los tratamientos hormonales y sus respectivos controles se incubaron por 24, 48 y 72h en una cámara de crecimiento a 22°C y 4°C. Seguido de esto se sometieron al análisis histoquímico GUS. Para cada tratamiento se utilizaron 9 plántulas ($n = 9$) en donde se muestra una foto representativa en cada figura. Experimentos independientes se llevaron a cabo por lo menos dos veces con resultados similares.

*2.5. Análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS en la línea Pro:GUS-13 de *Arabidopsis thaliana* sometidas a inhibidores de auxinas.*

Para la aplicación de los inhibidores en el transporte y la biosíntesis de auxinas, se utilizaron plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad en medio líquido MS al 0.5x suplementado con 3 μ M de PPBO (Phenoxyphenyl boronic acid), con 10 μ M de L-kynurenine, y con 10 μ M de NPA (N-1-naphthylphthalamic acid), y como control 10 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO), debido a que los inhibidores fueron resuspendidos en esta solución. Además, se realizó un experimento que incluye la combinación de ABA junto con cada inhibidor auxínico, 3 μ M de PPBO - 5 μ M de ABA, ó 10 μ M de L-kynurenine - 5 μ M de ABA, ó 10 μ M de NPA - 5 μ M de ABA. Posteriormente las plántulas fueron sometidas al análisis histoquímico GUS como se describe previamente. Para cada tratamiento se utilizaron 9 plántulas ($n = 9$) en donde se muestra una foto representativa en cada figura. Experimentos independientes se llevaron a cabo por lo menos dos veces con resultados similares.

*2.6. Análisis *in silico* del promotor del gen AtGRDP2*

De la región promotora del gen *AtGRDP2*, se seleccionaron 2000 pb río arriba del inicio de la traducción para el análisis *in silico*. Se buscaron en las bases de datos PLACE (Higo et al., 1999, <https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) y PlantCARE (Lescot et al., 2002, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) las potenciales cajas regulatorias presentes en el promotor del gen *AtGRDP2*.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de expresión del gen AtGRDP2 mediante la línea reportera que contiene el Promotor de AtGRDP2 fusionado a los reporteros GFP-GUS bajo estrés abiótico y hormonas.

Con el fin de analizar la expresión del gen *AtGRDP2* en los tejidos de plántulas de *A. thaliana* bajo diferentes tipos de estrés abiótico, se realizó un análisis histoquímico con la línea reportera Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS (Línea Pro:GUS-13), la cual contiene 2,000 pb del promotor del gen *AtGRDP2* fusionado al ORF de los genes reporteros GFP y GUS en el vector pKWFS7 (Ortega-Amaro et al., 2015). Para determinar si el promotor de *AtGRDP2* se induce por estrés por frío se sometieron plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad a 4°C por 24h, y también bajo estrés salino mediante la aplicación de 150mM de NaCl por 24h a 22°C. Como se puede observar en la Figura 1A, no se detectaron cambios relevantes en la señal de GUS en los tratamientos de frío y sal en este periodo de tiempo en comparación con plántulas control a 22°C, sin ningún tratamiento.

Posteriormente se analizó el efecto de la aplicación exógena de las fitohormonas ácido indolacético (IAA) y ácido abscísico (ABA) en la expresión del gen *AtGRDP2*. Plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad se sometieron durante 24h a 10µM de ABA ó 10µM de IAA. Los resultados obtenidos revelaron que el tratamiento con IAA no mostró una diferencia en la señal de GUS en comparación con las raíces del control, mientras que la aplicación con la fitohormona ABA mostró una señal intensa de GUS en la zona de elongación y las cofias de las raíces principales y secundarias (Fig. 1B). Respecto a las hojas no se observó ninguna señal GUS bajo la aplicación de las fitohormonas.

Por último, nosotros crecimos plántulas de la línea Pro:GUS-13 para determinar si la expresión del gen *AtGRDP2* es inducida a una temperatura de 4°C junto con la aplicación exógena de NaCl, ABA ó IAA. En la Figura 1C, se observó que la señal de GUS fue aditiva en la combinación de los tratamientos de ABA y 4°C, es decir que mostró una señal más intensa en las raíces principales y secundarias, llegándose incluso a teñir toda la raíz secundaria, que cuando se aplicaron los

tratamientos por separado. Para los tratamientos de IAA y NaCl no se percibió ninguna diferencia en comparación con los controles, tanto a 22°C como a 4°C. Por otra parte, no se observó señal GUS en las hojas bajo ningún tratamiento hormonal y a 4°C. Con base en estos resultados podemos concluir que la inducción del promotor del gen *AtGRDP2* respondió únicamente a la fitohormona ABA, y la señal de GUS se incrementó al combinar el ABA y una baja temperatura a 4°C.

*3.2. Análisis de expresión de la línea reportera Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS bajo fitohormonas y estrés por frío a corto, mediano y largo plazo.*

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior, se realizó un análisis de la expresión del gen *AtGRDP2* utilizando las mismas fitohormonas (ABA e IAA) a corto, mediano y largo plazo de tratamiento. Para esto, se utilizaron plantas de 9 días de edad de la línea Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS (Pro:GUS-13), las cuales fueron tratadas con ABA (0.5μM y 5μM) ó 10μM de IAA, y una combinación de ambas hormonas (10μM de IAA y 5 μM de ABA) por 24h, 48h y 72h a las dos temperaturas 22°C y 4°C.

En la Figura 2A, a 24h se puede observar que los tratamientos de 0.5μM y 5μM de ABA y ABA-IAA presentaron un aumento en la señal de GUS en las raíces secundarias en comparación al control a 22°C. Este mismo comportamiento ocurrió a 4°C, sin embargo, bajo esta temperatura las raíces principales también presentaban un incremento en la señal de GUS con la aplicación de 5μM de ABA y ABA-IAA en comparación al control a 4°C (Fig. 2B). El tratamiento con IAA no presentó cambios en comparación a los controles de ambas temperaturas.

A las 48h, a 22°C las raíces secundarias de los 4 tratamientos presentaban una inducción del promotor de *AtGRDP2*, mientras que la raíz principal se mantiene similar al control (Fig. 2A). Por otro lado, a 4°C la señal de GUS en la raíz principal en particular en la zona de elongación, comenzó a aparecer en los tratamientos 5μM de ABA y ABA-IAA. Mientras que las raíces secundarias presentaban una señal más intensa en los tratamientos con 0.5μM y 5μM de ABA en comparación al tratamiento a 4°C (Fig. 2B).

Por último, a las 72h las raíces secundarias de las plántulas tratadas con 5µM de ABA y ABA-IAA presentaron una señal intensa a 22°C, en comparación al control (Fig. 2A). Las raíces principales no mostraron diferencias en comparación al control. En el tratamiento a 4°C, tanto las raíces secundarias como las principales de estos mismos tratamientos (5µM de ABA y ABA-IAA) presentaron una mayor inducción del promotor de *AtGRDP2*, en comparación al control (Fig. 2B). Cabe mencionar que las hojas de las plántulas no presentaron señal de GUS, exceptuando algunos casos, donde se apreciaba un ligero tono azul en los haces vasculares (Suplementaria 2 y 3). De acuerdo a lo observado, podemos concluir que la aplicación exógena de 5µM de ABA induce fuertemente al promotor del gen *AtGRDP2* y al aplicar la temperatura de 4°C la señal se potenció. Cabe recalcar que se probó una concentración menor de ABA que en el apartado anterior (10µM de ABA), sin embargo, la expresión del gen reportero fue la más alta en comparación a los otros tratamientos. Por otro lado, la combinación de ABA-IAA provocó una señal de GUS constante en las raíces secundarias, pero con una intensidad igual o menor a la observada en el tratamiento con 5µM de ABA.

*3.3. Análisis de expresión de la línea reportera Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS bajo estrés salino a corto, mediano y largo plazo.*

Adicionalmente nosotros analizamos el efecto de someter plántulas de la línea Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS a estrés salino durante un periodo más largo de tiempo a dos temperaturas. Para ello, plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad se sometieron a 150mM de NaCl a 22°C y 4°C durante 24, 48 y 72h (Fig. 3).

En los resultados se observó que a los 22°C las plantas sometidas a NaCl presentan un aumento en la señal de GUS a las 72h, tanto en raíces secundarias como en la principal, en comparación con el control (Fig. 3C-I); además, se pudo observar una deformación en las raíces tanto principales como secundarias a causa del estrés salino. Cabe destacar, que a las 24 y 48h la señal de GUS fue similar al control (Fig. 3A-I, 3B-I).

Por otro lado, a 4°C, la combinación entre el estrés por frío y estrés salino disminuyó la expresión del promotor de *AtGRDP2* en todos los tiempos en

comparación al control de 4°C (Fig. 3 A-II, B-II, C-II). Incluso la deformación en las raíces por la salinidad a 22°C a las 72h, a 4°C no se apreciaba (Fig. 3C-II). De acuerdo a los resultados el promotor de *AtGRDP2* se induce por estrés abiótico como estrés por salinidad y frío; sin embargo, la combinación de ambos tipos de estrés provocó una disminución en su expresión.

*3.4. Análisis de la expresión de la línea reportera Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS bajo la aplicación de inhibidores de Auxinas.*

Con el objetivo de conocer más acerca de la relación de las auxinas con la expresión del gen *AtGRDP2*, se realizó un análisis histoquímico en plántulas de la línea de *A. thaliana* Promotor *AtGRDP2*::GFP-GUS (Pro:GUS-13) con la aplicación de los inhibidores biosíntesis y transporte de auxinas: 3µM de Phenoxyphenyl boronic acid (PPBO), 10µM de L-kynurenine y 10µM de *N*-1-naphthylphthalamic acid (NPA), por 24h a 22°C y 4°C. El PPBO y la L-kynurenine son inhibidores que participan en la biosíntesis de auxinas, mientras que el NPA inhibe el transporte de auxinas (He et al., 2011; Kakei et al., 2015; Scanlon, 2003). A 22°C las plántulas tratadas con cada uno de los inhibidores mostraron un ligero aumento en la señal de GUS en las puntas y en la zona de elongación de las raíces principales y secundarias en comparación al control (Fig. 4A). En cuanto a las hojas también presentaron una inducción del promotor de *AtGRDP2* bajo todos los inhibidores. Por otro lado, las plántulas sometidas a estrés por frío e inhibidores no presentaron diferencia en la señal de GUS en comparación al control a 4°C (Fig. 4B). Estos hallazgos mostraron que la expresión del promotor del gen *AtGRDP2* respondió ligeramente a 22°C cuando se inhibe la biosíntesis o transporte de auxinas.

*3.5. Análisis de la expresión de la línea reportera Promotor-*AtGRDP2*::GFP-GUS bajo la aplicación de ABA e inhibidores de Auxinas.*

Por último, nosotros probamos el efecto de la aplicación conjunta de la fitohormona ABA con los inhibidores de auxinas L-kyn, PPBO y NPA, dado que el ABA tiene un efecto antagónico a las auxinas. Plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad se sometieron a una combinación 5µM de ABA-10µM de L-kyn,

5 μ M de ABA-3 μ M de PPBO y 5 μ M de ABA-10 μ M de NPA por 48h a 22°C y 4°C (Fig. 5). Además, como línea reportera de los niveles de auxinas incluimos como control a la línea DR5 bajo ambas temperaturas (Fig. 6). Se observó que las plántulas tratadas con L-kyn-ABA a 22°C presentaron una disminución en la señal de GUS tanto en la zona de elongación y puntas de raíces secundarias y principales, en comparación con el tratamiento de ABA (Fig. 5A). Contrario a lo que se observó con los inhibidores de auxinas, el tratamiento con el inhibidor de transporte de auxinas NPA y con ABA a 22°C, se observó un aumento en la señal de GUS principalmente en la zona de elongación en las raíces principales, y una señal muy intensa en toda la raíz secundaria, en comparación con el control con ABA (Fig. 5C).

Por otro lado, en la Figura 5B se puede observar que las raíces de las plántulas tratadas con los L-kyn-ABA a 4°C mostraron un aumento en la señal de GUS, en comparación a las plántulas tratadas solo con ABA. Por su parte, las raíces secundarias del tratamiento de PPBO-ABA a 4°C mostraron una señal similar al tratamiento solo con ABA, mientras que la raíz principal presentó una ligero disminución en la señal de GUS en comparación con el control de ABA. En el caso de plántulas tratadas con NPA-ABA a 4°C tanto raíces principales como secundarias exhibieron una señal similar a la observada en el tratamiento de ABA (Fig. 5D). Con base en estos resultados se observó que la expresión del gen *AtGRDP2* solo se disminuyó en raíces principales con Lkyn-ABA a 22°C y PPBO-ABA a 4°C, y aumento con NPA-ABA a 22°C en comparación a sus respectivos controles con ABA en ambas temperaturas.

Con la finalidad de observar el comportamiento de las auxinas bajo estrés por frío y así comparar con nuestros resultados, realizamos un análisis en plántulas de la línea reportera de auxinas DR5. Se observó que la señal de GUS que refleja la acumulación de auxinas en plántulas de la línea DR5 se presentó en el hidatodo apical de la hoja y solo en las puntas de raíces principales y secundarias, a 22°C y 4°C (Fig. 6). En la línea Pro:GUS-13 la localización histológica de la señal de GUS fue similar a la de la línea DR5, en las puntas de las raíces primarias y secundarias. Sin embargo, a 4°C la línea DR5 muestra una disminución en la

señal de GUS, mientras que la línea Pro:GUS-13 presenta un aumento en la señal de GUS y se extiende en la zona de elongación en las raíces secundarias.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la señal GUS disminuye en presencia de los inhibidores de biosíntesis a 22°C.

*3.6. Análisis *in silico* del promotor del gen AtGRDP2.*

Para conocer las posibles cajas regulatorias presentes dentro del promotor de *AtGRDP2* se consultaron las bases de datos PlantCARE y PLACE. Se encontraron un total de 15 tipos de cajas regulatorias, entre las cuales están las de respuesta a auxinas (ARF, *Auxin Response Factor*), ABA (DPBF-1 and 2 ,Dc3 DE promoter-binding factor-1 and 2; MYB, MYC), JA (GC-BOX), ET (RAV1, *Related to ABI3/VP1*), SA (TCA-ELEMENT), giberelinas (GARE); de respuesta a estrés como frío (ICE1, inducer of CBF expression 1, LTRE *Putative low temperature responsive element*, Core of low temperature responsive element; CBF (C-repeat (CRT) binding factors), sequía (ABRE) y salinidad (GT-1 motif) (Fig. 7).

Estos resultados indicarían que el promotor de *AtGRDP2* podría estar implicado en la respuesta a estrés.

4. DISCUSIÓN

El gen *AtGRDP2* codifica para una proteína con un dominio rico en glicina (GRDP). Se sabe que las proteínas ricas en glicina (GRP) y las GRDPs están involucradas en la respuesta a diversos tipos de estrés abiótico (Jiménez-Bremont et al., 2018; Kim et al., 2010). Anteriormente en nuestro grupo de trabajo reportaron una nueva familia de genes en *Arabidopsis thaliana*, que tienen la característica que comparten el dominio llamado DUF1399, la cual está formada por cuatro genes, incluyendo el gen *AtGRDP2*. Ortega-Amaro y col. (2015) desarrollaron líneas mutantes y sobreexpresantes de este gen, en donde observaron que las líneas sobreexpresantes exhiben tolerancia a estrés salino, mientras que las líneas mutantes sensibilidad a este estrés. Además, los autores analizaron genes que se inducen por estrés abiótico tanto en la línea sobreexpresora como mutante del gen *AtGRDP2* bajo estrés salino, como el gen Sensible a Disecación 29B (RD29B, Responsive to Desiccation 29B), Marcador de Metionina Temprano de *Arabidopsis* (EM6/LEA, *Arabidopsis* Early Methionine-Labeled 6) y el Factor de Unión a ABRE 4 (ABF4, ABRE Binding factor 4). Y observaron que en la línea sobreexpresante dichos genes están inducidos. Lo opuesto sucedió en la línea mutante *Atgrdp2* en donde se observó que estos genes están reprimidos o no inducidos en comparación a la línea parental Col-0. Así mismo la línea sobreexpresante presenta una ligera acumulación de IAA.

Por lo anterior, en este estudio nosotros evaluamos la respuesta del promotor del gen *AtGRDP2* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico y aplicación de hormonas. Con base en los resultados obtenidos en el análisis del promotor del gen *AtGRDP2* mediante el gen reportero GUS, se muestra que el gen se induce a baja temperatura (4°C), principalmente en las raíces secundarias, y está expresión fue mayor en los tratamientos a largo plazo. Además, el promotor *AtGRDP2* se indujo bajo estrés salino a las 72h, en la zona de elongación de raíces principales y secundarias. Por lo anterior, nosotros nos dimos a la tarea de analizar *in silico* el promotor de *AtGRDP2* para buscar cajas regulatorias por estrés abiótico, como frío y sal. Analizamos 2,000 pb río arriba del inicio de la traducción, y encontramos sitios de reconocimiento para factores transcripción de respuesta a frío como ICE1

(inducer of CBF expression 1), Putative low temperature responsive element (LTRE), Core of low temperature responsive element (LTRE), CBF (C-repeat (CRT) binding factors); a ABA, DPBF-1 and 2 (Dc3 DE promoter-binding factor-1 and 2), MYB, MYC; y a salinidad GT-1 motif (Fig. 7). En conjunto, esto indicaría que el gen *AtGRDP2* está involucrado en la respuesta a estrés abiótico.

Se ha reportado que otras GRPs como la OsGRP1, OsGRP4 y OsGRP6 de *Oryza sativa* están inducidas en la respuesta a estrés por frío (Kim et al., 2010). Los autores generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los genes OsGRP1, OsGRP4 y OsGRP6, en un fondo mutante *grp7* con fenotipo sensible a frío (Kim et al., 2008). Las líneas sobreexpresoras de OsGRP1 y OsGRP4 destacaron debido a que revertían el defecto de crecimiento en la línea mutante *grp7*, y la línea OsGRP6 confirió tolerancia a congelamiento (Kim et al., 2010). Otro estudio realizado en plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes del gen GRP7, demuestra que la sobreexpresión de esta GRP le confiere a la planta tolerancia al estrés por congelamiento (Kim et al., 2008).

Posteriormente, nosotros analizamos sí el promotor de *AtGRDP2* se induce por el ácido abscísico (ABA), la cual es la fitohormona que regula la respuesta al estrés abiótico. Como era de esperarse, nuestros datos muestran claramente que el promotor de *AtGRDP2* se activa fuertemente en plántulas tratadas con ABA, desde una concentración baja de 0.5 µM. Además, quisimos probar si existían cambios en el comportamiento del promotor al someter a las plántulas a frío y ABA, y observamos que la inducción del promotor de *AtGRDP2* fue mayor en presencia de ambas condiciones.

Por otro lado, al evaluar los efectos que provocaba la combinación de dos tipos de estrés abiótico, en este caso el estrés salino y estrés por frío, no se observó la inducción del promotor de *AtGRDP2*, ni la deformación de las raíces, como sucedió en los tratamientos con NaCl. Esto podría sugerir que la señalización por frío hace que disminuya los efectos de la NaCl, posiblemente al reducir la entrada de NaCl; sin embargo, más estudios sobre la relación de frío y sal serán necesarios para comprender este comportamiento.

En los últimos años se realizó un meta-análisis de investigaciones relacionadas a estrés por sequía, lo que permitió elaborar un modelo de la respuesta de las plantas ante este estrés y se destacó la interacción que presentan los azúcares, las especies reactivas de oxígeno (ERO), el metabolismo del nitrógeno y las hormonas (ABA, etileno, auxinas, citoquininas, ácido salicílico, giberelinas y brasinoesteroides) (Cramer et al., 2011; Verma et al., 2016). Lo que indica que las hormonas juegan un papel importante en la respuesta a estrés en plantas.

El ácido abscísico, además de ser fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas, regula la respuesta de estrés abiótico y biótico (Ma et al., 2018). Anteriormente en nuestro grupo de trabajo se investigó el gen *AtGRDP1* (Rodríguez-Hernández et al., 2014), gen parálogo de *AtGRDP2*, y se observaron altos niveles de expresión de *AtGRDP1* a las 24 y 48h en plantas sometidas a esta hormona. Además se determinó que la sobreexpresión de este gen generaba plantas resistentes a ABA (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Por otro lado, en una investigación sobre una GRP de alfalfa (*Medicago sativa*) se observó que este gen *MsGRP* se inducía por salinidad y ABA, sin embargo al sobreexpresarlo en *Arabidopsis* esta se volvía más sensible que las plantas control (Long et al., 2013). Las auxinas son fitohormonas que regulan el crecimiento y el desarrollo, y se sabe están involucradas en la respuesta a estrés abiótico (Shani et al., 2017). El gen *AtGRDP2* había sido previamente estudiado en nuestro grupo de trabajo (Ortega-Amaro et al., 2015). En dicho trabajo se observó que este gen se inducía por tratamientos exógenos de IAA y en líneas de *Arabidopsis* sobreexpresantes había una inducción del transportador de auxinas *AUX1* y los factores de respuesta a auxinas *ARF6* y *ARF8*, mientras que en la línea mutante estos estaban reprimidos (Ortega-Amaro et al., 2015).

En este trabajo, pudimos analizar el efecto de la aplicación exógena del IAA en el promotor de *AtGRDP2*. Nosotros encontramos que la aplicación del IAA indujo el promotor *AtGRDP2*, pero en menor medida que el ABA. Por ejemplo, a las 48h se observó una mayor inducción en las raíces secundarias en la línea reportera del promotor *AtGRDP2*. Por otra parte, al combinar ambas hormonas, observamos que el promotor se induce de manera constante e intensa, similar a la observada

en los tratamientos de ABA. Esto nos indicaría que el promotor es inducido tanto por IAA y ABA, como por estrés abiótico. Además, al someter a plántulas a la combinación de estas hormonas (ABA-IAA) se observó una señal constante a lo largo de 72h, a 22°C y 4°C (Fig. 2). Esto indicaría que ambas hormonas están regulando la expresión del *AtGRDP2*.

La señal del gen reportero GUS en la línea Pro::GUS-13 permanece al adicionar exógenamente inhibidores de auxinas (Fig. 4A), incluso la localización de la señal se asemeja con la observada en plántulas de la línea reportera de auxinas DR5 (Fig. 6A). Los inhibidores que empleamos están involucrados en el transporte y la biosíntesis de auxinas, por ejemplo el NPA inhibe el transporte polar de auxinas afectando al transportador de auxinas por el PIN1 (Adamowski and Friml, 2015; Scanlon, 2003); PPBO inhibe las proteínas YUC las cuales están involucradas en la síntesis de IAA a partir de índole-3-ácido pirúvico (IPyA) (Kakei et al., 2015); mientras que L-kyn actúa como inhibidor de la triptófano amino-transferasa de *Arabidopsis* 1 (TAA1) y relacionadas a triptófano aminotransferasa (TARs), las cuales convierten el L-Triptófano a IPyA (Kakei et al., 2015). Sin embargo, existen vías alternas para la biosíntesis de auxinas lo que podría explicar la señal de GUS en las plantas sometidas a inhibidores de biosíntesis de auxinas (Fig. 8). No obstante, se ha reportado que los conjugados de auxinas están implicados en la tolerancia al estrés abiótico (Ludwig-Müller, 2011). Se ha registrado en *Arabidopsis* y en *Hyoscyamus muticus* el incremento de conjugados de auxinas cuando se someten a estrés abiótico (Gray et al., 1998; Oetiker and Aeschbacher, 1997). De igual manera en la especie tolerante a salinidad *Populus euphratica* se observó un incremento en la cantidad de conjugados de IAA en el xilema (Junghans et al., 2006). Esto podría indicar que el promotor de *AtGRDP2* podría ser inducido también por conjugados de auxinas bajo estrés abiótico.

Nuestros datos muestran que el promotor del gen *AtGRDP2* se induce por estrés salino y por frío. Esto es interesante, ya que también demostramos que dicho promotor responde sensiblemente a la aplicación exógena de la hormona ABA, incluso se potencia en la combinación de ABA a una baja temperatura de 4°C, siendo la mayor expresión que registramos en nuestros experimentos. Como se

reportó anteriormente por nuestro grupo, el promotor del gen *AtGRDP2* se induce por la aplicación exógena de auxinas a corto plazo; nosotros en este estudio observamos que esta inducción también sucede en periodos más largos. Por último, observamos ligeros cambios en la inducción del promotor del gen *AtGRDP2* en presencia de los inhibidores de biosíntesis y transporte de auxinas. Con base a nuestros hallazgos sabemos que el promotor del gen *AtGRDP2* responde a estrés por frío, salinidad y ABA, por lo que sería interesante identificar algunos genes que se activan en la línea sobreexpresora de *AtGRDP2* bajo estrés abiótico.

LISTA DE FIGURAS

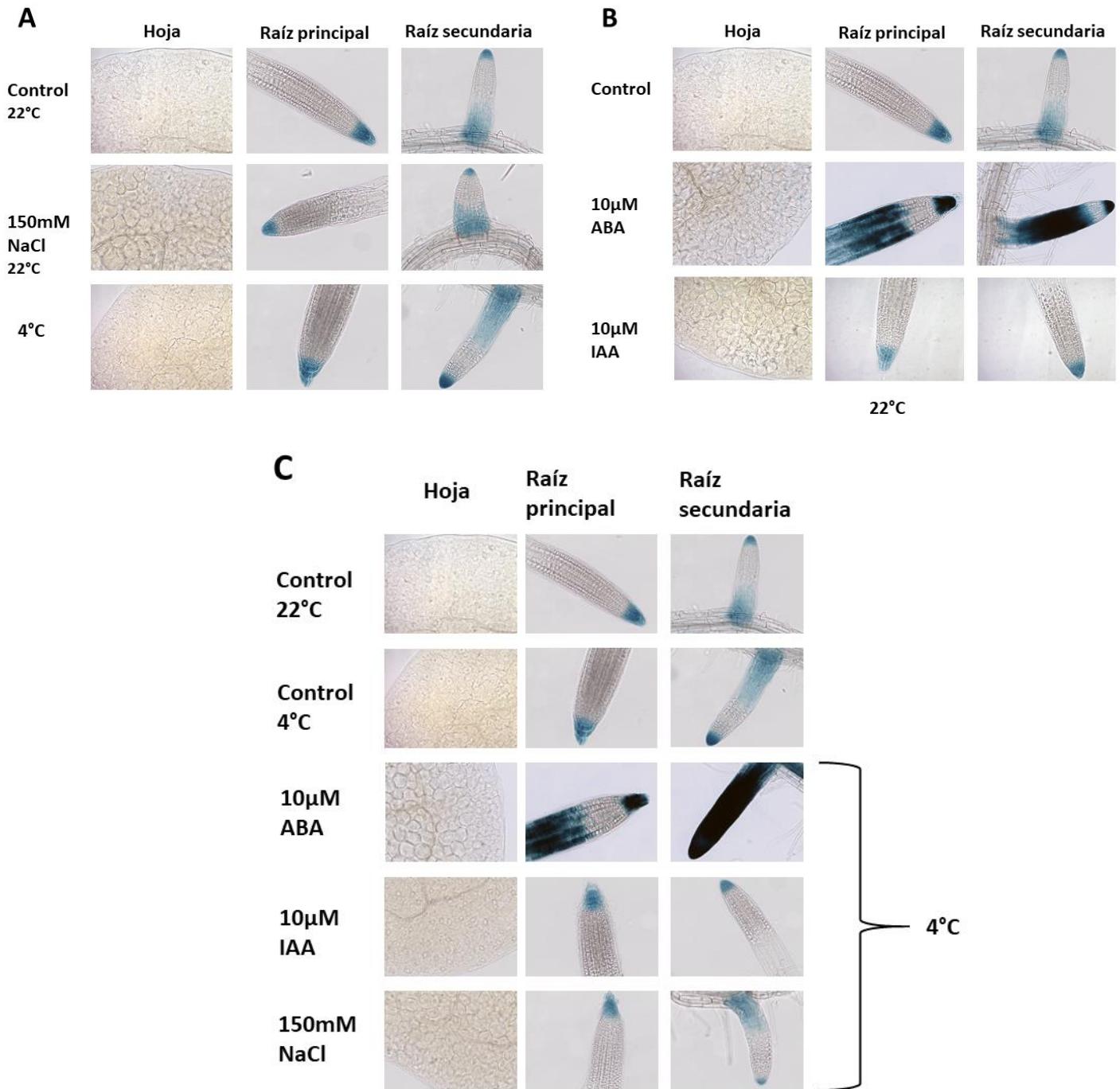


Fig. 1. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por estrés.

Plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad fueron sometidas a 10 μ M de ABA, 10 μ M de IAA, 150 de mM NaCl a 4°C y 22°C por 24 h. A) Estrés Abiótico; B) Hormonas; C) Estrés por frío adicionando hormonas y cloruro de sodio. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).

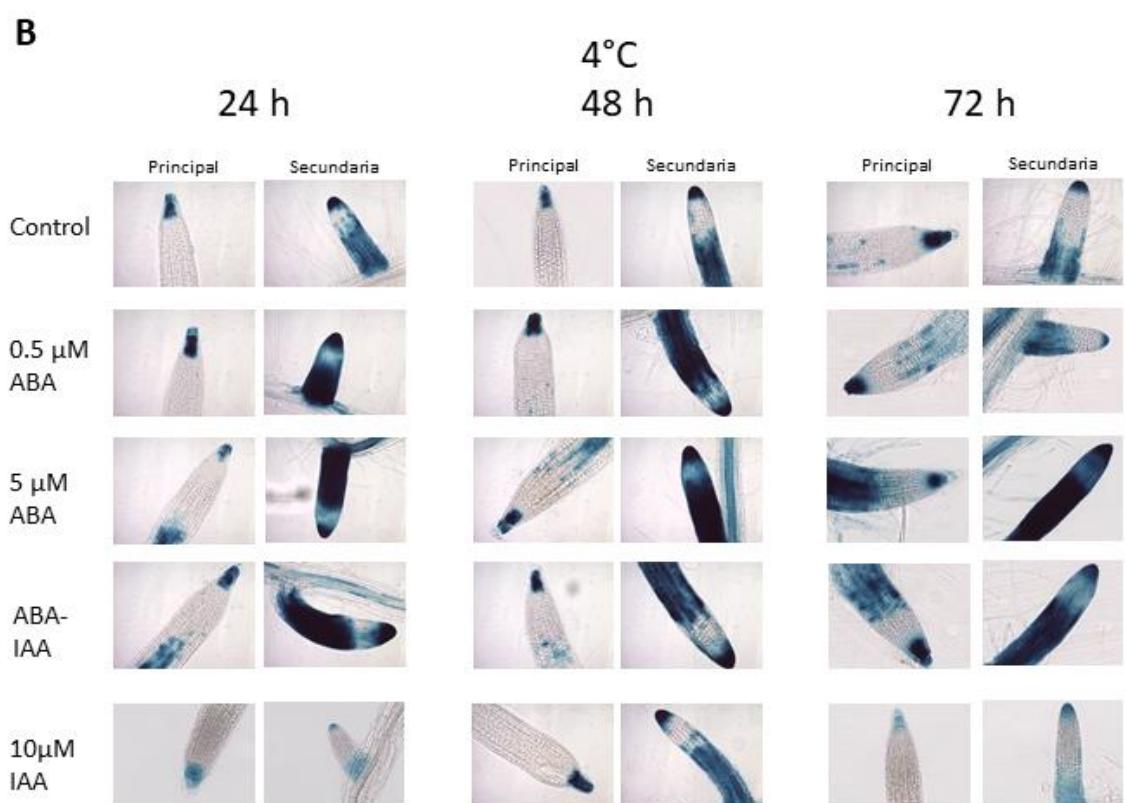
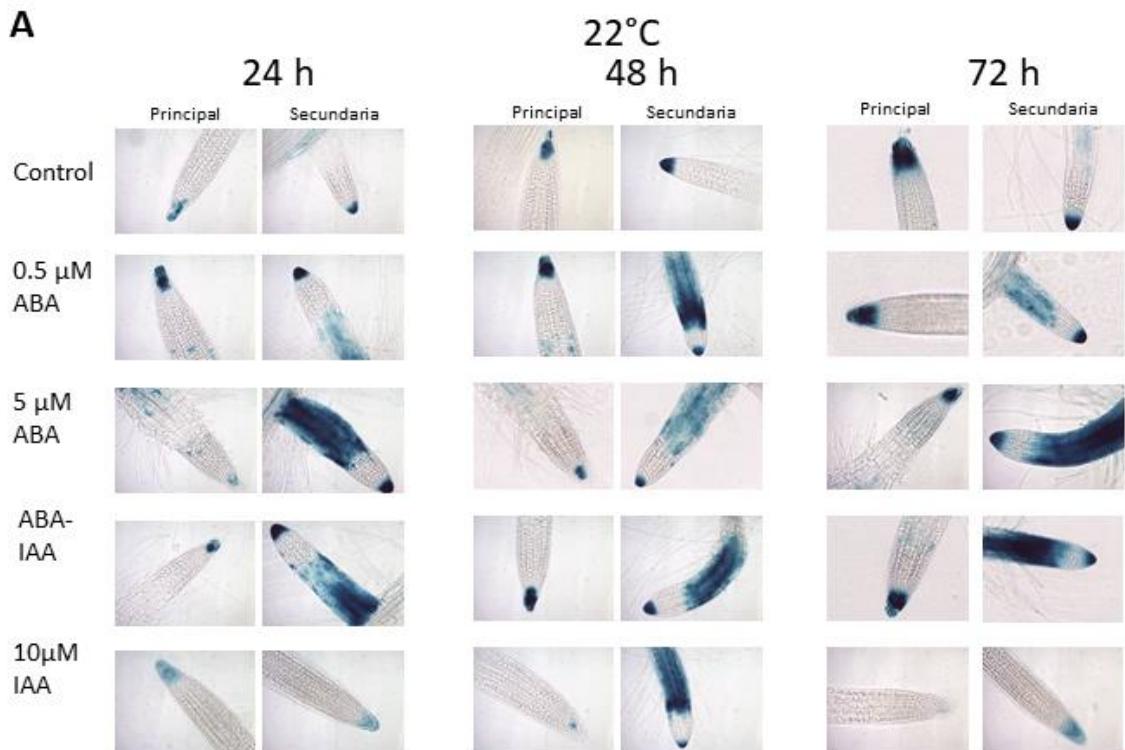
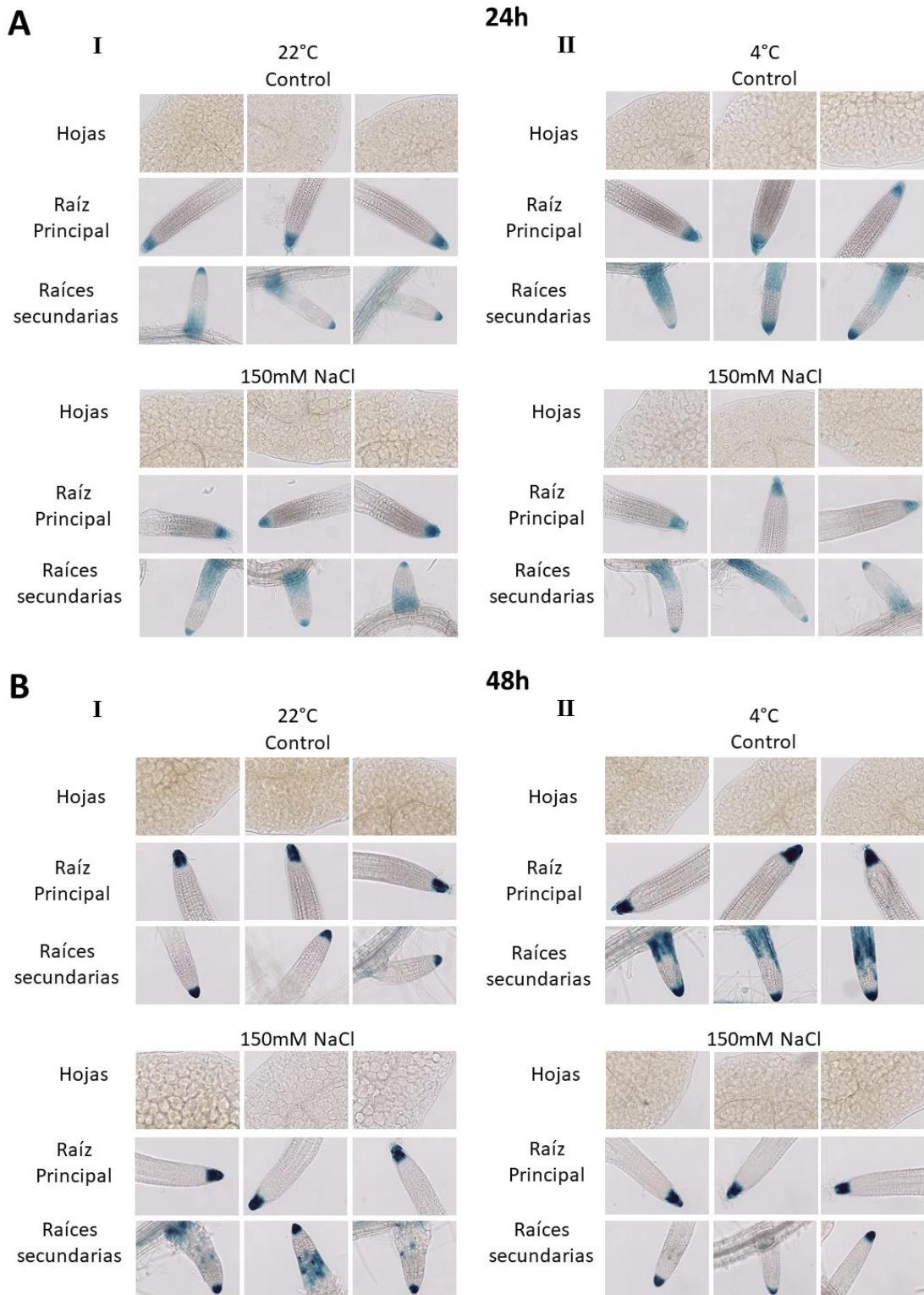


Fig. 2. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 en raíces de *Arabidopsis* por estrés a diferentes tiempos.

Plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad fueron sometidas a medio MS suplementado con 0.5µM de ABA, 5µM de ABA, 10µM de IAA, y una combinación 0.5µM de ABA - 10µM de IAA y como control solo medio, a 4°C y 22°C por 24, 48 y 72h. A: Plantas sometidas a 22°C; B: Plantas a 4°C. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0). Secundaria (Raíz secundaria); Principal (Raíz principal).



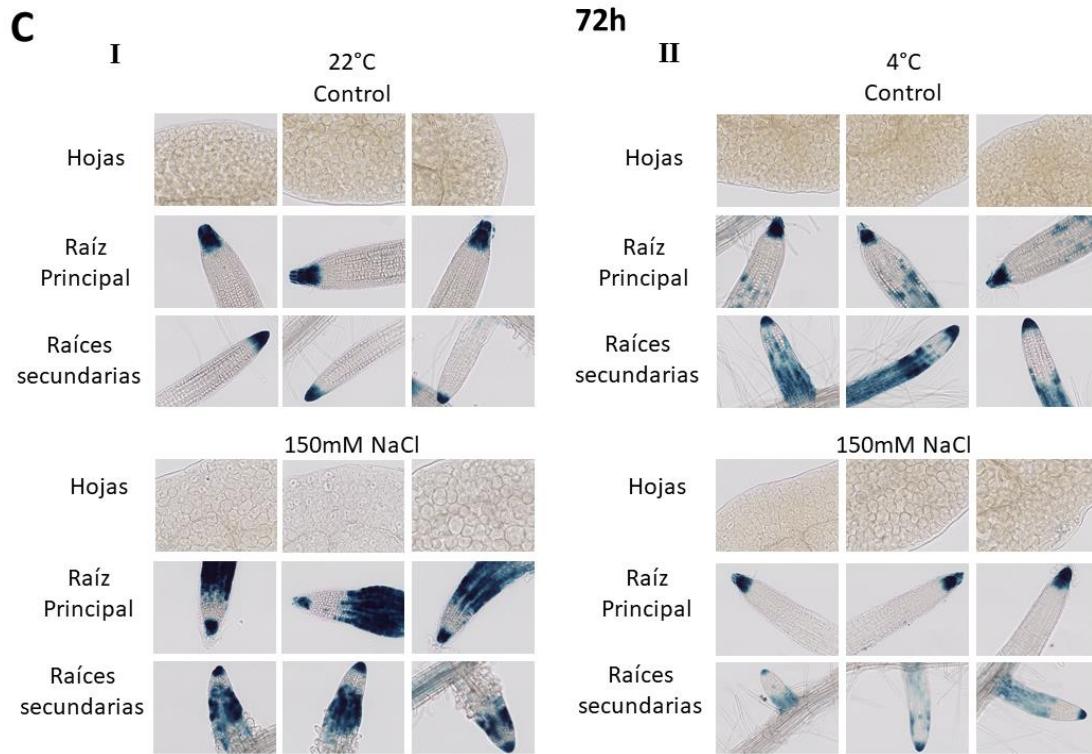


Fig. 3. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por estrés salino a corto, mediano y largo plazo.

Plántulas de la Pro:GUS-13 de 9 días de edad fueron sometidas a 150mM de NaCl, a 4°C y 22°C por 24, 48 y 72h. A: Plantas sometidas a estrés salino por 24h; B: Plantas sometidas a estrés salino por 48h; C: Plantas sometidas a estrés salino por 72h. (I: 22°C; II:4°C) Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).

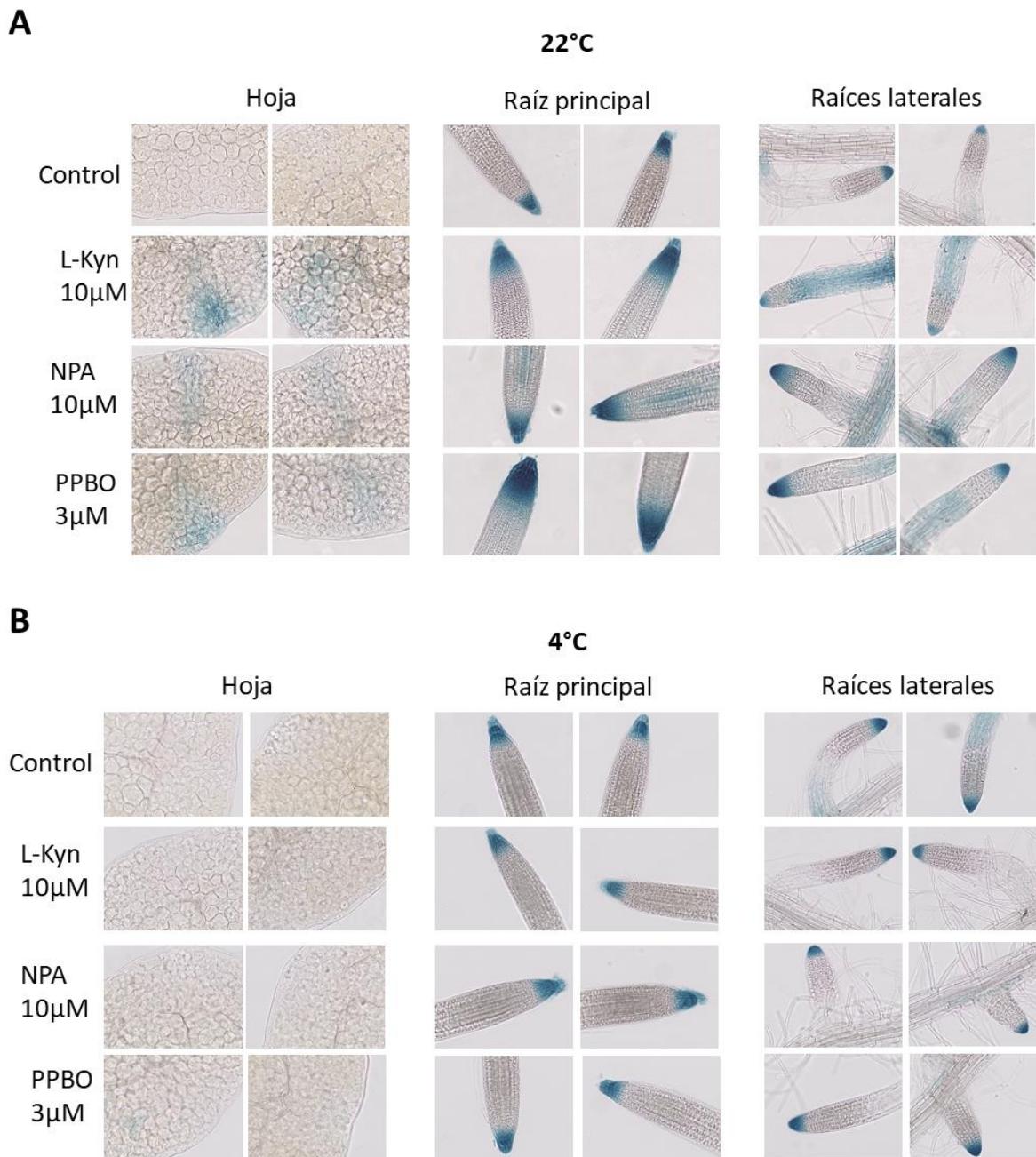
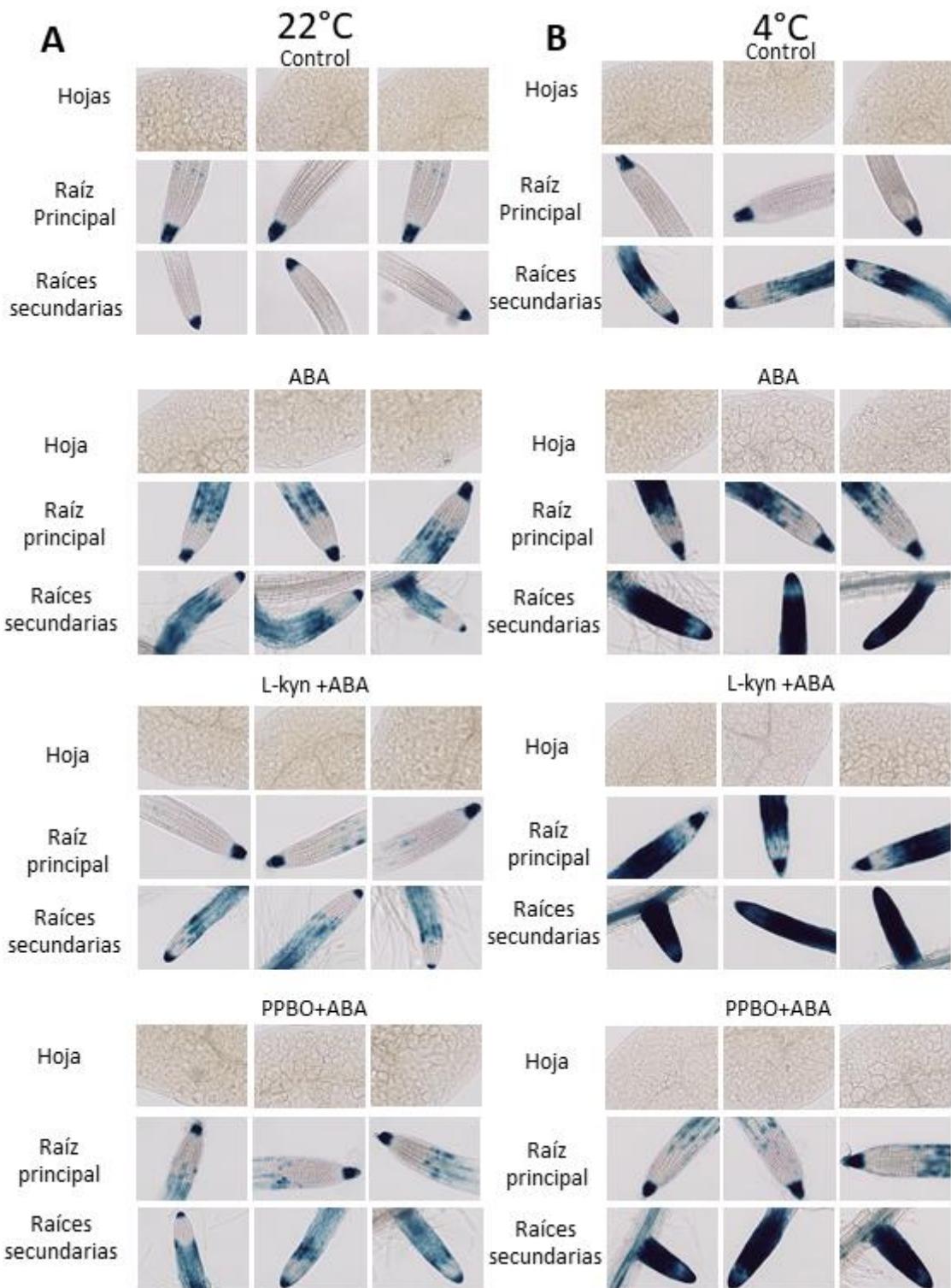


Fig. 4. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por inhibidores de auxinas.

Plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad fueron sometidas a 10µM de L-Kyn , 10µM de NPA y 3µM de PPBO y como segundo control DMSO 1µl/ml, a 4°C y 22°C por 24h. A: Plantas sometidas a 22°C; B: Plantas a 4°C. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo

5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).



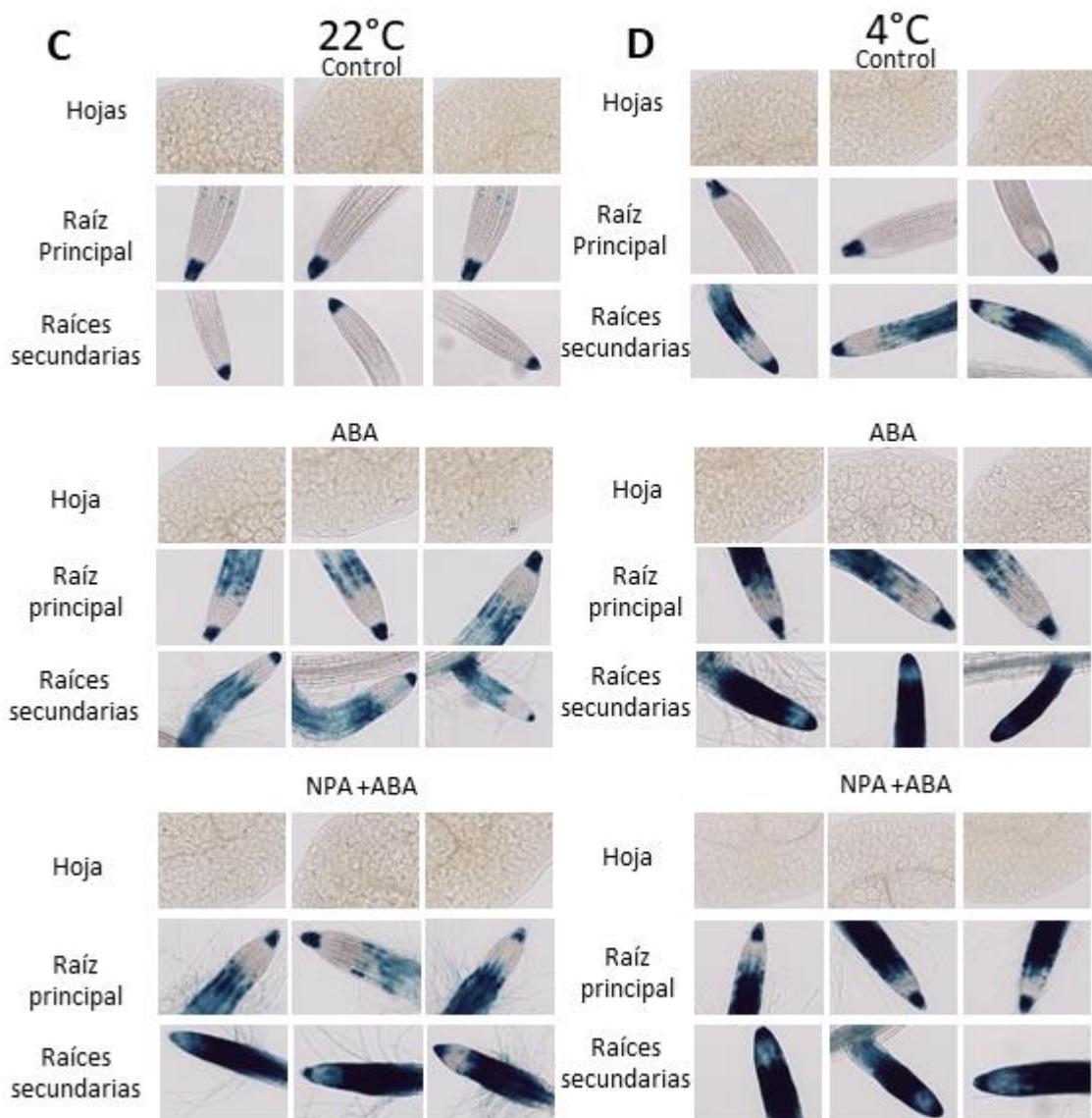


Fig. 5. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 por inhibidores de auxinas y ácido abscísico.

Plántulas de la línea Pro:GUS-13 de 9 días de edad fueron sometidas a 10 μ M de L-Kyn, 10 μ M de NPA, 3 μ M de PPBO y DMSO 1 μ l/ml, adicionados con 5 μ M de ABA y como control DMSO 1 μ l/ml, a 4°C y 22°C por 24h. A-B: Plántulas tratadas con inhibidores de auxinas implicados en la biosíntesis; A: plántulas a 22°C, B: plántulas a 4°C. C-D: Plántulas tratadas con inhibidor del transporte de auxinas; C: plántulas a 22°C, D: plántulas a 4°C. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara

MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).

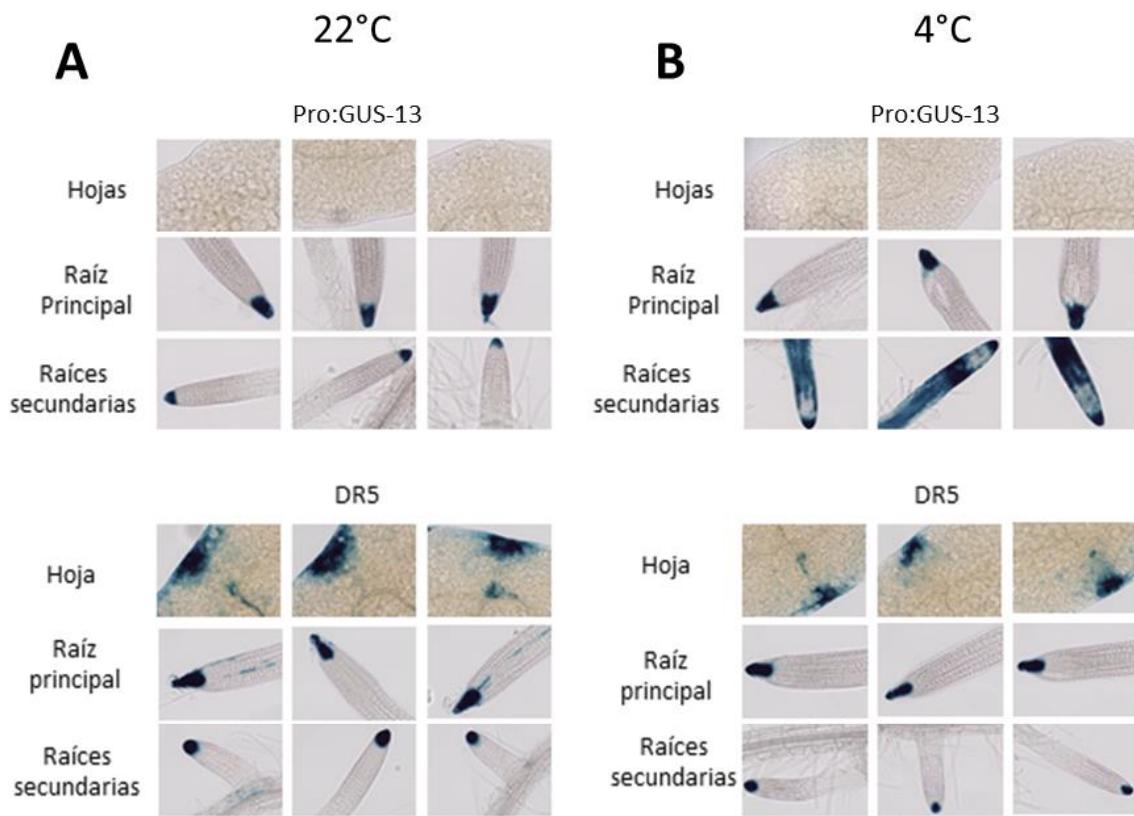


Fig. 6. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 y DR5 a 22°C y 4°C.

Plántulas de las líneas Pro:GUS-13 y DR5 de 9 días crecidas con medio MS sin ningún aditivo a 4°C y 22°C por 24h. A: plántulas a 22°C, B: plántulas a 4°C. Las imágenes se tomaron a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0). Esto se utilizó como control en tratamientos de inhibidores de auxinas y ácido abscísico.

1-70 GTCAAAGTTT GAAGGTTGG TGGGCAAGTT GATTGAGAGA ACAAGATCCC CGTGCCAAA CTGCCTGAAG
 71-140 GATGCTGGAG TCACAATTAA GGAAGTTGAT GAGGTTCTTC TTGTTGGTGG AATGACCGT GTTCCCAAAG
 141-210 TGCAAGAGAT AGTTTCTGAG ATCTTGGGA AGAGTCCTG TAAAGGTGTT **AACGGGATG** AAGCGGTTGC
 2 4
 211-280 CATGGGAGCA GCCATTCAAG GTGGTATCCT CCGTGGTGAT GTGAAGGATT TGCTTCTTTT GG**ACGGTGGT**
 13
 281-350 CCTCTCTCAT TGGGTATTGA AAC**ATTGGT** GCAGTCCTCA CCAAGTTGAT TCCACGAAAC ACCACTATTC
 351-420 CCACAAAGAA GTCTCAGGTA ATGAATCTG ACAGAGTACA ATATCAGAGT GCGTCTGAAA **ACTGTTGCTG**
 4
 421-490 ACTTTTATTG TGTCATTGT GATTGGTTC TTAGGTTTC TCCACAGCTG **CTGACAAACCA** **GATGCAAGTG**
 2 10 4
 491-560 GGAATCAAAG TTCTTCAGGG AGA**ACGGTAA** AT**GGCGGTG** **ACAAACAAAGT** GCTTGGAGAA TTGACCTTG
 561-630 TTGGCATTCCC ACCGGCACCT AGAGGAATGC CACAGATCGA AGTTACATTG GACATTGATG **CAAATGGTAT**
 1 4 11
 631-700 TACTACT**TGTC** **TCAGCGAAAG** **ACAAAGCAAC** **AGGTAAGAG** CAGAATATCA CAATCAGATC **TTCAAGGTGGT**
 4
 701-770 CTCTCAGACG ATGAGAT**TAA** **CAGAATGGTG** AAAGAAGCTG AGCTAACGC ACAGAAGGAT CAAGAGAAGA
 3 11
 771-840 AGCAACTT**AT** **CGAC** CTTAGG AACAGTGCTG ATA**CAACAAAT** TTACAGTGTA GAGAAGAGCT TGAGTGAATA
 14
 841-910 CAGAGAGAAAG ATT**CAGCTG** AGATTGCCCT TGAGATCGAA ACTGCAGTGT CTGATCTCG GACTGCTATG
 911-980 GCTGGTGAGG ATGTCGAGGA CATCAAGGCT AAGGTCGAAG CTGCAAACAA GGCAGTGTG AAGATCGGAG
 8 7 14 14
 981-1050 **A****ACACATGTC** TAAGGGATCT GGAT**CATCTG** GTTCCGATGG AAGCTCTGGT GAGGGT**CAA** **GTGGGACTGA**
 4
 1051-1120 GCAGACGCCT GAAGCTGAAT TCGAGGAGGC CAGTGGTCA AGGAAGTGAG GTTGCCG**CTA** **ACCGGTTCCA**
 1121-1190 TACAGAAATC AGGTTTTCC CAAAATAAGT TTACATGCTT ATCTCCTCCC TCACAAATTG GATTAGTTTT
 1191-1260 GTGTATTAA AACCTTATTG GAGAGGTATC ATCTCTCGA AACCTATTGA GAGTCCCGGA TGTAGTTGT
 13 4 4
 1261-1330 **TTGATTGGTT** **ATTTCATGA** AGTTTACGGT TATTATCTTG **ACCGGTTAAA** TGAGTCATT TCACATAAGA
 9
 1331-1400 TTATGAC**CTT** **TTAAGTTGG** TTTATGGATG AAGAATGGCG ATAATTGAAT TGTTTGTAAC CCCTTGGAAC
 15
 1401-1470 TTTGAAAGTA AAACAGTTTA TAGGAAATC TGGGCTTTGT **CGGT** **TTTTGT** AGTCAAAGA AGCTTGAT**GA**
 9
 1471-1540 **AAAA** GACTTG GTCATGTTGT TGGCGTT**GTC** **GTGTAAGGC** CTCAAATTCA ATTACTGTG GAACTTACCT
 4 1 8
 1541-1610 TTGTCCAT**GA** **ACGGGAGACAA** AGTTAGCGAA AATGTCAGCA AATTATGG**A** **ATGC** **ATTTG** TTCCTCGAAG
 3 1 6 12 7
 1611-1680 **GTCGATAATC** TTATGAT**CTC** **ACGCAATTTC** **CAGCTTTTA** AAATTGTTGG AACGCATATT **CAAATGTTGA**
 5
 1681-1750 TTAAGAAAAT TAAATTATA**AA** CGACATAGAA GAAACAGTTC CATACTAAA GATTTAAC TTTTTTAA
 4
 1751-1820 TTCCCTCTGG TCAGAGGGGT AATATCGAA TTTTCTAAAG GCAAAGAACAA CCGCTATAAA TAGTGG**CTGT**
 13
 1821-1890 **TGAAAGTCGTC** TTCTCTCTCA AACAAAATTC AAGAGTCAGC TTTATCAGAG AAAGTTCCC **CC****ATTGGTAC**
 7 9
 1891-1960 AGTTTGATTC **TCTCTTATTC** **AAAC****TTTTTC** AAAAGCGTGT TCTTTGCAA GATAAGAAGA TAAAGACCAA
 11
 1961-2024 AACTTTGGGT CAATTATATA GACTTTCAT TTTGTATTG **GCAGGTGAAA** ATTTGTAAGAGAT**G**

- | | | |
|---------------|---------------------|-----------------------|
| 1 ARF | 6 TCA | 11 RAV1 |
| 2 ABRE | 7 MYC | 12 GARE |
| 3 CBF | 8 Dc3 | 13 "CCAAT box" |
| 4 MYB | 9 GT-1 motif | 14 ICE1 |
| 5 TGA | 10 GCC-box | 15 LTRE |

Fig. 7. Análisis de las posibles secuencias regulatorias en el promotor de *AtGRDP2*.

Analizamos el promotor de *AtGRDP2* (2000 pb), en las bases de datos PLACE y PlantCARE. Esta es una representación esquemática de la localización de las cajas regulatorias. Las cajas se encuentran identificadas por color y numero. 1 ARF; 2 ABRE; 3 CBF; 4 MYB; 5 TGA; 6 TCA; 7 MYC; 8 Dc3; 9 GT-1 motif; 10 GCC-box; 11 RAV1; 12 GARE; 13 CCAAT box; 14 ICE1; 15 LTRE.

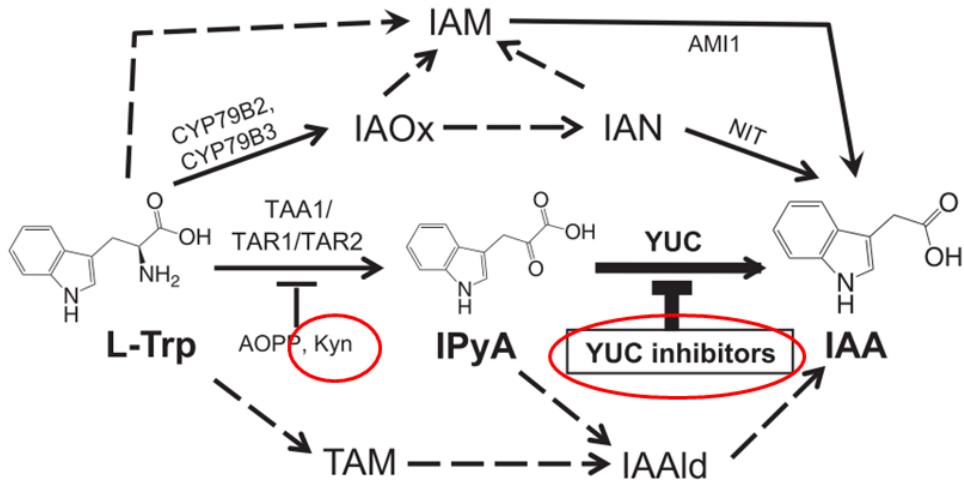
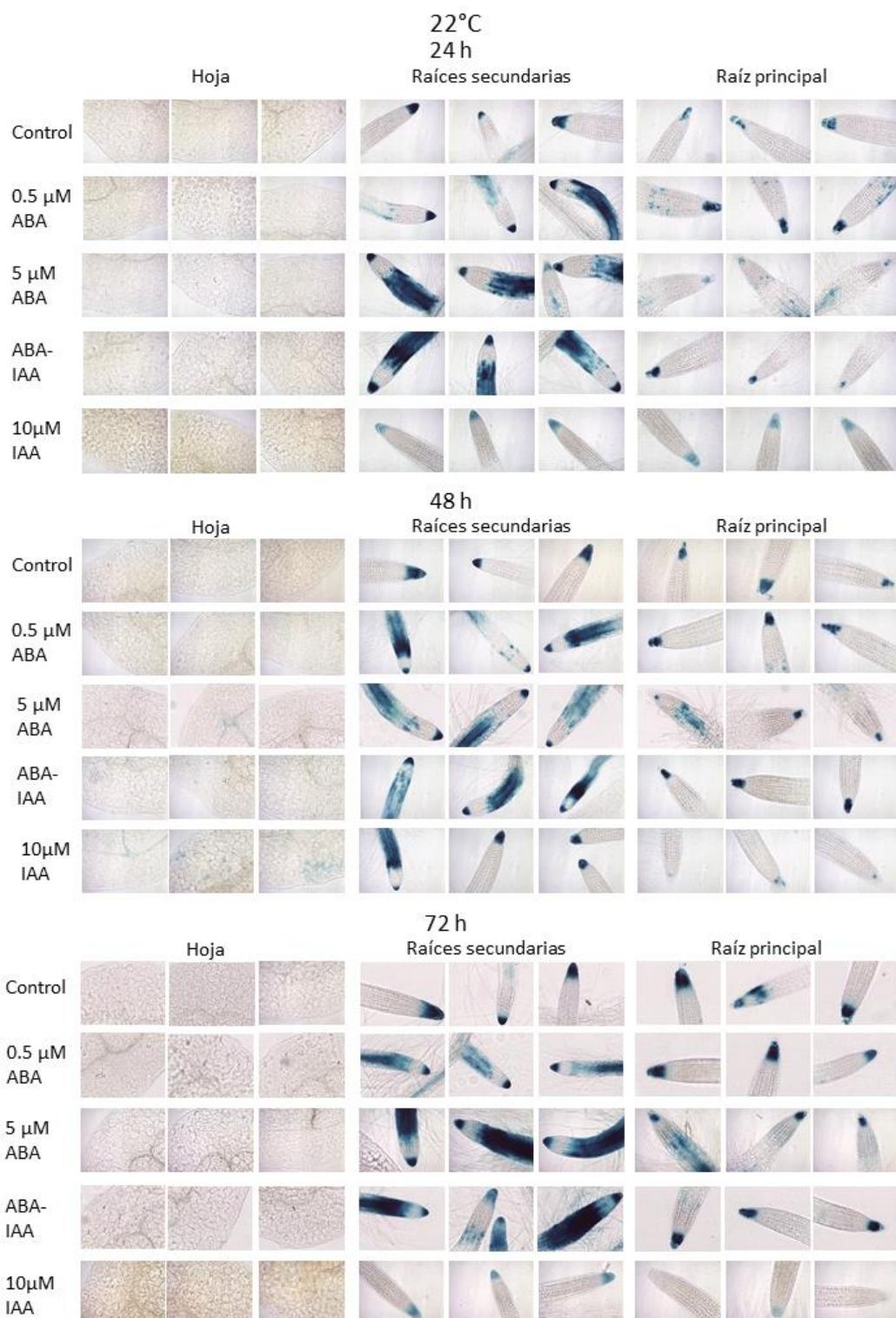


Fig. 8. Vías biosintéticas del ácido indolacético (IAA) y sus inhibidores.

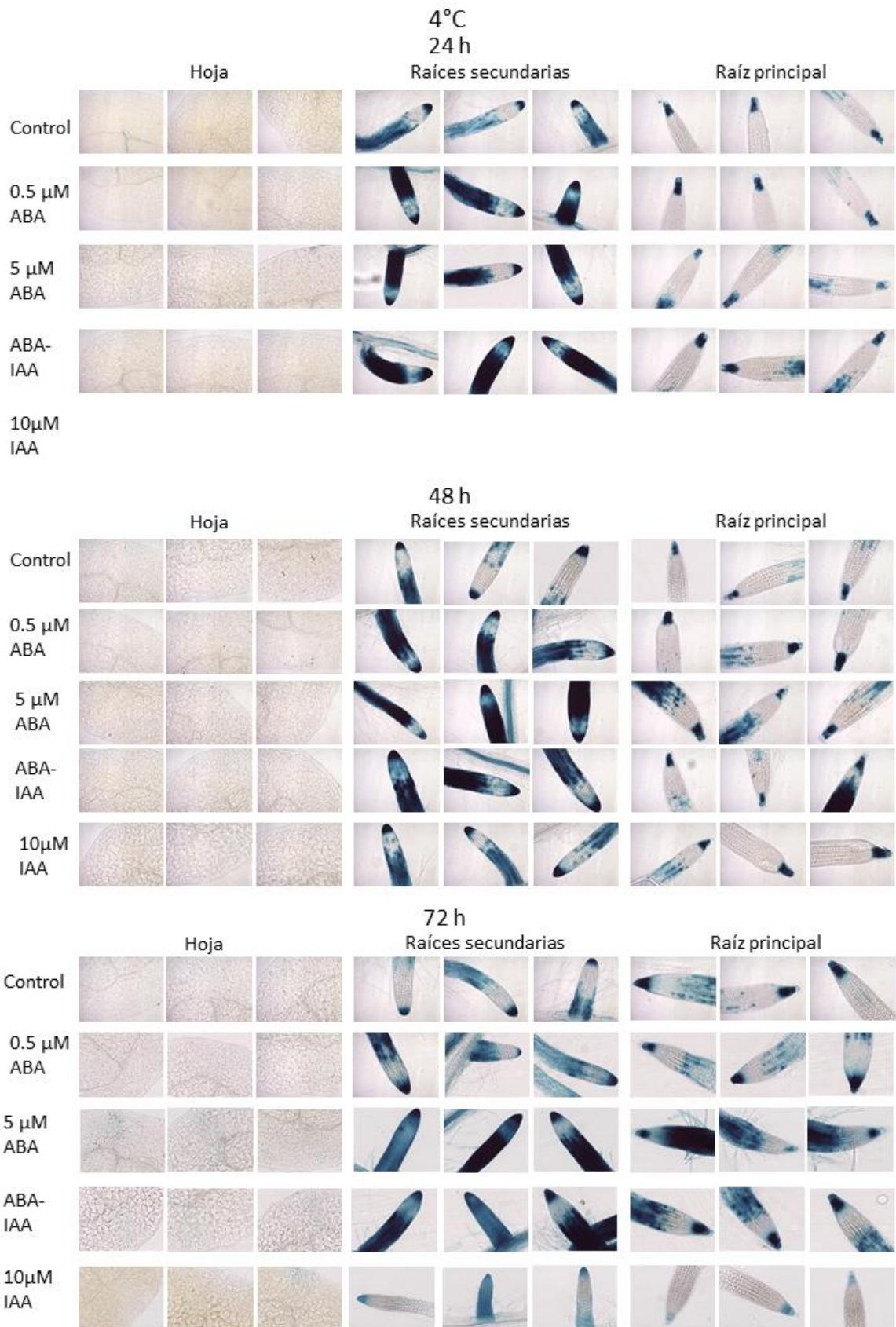
Vías de biosíntesis con sus enzimas e intermediarios. L-Trp, L-triptofano; IPyA, acido indol-3-piruvico; IAA, acido indol-3acetico; IAM, indol-3-acetamida; IAOx indol-3-acetaldoxime; IAN, indol-3-acetonitrilo; TAM, triptamino; IAALd, indol-3-acetaldehido; TAA1, TRYPTOPHAN AMINO- TRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1; TARs, TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATEDs; YUC, YUCCA, flavin-containing monooxygenase; AMI1, AMIDASE1; NIT, nitrilase; AOPP, L-amino-oxyphenylpropionic acid; Kyn, L-kynurenine. En rojo se señalan los inhibidores de L-kynurenine y los inhibidores de YUC al cual pertenece el Phenoxyphenyl boronic acid. Esta imagen fue extraída del artículo de Kakei et al. 2015.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Suplementaria. 1. Expresión del gen reportero en la línea Pro:GUS-13 en raíces de *Arabidopsis* por estrés a diferentes tiempos.

Plántulas de la línea 13 de pAtGRDP2::GFP-GUS de 9 días de edad fueron sometidas a medio MS suplementado con 0.5µM de ABA, 5µM de ABA, 10µM de IAA, y una combinación 0.5µM de ABA - 10µM de IAA y como control solo medio, 22°C por 24, 48 y 72h. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).



Suplementaria 2. Expresión del gen reportero en la línea Pro-GUS-13 en raíces de Arabidopsis por estrés a diferentes tiempos.

Plántulas de la línea 13 de *pAtGRDP2::GFP-GUS* de 9 días de edad fueron sometidas a medio MS suplementado con 0.5 μ M de ABA, 5 μ M de ABA, 10 μ M de IAA, y una combinación 0.5 μ M de ABA - 10 μ M de IAA y como control solo medio, a 4°C por 24, 48 y 72h. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x con el microscopio Axioscope modelo 5/7/Vario Zeiss con la cámara MOTICAM 2500 de 5.0 megapíxeles y se procesaron con el software MOTIC (versión 2.0).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Proyecto de Ciencia Básica titulado “Caracterización de la proteína de unión a RNA *AtGRDP2* de *Arabidopsis* bajo estrés por frío” (A1-S-25233), por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis. A la MC. Alicia Becerra por su apoyo en el laboratorio.

Se agrade al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. por las becas (CVU: 931497) otorgadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamowski, M., Friml, J., 2015. PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. *Plant Cell* 27, 20–32. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134874>
- An, J.-P., Li, R., Qu, F.-J., You, C.-X., Wang, X.-F., Hao, Y.-J., 2018. R2R3-MYB transcription factor MdMYB23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. *Plant J.* 96, 562–577. <https://doi.org/10.1111/tpj.14050>
- Armstrong, A.F., Badger, M.R., Day, D.A., Barthet, M.M., Smith, P.M.C., Millar, A.H., Whelan, J., Atkin, O.K., 2008. Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration. *Plant. Cell Environ.* 31, 1156–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01830.x>
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K., 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.07.002>
- Ding, Y., Shi, Y., Yang, S., 2019. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytol.* 222, 1690–1704. <https://doi.org/10.1111/nph.15696>
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124, 509–525. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>
- Fusaro, A.F., Bocca, S.N., Ramos, R.L.B., Barrôco, R.M., Magioli, C., Jorge, V.C., Coutinho, T.C., Rangel-Lima, C.M., 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. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0444-4>
- Gray, W.M., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C.P., Estelle, M., 1998. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 7197–7202. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7197>
- Han, H., Yan, A., Li, L., Zhu, Y., Feng, B., Liu, X., Zhou, Y., 2020. A signal cascade

originated from epidermis defines apical-basal patterning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. *Nat. Commun.* 11, 1214. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14989-4>

He, W., Brumos, J., Li, H., Ji, Y., Ke, M., Gong, X., Zeng, Q., Li, W., Zhang, X., An, F., Wen, X., Li, P., Chu, J., Sun, X., Yan, C., Yan, N., Xie, D.-Y., Raikhel, N., Yang, Z., Stepanova, A.N., Alonso, J.M., Guo, H., 2011. A Small-Molecule Screen Identifies *l*-Kynurenone as a Competitive Inhibitor of TAA1/TAR Activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and Root Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3944–3960. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089029>

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T., 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.297>

Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., Ovesná, J., 2010. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol.* 12, 395–405. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x>

Jiménez-Bremont, J.F., Ortega-Amaro, M.A., Hernández-Sánchez, I.E., Rodriguez-Peña, A.L., Maruri-Lopez, I., 2018. Plant Glycine-Rich Proteins and Abiotic Stress Tolerance, in: Metabolic Adaptations in Plants During Abiotic Stress. CRC Press, Boca Raton, FL : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018., pp. 203–212. <https://doi.org/10.1201/b22206-17>

Junghans, U., Polle, A., Duchtig, P., Weiler, E., Kuhlman, B., Gruber, F., Teichmann, T., 2006. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant, Cell Environ.* 29, 1519–1531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01529.x>

Kakei, Y., Yamazaki, C., Suzuki, M., Nakamura, A., Sato, A., Ishida, Y., Kikuchi, R., Higashi, S., Kokudo, Y., Ishii, T., Soeno, K., Shimada, Y., 2015. Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *Plant J.* 84, 827–837. <https://doi.org/10.1111/tpj.13032>

Kazemi-Shahandashti, S.-S., Maali-Amiri, R., 2018. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J.*

- Plant Physiol. 226, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.03.022>
- Kim, J.S., Jung, H.J., Lee, H.J., Kim, K.A., Goh, C.-H., Woo, Y., Oh, S.H., Han, Y.S., Kang, H., 2008. Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 55, 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03518.x>
- Kim, J.Y., Kim, W.Y., Kwak, K.J., Oh, S.H., Han, Y.S., Kang, H., 2010. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. J. Exp. Bot. 61, 2317–2325. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq058>
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van De Peer, Y., Rouzé, P., Rombauts, S., 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Res. 30, 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
- Long, R., Yang, Q., Kang, J., Zhang, T., Wang, H., Li, M., Zhang, Z., 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1443-0>
- Ludwig-Müller, J., 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. J. Exp. Bot. 62, 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Ma, Y., Cao, J., He, J., Chen, Q., Li, X., Yang, Y., 2018. Molecular Mechanism for the Regulation of ABA Homeostasis During Plant Development and Stress Responses. Int. J. Mol. Sci. 19, 3643. <https://doi.org/10.3390/ijms19113643>
- Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124, 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>
- Mangeon, A., Magrani Junqueira, R., Sachetto-Martins, G., 2010. Plant Signaling & Behavior Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. <https://doi.org/10.4161/psb.5.2.10336>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15, 473–497.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Oetiker, J.H., Aeschbacher, G., 1997. Temperature-Sensitive Plant Cells with Shunted Indole-3-Acetic Acid Conjugation. *Plant Physiol.* 114, 1385–1395.
<https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1385>

Oliver, S.N., Van Dongen, J.T., Alfred, S.C., Mamun, E.A., Zhao, X., Saini, H.S., Fernandes, S.F., Blanchard, C.L., Sutton, B.G., Geigenberger, P., Dennis, E.S., Dolferus, R., 2005. Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility, *Plant, Cell and Environment*.

Ortega-Amaro, M.A., Rodriguez-Hernandez, A.A., Rodriguez-Kessler, M., Hernandez-Lucero, E., Rosales-Mendoza, S., Ibanez-Salazar, A., Delgado-Sanchez, P., Jimenez-Bremont, J.F., 2015. Overexpression of *AtGRDP2*, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 5, 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00782>

Ortega-Amaro, M.A., Rodríguez-Kessler, M., Rodríguez-Hernández, A.A., Becerra-Flora, A., Rosales-Mendoza, S., Jiménez-Bremont, J.F., 2016. Overexpression of *AtGRDP2* gene in common bean hairy roots generates vigorous plants with enhanced salt tolerance. *Acta Physiol. Plant.* 38, 66.
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2083-0>

Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., Grill, E., 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 15, 395–401.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.006>

Rodríguez-Hernández, A.A., Ortega-Amaro, M.A., Delgado-Sánchez, P., Salinas, J., Jiménez-Bremont, J.F., 2014. AtGRDP1 Gene Encoding a Glycine-Rich Domain Protein Is Involved in Germination and Responds to ABA Signalling. *Plant Mol. Biol. Report.* 32, 1187–1202. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0714-4>

Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W., Singh, N.B., 2011. Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants, *Current Genomics*.

Scanlon, M.J., 2003. The Polar Auxin Transport Inhibitor N -1-Naphthylphthalamic

- Acid Disrupts Leaf Initiation, KNOX Protein Regulation, and Formation of Leaf Margins in Maize. *Plant Physiol.* 133, 597–605.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.026880>
- Shani, E., Salehin, M., Zhang, Y., Sanchez, S.E., Doherty, C., Wang, R., Mangado, C.C., Song, L., Tal, I., Pisanty, O., Ecker, J.R., Kay, S.A., Pruneda-Paz, J., Estelle, M., 2017. Plant Stress Tolerance Requires Auxin-Sensitive Aux/IAA Transcriptional Repressors. *Curr. Biol.* 27, 437–444.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.016>
- Silva-Cancino, M.C., Esteban, R., Artetxe, U., Plazaola, J.I.G., 2012. Patterns of spatio-temporal distribution of winter chronic photoinhibition in leaves of three evergreen Mediterranean species with contrasting acclimation responses. *Physiol. Plant.* 144, 289–301. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01556.x>
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A., 2012. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506, 265–273.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.076>
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971.
<https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>
- Verma, V., Ravindran, P., Kumar, P.P., 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16, 86. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
- Waqas, M.A., Kaya, C., Riaz, A., Farooq, M., Nawaz, I., Wilkes, A., Li, Y., 2019. Potential Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants Induced by Thiourea. *Front. Plant Sci.* 10, 1336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01336>
- Zwack, P.J., Compton, M.A., Adams, C.I., Rashotte, A.M., 2016. Cytokinin response factor 4 (CRF4) is induced by cold and involved in freezing tolerance. *Plant Cell Rep.* 35, 573–584. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1904-8>

CAPÍTULO II

Análisis de expresión de genes de respuesta a estrés abiótico en la línea mutante y sobreexpresante del gen *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana*

Genesis Montalvo-Guevara¹, Azucena Ortega-Amaro¹, Juan Francisco Jiménez-Bremont^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Molecular Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, San Luis Potosí, México

RESUMEN

El gen *AtGRDP2* codifica para una proteína con un dominio rico en glicina y se ha relacionado con el crecimiento y la respuesta a estrés por salinidad. Analizamos la expresión de tres genes: *TOZ*, *TMPIT-like protein* y *ATHAM*, los cuales estaban sobreexpresados en la línea sobreexpresante. Estos se seleccionaron mediante un análisis bioinformático de un experimento de expresión génica de microarreglos donde se comparó la expresión de plántulas de *Arabidopsis* de la línea sobreexpresante de *AtGRDP2* y plántulas de la línea mutante *Atgrdp2* sometidas bajo estrés salino a 150mM de NaCl. Por medio de qRT-PCR se determinó la expresión de estos 3 genes bajo estrés por frío en plántulas de *Arabidopsis* de 9 días de edad que fueron sometidas a estrés por frío (4°C) por 24h. Se observó que estos genes se inducen bajo estrés por frío en plantas de la línea sobreexpresante de *AtGRDP2*, mientras que en la línea mutante *Atgrdp2* los genes *ATHAM* y *TOZ* se encontraban reprimidos. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión del gen *AtGRDP2* induce la expresión de genes que responden a estrés abiótico.

Palabras Clave: estrés por frío; microarreglos; expresión génica.

1. INTRODUCCIÓN

El gen *AtGRDP2* codifica para una proteína con un dominio rico en glicina de *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína presenta tres regiones principales: 1) un dominio de función desconocida en el N-terminal (DUF1399, por sus siglas en inglés), 2) un motivo putativo de unión a ARN (RNP, por sus siglas en inglés) y 3) el dominio rico en glicinas en el C-terminal (Ortega-Amaro et al., 2015). Anteriormente, en el trabajo de Ortega-Amaro et al. (2015) se reportó que plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes de *AtGRDP2* presentan un crecimiento acelerado, floración adelantada, y una acumulación de la fitohormona ácido indolacético (IAA, por sus siglas en inglés). Además, determinaron que plántulas de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa* L. sobreexpresantes del gen *AtGRDP2* presentan un fenotipo de tolerancia a estrés salino.

Con base en esos hallazgos, el equipo de trabajo del Dr. Juan F. Jiménez Bremont realizó microarreglos en plántulas de la línea mutante y sobreexpresante del gen *AtGRDP2* sometidas a estrés salino. Por lo que, en este segundo capítulo nos enfocamos en seleccionar algunos genes diferenciales de los datos de microarreglos de la línea mutante y sobreexpresante del gen *AtGRDP2* para ser cuantificados mediante qRT-PCR en plántulas de 9 días de edad de la línea mutante y sobreexpresante del gen *AtGRDP2*, y la parental Col-0 bajo a estrés por frío

durante

24h.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Condiciones de crecimiento vegetal.

Las semillas de las líneas sobreexpresante (OE3-AtGRDP2) y mutante (*atgrdp2*) y la parental Col-0 fueron esterilizadas por 5 min con cloro al 20% y se lavaron 5 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles se llevaron a vernalización por 2 días a 4°C. Posteriormente, se colocaron en placas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) al 0.5x, pH 5.7, 0.5% de sacarosa y 1.2% agar (Murashige and Skoog, 1962). Las placas se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h (13,000 luxes) / 8 h en ciclo de luz/oscuridad a 22°C. Se colocaron 20 plántulas de 9 días de edad en placas con medio MS 0.5x nuevo y se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h (13,000 luxes) / 8 h, en ciclo de luz/oscuridad a 22 ± 2°C y 4°C por 24h.

*2.2. Extracción de ARN total de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.*

Con el fin de realizar un análisis semicuantitativo por qRT-PCR, se realizó la extracción total de ARN de las plántulas de las líneas de *Arabidopsis* mutantes de AtGRDP2 (*atgrdp2*) y sobreexpresantes (OE3-AtGRDP2) y parental (Col-0). Las plántulas de 9 días de edad fueron sometidas a estrés por frío (4°C) y como control 22°C por 24h. Esto se realizó por triplicados (Suplementaria 2).

La extracción de ARN se realizó con 100-200mg de material biológico siguiendo el protocolo de Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). Los contaminantes de ADN genómico se eliminaron con DNase I (Invitrogen). Posteriormente se realizó la cuantificación y la integridad del ARN mediante espectrofotometría (EPOCH2, BioTek), así como en gel de agarosa.

2.3. Síntesis de cDNA de plántulas sometidas a estrés por frío.

Después de la extracción de ARN previamente descrita, se realizó la síntesis de cDNA con la enzima transcriptasa reversa RevertAid (Thermo Fisher) de acuerdo a las instrucciones del protocolo de Thermo Fisher.

2.4. Identificación de genes candidatos de las líneas sobreexpresante y mutante del gen AtGRDP2 bajo estrés salino.

Anteriormente el equipo de trabajo del doctor Juan Francisco Jiménez Bremon realizaron microarreglos con GeneChip® Arabidopsis ATH1, de plantas de 14 días de edad de las líneas *AtGRDP2* mutante y sobreexpresante sometidas a 125mM de NaCl por tres días. Mediante el lenguaje de programación R (R Core Team, 2021) escalamos los datos usando la función Z score. De estos resultados se destacó la expresión de un total de 30 genes para cada línea (Suplementaria 1). Posteriormente se seleccionaron 3 genes de acuerdo a su función biológica, que se encontraban inducidos en la línea sobreexpresante con respecto de la mutante, de los cuales se diseñaron oligos para posteriormente ser analizados semicuantitativamente en las plantas de las líneas *AtGRDP2* bajo estrés por frío.

2.5. Análisis de expresión del gen AtGRDP2 en las líneas mutante y sobreexpresante por qRT-PCR.

Con la finalidad de medir los niveles de expresión de los genes ATHAM, TOZ y TMPIT en las líneas mutante (*atgrdp2*) y sobreexpresante (OE3-*AtGRDP2*), se realizó una qRT-PCR usando los oligos: FWTMPIT, RVTMPIT; FWTOZ, RVTOZ; FWATHAM, RVATHAM, respectivamente (Tabla 3). El análisis cuantitativo se realizó en reacciones de 10μL con 100ng de cDNA total, se utilizó el Power SYBR® Green RNA-to-CT™ One-Step Kit (Applied Biosystems). Las curvas de disociación se hicieron por 15 ciclos a 95°C (desnaturalización), 15 ciclos a 60°C (anneal) y 15 s a 95°C (desnaturalización). Para el cálculo de los niveles de expresión relativa de mRNA se usó el número de ciclos del umbral (valor Ct). El valor Ct de cada blanco fue normalizado con el valor Ct del gen de ubiquitina 5 (At3g62250) de *Arabidopsis*. El fold change en la expresión relativa de las muestras control se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Por cada muestra, se analizaron tres replicas biológicas con sus respectivas replicas técnicas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación de genes inducidos de las líneas sobreexpresante y mutante del gen AtGRDP2 bajo estrés salino.

Con base en los datos de Z-score obtenidos a partir de los datos de los microarreglos de expresión génica que fueron obtenidos de plántulas de la línea sobreexpresante del gen *AtGRDP2* contra la línea mutante *Atgrdp2* bajo estrés salino. Se identificaron los 30 genes que presentaron una mayor inducción en la línea sobreexpresante en comparación la mutante de *AtGRDP2* (Tabla suplementaria 1 y Suplementaria 1). De esos 30 genes, nosotros seleccionaron 3 genes como: TOZ, TMPIT-like protein y ATHAM de los datos de la línea sobreexpresante de *AtGRDP2* vs la línea mutante (Tabla 1). Además, realizamos una comparación entre estos 30 genes en el microarreglo realizado en la parental contra la mutante *Atgrdp2* (Suplementaria 1).

Los genes seleccionados en la línea sobreexpresante *AtGRDP2* fueron el gen *Tormozembryo Defective (TOZ)*, el cual está involucrado en el desarrollo embrionario y división celular (Griffith et al., 2007), además aparece en la base de datos de expresión BAR ePLANT como inducido bajo estrés por sequía; el gen *Transmembrane Protein Inducible By Tnf- α (TMPIT-like protein)* de función desconocida, el cual se expresa bajo estrés por frío (BAR ePLANT); y el gen *Hairy Meristem 1 (ATHAM)* se relaciona con la diferenciación y división celular, participa en la regulación transcripcional y en el crecimiento de las células apicales de los pelos radiculares (Engstrom et al., 2011; Han et al., 2020); este gen al igual que el anterior también se induce bajo estrés por frío según los datos de expresión de la página BAR ePLANT.

3.2. La sobreexpresión del gen AtGRDP2 potencia la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico.

Con el objetivo de determinar si genes que resultaron inducidos en los datos de los microarreglos bajo estrés salino, también se inducen por frío en la línea sobreexpresante de *AtGRDP2* en comparación a la mutante y a la parental Col-0,

nosotros los cuantificamos por qRT-PCR en plántulas de 9 días de edad a 4°C por 24h. El análisis cuantitativo por qRTPCR mostró que en la línea sobreexpresante de *AtGRDP2* estos genes están inducidos bajo estrés por frío. El gen ATHAM a 22°C se encontraba ligeramente inducido en la línea mutante (3.1 veces), y también en la línea sobreexpresante (1.4 veces) en comparación con la parental Col-0; por otra parte, a 4°C este gen se observó fuertemente inducido con 13.7 veces y en la mutante estaba ligeramente reprimido (-1.4 veces) en comparación con la parental Col-0 (Fig. 1A). Este gen pertenece a la familia de genes HAM los cuales están implicados en el mantenimiento de la homeostasis de las células meristemáticas (Han et al., 2020).

Por otro lado, el gen *TOZ*, el cual se ha relacionado con el desarrollo y diferenciación de tejidos en *Arabidopsis* (Griffith et al., 2007), se observó que a 22°C estaba reprimido en la sobreexpresante (-3.9 veces) y en la mutante (-2.7 veces) en comparación con la Col-0. A 4°C, en la línea mutante se mantuvo reprimido (-1.1 veces) mientras que en la línea sobreexpresante tuvo una expresión de 2.3 veces en comparación con la Col-0 (Fig. 1B).

Un patrón de expresión similar al gen anterior, ocurrió con el gen *TMPIT-like protein*, a 22°C en las líneas mutante (-2 veces) y sobreexpresante (-2.9 veces) se encontraba reprimido, y al someterse a 4°C el gen se induce fuertemente en la sobreexpresante con 6.5 veces y en la mutante no se observó un cambio en comparación con la línea parental Col-0 (Fig. 1C). Existen registros de que el gen *TMPIT* se induce bajo condiciones de sequía en plantas de trigo tolerantes (TR39477) (Lucas et al., 2011)

Anteriormente en el trabajo de Ortega-Amaro et al. (2015) analizaron genes marcadores de estrés abiótico, como el gen *Respuesta a disecación 29B (RD29B)*, *Marcador de metionina temprano de Arabidopsis 6 (EM6/LEA)* y *factor de unión ABRE 4 (ABF4)* los cuales estaban inducidos en la línea sobreexpresante y reprimidos en la línea mutante, bajo estrés salino.

Con base en estos se puede inferir que la sobreexpresión del gen *AtGRDP2*, en *Arabidopsis thaliana*, indujo la expresión de estos genes que están implicados en crecimiento y de respuesta a estrés

4. CONCLUSIÓN

Se determinó que la sobreexpresión del gen *AtGRDP2* podría inducir genes de respuesta a estrés y desarrollo, lo que podría explicar por qué estas plantas son más tolerantes a estrés abiótico.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes seleccionados del análisis de microarreglos de *AtGRDP2* bajo estrés salino.

ID	Gen	Z SCORE	
		Sobreexpresante	Mutante
AT5G16750.1	<i>TOZ</i>	1.366004	-2.5386927
AT1G33230.1	<i>TMPIT-like protein</i>	1.112419	-2.962209
AT2G45160.1	<i>HAIRY MERISTEM 1</i>	2.889155	-1.782488

Tabla 2. Oligos utilizados en el análisis de expresión por qRT-PCR.

Nombre	Secuencia	Amplicón
FWTMPIT	GAAGTCGAGATTCAAGGCGAAG	118
RVTMPIT	GGGAGAAAGATCCACAGTTGG	
FWTOZ	GAAGAGACTCATTGCCGAAGC	110
RVTOZ	CCACCCCTCAGATCTCAATC	
FWATHAM	GCTGTTGATGAAACGACACCG	125
RVATHAM	GCAACAAACACTCCGCCTGA	

LISTA DE FIGURAS

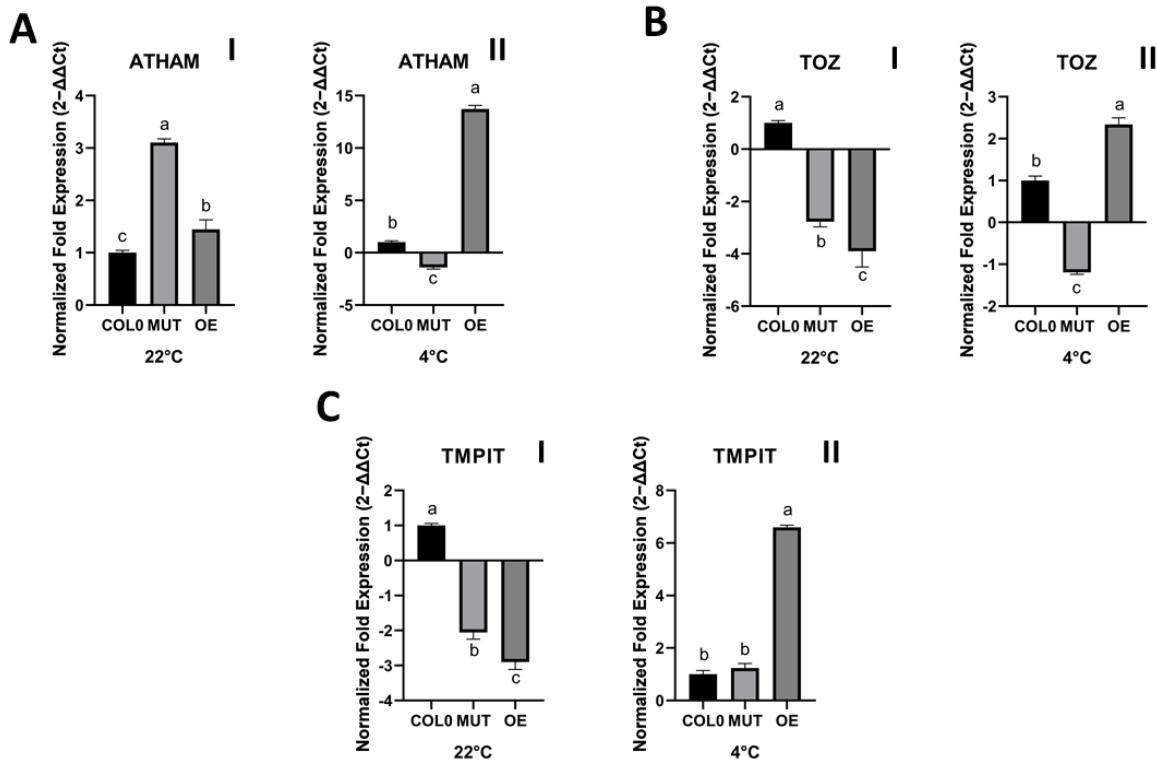


Fig. 1. Análisis de expresión de los genes candidatos en líneas sobreexpresantes y mutantes de *AtGRDP2* bajo estrés por frío.

Se llevo a cabo una qRT-PCR en plantas de 9 días de edad de las líneas sobreexpresante OE3-*AtGRDP2* y la mutante *atgrdp2* y la parental Col-0. Se utilizaron 10 plántulas por triplicado. Para la qRT-PCR se utilizó el colorante SYBR green. El fold change normalizado fue calculado comparando la expresión de los blancos contra el control (Col-0), después se normalizo contra el gen de UBQ5 de *Arabidopsis* usando el método de $(2^{-\Delta\Delta Ct})$. En el caso de las proporciones menores a 1, se estimó el inverso de la proporción y se cambiaron los signos.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

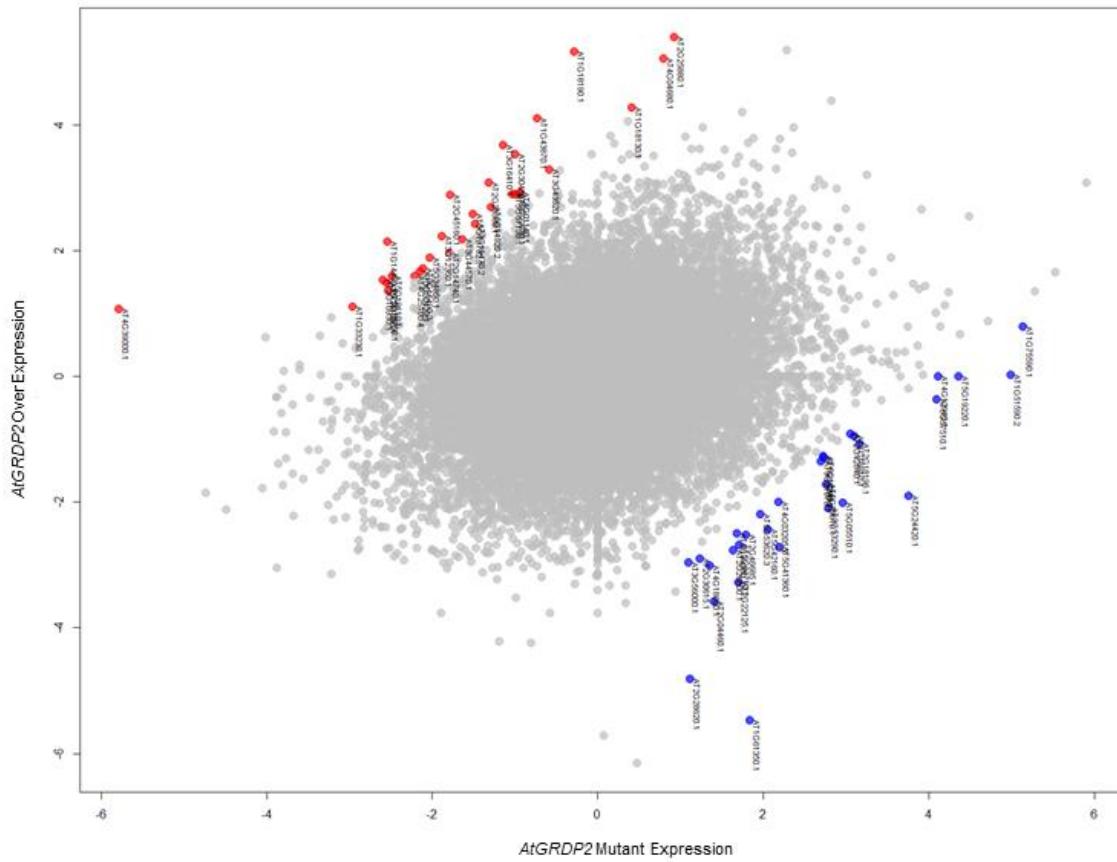
Tabla suplementaria 1. 30 proteínas inducidas en la línea mutante y sobreexpresante del gen *AtGRDP2* bajo estrés salino.

ID	Proteína	Z-score OE	Z-score MUT
AT4G39000.1	Glycosyl hydrolase 9B17	1.072641	-5.7849047
AT1G14490.1	Putative AT-hook DNA-binding family protein, AHL28	2.14729	-2.544342
AT2G45160.1	HAIRY MERISTEM 1	2.889155	-1.782488
AT2G28360.1	SIT4 phosphatase-associated family protein	3.088592	-1.319714
AT2G30480.1	Hypothetical protein	3.540891	-0.9984065
AT3G16410.1	Nitrile-specifier protein NSP4	3.685328	-1.141032
AT1G43870.1	Transposable_element_gene; similar to myosin heavy chain-related	4.113499	-0.7367462
AT4G04680.1	Rix1 complex component	5.059052	0.7951041
AT1G18190.1	GC2, GOLGIN CANDIDATE 2	5.17285	-0.2876024
AT2G25880.1	AUR2, family Ser/Thr kinases	5.398319	0.924497
AT3G10930.1	IDA-LIKE7, IDL7	1.542146	-2.60017
AT3G12360.1	ITN1, INCREASED TOLERANCE TO NACL	2.225856	-1.881768
AT3G13782.1	NFA04, NAP1;4, NUCLEOSOME/CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR GROUP A 04, NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1;4	2.58719	-1.512138

AT5G19110.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1.601674	-2.489159
AT1G33230.1	TMPIT-like protein	1.112419	-2.962209
AT5G41685.1	Mitochondrial outer membrane translocase complex, subunit Tom7	1.482239	-2.5504448
AT5G14920.2	GASA14, A-STIMULATED IN ARABIDOPSIS 14	2.692036	-1.2868102
AT5G07130.1	LAC13, LAACASE 13	2.904044	-1.0337678
AT5G34850.1	ATPAP26, PAP26	1.896316	-2.0300665
AT3G19470.2	F-box and associated interaction domains-containing protein	2.421083	-1.4871624
AT5G16750.1	TOZ	1.366004	-2.5386927
AT5G22630.1	ADT5	2.904513	-0.9943414
AT4G01140.1	Transmembrane protein, putative (DUF1191)	2.930180	-0.9431611
AT3G43520.1		3.286587	-0.5859607
AT1G18130.1		4.280891	0.4120473
AT2G15490.2	UGT73B4, UDP-glycosyltransferase 73B4	1.719323	-2.1131371
AT3G44570.1	retrotransposon ORF-1 protein	2.186926	-1.6411909
AT3G50420.1		1.675564	-2.1483759
AT4G25100.4	FSD1	1.593070	-2.2107722
AT2G14740.1	ATVSR3, VACUOLAR SORTING RECEPTOR 3	1.960345	-1.7916841
AT1G61350.1	ARM repeat superfamily protein	-5.472214	1.83572
AT2G28620.1	RADIALLY SWOLLEN 7, RSW7	-4.812693	1.111358
AT2G04460.1	transposable_element_gene	-3.584614	1.401126

AT2G22125.1	CELLULOSE SYNTHASE-INTERACTIVE PROTEIN 1, CSI1, POM-POM 2, POM2	-3.271444	1.694448
AT5G41360.1	XPB2	-2.721817	2.19556
AT5G42160.1	similar to carboxylic ester hydrolase/ lipase	-2.433544	2.054103
AT3G53290.1	CYP71B30P	-2.096128	2.783692
AT5G05510.1	Mad3/BUB1 homology region 1	-2.011339	2.959607
AT5G24420.1	cytosolic 6-phosphogluconolactonase ; PGL5	-1.897726	3.750678
AT5G39810.1	AGAMOUS-LIKE 98, AGL98	-1.721077	2.762479
AT5G57510.1	cotton fiber protein	-0.3649338	4.09289
AT5G64710.1	MITOCHONDRIAL NUCLEASE 1, MNU1	-2.685239	1.710827
AT2G26800.1	3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COA (HMGCOA) LYASE, HGML	-2.759599	1.634981
AT4G18090.1	hypothetical protein	-3.00923	1.352141
AT5G19220.1	APL1, ADG2, ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 2,	0.0000000	4.360636
AT1G75590.1	SAUR52, SAUR-like auxin-responsive protein family	0.7936079	5.132490
AT2G46685.1	MICRORNA166A, MIR166	-2.5214399	1.788426
AT2G18196.1	ATHMP16, Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	-1.0738653	3.164422
AT4G03205.2	HEMF2, Coproporphyrinogen III oxidase	-1.9939519	2.180687
AT5G39380.1	Plant calmodulin-binding protein-like protein	-2.4928366	1.678590
AT5G53620.3	RNA polymerase II degradation factor	-2.1949577	1.959996

AT2G30615.1	F-box/LRR protein	-2.9005677	1.231551
AT4G12940.1		0.0000000	4.114812
AT3G56000.1	CSLA14, ATCSLA14, ARABIDOPSIS THALIANA CELLULOSE SYNTHASE LIKE A14	-2.9635584	1.096429
AT3G21070.1	ATNADK-1, NADK1	-1.3450344	2.697213
AT1G16910.1	LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 8, LSH8	-0.9485808	3.093155
AT5G14340.1	AtMYB40	-1.2886159	2.731971
AT1G25280.2	AtTLP10, TUBBY LIKE PROTEIN 10	-1.2717796	2.721661
AT2G42840.1	PDF1, PROTODERMAL FACTOR 1	-0.9132061	3.048372



Suplementaria 1. Selección de 30 genes de microarreglos de la línea mutante y sobreexpresante de AtGRDP2.

Distribución de valores Z-score en datos de microarreglos. Los puntos rojos representan los genes 30 genes con los valores Z-score más altos en la sobreexpresante y los puntos azules representan 30 genes con los valores Z-score más altos de la mutante.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Proyecto de Ciencia Básica titulado “Caracterización de la proteína de unión a RNA *AtGRDP2* de *Arabidopsis* bajo estrés por frío” (A1-S-25233), por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis. A la MC. Alicia Becerra por su apoyo en el laboratorio.

Se agrade al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. por las becas (CVU: 931497) otorgadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Engstrom, E.M., Andersen, C.M., Gumulak-Smith, J., Hu, J., Orlova, E., Sozzani, R., Bowman, J.L., 2011. Arabidopsis Homologs of the Petunia HAIRY MERISTEM Gene Are Required for Maintenance of Shoot and Root Indeterminacy. *Plant Physiol.* 155, 735–750. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168757>
- Griffith, M.E., Mayer, U., Capron, A., Ngo, Q.A., Surendraraao, A., McClinton, R., Jürgens, G., Sundaresan, V., 2007. The TORMOZ Gene Encodes a Nucleolar Protein Required for Regulated Division Planes and Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2246–2263. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042697>
- Han, H., Yan, A., Li, L., Zhu, Y., Feng, B., Liu, X., Zhou, Y., 2020. A signal cascade originated from epidermis defines apical-basal patterning of Arabidopsis shoot apical meristems. *Nat. Commun.* 11, 1214. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14989-4>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lucas, S., Dogan, E., Budak, H., 2011. TMPIT1 from wild emmer wheat: First characterisation of a stress-inducible integral membrane protein. *Gene* 483, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.003>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ortega-Amaro, M.A., Rodriguez-Hernandez, A.A., Rodriguez-Kessler, M., Hernandez-Lucero, E., Rosales-Mendoza, S., Ibanez-Salazar, A., Delgado-Sanchez, P., Jimenez-Bremont, J.F., 2015. Overexpression of *AtGRDP2*, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 5, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00782>
- R Core Team. (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>