

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

Caracterización funcional y molecular de *AtGRDP1* un  
nuevo gen implicado en la respuesta a ABA y estrés  
abiótico

Tesis que presenta

**Aída Araceli Rodríguez Hernández**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

San Luis Potosí, S.L.P., 30 de Mayo de 2014



## Constancia de aprobación de la tesis

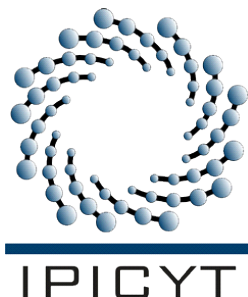
La tesis "*Caracterización funcional y molecular de AtGRDP1 un nuevo gen implicado en la respuesta a ABA y estrés abiótico*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Aída Araceli Rodríguez Hernández** y aprobada el **treinta de mayo del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont  
**Director de la tesis**

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga  
**Miembro del Comité Tutorial**

Dra. Martha Leticia Santos Martínez  
**Miembro del Comité Tutorial**

Dra. Catalina Arenas Huertero  
**Miembro del Comité Tutorial**

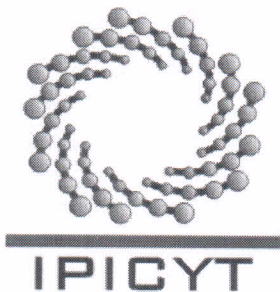


## **Créditos Institucionales**

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

Francisco Jimenez Bremont

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro: 209646 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 070 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de mayo del año 2014, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Catalina Arenas Huertero</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Aída Araceli Rodríguez Hernández**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización funcional y molecular de AtGRDPI un nuevo gen implicado en la respuesta a ABA y estrés abiótico*

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 10:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de mayo de 2014.

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

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

Esta tesis esta dedicada a **Dios** quien me premio permitiendome continuar con un sueño, él sabe que todo el trabajo y esfuerzo realizado en este trabajo ha sido gracias a él ya que cuando menos creí que podría lograrlo siempre me dio la fuerza necesaria asi como puso en mi camino a las personas que me ayudarían a lograrlo.

A mis **padres** que me dieron la vida y a que ambos han sido importantes en mi formación como la persona que soy hoy, ya que sin los valores que me inculcaron no habría podido tener la visión para entender muchas situaciones.

A mi esposo **Omar** porque de él siempre he recibido su apoyo y amor incondicional en este sueño, y porque sin sus palabras en momentos dificiles no hubiera tenido la claridad mental que se requeria en situaciones de estrés.

A mis hermanos **Jesús, Elizabeth, Patricia y Rogerio**, ya que sin sus consejos, platicas amenas y amor hubiera sido más dificil a veces encontrarle sentido a este proyecto.

A mis sobrinas **Miranda, Daniela, Valeria y Samantha** quienes siempre me han motivado a sacar lo mejor de mi y a estar llena de esperanza para dejarles un mundo mejor y porque sin su ternura y calidez habría sido más dificil estar dispuesta a seguir adelante.

A mi abue **Raquel** que siempre me ha dado un ejemplo vivo de Fortaleza y Tenacidad y que aunque ella no lo crea siempre esta cerca de mi corazón y en cada pasao que doy.

A mis **Tíos María Esther y Jose Luis** que sin sus palabras y consejos yo no habría continuado con este sueño, ellos simepre han tenido fe en mi y sabían que podía lograrlo.

Al **Dr. Juan Francisco Jimenez Bremont** ya que desde que me incorpore a su grupo de investigación siempre ha creído en mi y ha confiado plenamente en lo que hago, él es la persona a quien admiro y respeto profundamente ya que el me ha enseñado todo sobre este trabajo.

## Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias, con beca número de registro **209646**.

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

Al **Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont** por haberme permitido pertenecer a su grupo de investigación y por todo el apoyo así como su amistad que ha sido muy importante para formar un equipo de trabajo en el cual el me ha enseñado mucho y siempre le estaré agradecida.

A mi Comité tutorial, **Dr. Gerardo, Dra. Leticia, Dra. Catalina** por sus contribuciones a mi trabajo de tesis.

A la **Dra. Alejandra Covarrubias** que siempre apporto comentarios que fueron para mejorar el trabajo.

A la **Dra. Catalina Arenas Huertero** quien nos enriqueció el trabajo de forma importante.

A la **M. C. Alicia Becerra Flora** por todo su apoyo y amistad incondicional tanto en el laboratorio como en lo personal, su trabajo y su aporte en este proyecto fue muy importante para su realización.

A la **Dra. Gladis Judith Labrada Delgado** por su asistencia técnica en el microscopio electrónico e-SEM.

A todos los **profesores de la división** de quienes aprendí todo lo básico de este trabajo.

A mis amigas **Adriana e Itzell** que con su amistad siempre encontré apoyo en todo momento.

A todos **mis compañeros del laboratorio** quienes aportaron algo siempre a mi trabajo.

A mi **familia y amigos** cercanos que siempre han estado incondicionalmente conmigo.

# Contenido

	Página
Portada	i
Constancia de aprobación	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 La semilla	6
2.2 Estrés abiótico	6
2.3 Respuesta molecular en la planta al estrés abiótico	8
2.4 Respuesta hormonal en la planta al estrés abiótico	11
2.5 Ácido abscísico (ABA)	12
2.6 Genes de función desconocida implicados en la respuesta al estrés abiótico	16
2.7 Proteínas Ricas en Glicina	17
2.8 Proteínas de unión a RNA con una región rica en glicinas RRM-GRPs	19
2.9 microRNAs y su regulación durante el estrés abiótico	21
3. OBJETIVO GENERAL	23
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
4. CAPITULO I <i>AtGRDP1</i> , un gen que codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas involucrada en la respuesta al estrés abiótico en	24

la germinación, y un nuevo actor en la señalización por ABA.	
4.1 CAPITULO II La desregulación del gen <i>AtGRDP1</i> provoca alteraciones en la morfología de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
4.2 CAPITULO III Perfiles transcripcionales de microRNAs, en la línea sobreexpresante del gen <i>AtGRDP1</i> de <i>Arabidopsis</i> , revelaron la desregulación de <i>miR159</i> y <i>miR160</i> en bajo la aplicación exógena de ABA	37
5. DISCUSIÓN	49
La proteína <i>AtGRDP1</i> miembro de una nueva familia de proteínas que contiene el dominio DUF1399	49
<i>AtGRDP1</i> está involucrado en la respuesta al estrés abiótico	50
La desregulación de la expresión de <i>AtGRDP1</i> provoca cambios morfológicos en las semillas de <i>Arabidopsis</i>	52
<i>AtGRDP1</i> está involucrado en la regulación transcripcional de reguladores positivos de la ruta de señalización de ABA	53
Expresión de microRNAs en la línea sobreexpresora del gen <i>AtGRDP1</i>	54
6. CONCLUSIÓN	56
7. REFERENCIAS	57



# Lista de figuras

	Página
<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Figura 1.</b> Esquema de la estructura de una semilla madura de <i>Arabidopsis thaliana</i> (modificado de <a href="http://seedgenenetwork.net/arabidopsis">http://seedgenenetwork.net/arabidopsis</a> ).	5
<b>Figura 2.</b> Esquema general de la respuesta a estrés abiótico en una célula vegetal (modificado de Hirayama & Shinozaki, 2010).	8
<b>Figura 3.</b> Señalización molecular de la ruta dependiente e independiente de ABA durante el estrés abiótico.	10
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica de las fitohormonas reportadas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	11
<b>Figura 5.</b> Ruta de señalización de ABA y sus factores transcripcionales ABI3, ABI4 y ABI5.	16
<b>Figura 6.</b> Esquema de la clasificación de las proteínas ricas en glicina (GRPs) (Modificado de Mangeon et al. 2010).	19
<b>CAPITULO II. Deregulation of AtGRDP1 gene produces morphology alterations in Arabidopsis thaliana seeds</b>	
<b>Figure 1.</b> Seed weight of Col-0, <i>Atgrdp1</i> -null mutant, and 35S:: <i>AtGRDP1</i> over-expressing lines.	35
<b>Figure 2.</b> Seed morphology of Col-0, <i>Atgrdp1</i> -null mutant, and 35S:: <i>AtGRDP1</i> over-expressing lines.	36
<b>CAPITULO III. MicroRNA profiling of Arabidopsis AtGRDP1 overexpression line reveals deregulation of miR159 and miR160 in response to ABA</b>	
<b>Figure 1.</b> Expression levels of <i>miR159</i> and <i>miR160</i> in Col-0, <i>Atgrdp1</i> -null mutant and 35S:: <i>AtGRDP1-6</i> over-expressing line during ABA treatment.	47

## RESUMEN

### **Caracterización funcional y molecular de *AtGRDP1* un nuevo gen implicado en la respuesta a ABA y estrés abiótico**

El estrés abiótico afecta la germinación así como el crecimiento y desarrollo de las plantas, impactando en la productividad agrícola. En este estudio, se caracterizó molecular y funcionalmente el gen *AtGRDP1* (*Arabidopsis thaliana* Glycine Rich Domain Protein), que contiene un dominio DUF1399, un motivo probable de unión a RNA (RNP) y un dominio rico en glicinas. Datos transcripcionales, revelaron que *AtGRDP1* mostró una clara inducción de su expresión por estrés abiótico y en respuesta a la aplicación de ABA. Para estudiar la función del gen *AtGRDP1* se generaron líneas sobreexpresoras y una mutante insercional. La línea mutante mostró un aumento de la sensibilidad a estrés salino y osmótico durante la germinación y el desarrollo de los cotiledones, mientras que las líneas que sobreexpresan el gen *AtGRDP1* mostraron una mayor tolerancia al estrés abiótico. Interesantemente, estas líneas mostraron un fenotipo de insensibilidad a la hormona ABA, semejante al fenotipo de las líneas ABI, mientras que la interrupción del gen *AtGRDP1* dio lugar a mutantes con hipersensibilidad al ABA. En plántulas de la línea mutante y sobreexpresora se analizó el transcrito de los factores de transcripción *ABI3* y *ABI5*, mostrando niveles elevados de estos transcritos en la mutante, mientras que en la línea sobreexpresante se encontró una clara represión de estos factores. Otro factor de transcripción que se analizó fue el *WRKY2*, en donde plántulas de la línea sobreexpresante del gen *AtGRDP1* bajo la aplicación de ABA, presentaron una mayor expresión del gen *WRKY2*, el cual correlaciona con los patrones de expresión de los genes *ABI3* y *ABI5*. Adicionalmente se analizó al microRNA *miR159*, el cual es regulado por *ABI3*, y se encontró reprimido en el fondo sobreexpresante de *AtGRDP1*. Se analizó también a *miR160*, el cual ha sido involucrado en la regulación de *ABI3*, y de factores de transcripción de respuesta a auxinas como *ARF10*, *ARF16* y *ARF17*. Contrario, a lo observado para el *miR159*, en la línea sobreexpresante de *AtGRDP1* se encontró una inducción elevada de este *miR160* en ABA exógeno, un dato que correlaciona con la expresión mostrada de *ABI3* en estas líneas sobreexpresoras. Las semillas de las líneas mutantes y sobreexpresantes presentaron alteraciones en su morfología y en la talla de la semilla. En esta tesis, describimos por primera vez al gen *AtGRDP1* el cual pertenece a una nueva familia DUF1399-GRD, y nuestros hallazgos proporcionan evidencia clave sobre *AtGRDP1*, el cual está involucrado en la tolerancia al estrés abiótico, como un nuevo actor en la ruta de señalización del ABA.

**PALABRAS CLAVE:** DUF1399-GRDP, proteína rica en glicinas, germinación

---

## ABSTRACT

### Functional and molecular characterization of *AtGRDP1*, a novel gene involved in the response to ABA and abiotic stress

Abiotic stress affects germination and growth and development of plants, impacting on agricultural productivity. In this study, we show the molecular and functional characterization of *AtGRDP1* gene (*Arabidopsis thaliana* Protein Glycine Rich Domain) that containing DUF1399 domain, putative RNA-binding motif (RNP), and a glycine domain rich. Transcriptional data revealed that *AtGRDP1* induction showed clear expression by abiotic stress and in response to the application of ABA. To study the role of *AtGRDP1* gene were analyzing the overexpressing and insertional mutant lines. The mutant line showed an increased sensitivity to salt and osmotic stress during germination and cotyledon development, whereas the overexpressing lines of *AtGRDP1* gene showed a higher tolerance to abiotic stress. Interestingly, these lines showed insensitivity phenotype under application of ABA hormone, similar to the ABI-phenotype, whereas *AtGRDP1* gene disruption resulted a hypersensitive phenotype to ABA. In seedlings of mutant and overexpressing lines, ABI3 and ABI5 transcription factors were analyzed showing elevated levels of these transcripts in the mutant background, while in the 35S::*AtGRDP1* line showed a clear suppression of these factors. WRKY2 transcription factor was also analyzed, where seedlings overexpressing *AtGRDP1* under the application of ABA showed increased expression of *WRKY2* gene, which correlates with the expression patterns of *ABI3* and *ABI5* genes. Further analyzed showing that miR159, which is regulated by ABI3, was repressed in overexpressing background. Another microRNA analyzed was miR160, which has been, implicated in the regulation of ABI3, and others transcription factors responding to auxin as ARF10, ARF16 and ARF17. Contrary to that observed for miR159, 35S::*AtGRDP1* overexpressing line showed a high induction of miR160 under application of ABA, a finding that correlates with the expression of *ABI3* in these overexpression lines. Both *Atgrdp1*-null mutant and 35S::*AtGRDP1* overexpressing lines showed alterations in seed morphology. Here we describe for the first time *AtGRDP1* gene that belongs to a new family DUF1399-GRDP and our data suggest that it plays a regulatory role in ABA signaling pathway and tolerance to abiotic stress.

KEY WORDS: DUF1399-GRDP, glycine rich protein, seed germination

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas y por tanto controlan su productividad, en condiciones adversas provocan graves repercusiones ya que la disponibilidad de alimentos estará sujeta a que existan condiciones óptimas para los cultivos. Actualmente el planeta presenta grandes retos, por un lado la población mundial está aumentando aceleradamente, por ejemplo el año pasado se alcanzó la cifra de 7,000 millones de habitantes, y se estima que para el año 2050, la población será de 9,200 millones de habitantes, por lo que la producción de alimentos deberá incrementarse en un 70% para cubrir las necesidades alimenticias de todo el mundo (Clarke & Daniell, 2011).

Es por ello que una de las prioridades debe ser la realización de estudios fisiológicos y moleculares de plantas que han desarrollado la capacidad de adaptación y tolerancia a diversos factores considerados como inductores de estrés, y así contar con herramientas para resolver tal problemática en cultivos de gran importancia sensibles a estos factores. A pesar de que la información generada por secuenciación masiva de genomas y transcriptomas de plantas ha proporcionado una gran cantidad de datos referente a nuevos genes, se ha estimado que aún no conocemos la función del 50% de las proteínas del genoma (Gollery et al., 2006, 2007, Hanson et al. 2010). En el caso particular de *Arabidopsis thaliana*, cerca de un 30% de proteínas son de función desconocida. En particular, se ha calculado que aproximadamente 1004 proteínas pertenecen a proteínas con dominios conocidos como DUF (por sus siglas en inglés domains of unknown function) o proteínas que pertenecen a una familia de proteínas no caracterizadas ó UPF (por sus siglas en inglés, uncharacterized protein family; Arabidopsis Genome Initiative). Las proteínas UPF constituyen cerca de la cuarta parte de todas las familias de proteínas de diferentes organismos reportadas en la base de datos de familias de proteínas (pfam) (Punta et al. 2012).

Debido a la falta de variedades resistentes a factores abióticos surge la necesidad de buscar alternativas mediante la identificación de nuevos genes blancos que podrían dar mayor información de la forma en la que es regulada la expresión de

---

---

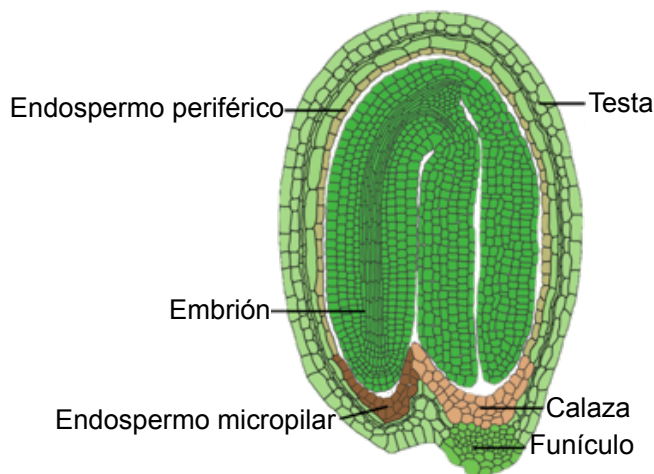
genes que intervienen durante el estrés. Existen un gran número de genes de plantas que participan en la respuesta a estrés abiótico (Mazzucoteli *et al.* 2008).

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 La semilla

Uno de los procesos esenciales en el ciclo de vida de las plantas es la formación y el desarrollo de la semilla (Ray, 1997). El mayor suceso evolutivo de las angiospermas es la “invención” de la doble fertilización y la formación de las semillas (Baskin & Baskin 1998). En una semilla de una angiosperma típica el embrión es rodeado por dos capas denominadas el endospermo y la testa (Figura 1). La maduración de la semilla es completada cuando la embriogénesis esta en coordinación con la acumulación de los compuestos de reserva en la semilla, una etapa de disminución importante en el contenido de agua, y por ende, la tolerancia a la desecación, así como la modulación en los niveles de fitohormonas para establecer una dormancia primaria (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). El proceso de germinación inicia con la hidratación y entrada de agua a la semilla seca a través del proceso de imbibición, y culmina cuando la radícula emerge rompiendo las cubiertas de la semilla (Bewley 1997, Koornneef et al. 2002, Kucera et al. 2005). Con el fin de romper el período de dormancia y completar la germinación, se activan diferentes vías metabólicas, incluyendo la biosíntesis de fitohormonas, la activación de vías de transducción de señales, modificaciones en el estado de la cromatina así como mecanismos de regulación pos-transcripcional, algunos de ellos mediados por micro-RNAs (Daszkowska-Golec, 2011).



**Figura 1.** Esquema de la estructura de una semilla madura de *Arabidopsis thaliana* (modificado de <http://seedgenenetwork.net/arabidopsis>).

---

Previamente al proceso de germinación, las semillas entran a un periodo de desecación y de dormancia durante la última fase de desarrollo (Leprince et al. 1993). La desecación de las semillas es un requisito necesario para la culminación del ciclo de la planta, y que comience el proceso de dormancia; este periodo le permite tener ventajas de sobrevivencia a condiciones ambientales desfavorables, disminuyendo la competencia entre individuos de la misma especie, el ataque de microorganismos, y principalmente previniendo la germinación en condiciones desfavorables o fuera de tiempo (Ramanjulu y Bartels, 2002; Finkelstein et al. 2008). En el estado de maduración de la semilla, cuando el potencial osmótico es muy bajo, se expresan genes en respuesta a la desecación como las proteínas LEA (late embryogenesis abundant), las acuaporinas, proteínas de transferencia de lípidos, chaperonas y genes de detoxificación evitando de esta forma la muerte de las semillas inmaduras durante la desecación, e incrementar el número de semillas viables (Hoekstra y *et al.* 2001; Kotak *et al.* 2007). Este evento genera estrés hídrico dentro de la semilla por lo que el embrión presenta tolerancia a estas condiciones, donde la viabilidad de la semilla es protegida. Esta latencia se rompe una vez que encuentra condiciones óptimas, tales como temperatura y contenido de humedad (Weitbrecht *et al.* 2011).

Durante el proceso de germinación, las semillas son expuestas a una amplia variedad de factores ambientales adversos tales como: salinidad, temperaturas extremas, entre otras; lo que limita su germinación (Daszkowska-Golec, 2011). El superar estos factores ha llevado a las semillas a desarrollar diferentes estrategias adaptativas que permiten que ellas inicien o regulen el proceso de germinación dependiendo de las condiciones que las rodean, disparando así la expresión de genes que le permiten la sobrevivencia a estas condiciones (Leprince et al. 1993).

## **2.2 Estrés abiótico**

Las plantas son organismos sésiles y por tanto no pueden escapar de las condiciones adversas. El estrés en plantas se define como un factor que produce una condición desfavorable que afecta ó bloquea el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo (Hirayama & Shinozaki, 2010). El estrés abiótico es percibido por la

---

célula vegetal provocando una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento de la planta y su productividad (Wang et al. 2001). La forma en que responden las plantas al estrés abiótico involucra cambios en la expresión génica, actividad proteica, síntesis de metabolitos y variaciones en los niveles de iones, esto es coordinado por las fitohormonas que son los compuestos encargados de la transducción de señales (Peleg & Blumwald, 2011).

El estrés abiótico es la principal causa de pérdidas de cultivos en el mundo reduciendo su rendimiento en más del 50% (Bray et al. 2000). Además, las plantas cultivadas presentan menor tolerancia a los factores ambientales adversos, en comparación a las plantas silvestres, siendo más sensibles a las condiciones climáticas extremas, y a desajustes del suelo como son el exceso de sales, pHs extremos, disminución de nutrientes (N, P, K), presencia de metales pesados, entre otros. Por lo que la sequía y la salinidad junto con las temperaturas extremas son los principales problemas para la agricultura debido a que estos factores adversos provocan que las plantas no expresen todo su potencial genético (Wang et al. 2003).

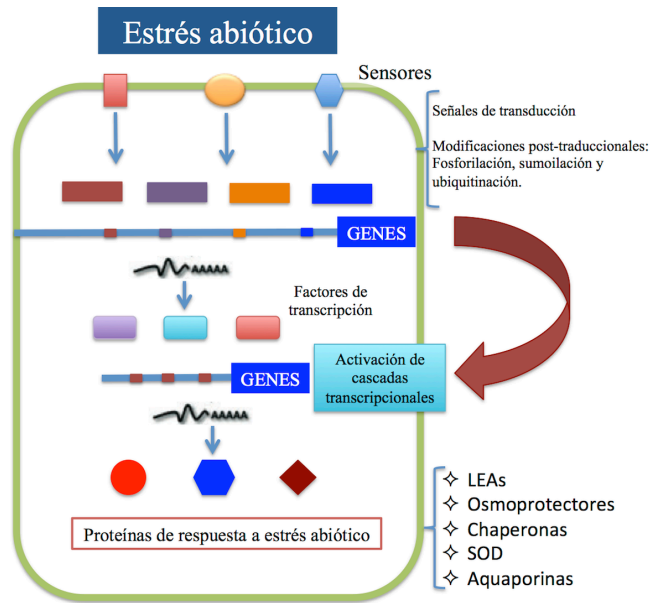
A pesar de no poder escapar de factores adversos, las plantas se adaptan con una sorprendente plasticidad a las condiciones ambientales existentes en su entorno. Se ha sugerido que las plantas han adquirido mayor tolerancia a los efectos adversos de su entorno, debido a que en sus genomas presentan un mayor número de genes involucrados en la percepción y respuesta al estrés, por ejemplo los factores de transcripción, los cuales están involucrados en diversos procesos tales como el desarrollo, defensa contra patógenos y respuesta a estrés abiótico (Shiu et al. 2005). En *Arabidopsis* cerca de 1773 genes codifican para factores de transcripción agrupados en 50 familias (Yilmaz et al. 2011) y 45% de estos factores son comunes en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, y *Saccharomyces cerevisiae* (Riechmann et al. 2000).

Las plantas se adaptan con una sorprendente plasticidad a las condiciones ambientales existentes en su entorno. La resistencia que adquieren algunas plantas al estrés abiótico es debido a la reprogramación de la expresión génica y

---



el metabolismo obteniendo un equilibrio entre crecimiento, desarrollo y sobrevivencia (Dinneny et al. 2008). Aun cuando cada tipo de estrés podría parecer diferente y provocar respuestas específicas en la planta, se ha reportado que se activan algunas reacciones comunes y mecanismos de respuesta que están interconectados (Wang et al. 2003; Zhu 2001a). La sequía y salinidad se manifiestan como un estrés osmótico que provoca la disrupción de la homeostasis y la distribución de iones en la célula (Serrano et al. 1999; Zhu 2002). Como consecuencia se activa una compleja ruta de señalización (Figura 2) responsable de la adaptación de la planta a estas condiciones ambientales adversas (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight & Knight, 2001; Zhu, 2001b; 2002). Estas rutas de señalización y respuestas celulares incluyen la síntesis de proteínas de estrés, síntesis de antioxidantes, y la acumulación de metabolitos y solutos compatibles (Vierling & Kimpel, 1992; Zhu et al. 1997; Cushman & Bohnert, 2000).



**Figura 2.** Esquema general de la respuesta a estrés abiótico en una célula vegetal (modificado de Hirayama & Shinozaki, 2010).

### 2.3 Respuesta molecular de la planta al estrés abiótico

La activación transcripcional de genes específicos es la respuesta más importante de la planta para enfrentar al estrés abiótico. La regulación espacial y temporal de patrones de expresión de genes de respuesta ante las condiciones

adversas es parte de la adaptación que lleva a cabo la planta para contender al estrés abiótico (Riechmann et al. 2000). El estrés abiótico en general provoca la síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA), que a su vez funciona como una molécula transductora de la señal, induciendo la transcripción de una serie de genes participantes en la respuesta al estrés. Además el ABA controla respuestas fisiológicas en la planta que le ayudan a tolerar el estrés abiótico y esto lo hace regulando el crecimiento, la apertura de estomas y la conductividad hidráulica (Raghavendra et al. 2010).

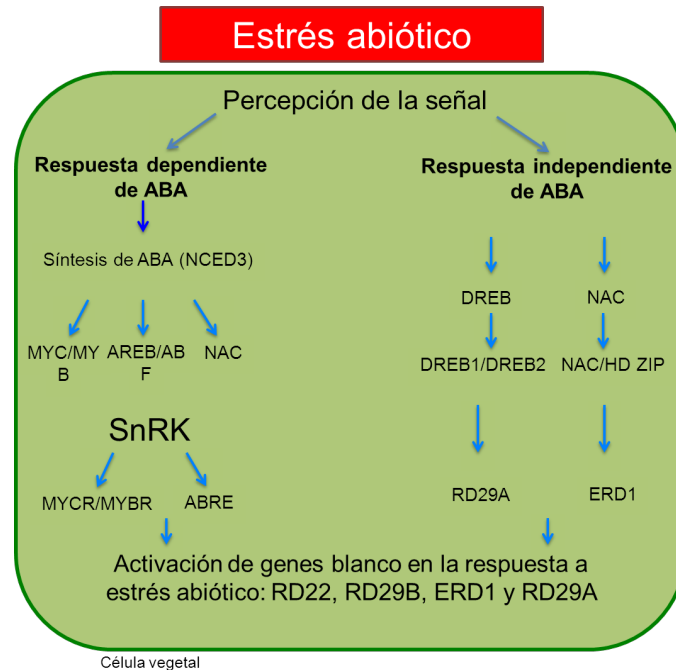
Análisis de los genes que se expresan como respuesta al estrés abiótico sugiere la presencia de dos rutas: la ruta dependiente de ABA y la ruta independiente a esta hormona (Figura 3). Los genes que se inducen con la presencia de esta fitohormona contienen en la región del promotor elementos en *cis* conservados, llamados elementos de respuesta al ABA (ABRE; ACGTGG/TC) (Bonetta & McCourt, 1998; Grill & Himmelbach, 1998; Leung & Gidaudat, 1998). Los elementos ABRE fueron descritos por primera vez en los genes tipo LEA *Em* (*Early Methionine-labelled 6*) de trigo y *Rab* (Ras-Related Protein) de arroz, de forma que se identificó la proteína de unión al elemento ABRE, como el factor transcrpcional bZIP denominado EmBP-1 (Lang & Palva, 1992; Menkes et al. 1995). Además de los elementos ABRE existen otros elementos promotores en *cis* que participan en la regulación génica dependiente del ABA durante el estrés; como por ejemplo, los motivos “Sph” y GTGTC que en maíz regulan la expresión dependiente de ABA durante la sequía y la desecación de la semilla (McCarty, 1995). Se ha reportado que estos motivos son reconocidos por factores transcripcionales como los MYC/MYB (Iwasaki et al. 1995).

En la ruta independiente a ABA, también existen elementos que tienen función en *cis* sobre regiones promotoras, uno de los factores principales que activan esta respuesta es el factor transcrpcional DREB (Figura 3). DREB1A regula la expresión del resto de genes de la familia DREB1 (DREB1B y DREB1C) (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000). Los factores de transcripción de la familia *DREB1* tienen como genes blancos una serie de efectores de resistencia a estrés como *RD29A*, *KIN1*, *RD17*, *COR15A* y *ERD10* (Shinozaki & Yamaguchi-

---

Shinozaki, 1997). Al analizar la secuencia de sus promotores se ha encontrado la presencia de una firma de 9 nt TACCGACAT llamada elemento DRE (drought responsive element) que es esencial para la inducción de estos genes bajo condiciones de estrés abiótico, pero este elemento no responde a la hormona ABA como lo hace el elemento ABRE (Shinozaki & Yamaguchi- Shinozaki, 1997).

Los genes que responden al estrés abiótico se activan como consecuencia de ambas rutas (dependiente e independiente de ABA) están clasificados en 3 categorías (i) los que están involucrados en las cascadas de señalización y control transcripcional tal es el caso de MYC, MAP cinasas, SOS, fosfolipasas, y factores transcripcionales como HSF, CBF/DREB y la familia de los ABF/ABAE (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997; Zhu 2001b); (ii) los que están involucrados en la protección de proteínas de membrana tales como proteínas de choque térmico (HSPs), proteínas LEAs, proteínas con actividad de osmoprotección y detoxificante (Vierling & Kimpel, 1992; Ingram & Bartels, 1996; Tomashow 1998; Bray et al. 2000; Bohnert et al. 1995); (iii) los que están involucrados en transporte de agua y iones como las acuaporinas (Maurel 1997; Serrano et al. 1999).



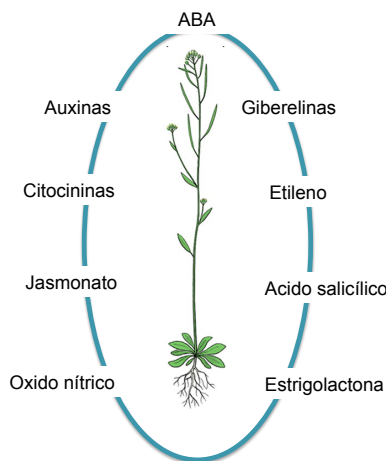
**Figura 3.** Señalización molecular de la ruta dependiente e independiente de ABA durante el estrés abiótico.

---

## 2.4 Respuesta hormonal de la planta al estrés abiótico

Las plantas responden a una gran variedad de estímulos externos así como a los cambios que ocurren en el medio ambiente, regulando su crecimiento y desarrollo. Dichas adaptaciones son llevadas a cabo por respuestas específicas que son mediadas por reguladores conocidos como fitohormonas, que son activadas por fluctuaciones en la temperatura, pérdida de iones, nutrientes y pérdida de agua. Estos reguladores de crecimiento incluyen hormonas como: ABA, etileno (ET), citoquininas (CK), auxinas (IAA), giberelinas (GA), jasmonato (JA), brasinoesteroides (BR), ácido salicílico (SA), óxido nítrico (NO), y estrigolactona (SL) (Figura 4).

La investigación al respecto ha avanzado de forma importante, tomando como herramienta la caracterización de mutantes afectadas en la biosíntesis, en la percepción, y en la transducción de señales de estas moléculas para lograr entender el papel individual de cada hormona en la respuesta que conducen a la defensa y adaptación al estrés. Actualmente se conocen algunos aspectos, de forma individual y específica, de la percepción, transducción de señales, homeostasis ó influencia en la expresión de genes, sin embargo es poco conocido el mecanismo por el cual la planta integra los cambios inducidos por el estrés a nivel hormonal, así como el inicio de las respuestas adaptativas es poco conocido (Bari & Jones, 2009).



**Figura 4.** Representación gráfica de las fitohormonas reportadas en *Arabidopsis thaliana*.

---

#### **2.4.1 Ácido abscísico (ABA)**

El ABA se identificó a finales de la década de los 60's como un inhibidor de crecimiento que se acumulaba en los frutos y hojas de la planta de algodón (Finkelstein, 2013). Esta molécula se clasifica como un metabolito de naturaleza isoprenoide. Aunque la molécula contiene 15 átomos de carbono, en plantas esta no es derivada directamente de un sequiterpeno precursor de 15 átomos de carbono si no del compuesto fitoeno que proviene de la ruta de los carotenoides (Finkelstein, 2013)

La base molecular del metabolismo del ABA fue establecida por análisis de mutantes. En maíz algunas mutantes vivíparas mostraron defectos en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Estas mutantes mostraron un fenotipo albino con un nivel reducido en el contenido de ABA, por lo que análisis funcionales del gen *VP1* demostraron que es un activador transcripcional de genes como *EM* y *C1* en maíz, aunque el papel de estos genes en la ruta de transducción de ABA es pobremente comprendido, estos genes son factores que afectan la maduración del embrión (Finkelstein, 2013).

El ABA, además de su papel clave durante la señalización al estrés abiótico, regula aspectos importantes durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo maduración del embrión, dormancia, germinación, división celular, elongación y floración; la presencia de ABA es ubicua en la planta, esto ocurre en parte debido a que tanto su síntesis como su transporte son elementos claves durante el desarrollo ó bien la respuesta a estrés abiótico (Seo & Koshiba, 2002; Kang et al. 2010). El ABA puede ser transportado a partir del sitio de síntesis al lugar de acción que pueden ser tejidos vegetativos y durante la embriogénesis principalmente; los transportadores de ABA desempeñan un papel trascendental permitiendo tener disponible esta fitohormona y dar señal de forma inmediata (Boursiac et al. 2013).

Interesantemente, esta hormona también ha sido detectada en otros organismos como hongos fitopatógenos, bacterias, algunos metazoos, esponjas de mar e incluso en humanos (Nambara & Marion-Poll, 2005); aunque algunos aspectos de señalización parecen conservados entre reinos, se conocen por lo menos dos

---

rutas biosintéticas ya que en hongos esta es sintetizada a partir de un compuesto llamado farnesil pirofosfato mientras que en plantas el compuesto proviene de la ruta de los carotenoides, su biosíntesis ocurre predominantemente en tejido vascular de la planta y células del parénquima lo que tiene un efecto sistémico (Seo & Koshiba, 2002; Kang et al. 2010).

La hormona ABA controla el proceso de germinación de semillas, ya que al término de la embriogénesis los niveles de esta hormona se incrementan, deteniendo el crecimiento del embrión por un efecto antagónico a los niveles de las giberelinas, estableciéndose un balance hormonal entre ABA /- giberelinas en los procesos de dormancia y germinación (Toh et al. 2008). Además del efecto directo de la inhibición en la germinación debido a un alto contenido de ABA, la sensibilidad a esta fitohormona es un punto crítico en la semilla, este efecto es un reflejo de la eficiencia en la percepción de la señal.

A pesar de que se habían reportado una gran variedad de receptores para el ABA (Razem et al. 2006; Shen et al. 2006; Liu et al. 2007), finalmente en el año 2009, dos grupos de investigación convergieron proponiendo a una familia de 14 proteínas solubles PYR/PYL/RCAR que son capaces de formar un complejo receptor de ABA, y este es capaz de activar la transcripción de genes de respuesta a ABA. Por medio de estudios de cristalografía de estas proteínas se puede comprender la interacción entre estas proteínas, el ABA, y las proteínas de la clase 2C serina/treonina fosfatasas (PP2C).

Se ha reportado, que antes de la imbibición de la semilla más de 10,000 diferentes RNAs mensajeros se almacenan en la semilla seca de *Arabidopsis* (Okamoto et al. 2010). En la semilla, después de las 24 horas de imbibición, observaron que se inducen 336 genes en respuesta a ABA y 586 genes se reprimen (Okamoto et al. 2010). Muchos de los componentes de la señalización del ABA participan en la regulación de la germinación de las semillas bajo estrés abiótico (Okamoto et al. 2010). Se han realizado estudios genéticos que han facilitado la elucidación del papel de genes regulatorios involucrados durante la germinación, como los genes denominados *ABI*, *ABI2*, *ABI3*, *ABI4* y *ABI5*, denominados debido a que las mutantes de estos genes muestran un fenotipo de insensibilidad al ABA (*ABI*:

---

ABA-insensitive). Como ya se mencionó anteriormente estos genes se identificaron en mutantes químicas de *Arabidopsis*, las cuales desarrollaron resistencia al ABA durante la germinación (Koornneef et al. 1984). Análisis subsecuentes han revelado que estos genes *ABIs* son componentes de la señalización primaria y que son responsables de la transducción de la señal por ABA. *ABI1* y *ABI2* codifican para proteínas de la clase 2C serina/treonina fosfatasas (PP2C), y sus mutantes presentan defectos en dormancia (Koornneef et al. 1984; Leung et al. 1994; Meyer et al. 1994; Leung et al. 1997). Estas proteínas *ABI1* y *ABI2* tienen un papel redundante y son reguladores negativos de la ruta de ABA (Merlot et al. 2001).

Por otro lado, los genes *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* codifican para factores de transcripción que poseen dominios B3, APETALA2 (AP2) y zipper de leucina (bZIP), respectivamente (Giraudat et al. 1992; Finkelstein et al. 1998; Finkelstein & Lynch, 2000). *ABI3* es el ortólogo del gen de maíz *VP1* (viviparous 1) que codifica para un factor transcripcional *VP1* (McCarty et al. 1991). Las mutantes de estos genes también presentan insensibilidad al ABA, en particular las mutantes nulas del gen *ABI3* presentan un fenotipo más severo que en el caso de mutantes de *ABI4* y *ABI5*. *ABI3* es un factor de transcripción que controla los procesos de embriogénesis, de germinación y maduración de la semilla inducidos por el ABA. Las mutantes de estos genes también presentan insensibilidad al ABA, en particular las mutantes nulas del gen *ABI3* presentan un fenotipo más severo que en el caso de mutantes de *ABI4* y *ABI5*; en la mutante *abi3* al no tener funcional este factor transcripcional compromete la maduración del embrión dando como resultando un efecto de dormancia reducida, y además una de las características fenotípicas de esta mutante es el color verde presente en la semilla debido a una disminución en la degradación de la clorofila (Koornneef et al. 1984; Giraudat et al. 1992; Finkelstein, 1994; Nambara et al. 1992; Parcy et al. 1994). *ABI3* es considerado como un regulador clave de la embriogénesis y de la germinación. Respecto al gen *ABI4*, se ha reportado que además de estar involucrado en la señalización del ABA en etapas de germinación (Finkelstein, 1994), participa en la respuesta a estrés salino en germinación (Quesada et al. 2000), respuesta a

---

azúcares en plántulas en desarrollo (Arenas-Huertero et al. 2000), y señalización retrograda en cloroplasto (Koussevitzky et al. 2007). La expresión de ABI5 principalmente es encontrada en semillas secas, sugiriendo que es un factor esencial durante la ejecución de señales que involucran el arresto de crecimiento (Lopez-Molina et al. 2001). El factor de transcripción ABI5 activa la expresión de genes *LEA*, quienes confieren osmo-tolerancia al embrión y que son importantes durante la desecación de la semilla (Finkelstein & Lynch, 2000; Lopez-Molina et al. 2001). Estos factores de transcripción (ABI3, ABI4, y ABI5) en respuesta a un incremento de ABA regulan río abajo la expresión de genes blanco que activarán una respuesta específica traducida en cambios fisiológicos y bioquímicos. En este sentido se ha demostrado que el factor ABI3 actúa río arriba de ABI4 y ABI5 (Figura 5) activándolos transcripcionalmente en respuesta a ABA (Lopez-Molina et al. 2002). Por otro lado, la sobreexpresión del gen *ABI4* resulta en una inducción de la expresión de ABI3 por ABA exógena, y en una hiper-inducción de ABI5 (Soderman et al. 2000). Estos datos sugieren que los genes *ABIs* actúan de forma lineal en la ruta dado que *ABI3* activa a *ABI5* y *ABI4*. Además de esta regulación-cruzada, se ha visto que estos factores de transcripción comparten genes blanco, regulando genes específicos de semilla en diferentes momentos durante el proceso de germinación (Parcy et al. 1994; Finkelstein & Lynch, 2000; Soderman et al. 2000).

Por otro lado, genes que están en la señalización como ABF2, ABF4, ABI4 y ABI5 contienen en su región promotora secuencias W-box, las cuales son reconocidas por factores de transcripción WRKY. El factor WRKY63 regula positivamente la expresión de ABF2 a través de la unión de las cajas W-box presentes en su promotor. Interesantemente mutantes de *wrky63* incrementan la sensibilidad al ABA durante la germinación y no muestran sensibilidad a ABA durante el cierre de estomas (Ren et al. 2010) La mutante knockout del gen *WRKY2* afecta la germinación y desarrollo de plántula mostrando un fenotipo de hipersensibilidad a ABA y esto se atribuye a los altos niveles de expresión de los genes *ABI3* y *ABI5* (Jiang and Yu, 2009).

---



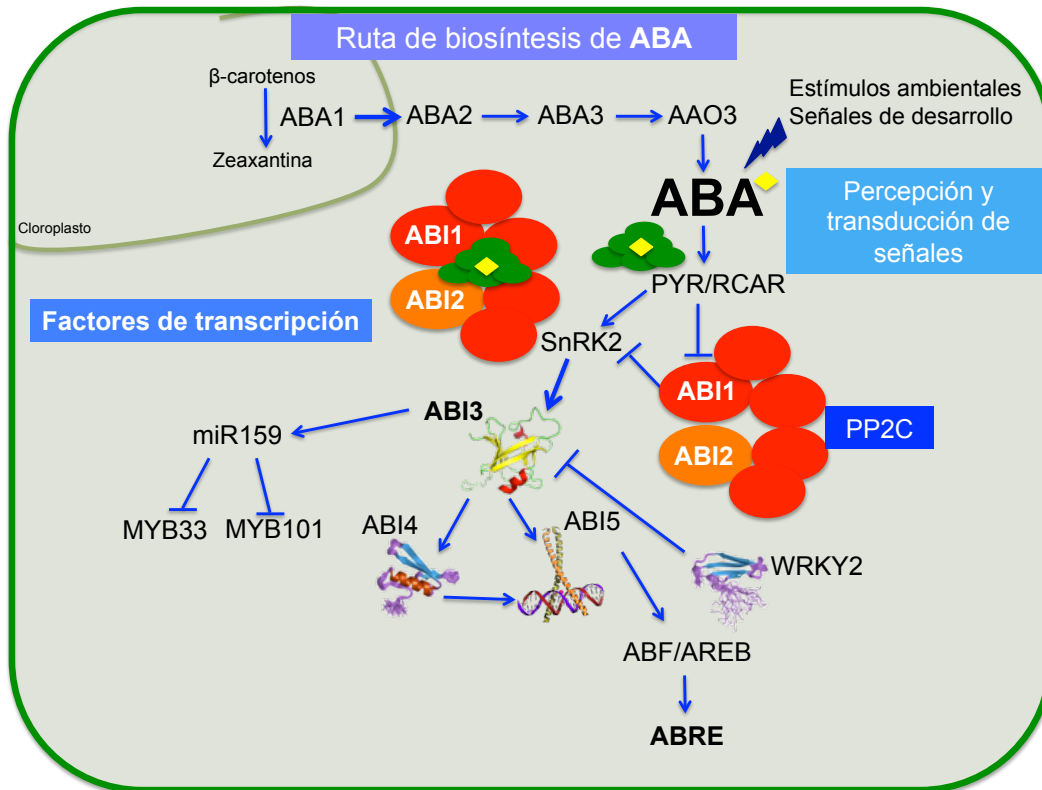


Figura 5. Ruta de señalización de ABA y sus factores transcripcionales ABI3, ABI4 y ABI5.

## 2.5 Genes de función desconocida implicados en la respuesta al estrés abiótico

Solo un bajo porcentaje de genes en diversos genomas de plantas y animales han sido completamente caracterizados con respecto a sus funciones celulares. De los genes que han sido caracterizados hasta el 2007, tan solo un 40% de ellos, se conoce la función que desempeñan (Gollery et al., 2006, 2007). Gracias a la secuenciación masiva se ha estimado que cerca de un 50% de estos genes codifican para proteínas de función desconocida (Gollery et al., 2006, 2007). En Arabidopsis las proteínas clasificadas como PUF (protein unknown function) representan un 38% (Horan et al. 2008). Debido a la falta de variedades de plantas “crops” resistentes a la sequía, surge la necesidad de aislar y caracterizar nuevos genes que podrían dar mayor información, de los mecanismos de respuesta al estrés, incluyendo la regulación de génica. La generación de plantas transgénicas donde se sobreexpresan genes involucrados en respuesta a estrés abiótico ha dado como resultado fenotipos de tolerancia al estrés. Por

ejemplo, plantas que sobreexpresan proteínas serina/arginina que están involucradas en el proceso de splicing alternativo, son capaces de conferir una alta tolerancia a cloruro sodio y litio (Forment et al. 2002). Existen un gran número de genes que participan en la respuesta a estrés abiótico (Mazzucoteli et al. 2008), dentro de los cuales se han identificado genes que codifican para proteínas denominadas GRPs (Glycine rich proteins), las cuales contienen un dominio de unión a RNA (GRP-RRM).

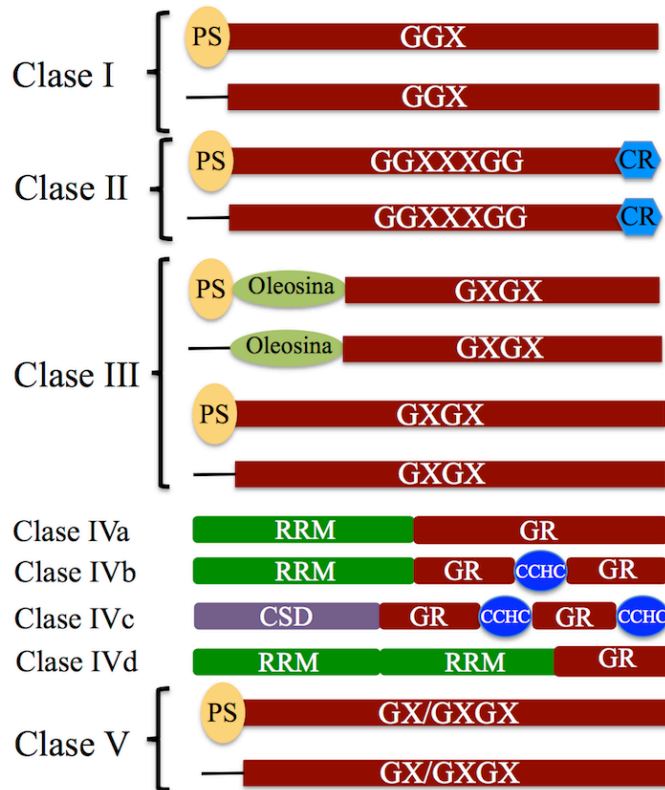
## 2.6 Proteínas Ricas en Glicina

Las GRPs pertenecen a una superfamilia que forman un grupo grande y complejo de proteínas de plantas, de las que hasta la fecha se han identificado más de 150 diferentes genes que codifican para proteínas GRPs en los genomas de plantas modelo como *Arabidopsis*, caña de azúcar y eucalipto (Fusaro y Sachetto 2007). Las GRPs han sido identificadas en una amplia variedad de organismos dentro de los que incluyen organismos unicelulares como cianobacterias así como organismos complejos como mamíferos (Sachetto et al. 2000). Estas proteínas juegan un papel importante en procesos tales como transducción de señales y la regulación génica (Bocca et al. 2005). Las GRPs presenta como característica común las regiones ricas en glicina, se ha reportado que estas regiones pueden ser importantes en la interacción proteína-proteína (Steinert et al. 1991). Por otro lado, se ha reportado que estos genes se expresan durante el desarrollo, y su expresión es regulada de forma específica por tejido, por factores bióticos y abióticos (Mangeon et al. 2010). Debido a la gran diversidad de GRPs se han clasificado en 5 clases, en base a los siguientes parámetros como: su arreglo de repetidos de glicina, los cuales forman firmas particulares y, la presencia de motivos conservados dentro de su estructura (Figura 6): las de la clase I, que presentan un péptido señal seguido del dominio repetido de glicinas (GGX)<sub>n</sub>. Las de la clase II, además del péptido señal en la porción carboxilo terminal presentan una región rica en cisteínas. La clase III son GRPs con un dominio de oleosina, un péptido señal y bajo contenido de glicinas comparadas con otras clases. Las proteínas de la clase IV son GRPs que se unen a RNA,

---

además de presentar un dominio rico en glicinas tienen un motivo de reconocimiento a RNA (RRM) ó bien un dominio conocido como cold-shock domain (CSD) y pueden presentar en su estructura dedos de Zinc. En la clase IV existen subclases basadas en los tipos de arreglos que presentan en su estructura, como: la clase IVa que contiene el RRM y la región rica en glicinas, la clase IVb que presenta un RRM y un dedo de zinc, mientras que la clase IVc presenta un CSD y 2 dedos de zinc, finalmente la clase IVd que presenta dos motivos RRM; las cuatro subclases contienen la región rica en glicinas. En la clase V, las proteínas están conformadas en su totalidad por un alto contenido de glicinas agrupadas en firmas distintas a las de la clase I (Mangeon et al. 2010).

Debido a la importancia de las GRPs-RRMs en respuesta al estrés, en estudios recientes se ha encontrado evidencia genética y fisiológica que las proteínas de unión a RNA (clase IV) están involucradas en la respuesta a varias condiciones de estrés y que están moduladas por el (ABA), desarrollando funciones en la célula como transporte, almacén, procesamiento y estabilización de RNAs (Kwak et al. 2005; Jung et al. 2013). Recientemente, se ha reportado que los niveles del gen *MhGR-RBP1* que codifica una GRP-RRM en manzana (*Malus hupehensis*) es regulada por ABA (Wang et al. 2012).



**Figura 6.** Esquema de la clasificación de las proteínas ricas en glicina (GRPs) (Modificado de Mangeon et al. 2010).

Además de la proteínas GRPs canónicas, se han encontrado otro grupo de proteínas denominadas en este trabajo como proteínas con un dominio rico en glicinas (GRDPs), las cuales han sido reportados en transcritos de Eucalipto (Bocca et al. 2005).

## 2.7 Proteínas de unión a RNA con una región rica en glicinas RRM-GRPs

En años recientes ha crecido mucho la expectación hacia el estudio del RNA y de las proteínas que interactúan con él. A lo largo de la vida útil de un mRNA, existe una asociación dinámica entre los mRNA y proteínas que interactúan con estos ácidos nucleicos. Estas interacciones son claves para llevar a cabo eventos de maduración del mRNA, tales como el splicing, adición del CAP, poliadenilación y la exportación hacia el núcleo (Lorkovic *et al.* 2009). Las proteínas de unión a RNA (RBPs) tienen una función clave en procesos básicos

celulares actuando como reguladores durante la expresión génica (Lorkovic *et al.* 2009). Las proteínas de unión al RNA también están involucradas en los procesos regulatorios post-transcripcionales en el citoplasma, como la localización, la estabilidad, degradación y su correcta traducción del mRNA. Las RBPs presentan una estructura compuesta por diferentes motivos y dominios que presentan diferentes arreglos y de esa forma pueden estar activos en una amplia diversidad de rutas y funciones. Pueden ser clasificadas en diferentes familias dependiendo de la presencia de motivos, el motivo RRM (RNA recognition motif), el dominio KH, proteínas de unión a RNA de doble cadena (dsRBD), y las que presentan un motivo tipo de dedo de Zinc. En particular las RBPs que poseen el motivo RRM, se han identificado más de 200 proteínas en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, este motivo presenta aproximadamente 90 aminoácidos y contiene una secuencia central de 8 residuos conservados (Fedoroff *et al.* 2002 y Maris *et al.* 2005). El RNA es una estructura muy flexible y puede adoptar diferentes conformaciones, algunas de ellas no son funcionalmente favorables debido a eso se necesitan proteínas que puedan asistir a estos mRNAs y hacer que estén funcionalmente activos *in vivo*. Las chaperonas de RNA facilitan interacciones RNA-RNA y pueden resolver estructuras no funcionales (Lorkovic *et al.* 2009). El término “chaperona de RNA” se refiere a las proteínas que ayudan en el plegamiento del RNA. Las proteínas GRP-RBPs que mejor se han caracterizado en *Arabidopsis* son 8, las cuales presentan el RRM en la porción amino terminal y con una porción carboxilo terminal de tamaño variable en donde se encontraba la región rica en glicinas, adicionales a estas proteínas se encuentran las atRZ-1a y atRZ-1b, que son GRP-RBPs, sin embargo ellas difieren en que también poseen en su estructura un dedo de Zinc insertado entre el RRM y la región rica en glicinas. De estas GRP-RBPs se han caracterizado que están presentes durante la germinación, por ejemplo la sobreexpresión de *AtGRP2/CSPD2* incremento la tolerancia a estrés salino en comparación con plantas WT y mutantes que mostraron tasas de germinación más bajas bajo estrés salino (Kim *et al.* 2007). Adicionalmente se han estudiado GRP-RBPs de plantas monocotiledóneas de trigo como la proteína WsCSP1 y en arroz OsCSP1 y OsCSP2 quienes también están involucradas en germinación,

---

desarrollo y en la respuesta al estrés abiótico (Nakaminami et al. 2006; Chaikam and Karlson 2008). Por lo que la expresión de proteínas que codifican a GRP-RBPs parece estar involucrada a la respuesta a estrés abiótico (Mangeon et al. 2010). Estudios recientes han revelado que una batería de cofactores como las RBPs están involucradas en la maduración de los miRNAs. En mamíferos se demostró la participación de dos proteínas de unión a RNA de doble cadena como la DGCR8 y TRBP que son esenciales para los complejos Drosha y Dicer que en general afectan a la producción de miRNA y específicamente regulan la maduración de un sub-conjunto de miRNAs. Un claro ejemplo en plantas es la interacción de RBPs y microRNAs es lo que ocurre con la proteína HYL1 (Hyponastic leaves 1) y SE (Serrate) las que interactúan con DCL1 (Dicer like 1) dentro de cuerpos nucleares llamados D-body (Dicing-body) que regulan positivamente a los miRNAs. Mutaciones en el gen *HYL1*, tienden a reducir el crecimiento en raíces, hojas, ocurre una reducción en la fecundidad y se presenta un desajuste hormonal, estos fenotipos son restaurados incrementando la actividad de DCL1, sugiriendo que los fenotipos observados en mutantes de *hyl1* son debido al decremento en niveles de miRNAs (Jover-Gil et al. 2012).

## **2.8 microRNAs y su regulación durante el estrés abiótico**

Los microRNAs (miRNAs) son una familia grande de RNAs que tienen una longitud que oscila entre los 21 y 24 nt que han emergido como reguladores post-transcripcionales claves durante la expresión génica en organismos como animales, plantas y protozoos. Se ha reportado que tan solo en mamíferos el 60% de los genes codificantes son regulados por miRNAs y que participan en la regulación de procesos celulares. El conocimiento actual acerca del papel regulatorio de los miRNAs es un punto fundamental para aspectos particulares de la planta como: desarrollo, formación del meristemo, diferenciación celular, polaridad y desarrollo de hojas, formación de raíces laterales y señalización por fitohormonas. Interesantemente incluso algunos de ellos no funcionan de forma independiente debido a un traslape en las rutas regulatorias (Mallory & Vaucheret, 2006).

---

Adicional a los roles que tienen los miRNAs durante el desarrollo en plantas desempeñan un papel regulatorio durante la repuesta adaptativa al estrés abiótico, estas operan a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional (Sunkar 2012). Existe evidencia que muestra una línea directa entre la regulación de miRNAs y la respuesta a estrés en plantas. Algunos de los genes relacionados al estrés abiótico son regulados post-transcripcionalmente por miRNAs, por ejemplo NFYA5 el cual es un factor transcripcional que promueve resistencia a sequía en Arabidopsis se encontró que es regulado por miR169 (Li et al. 2008; Trindade et al. 2010). miR159 y miR160 han sido reportados en algunos estudios que esta involucrados en señalización hormonal, regulando de esta forma varios procesos como la germinación y el desarrollo de anteras (Liu et al., 2007; Reyes and Chua, 2007; Nonogaki, 2008; Alonso-Peral et al., 2012).

### 3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y funcionalmente al gen *AtGRDP1* de *Arabidopsis thaliana* e identificar su papel en respuesta a estrés abiótico.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterización *in silico* de los dominios presentes en la proteína AtGRDP1.
2. Análisis de perfiles transcripcionales del gen *AtGRDP1* bajo diferentes tipos de estrés abiótico y en presencia de ABA.
3. Tipificación molecular de la línea mutante insercional (SALK\_079708) del gen *AtGRDP1* obtenida del instituto Salk Genomic Analysis Laboratory.
4. Generación de líneas sobreexpresoras del gen *AtGRDP1*.
5. Caracterización fenotípica de la línea mutante insercional y sobreexpresantes del gen *AtGRDP1*.
6. Ensayos de germinación bajo estrés abiótico y ABA de la línea mutante y sobreexpresoras del gen *AtGRDP1*.
7. Evaluación de perfiles transcripcionales de los genes *ABI3*, *ABI5*, *WRKY2*, *miR159* y *miR160* en los fondos mutante y sobreexpresante.
8. Morfología de las semillas de la línea mutante *Atgrdp1* y líneas sobreexpresantes de *AtGRDP1*.



#### 4. CAPITULO I

**AtGRDP1, un gen que codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas, el cual está involucrado en la respuesta al estrés abiótico en la germinación, y es un nuevo actor en la señalización por ABA.**

Se ha logrado la identificación de genes implicados en la respuesta al estrés abiótico utilizando diversas herramientas moleculares, una de ellas es la generación de bibliotecas por hibridación sustractiva (SSH) el cual es un método rápido, económico y eficiente (Diatchenko et al. 1996). Los ESTs (expressed sequence tags) han sido utilizados exitosamente para identificar nuevos genes implicados en respuesta al estrés. En particular, Hernández-Lucero y col. (2013), realizaron una biblioteca sustractiva de cDNA de frijol (*var. Pinto villa*) bajo estrés salino inducido con NaCl 200mM a los 2 y 5 días. Los genes identificados fueron clasificados en categorías de acuerdo a su probable función, de estos unigenes se encontró uno en particular que mostró identidad con proteínas ricas en glicina (Hernández-Lucero y col., 2013). De este dato se originó mi tema de tesis, en donde identificamos el posible ortólogo en *Arabidopsis*, el gen de función desconocida At2g22660 el cual denominamos *AtGRDP1* (*Arabidopsis thaliana Glycine Rich Domain Protein*). *AtGRDP1* posee regiones conservadas, como el DUF1399 al cual no se le ha encontrado una función específica, sin embargo es altamente conservado en proteínas de plantas; un posible motivo de unión a RNA (RRM), y un dominio rico en glicinas. Respecto a los dominios RRM se describieron por primera vez en la década de los 80s encontrándolos principalmente en complejos proteicos implicados en procesos como el procesamiento y estabilidad del RNA. A partir de la caracterización de PABP (poly-A binding proteins) y la hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) se encontró que el dominio de unión a RNA está conformado por 90 aminoácidos conteniendo una secuencia central de 6 u 8 residuos que generalmente son aromáticos y están cargados positivamente, a esta secuencia se le llamó RNP1 para el caso del octámero y RNP2 (hexámero), estos presentan una estructura particular de láminas beta implicada en la interacción con el RNA (Lorkovic & Barta, 2002; Maris et al., 2004).

---

En eucariotas las proteínas de unión a RNA participan en síntesis, procesamiento, edición, modificación y exportación de moléculas de RNA a partir del núcleo. Esto favorece que las RBPs puedan transportar las moléculas de RNA entre células. Además están involucradas en diversos aspectos, así como en el almacenamiento de los mRNAs previo a la traducción y transporte, por lo que en resumen las proteínas de unión a RNA regulan la estabilidad del mRNA y su degradación (Fedoroff, 2002). Respecto a la región rica en glicinas, se han reportado que las proteínas con esta característica están agrupadas en una súper familia conocida como GRPs (glycine-rich proteins). La presencia de regiones ricas en glicina esta representada por la relación de (Gly) $n$ -X. En general, las GRPs presentan un alto contenido de glicinas, entre el 40-70 %. En el caso del transcriptoma de *A. thaliana* se han identificado 121 genes que codifican para GRPs, además se identificaron proteínas que presentan un dominio rico en glicinas, y su contenido total de glicinas es menor al 10 % de la proteína (Fusaro Flores & Sachetto-Martins, 2007).

En el presente trabajo se realizó la caracterización de *AtGRDP1* (At2g22660), un novedoso gen de *A. thaliana* que codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas. Análisis de expresión sugirieron que la expresión de este gen es modulada en respuesta al estrés abiótico. Se caracterizó molecularmente con la ayuda de una línea mutante nula y sobreexpresantes del gen *AtGRDP1*; la mutante nula mostró menor tolerancia a estrés salino y osmótico en germinación, mientras que en las líneas sobreexpresantes se encontró el fenotipo opuesto. Interesantemente, las líneas sobreexpresoras fueron más resistentes a la exposición con ABA mientras que la línea mutante fue hipersensible. Estos fenotipos nos condujeron a realizar un análisis de los perfiles transcripcionales de los factores *ABI3*, *ABI5* y *WRKY2* los cuales son los reguladores centrales en la ruta de señalización de ABA en los fondos mutante y sobreexpresante, en el análisis se encontró que la señalización podría estar alterada en ambos fondos encontrando que *ABI3* y *ABI5* estaban inducidos en la mutante y en la sobreexpresante se encontraron reprimidos, con respecto a plantas silvestres controles; en el caso de *WRKY2* quien funge como un regulador negativo en esta

---

ruta se encontró inducido en el fondo sobreexpresante. Sugiriendo que la desregulación de los niveles de *AtGRDP1* afectan la respuesta a ABA en la planta, posiblemente a través de los factores de transcripción ABI.

### **Artículo**

Aída Araceli Rodríguez-Hernández, María Azucena Ortega-Amaro, Pablo Delgado-Sánchez, Julio Salinas, Juan Francisco Jiménez-Bremont (2014). *AtGRDP1* Gene Encoding a Glycine-Rich Domain Protein Is Involved in Germination and Responds to ABA Signalling. *Plant Molecular Biology Reporter*. DOI: DOI 10.1007/s11105-014-0714-4.

# *AtGRDP1 Gene Encoding a Glycine-Rich Domain Protein Is Involved in Germination and Responds to ABA Signalling*

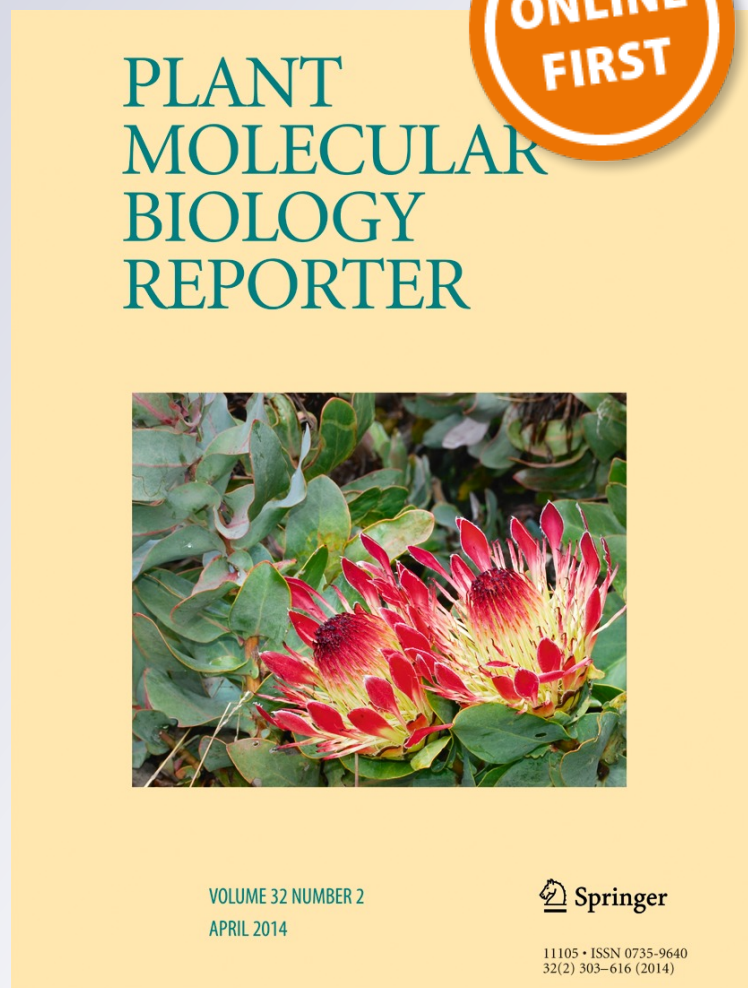
**Aída Araceli Rodríguez-Hernández,  
María Azucena Ortega-Amaro, Pablo  
Delgado-Sánchez, Julio Salinas & Juan  
Francisco Jiménez-Bremont**

**Plant Molecular Biology Reporter**

ISSN 0735-9640

Plant Mol Biol Rep

DOI 10.1007/s11105-014-0714-4



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

## 4. 1 CAPITULO II

### **La desregulación del gen *AtGRDP1* provoca alteraciones en la morfología de las semillas de *Arabidopsis thaliana***

En el manuscrito anterior, mostramos que la línea mutante de *AtGRDP1* presenta una menor tolerancia a estrés salino y osmótico, esto fue reflejado por la disminución en la tasa de germinación y el desarrollo de los cotiledones, mientras que las líneas que sobreexpresan el gen *AtGRDP1* mostraron un fenotipo opuesto. Cuando analizamos semillas de la línea mutante y de las líneas sobreexpresoras del gen *AtGRDP1*, y al compararlas con la Col-0, observamos diferencias en el tamaño y forma de las semillas. La línea mutante del gen *AtGRDP1* presentó una semilla más pequeña de forma redonda y de menor peso, en comparación a la Col-0, mientras que semillas de las líneas sobreexpresoras, mostraron tallas, formas y pesos diferentes a la parental Col-0, incluso la línea 35S::*AtGRDP1*-6 tuvo el mayor peso.

Por otro lado, se analizó a detalle la morfología de la testa de cada línea utilizando un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (eSEM/QUANTA 200 FEI, Low Vacuum/Water), encontrando diferencias en la testa sobre todo en el caso de la línea mutante *Atgrdp1* (Fig. 2 de este capítulo).

Considerando que la talla de la semilla, es un factor importante de la eficacia biológica de las plantas y es también una característica agronómica importante en la domesticación de cultivos (Orsi and Tanksley, 2009), será clave a futuro determinar por qué la línea mutante presenta una talla de semilla más pequeña, y las sobreexpresoras tallas irregulares, y si hay alguna correlación con la tolerancia que presenta cada línea.

## **Deregulation of *AtGRDP1* gene produces morphology alterations in *Arabidopsis thaliana* seeds**

Aída Araceli Rodríguez-Hernández<sup>1</sup>, Pablo Delgado Sanchez<sup>2</sup> and Juan Francisco Jiménez-Bremont<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Estudios Moleculares de Respuesta a Estrés en Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, Camino a la Presa de San José 2055, C.P. 78216, AP 3-74 Tangamanga, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

<sup>2</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Km.14.5 Carretera San Luis Potosí-Matehuala, C.P. 78321 Soledad de Graciano Sánchez, SLP, México.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [jbremont@ipicyt.edu.mx](mailto:jbremont@ipicyt.edu.mx)

Phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010

## **Abstract**

In angiosperms, seed development is initiated with the double fertilization. That surrounds the embryo and endosperm is the seed coat. These three components undergo a series of cell division, differentiation, or death, and finally give rise to a mature seed. Previously we reported the characterization of *AtGRDP1* gene, which is involved in ABA signaling and response to abiotic stress. Here, we show the morphology of seeds in null mutant and overexpressing lines of *AtGRDP1*. Interestingly, we found that *AtGRDP1* mutant and overexpression seeds showed differences in size and weight in comparison to Col-0 seeds.

**Key words:** AtGRDP1; Glycine-rich domain protein; seed; seed coat.



## Introduction

In angiosperms plants, the two female gametes, the egg cell and the central cell, are fertilized by one of the two male gametes delivered by the pollen tube, fertilization results in the formation of the seed from the ovule (Haughn and Chaudhury, 2005; Angelovici et al., 2010). Seeds can be divided into parts of a genetically different origin: an embryo, the endosperm, and the seed coat or testa (Léon-Kloosterziel et al., 1994). The seed coat consists of several layers of specialized maternal cell types that provide an important interface between the embryo and the external environment during embryogenesis, dormancy and germination (Haughn and Chaudhury, 2005). The endosperm plays a central role in the control of seed size as indicated by a series of experiments in *Arabidopsis* and maize (*Zea mays*), where the dosage balance between maternal and paternal genomes was perturbed (Lin, 1984; Kermicle and Allemand, 1990; Scott et al., 1998). Seed size is a key determinant of evolutionary fitness in plants, and is also an important agronomic trait in crop domestication (Orsi and Tanksley, 2009). Several studies suggest that seedlings of large-seeded plants are better able to tolerate many of the stresses encountered during seedling establishment, whereas small-seeded plants are considered to have superior colonization abilities because they produce large numbers of seeds (Westoby et al., 2002; Moles et al., 2005). In this study, we performed the characterization of seed morphology in 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines and *Atgrdp1*-null mutants of *AtGRDP1* (At2g22660), a novel *Arabidopsis thaliana* gene encoding a glycine-rich domain protein. In a previous work, showing that *Atgrdp1*-null mutant is less tolerance to salt and osmotic stress, reflected by diminished germination rate and poor cotyledons development, whereas the 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines showed the opposite phenotype. Interestingly, 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines were more resistant to ABA (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

## Results and Discussion

Several parameters (seed size, weight, and testa structure) related to the seed morphology were measured. The weight of 500 seeds of the *Atgrdp1*-null mutant line was  $7.4 \pm 0.6$  mg. in comparison to the Col-0 ( $10.7 \pm 0.6$  mg) and *35S::AtGRDP1-6* over-expressing lines ( $12.9 \pm 0.1$  mg) (Fig. 1).

The seed coat (testa) consists of several layers of specialised maternal cell that provide an important interface between the embryo and the external environment during embryogenesis, dormancy and germination (Haughn and Chaudhury, 2005). In order to evaluate the testa morphology of *35S::AtGRDP1-3*, *-5*, and *-6*, and *Atgrdp1*-null mutant lines, eSEM was used. The Col-0 seeds showed the characteristic reticulate pattern and the central plateau or columella, as shown in Figure 2A. However, the seed coat showed changes in the structure of *Atgrdp1*-null mutant and *35S::AtGRDP1* over-expressing lines. In fact, they lost the hexagonal shape of the columella, resulting in irregular shapes that also appeared to affect the volcano-shape in comparison to Col-0 seeds; this phenotype was more evident in the *35S::AtGRDP1-6* line. When we compared dissected embryos of *35S::AtGRDP1* over-expressing and *Atgrdp1*-null mutant lines, no differences were observed with the Col-0 embryos (Fig. 2A). The seed coat is important organ that plays role in embryo nutrition during seed development and interfere with dormancy (Mohamed-Yasseen et al. 1994; Léon-Kloosterziel et al. 1994).

Deregulation of *AtGRDP1* gene levels, either via disruption or over-expressing lines, produced seeds with affected weight and size. Regarding *Atgrdp1*-null mutant seeds, these were smaller in size than Col-0 seeds, with a width of  $226.3 \pm 7.10$   $\mu\text{m}$  and a length of  $415.1 \pm 16.06$   $\mu\text{m}$ , versus  $280.4 \pm 27$   $\mu\text{m}$  and  $488.8 \pm 19.4$   $\mu\text{m}$  for Col-0, respectively. The *35S::AtGRDP1-6* line was the largest, reaching values of  $320.9 \pm 6.5$   $\mu\text{m}$  width and  $555.4 \pm 15.4$   $\mu\text{m}$  length (Fig. 2B). Other mutants with reduced seed size have been reported, for example the *miniature1* endosperm results from a reduced proliferation of the cellular endosperm (Vilhar et al. 2002)

The interesting phenotype observed in the *Atgrpd1*-null mutant was that this plant

---

---

produced smaller seeds with a round shape. Furthermore, plants that overexpressed the *AtGRPD1* gene also originated seed alterations in size and weight. However, the morphological development of the *Atgrdp1*-null mutant and *35S::AtGRDP1* over-expressing line embryos did not appear to differ from Col-0. Our results suggest that *AtGRDP1* plays a regulatory role in seed development.

## Materials and methods

### Plant Growth Conditions

The mutant and transgenic lines used in this study were generated in the *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia 0 (Col-0) background. The *AtGRDP1* T-DNA insertion mutant line (SALK\_079708) was obtained from the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso *et al.*, 2003).

### Microscopic Analysis by Environmental Scanning Electron Microscopy

For environmental scanning electron microscopy (eSEM) analysis, dried seeds were glued onto pure carbon containing polymer films, and were then fixed onto eSEM sample holders. The external seed morphology of Col-0, *Atgrdp1*-null mutant and 35S::*AtGRDP1*-3,-5, and -6 over-expressing lines were observed, and the seed width and length were measured with a high-resolution scanning electron microscope (eSEMQUANTA 200 FEI, Low Vacuum/Water). Photomicrographs were taken with the eSEM in a pressure chamber at 90 - 100 Pa and a voltage of 15.0 and 30.0 Kv. Morphological seed assays were carried out using 15 seeds of each genotype. The external morphology of embryo in Col-0, *Atgrdp1*-null mutant and 35S::*AtGRDP1*-3,-5, and -6 over-expressing lines were evaluated by the eSEM analysis. Embryos were glued onto pure carbon containing polymer films, and were then fixed on eSEM sample holders. Morphological embryo assays were carried out using 5 seeds of each genotype. For seed weight three samples of seeds including 500 seeds each genotype ( $n = 3$ ), were taken from each seed lot and measured for weight and expressed in milligrams. Experiments were repeated at least three times with similar results.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using One-way-ANOVA and Tukey's post-test to assess statistical significance between treatments, using GraphPad Prism version 5.0b (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The data are presented as the mean  $\pm$  standard error. Differences at  $P = 0.05$  were considered significant.

---

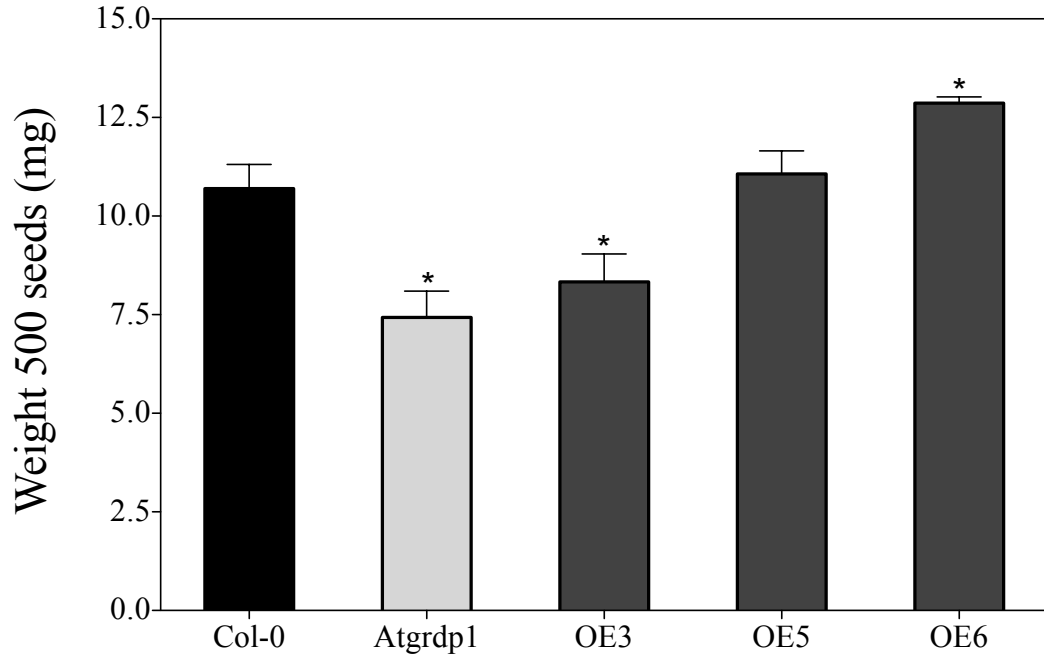
## **References**

- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A. (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trend in Plant Science* 15: 211-218
- Haughn G, Chaudhury A. (2005) Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trend in Plant Science* 10: 472-477
- Kermicle JL and Allemand M (1990) gametic imprinting in maize in relation to the angiosperm life cycle. *Development Suppl* 1:9-14
- Léon-Kloosterziel KM, Keijzer CJ, Koornneef M. (1994) A seed shape mutant in *Arabidopsis* that is affected in integument development. *Plant cell* 6: 385-392
- Lin B-Y. (1984) Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107:103-115
- Mohamed-Yasseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE, Costanza S. (1994) The role of seed coats in seed viability. *Bot Rev* 60: 426-439
- Moles AT, Ackerly DD, Webb CO, Tweddle JC, Dickie JB and Westoby M. (2005) A brief history of seed size. *Science*, 307, 576–580.
- Orsi CH and Tanksley SD (2009) Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. *PLoS Genet.* 5, e1000347.
- Scott RJ, Spielman M, Bailey J, Dickinson HG. (1998) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 3329-3341
- Vilhar B, Kladnik A, Blejec A, Chourey PS, Dermastia M. (2002) Cytometrical evidence that the loss of seed weight in the miniature1 seed mutant of maize is associated with reduced mitotic activity in the developing endosperm. *Plant Physiol* 129: 23-30
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA and Wright IJ. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 125–159
-

---

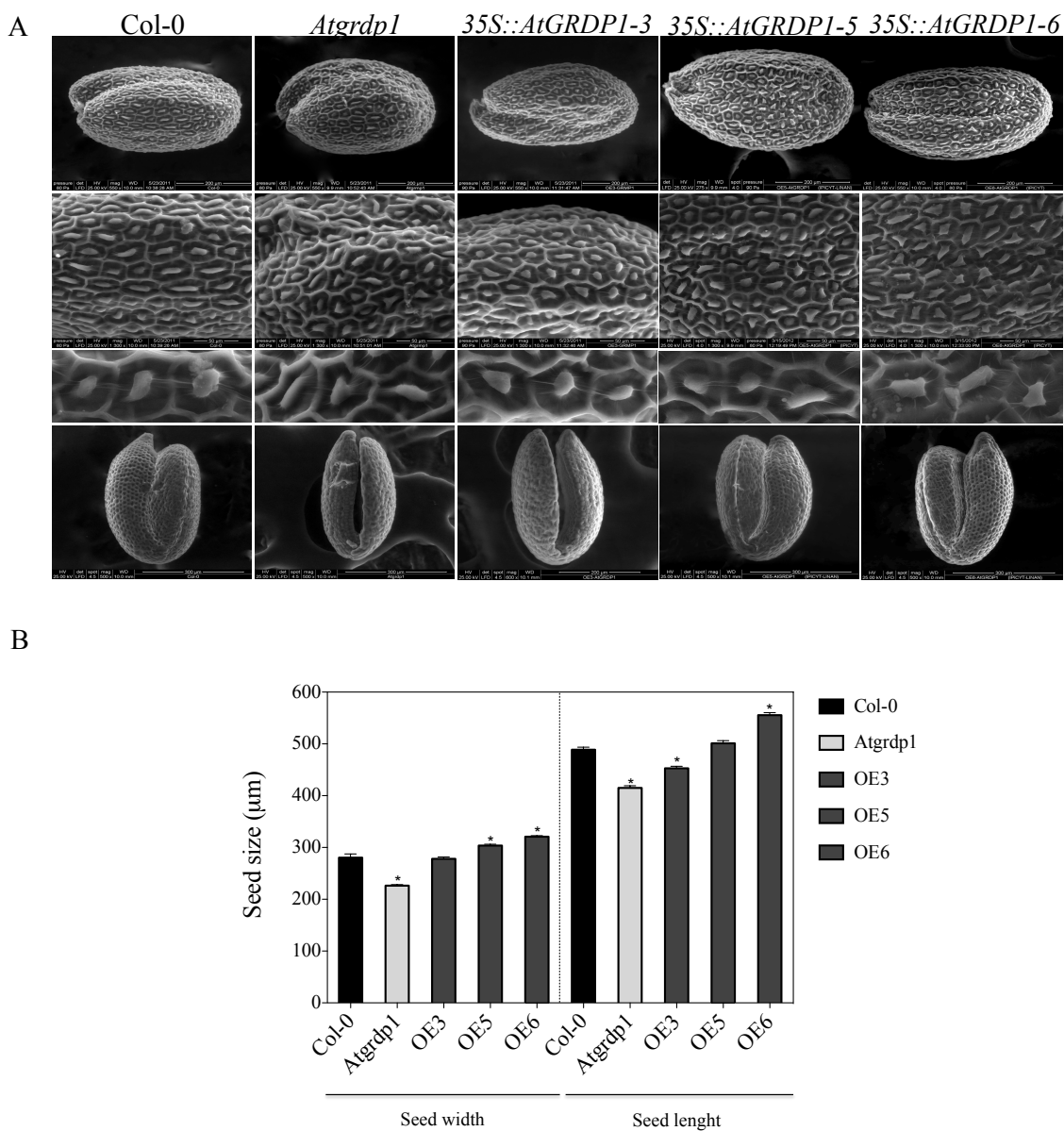
**Figures**

Fig. 1



**Figure 1.** Seed weight of Col-0, *Atgrdp1*-null mutant, and 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines. Weight of seeds (mg) from the Col-0 (black bars), *Atgrdp1*-null mutant (light grey), and 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines (dark grey). Error bars represent the means  $\pm$  SE ( $n = 500$ ) with three replicates. Asterisks indicate significant differences between the Col-0, *Atgrdp1*-null mutant, and 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines. One-way ANOVA was used to analyse the data ( $P < 0.05$ ). Tukey's multiple comparisons tests.

Fig. 2



**Figure 2.** Seed morphology of Col-0, *Atgrdp1*-null mutant, and *35S::AtGRDP1* over-expressing lines. A) Scanning electron micrographs showing: whole seed, scale bar = 200 µm; seed coat, scale bar = 50 µm; seed coat detail, zoom = 30x from micrograph of seed coat; and embryos, scale bar = 300 µm; of Col-0, *Atgrdp1*-null mutant, and *35S::AtGRDP1* over-expressing lines. B) Width and length of seeds (µm) from the Col-0 (black bars), *Atgrdp1*-null mutant (light grey), and *35S::AtGRDP1* over-expressing lines (dark grey). Error bars represent the means ± SE ( $n = 15$ ) with three replicates.

## 4.2 CAPITULO III

### **Pérfiles transcripcionales de microRNAs, en la línea sobreexpresante del gen *AtGRDP1* de *Arabidopsis*, revelaron la desregulación de *miR159* y *miR160* bajo la aplicación exógena de ABA**

En el capítulo 1, se describió que la desregulación del gen *AtGRDP1* afecta la respuesta al ABA, posiblemente a través de la modulación del gen *ABI3*. La represión del gen *ABI3* en la línea sobreexpresante, puede explicar el fenotipo de la resistencia a ABA, mientras que la interrupción del gen dio lugar a un fenotipo de hipersensibilidad a dicha hormona. Sugiriendo que *AtGRDP1* desempeña un papel regulatorio en la ruta de señalización de ABA. Por otro lado, se ha reportado que los microRNAs (miRNAs) son una familia de pequeños RNAs que han emergido como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica en organismos como animales, plantas, metazoarios y protozoarios.

Se ha descrito ampliamente su participación durante condiciones adversas de la planta, incluyendo estrés por deficiencia de fósforo, sulfato, etc (Huang et al. 2010). Además se han descrito conexiones funcionales entre miRNAs y fitohormonas se han observado en plantas mutantes del gen *hyl1* que codifica para una proteína de unión a RNA de *Arabidopsis*, mostró un fenotipo con diversos defectos e su desarrollo, una alta sensibilidad a ABA, y una sensibilidad reducida a auxinas y citocininas, presentando una disminución de los niveles de diversos miRNAs como *miR159*, *miR167* y *miR171* (Han et al., 2004).

El *miR159* es conocido como un regulador post-transcripcional de genes *GAMYB* (giberelic acid myeloblastosis) (*MYB33*, *MYB101* y *MYB65*) que están relacionados con desarrollo de hojas, flores y maduración de semilla (Cheng et al., 2004; Millar & Gubler, 2005; Tsuji et al., 2006; Reyes & Chua, 2007). La acumulación de *miR159* inducida por ABA es un mecanismo homeostático para dirigir los transcritos de *MYB33* y *MYB101* a su degradación para desensibilizar la señalización hormonal durante las respuestas al estrés (Reyes and Chua, 2007).

---



Estudios recientes han sugerido un papel de las auxinas en el mantenimiento de la dormancia, y una relación con el ABA en la germinación (Brady et al. 2003; Liu et al 2007; Liu et al. 2013). Por ejemplo, se ha reportado que factores de transcripción de respuesta a auxinas, como ARF10 y ARF16 actúan como reguladores positivos de la ruta de ABA, ya que funcionan como activadores del factor de transcripción ABI3 (Liu et al. 2013); *mir160*, es un miRNA que está involucrado en la represión de mensajeros de ARFs (*ARF10*, *ARF16* y *ARF17*) (Wang et al. 2005; Mallory et al. 2005; Liu et al. 2007). Esto sugiere que miR160 al regular negativamente a los genes ARFs esto podría estar regulando negativamente la expresión del gen *ABI3* de forma indirecta (Liu et al. 2013).

Los datos que presentamos en este capítulo sobre la expresión de los miRNAs (*miR159* y *miR160*) abre un abanico de posibilidades sobre el papel que podría jugar esta proteína AtGRDP1 en dicha regulación.

**MicroRNA profiling of Arabidopsis *AtGRDP1* overexpression line reveals deregulation of miR159 and miR160 in response to ABA**

Aída Araceli Rodríguez-Hernández<sup>1</sup>, Catalina Arenas-Huertero<sup>2</sup> and Juan Francisco Jiménez-Bremont<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Estudios Moleculares de Respuesta a Estrés en Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, Camino a la Presa de San José 2055, C.P. 78216, AP 3-74 Tangamanga, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Salvador Nava Mtz. s/n, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosi, México.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [jbremont@ipicyt.edu.mx](mailto:jbremont@ipicyt.edu.mx)

Phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010

**Abstract**

The plant triggers a response to abiotic stress is mainly based on the activation and repression of components that result in adaptation process in plant, it is regulated by the phytohormones that acts as signal transducers, it has been widely studied, new players in this response regulated by phytohormones are microRNAs that coordinate a complex scenario signals to respond to stimuli to which the plant is exposed. We present relevant data about AtGRDP1 protein recently characterized in our group and miR159 miR160. Our data suggest a possible role of AtGRDP1 as a regulator of these microRNAs.

**Keywords:** Abscisic acid (ABA); AtGRDP1; Glycine-rich domain protein; microRNAs.

## Introduction

Plants exhibit a grand assortment of adjustments of highly variable environmental conditions; phytohormones play central roles in the ability of plants to adapt to changing environments, by mediating growth, development, nutrient allocation, and source/sink transitions (Peleg and Blumwald, 2011). Abscisic acid (ABA) is one of the most studied stress-responsive hormone, and also plays important role in developmental processes such as seed maturation, including synthesis of seed storage proteins and lipids, seed desiccation tolerance, dormancy, control of germination, and the subsequent commitment to seedling growth and adaptive responses to environmental stimuli in plants (Finkelstein et al., 2002; Cutler et al., 2010; Hubbard et al., 2010; Raghavendra et al., 2010; Fujita et al., 2011).

Plants need to have a coordinated gene expression control throughout their lifecycle; an appropriately integrating communications between phytohormones pathways and environmental stimuli is essential in different cellular process. The complex dynamic of environmental responsive gene expression suggest that small RNA such as miRNAs are the mediators involved in stress adaptations.

Previously, we reported the *AtGRDP1* novel gene, encodes a protein with a short glycine-rich domain, which plays a regulatory role in ABA signaling and abiotic stress tolerance (Rodriguez-Hernandez et al., 2014). In this study, we analyzed the expression pattern of microRNAs such as miR159a and miR160 in *Atgrdp1* mutant and *AtGRDP1* overexpressing lines under ABA treatments. The expression profiles of the microRNAs are discussed in regard to ABI3 transcription factor.

## Results and Discussion

We analysed the miRNA expression profile of *mir159* in the Col-0, *Atgrdp1*-null mutant and *35S::AtGRDP1-6* over-expressing lines. For this, qRT-PCR experiments were carried out in 15-day-old plants subjected to ABA (0, 0.1, 1, and 9 mM) treatments for 24 h (Fig. 1). We observed that *miR159* was induced under ABA treatments at 24h, with gradual increase of the *miR159* RNA level in a dose-dependent manner in the *Atgrdp1*-null mutant line and the parental line (Col-0), exhibited a similar profile. In contrast, the *miR159* was repressed in *35S::AtGRDP1-6* over-expressing line for all ABA concentrations and untreated control seedlings in comparison to the *Atgrdp1*-null mutant and Col-0. As we reported previously, a similar transcriptional regulation to that observed with *miR159* was displayed to *ABI3* gene in the *35S::AtGRDP1-6* over-expressing line (Rodriguez-Hernandez et al., 2014). In accordance with our results, Reyes and Chua (2007) reported that in germinating *Arabidopsis thaliana* seeds, ABA induces the accumulation of *miR159* in an *ABI3*-dependent fashion.

Thereafter, we evaluated the expression pattern of *miR160* who reported that this involved as a regulator of auxins pathway (Wang et al. 2005; Mallory et al. 2005; Liu et al. 2007), and we found in the *35S::AtGRDP1-6* over-expressing line was induced under ABA treatments and under ABA application, *miR160* gene was repressed in *Atgrdp1*-null mutant seedlings. These data to correlate with the recently data that suggest direct regulation of *ABI3* factor through transcriptional activation by *ARF10* and *ARF16* (Liu et al. 2013), which are targets of *miR160*.

## Materials and Methods

### Plant Material and growth conditions

The mutant and transgenic lines used in this study were generated in the *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia 0 (Col-0) background. The *AtGRDP1* T-DNA insertion mutant line (SALK\_079708) was obtained from the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>; Alonso *et al.*, 2003). The seeds of the transgenic, mutant and Col-0 plants used in all the experiments were harvested at the same time. The seeds were surface sterilised for 10 min with 40% (v/v) chlorine in a 0.002% Triton X-100 solution and rinsed six times in sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.5 x MS medium (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, USA), pH 5.7, 0.5% (w/v) Sucrose, and 0.8% (w/v) phytigel (Murashige and Skoog, 1962). The plates were incubated at 4°C for a period two days, and then were placed in a growth chamber with a photoperiod of 16 h light/ 8 h dark cycle at a temperature of 22 ± 2°C.

### Estimation of *miR159* and *miR160* Transcript Levels in *Atgrdp1*-null Mutant and 35S::*AtGRDP1* over-expressing line by Quantitative PCR Analysis

RNA extraction from 15-day-old Col-0, *Atgrdp1*-null mutant and 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines was performed using the Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), following manufacturer's instructions; samples were stored at -70°C until analysis. Measurement of *miR159* and *miR160* mRNA expression levels was performed using RNAs obtained from Col-0, *Atgrdp1*-null mutant and 35S::*AtGRDP1* over-expressing lines that were previously treated with ABA (0, 0.1, 1, and 9 µM) for 24h. In each treatment, the phytohormone ABA was added to the 0.5 x MS medium liquid medium. One mg of total RNA was used for each sample for small RNA polyadenylation process and cDNA production using Ncode miRNA cDNA synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacture directions. Quantitative PCR was performed using SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo scientific) following manufacturer's instructions on using Thermal Cycle StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems, USA). All qRT-PCR reactions were

---

performed in triplicates for each cDNA sample and the program following were done as described (Contreras-Cubas et al. 2012). Expression level were quantified relative to that of the housekeeping gene *UBQ5*. The comparative cycle threshold method was used to quantify relative expression levels of target transcripts. Quantitation was based on a cycle threshold value. Expression analyses were performed by qRT-PCR as described above. For each sample (10 plantlets of each genotype), three biological replicates ( $n = 3$ ) were analysed with their respective technical replicates.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using One-way-ANOVA and Tukey's post-test to assess statistical significance between treatments, using GraphPad Prism version 5.0b (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The data are presented as the mean  $\pm$  standard error. Differences at  $P = 0.05$  were considered significant.

## References

- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. and Abrams, S.R. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signalling network. *Annual Rev. Plant Biol.* 61: 651–679.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., and Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 14: S15–S45.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124: 509–525.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. and Schroeder, J.I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development.* 24: 1695–1708.
- Huq, E., (2006) Degradation of negative regulators: a common theme in hormone and light signaling networks? *Trends Plant Sci* 11: 4–7.
- Liu PP, et al. (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 52(1):133–146.
- Liu, X., Zhanga, H., Zhaob, Y., Fenga, Z., Lia, Q., Yangc, H., Luand, S., Lie, J., and Hea Z. (2013) Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 38(110): 15485-15490
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005) MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant*
-



Cell 17(5):1360–1375.

Peleg, Z., Blumwald, E. (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 290–295.

Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K, Christmann, A. and Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15:395–401.

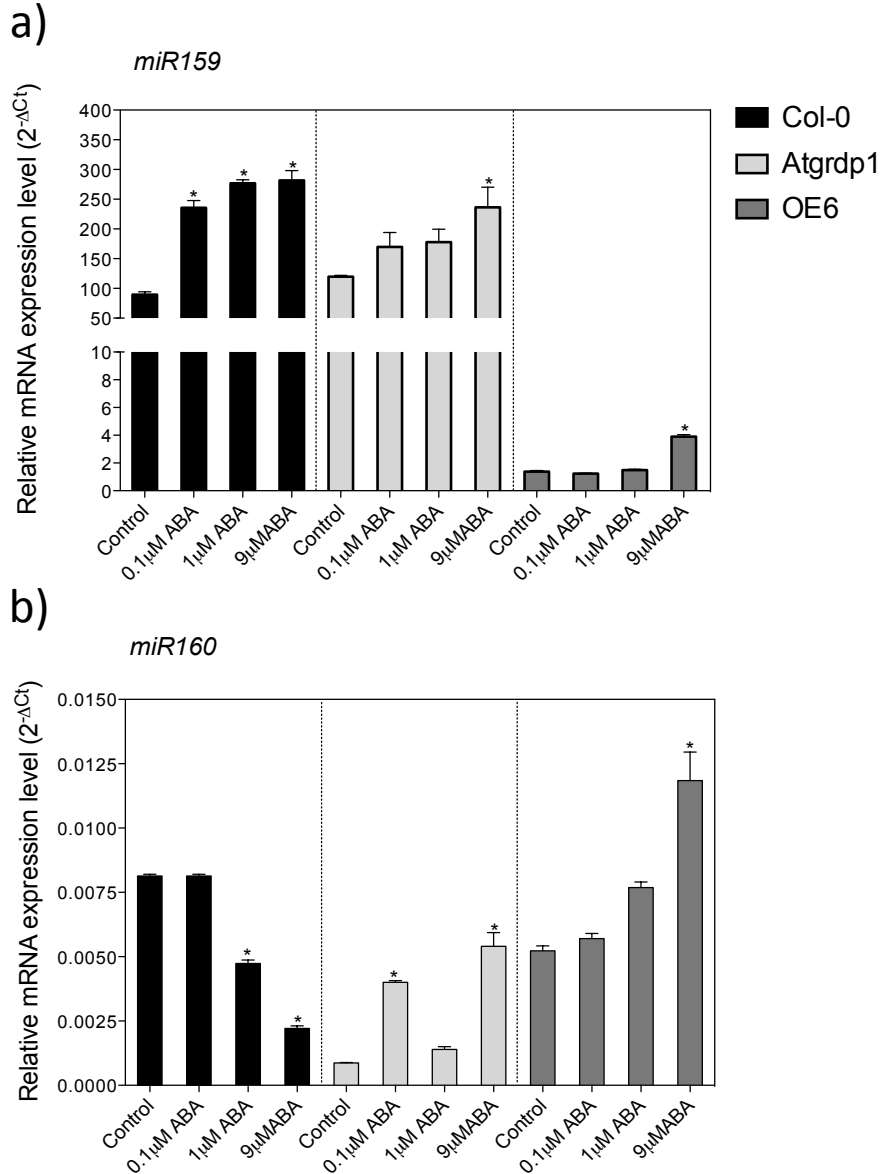
Reyes, J.L., Chua, N.H. (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 49: 592–606.

Rodríguez-Hernández, A.A., Ortega-Amaro, M.A., Delgado-Sánchez, P., Salinas, J., Jimenez-Bremont, J.F. (2014) AtGRDP1 gene encoding a Glycine-Rich Domain Proteins involved in germination and responds to ABA signaling. *Plant Mol Biol Rep*. DOI 10.1007/s11105-014-0714-4.

Wang JW, et al. (2005) Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 17(8):2204–2216.

Figures

Fig.1



**Figure 1.** Expression levels of *miR159* and *miR160* in Col-0, *Atgrdp1*-null mutant and *35S::AtGRDP1-6* over-expressing line during ABA treatment. Fifteen-days-old plants placed on grown on 0.5 x MS liquid medium supplemented with 0, 0.1, 1, and 9  $\mu$ M ABA at 24h was used. a)*miR159*, b)*miR160*. The expression levels were determinate by qRT-PCR using SYBR green dye. Data were expressed as relative mRNA level compared to control plants without ABA treatments, and were

calculated after normalization to the *A. thaliana* ubiquitin 5 (*UBQ5*) gene using the comparative threshold method. Bars represent mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Asterisks indicate significant differences between the samples treated and untreated, according to the One-way ANOVA analysis and Tukey's multiple comparison test ( $P < 0.05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

Hoy en día, las condiciones ambientales afectan negativamente la producción agrícola mediante la limitación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang et al. 2003). Por lo tanto, es de gran relevancia conocer cómo se activan y controlan las respuestas en la planta mediante cascadas de señalización así como la activación de los mecanismos moleculares para restablecer la homeostasis celular y proteger los componentes celulares bajo estrés abiótico. En las plantas que producen semilla, la sobrevivencia de la especie depende principalmente del éxito de los mecanismos que lleva a cabo la semilla en la dormancia, en la germinación y en el establecimiento del germinado en condiciones favorables, por lo que su papel es un paso crítico en el ciclo de vida de la planta.

Las plantas han desarrollado respuestas adaptativas que permiten cambios en su metabolismo con el fin de iniciar ó detener el proceso de germinación (Bliss et al. 1986). Al ser organismos sésiles, están constantemente expuestas a cambios inesperados en el medio ambiente que las rodea, lo que conduce a la activación de los genes relacionados con el estrés en diferentes tejidos y etapas del desarrollo (Walley & Dehesh, 2010). La caracterización molecular y funcional de nuevos genes implicados en la tolerancia al estrés abiótico en la planta es esencial para entender estas respuestas adaptativas, y poder contribuir a mejorar las tasas de germinación y tolerancia de las plantas a condiciones adversas.

### ***La proteína AtGRDP1 miembro de una nueva familia de proteínas que contiene el dominio DUF1399***

En el presente trabajo se describe por primera vez al gen *AtGRDP1* el cual pertenece a la nueva familia DUF1399-GRD. *AtGRDP1* es una proteína rica en glicinas no canónica, que contiene un dominio DUF1399, una región putativa de unión a RNA y un dominio rico en glicinas. En un análisis *in silico* en el genoma de *Arabidopsis* se usó la secuencia que conforma al dominio DUF1399 para realizar una búsqueda de otros genes que compartieran este dominio, lo que reveló la

---

presencia de 3 genes adicionales At4g37900, At437682 y At1g56230, los cuales codifican para proteínas de función desconocida.

La proteína At4g37900 presenta las tres regiones características de AtGRDP1. Lo que sugiere que el gen *At4g37900* es un posible parálogo de *AtGRDP1*, al cual lo denominamos *AtGRDP2*, y presentan una identidad del 64%. Interesantemente, estos genes muestran microsintenia (Kevei et al. 2005). El arreglo de exones-intrones tiene un arreglo diferente, el gen *AtGRDP1* presenta 9 exones mientras que el gen *AtGRDP2* muestra solo 5. Se ha sugerido que después de la duplicación del cromosoma II y IV en Arabidopsis la estructura de *At4g37900* (*AtGRDP2*) cambio perdiendo tres de los siete intrones, para fusionar esos cuatro exones (Kevei et al. 2005). Las proteínas At4g37682 y At1g56230 no contienen dominios ricos en glicina ni motivos de unión a RNA; presentan un 44% y 15% de identidad con respecto a la proteína AtGRDP1. Este dato infiere la presencia de una nueva familia de proteínas con un dominio en común DUF1399.

### ***AtGRDP1 está involucrado en la respuesta al estrés abiótico***

En este estudio demostramos que el gen *AtGRDP1* es inducido bajo diversas condiciones de estrés abiótico, incluyendo los producidos por la aplicación de sales y azúcares, así como de la fitohormona ABA. En una búsqueda en las bases de datos de microarreglos de Arabidopsis, encontramos que el gen *AtGRDP1* se induce bajo condiciones de estrés abiótico (Signal AtGeneExpress), por ejemplo con manitol 300 mM. En nuestro estudio, la mayor acumulación del transcrito de *AtGRDP1* fue encontrado bajo estrés osmótico, con la aplicación de sorbitol. El estrés iónico en células, tal como el causado por exposición a altas concentraciones de sales, provoca un desequilibrio en la concentración interna de iones, cambios en la turgencia y altera la actividad y estabilidad de macromoléculas (Hoyos and Zhang 2000). Estudios a futuro acerca del efecto del sorbitol sobre la expresión y función de *AtGRDP1* serán de gran relevancia para esclarecer esa respuesta.

Interesantemente, la aplicación exógena de ABA y de glucosa mostraron un patrón de expresión similar del gen *AtGRDP1* entre los 2 tratamientos, resultando en una

---

temprana represión, y en etapas posteriores una inducción significativa de dicho gen. Esta regulación transcripcional de *AtGRDP1* por estresores y ABA, sugiere que podría participar en la tolerancia al estrés en la planta.

Con el fin de profundizar sobre la función del gen *AtGRDP1* en respuesta al estrés abiótico, se realizaron ensayos de germinación utilizando una línea mutante insercional SALK y líneas sobreexpresoras del gen *AtGRDP1*, estas líneas revelaron fenotipos opuestos en germinación bajo diversas condiciones de estrés.

La línea mutante mostró un fenotipo de hipersensibilidad a estrés salino y osmótico, mientras que las líneas que sobreexpresan al gen *AtGRDP1* mostraron una clara tendencia a la tolerancia al estrés abiótico. Este dato concuerda con la inducción de este gen en respuesta a estrés abiótico. En particular la línea 35S::*AtGRDP1-6* mostró tener mayor vigor en los ensayos de germinación con respecto a las otras líneas 35S::*AtGRDP1-3* y 35S::*AtGRDP1-5*, siendo la línea transgénica que presentó una mayor expresión del gen *AtGRDP1*. En la línea mutante se observó que hubo una disminución cotiledones de las plantas que estuvieron bajo diversos tratamientos tales como NaCl, LiCl, manitol, sorbitol y glucosa. En contraste con las líneas que sobreexpresan el gen *AtGRDP1*, los cotiledones no se vieron muy afectados bajo el estrés abiótico. Además la línea complementante C2 (35S::*AtGRDP1/Atgrdp1*), mostró que complementa funcionalmente a la mutante nula *Atgrdp1* durante la germinación y el desarrollo cotiledonar bajo NaCl y sorbitol, lo que demuestra que la línea C2 recuperó el fenotipo de sensibilidad observado en la mutante manteniendo valores similares a los de la línea parental Col-0.

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) se caracterizan por la presencia de dominios que están conformados por glicinas. Las GRPs, se reportaron por primera vez en plantas, sin embargo, se han identificado en una amplia variedad de organismos, como cianobacterias y animales (Sachetto-Martins et al. 2000; Bocca et al. 2005). En algunos géneros de plantas, la expresión de las GRPs canónicas es modulada por factores bióticos y abióticos. Ha sido reportado, que las GRPs están involucradas en germinación (Kwak et al. 2005) ya que al sobreexpresar alguno de estos genes les confiere tolerancia a estrés abiótico durante la germinación. Por

---

ejemplo, líneas sobreexpresoras del gen *AtGRP2/CSDP2* de *Arabidopsis* son más tolerantes a estrés salino, mientras que líneas mutantes presentaron una tasa de germinación baja (Kim et al. 2007b). Se ha estudiado que GRPs de trigo y arroz, como *WsCSP1*, *OsCSP1* y *OsCSP2*, están involucradas en germinación, crecimiento y respuesta a estrés abiótico (Nakaminami et al. 2006; Chaikam and Karlson 2008). Por otro lado, se ha reportado la expresión de genes de RRM-GRPs en respuesta a diversas condiciones de estrés (Mangeon et al. 2010). Se han caracterizado diferentes RRM-GRPs en *Arabidopsis*, tales como: *GRP4*, *AtRZ1a*, *AtGRP2/CSDP2* y *GR/RBP2/GRP2*, sugiriendo que están involucradas en la respuesta a estrés por frío, salino y osmótico (Kwak et al. 2005; Kim et al. 2005, 2007a, b, c, 2008; Fusaro et al. 2007; Sasaki et al. 2007). La secuencia consenso del motivo de unión a RNA en estas proteínas sugiere su participación en procesos como maduración del RNA mensajero y control de la expresión génica (Fusaro and Sachetto-Martins 2007).

### ***La desregulación de la expresión de AtGRDP1 provoca cambios morfológicos en las semillas de Arabidopsis***

Un interesante hallazgo fue el encontrado en la línea mutante la cual produce semillas más pequeñas, de forma redonda, y además muestran alteraciones en la testa. Además, las semillas de las plantas sobreexpresoras del gen *AtGRDP1* mostraron alteraciones en la talla, peso y testa de las semillas. Sin embargo, el desarrollo del embrión de la línea mutante y sobreexpresoras no mostraron diferencias aparentes al compararlos con los embriones la Col-0. Estos fenotipos podrían estar relacionados con la expresión tejido-específica de este gen, en donde nosotros observamos una alta expresión en silicuas del gen *AtGRDP1*. Esto concuerda, con lo reportado en las bases de datos de microarreglos de la universidad de Toronto, en donde la mayor expresión del gen *AtGRDP1* se localiza en semilla y en silicua (<http://bar.utoronto.ca/>).

---

***AtGRDP1* está involucrado en la regulación transcripcional de reguladores positivos de la ruta de señalización de ABA**

Otro descubrimiento clave en este estudio, fue que líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *AtGRDP1* muestran un claro fenotipo de resistencia al ABA, semejante al fenotipo descrito para las líneas *abi*; mientras que para la línea mutante *Atgrdp1* se observó hipersensibilidad al ABA, como lo reportado para las líneas sobreexpresoras del gen *ABI3* (Parcy et al. 1994; Parcy and Giraudat 1997; Bies-Etheve et al. 1999). Como se observa en la figura 7c (Rodríguez-Hernández et al. 2014), el crecimiento y desarrollo de las plántulas de la línea sobreexpresora 35S::*AtGRDP1-6*, a pesar de la alta concentración de 9µM de ABA, continúan creciendo y mantienen un porcentaje de cotiledones verdes en comparación a la Col-0, y línea mutante *Atgrpd1*, la cual fue la más afectada. Con respecto a la línea C2 (35S::*AtGRDP1/Atgrdp1*) mostró valores semejantes a los de Col-0 bajo tratamientos de ABA.

Cuando analizamos al gen *ABI3*, regulador clave de la ruta de señalización del ABA, en la planta Col-0 y líneas mutante y sobreexpresante bajo la aplicación de ABA, encontramos que la falta del gen *AtGRDP1* provoca un expresión constitutiva del gen *ABI3*. Este incremento en la expresión del gen *ABI3* en la línea *Atgrdp1*, podría ser correlacionada con el fenotipo de hipersensibilidad a ABA observado en esta misma línea durante la germinación. Adicionalmente, nosotros encontramos que las líneas sobreexpresoras de *AtGRDP1* fueron más resistentes a ABA manteniendo un crecimiento y desarrollo continuo, mostrando un fenotipo semejante al de las mutantes *abi3-1* (Bies-Etheve et al. 1999). En estas líneas 35S::*AtGRDP1* se detectó una baja expresión del gen *ABI3* bajo los tratamientos con ABA, contrario a la inducción que se observó tanto en la línea mutante *Atgrpd1* y la Col-0; este comportamiento podría explicar su resistencia a la hormona.

Aunado al análisis del gen *ABI3*, evaluamos la expresión del gen *ABI5*, este gen codifica para un factor de transcripción del tipo bZIP, y se expresa predominantemente en semillas. Este factor activa la transcripción de genes tipo

---



---

LEA quienes le pueden conferir osmotolerancia al embrión (Finkelstein and Lynch 2000; López-Molina et al. 2001, 2002). El comportamiento transcripcional del gen *ABI5* fue semejante al observado en *ABI3*. En el fondo mutante (*AtGRDP1*) se encontraron altos niveles de expresión de *ABI5*, mientras que en la línea sobreexpresora, se detectaron bajos niveles del transcrito de *ABI5* bajo los tratamientos con ABA. Este dato concuerda con lo reportado para estos factores de transcripción, ya que se ha propuesto que *ABI3* regula la expresión de *ABI5* (Lopez-Molina et al. 2002).

Otro hallazgo interesante, fue cuando analizamos otro factor de transcripción como el *WRKY2*, el cual se ha reportado que está río arriba de *ABI3*. Jiang and Yu (2009) reportaron un fenotipo de sensibilidad al ABA en mutantes de *wrky2*, además cuando midieron la expresión de los genes *ABI3* y *ABI5* en la mutante *wrky2* en presencia de ABA encontraron que estaban más inducidos con respecto a la WT. Nosotros encontramos una inducción del gen *WRKY2* en la línea sobreexpresora del gen *AtGRDP1* en presencia de ABA, lo cual podría explicar la represión observada del gen *ABI3* en estas líneas transgénicas. Investigaciones posteriores serán necesarias para la identificación de nuevos actores río arriba de la vía de señalización del ABA en donde puede estar implicada la proteína *AtGRDP1*.

### **Expresión de microRNAs en la línea sobreexpresora del gen *AtGRDP1***

A partir de los datos generados de la ruta de ABA, y de la posible participación de *AtGRDP1*, nos planteamos analizar los microRNAs *miR159* y *miR160* para determinar su expresión en las líneas mutante y sobreexpresante del gen *AtGRDP1*, y conocer más sobre estos actores de la vía de señalización del ABA.

Al analizar la línea sobreexpresante 35S::*AtGRDP1-6*, identificamos una clara represión de *miR159* tanto en la condición control como con la aplicación de diversas concentraciones de ABA, en comparación con el comportamiento de inducción bajo ABA en la línea mutante y Col-0. Este dato correlaciona con nuestro dato de represión del gen *ABI3* en la línea sobreexpresante bajo la

---

aplicación de ABA. Ya que se ha reportado que *miR159* es regulado por el gen *ABI3* en respuesta a la acumulación de ABA en la célula (Reyes and Chua, 2007). El *mir159* desempeña un papel regulatorio ya que sus genes blanco son los que codifican para factores de transcripción tales como: MYB33, MYB65 y MYB101 (Millar & Gublar, 2005).

Cuando analizamos al *miR160*, un miRNA relacionado con auxinas (Wang et al. 2005; Mallory et al. 2005; Liu et al. 2007), la línea sobrepresora mostró una fuerte inducción bajo la aplicación de ABA, en comparación con el comportamiento de la de la línea mutante y Col-0. En este sentido se han incrementado los reportes que sugieren conexiones funcionales entre *miRNAs* y fitohormonas. Nuestros datos sugieren una posible relación entre dos rutas hormonales que regulan el proceso de germinación mediadas por diferentes *miRNAs*. En un dato reciente se ha encontrado que tanto las auxinas como el ABA desempeñan un papel en la inhibición de la germinación y dormancia, y que factores transcripcionales como ARF10 y ARF16 son capaces de regular positivamente al factor *ABI3* (Liu et al. 2013). Por otro lado *miR160* tiene como blancos a los factores ARF10, ARF16 y ARF17. Como se menciona anteriormente el gen *AtGRDP1* podría tener una participación directa en la señalización de la ruta de ABA, y nuestros hallazgos sobre *miR159* y *miR160* pueden ser claves para comprender la función de *AtGRDP1*.

## 6. CONCLUSIÓN

Este estudio reveló la presencia de una nueva familia de proteínas que contienen el dominio DUF1399, conformada por 4 proteínas en Arabidopsis, de las cuales dos de ellas, AtGRDP1 y AtGRDP2 presenta motivos característicos como el posible dominio de unión a RNA y la región rica en glicinas. En esta tesis, nosotros encontramos que el gen *AtGRDP1* se induce en respuesta a estresores, y juega un papel importante en la tolerancia al estrés abiótico durante la germinación, y en la ruta de señalización de ABA.

Las diferencias morfológicas encontradas podrían sugerir además, que *AtGRDP1* podría estar participando en la regulación de genes que estén implicados en la talla de la semilla. Además, la desregulación en la expresión de *AtGRDP1* afecta la respuesta a ABA, encontrando patrones de expresión alterados en *ABI3*, *ABI5* y *WRKY2* tanto en la línea mutante como en la sobreexpresante del gen *AtGRDP1*. Esta modulación de estos factores de transcripción (*ABI3*, *ABI5* y *WRKY2*) puede explicar el por qué al sobreexpresar *AtGRDP1* la línea mostró resistencia a ABA. Por último, nuestros hallazgos sobre la regulación de microRNAs como miR159 y miR160 en la línea sobreexpresante de *AtGRDP1*, podrían a futuro ofrecer datos claves sobre el papel que desempeña esta proteína AtGRDP1 en el estrés y la señalización del ABA.

## 7. REFERENCIAS

Alonso-Peral MM, Li J, Li Y, Allen RS, Schnippenkoetter W, et al. 2010. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol* 154: 757–771

Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, and León P. 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar.

Bari R, & Jones JD. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488

Baskin CC, and Baskin JM. 1998. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. (Academic Press, New York)

Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055-1066

Bocca SN, Magioli C, Mangeon A, Junqueira RM, Cardeal V, and Margis R. 2005 Survey of glycine rich proteins (GRPs) in the *Eucalyptus* expressed sequence tag database (ForEST). *Genetics and Molecular Biology.* 28: 608-24

Bohnert HJ, Nelson DE, and Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111

Bonetta D, Mccourt P. 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science* 3, 231-235

Boursiac Y, Leran S, Corratge-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B. 2013. ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science* 18: 325–333.

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Gruissen W, Buchanan B., Jones R. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD; pp 1158-1249

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk EB, Buchanan W, Gruissem R. 2000. Responses to abiotic stress *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, pp. 1158–1203

Chaikam V, and Karlson D. 2008. Functional characterisation of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant Cell Environment*. 31: 995-1006

Clarke J, Daniell H. 2011. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Molecular Biology* 76: 211–220

Cushman JC, Bohnert HJ. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3:117–124

Daszkowska-Golec A. 2011. Arabidopsis seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormones. *OMICS* 15: 763–774

Dinneny JR. *et al.* 2008. Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science* 320, 942–945.

Fedoroff NV. 2002. RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 452–459

Finch-Savage WE, and Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171, 501-523

Finkelstein R, and Lynch T. 2000a. The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12, 599–609

---

Finkelstein R. 2013. Abscisic acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* 11:e0166. doi: 10.1199/tab.0166

Finkelstein RR, Reeves W, Ariizumi T, and Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 387-415

Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, and Goodman HM. 1998. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10, 1043–1054

Finkelstein RR. 1994. Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* 5, 765–771

Forment J, Naranjo MA, Roldán M, Serrano R, Vicente O. 2002. Expression of Arabidopsis SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant Journal* 30: 511–519

Fusaro A, and Sachetto-Martins G. 2007. Blooming time for plant glycine-rich proteins. *Plant Signaling & Behavior*. 2: 386–387  
*Genes Dev.* 14, 2085–2096

Giraudat J, Hauge B, Valon C, Smalle J, Parcy F, and Goodman H. 1992. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4, 1251–1261

Gollery M, Harper J, Cushman J, Mittler T, Girke T, Zhu JK, Bailey-Serres J, Mittler R. 2006. What makes species unique? The contribution of proteins with obscure features. *Genome Biol* 7: R57

Gollery M, Harper J, Cushman J, Mittler T, Mittler R. 2007. POFs: what we don't know can hurt us. *Trends Plant Sci* (in press)

---

Grill E, Himmelbach A. 1998. ABA signal transduction. *Current opinion in Plant Biology* 1: 412-418

Hanson AD, Pribat A, Waller JC, and Crecy-Lagard V. 2010. “Unknown” proteins and “orphan” enzymes: The missing half of the engineering parts list-and how to find it *Biochem J* 425:1-11

Hirayama, T. and Shinozaki, K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61: 1041–1052

Hoekstra FA, Golovina EA and Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science.* 6: 431-438

Horan K, Jang C, Bailey-Serres J, Mittler R, Shelton C, Harper JF Zhu JK, Cushman JC, Gollery MT, Girke. 2008. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis *Plant Physiol.* 147, pp. 41–57  
in *Plant Biology* 4:401–406

Huang SQ, Xiang AL, Che LL, Chen S, Li H, Song JB, Yang ZM. 2010. A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnol. J.* 8:887–899

Ingram J, and Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 377-403

Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1995. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 247: 391-398

Jung HJ, Kim MK, and Kang H. 2013. An ABA-regulated putative RNA-binding protein affects seed germination of *Arabidopsis* under ABA or abiotic stress conditions. *Journal of Plant Physiology*. 15: 179-184

Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh CH, Cho K, Han O and Kang H. 2007. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Journal*. 50: 439–451

Kang J, Hwang J, Lee M, Kim Y, Assmann SM, Martinoia E, et al. 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*;107:2355-2360

Knight H, Knight MR. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6:262–267

Koornneef M, Bentsink L, and Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5, 33-36

Koornneef M, Reuling G, and Karssen C. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant*. 61, 377–383

Kotak S, Vierling E, Böäumlein H. and von Koskull-Döring P. 2007. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19:182-195.

Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, et al. 2007. Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science* 316: 715-9

Kucera B, Cohn MA, and Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions

---



during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 15, 281-307

Kwak KJ, Kim YO and Kang H. 2005. Characterisation of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration or cold stress. *J. Exp. Bot.* 56: 3007-3016

Lang V, Palva ET. 1992. The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 20:951–62

Leprince O, Hendry GAF, McKersie and BD. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3: 1-246

Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, and Giraudat J. 1994. *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264, 1448–1452

Leung J, Giraudat J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 49:199–222

Leung J, Merlot S, and Giraudat J. 1997. The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9, 759–771

Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H and Zhu JK. 2008. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20:2238- 2251

Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14, 836–843

---

Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, et al. 2007. A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid. *Science* 315: 1712-6

Lopez-Molina L, Mongrand S, and Chua NH. 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4782–4787

Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, and Chua NH. 2002. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal* 32:317–328

Lorković ZJ, and Barta A. 2002. Genomic analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 30:623–635

Mallory AC, Vaucheret H. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat. Genet.*, 38, pp. S31–S36

Mangeon A, Junqueira RM, and Sachetto-Martins G. 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signalling & Behaviour* 5: 99-104

Maris C, Dominguez C, Allain FH. 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 272, 2118–2131.10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x

Maurel C, Chrispeels M, Lurin C, Tacnet F, Geelen D, Ripoché P, and Guern J. 1997. Function and regulation of seed aquaporins. *J Exp Bot* 48, 421-430

Mazzucotelli E, Mastrangelo AA, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L. 2008. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-

---

translational regulations control transcription. *Plant Science* 174: 420-31

McCarty DR, Hattori T, Carson CB, Vasil V, Lazar M, and Vasil I. 1991. The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66, 895–905

Mccarty DR. 1995. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 46, 71-93

Menkes AE, Schindler U, Cashmore AR. 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Science* 20: 506-510

Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, and Giraudat J. 2001. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* 25, 295–303

Meyer K, Leube M, and Grill E. 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264, 1452–1455

Millar AA, Gubler F. 2005. The *Arabidopsis* GAMYB-Like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 17:705-721

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal.* 41:697-709

Nakaminami K, Karlson DT and Imai R. 2006. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 10122-10127

---

Nambara E, Marion-Poll M. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56:165-185

Nambara E, Naito S, and McCourt P. 1992. A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *Plant J.* 2, 435–441

Nonogaki H. 2008. Repression of transcription factors by microRNA during seed germination and postgermination. *Plant Signaling & Behavior*, 65–67

Okamoto M, Tatematsu K, Matsui A, et al. 2010. Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of *Arabidopsis* using tiling arrays. *The Plant Journal* 62:39-51

Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, and Giraudat J. 1994. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: Roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6, 1567–1582

Peleg Z, Blumwald E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 290–299

Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., et al. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue), D290–D301

Quesada V, Ponce M, and Micol J. 2000. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154, 421–436

Radestock, S., and Forrest, L.R. (2011). The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *J. Mol. Biol.* 407, 698–715

Ramanjulu S, and Bartels D. 2002. Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environment* 25, 141- 151

Ray A. 1997. Three's company: Regulatory cross-talk during seed development. *Plant Cell* 9:665–667

Razem FA, Luo M, Liu J-H, Abrams SR, Hill RD. 2004. Purification and Characterization of a Barley Aleurone Abscisic Acid-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279: 9922-9

Ren X, Chen Z, Liu Y, Zhang H, Zhang M, Liu Q, Hong X, Zhu JK, Gong Z. 2010. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J* doi: 10.1111/j.1365- 313X.2010.04248.x

Reyes JL, Chua NH. 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 49: 592–606

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105–2110

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105–2110

Sachetto-Martins G, Franco LO, and de Oliveira DE. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta* 1492: 1-14

---

Sara Jover-Gil, Héctor Candela, Pedro Robles, Verónica Aguilera, José María Barrero, José Luis Micol, and María Rosa Ponce. 2012. The MicroRNA Pathway Genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* Participate in Leaf Proximal–Distal, Venation and Stomatal Patterning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 53 (7): 1322-1333 first published online May 22, 2012 doi:10.1093/pcp/pcs077

Seo M, and Koshiba T. 2002. The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7, 41–48

Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal IM, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, Montesinos C. 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during SALT stress. *J. EXP. BOT.* 50, 1023-1036.  
Shen Y-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Du S-Y, Cao Z, et al. 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823-6

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115:327–334

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3:217–223

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3:217–223

Shiu SH, Shih MC, Li WH. 2005. Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals. *Plant Physiol* 139: 18–26

Söderman E, Brocard I, Lynch T, and Finkelstein R. 2000. Regulation and function

---

of the Arabidopsis ABA-insensitive4 (ABI4) gene in seed and ABA response signaling networks. *Plant Physiol.* 124, 1752–1765

Steinert PM, Mack JW, Korge BP, Gan SQ, Haynes SR, Steven AC. 1991. Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins *Int. J. Biol. Macromol.*, 13 pp. 130–139

Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17: 196–203

Thomashow MF. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 571- 599

Toh S, et al. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 146: 1368–1385.

Trindade I, Capitao C, Dalmay T, Fevereiro MP and Santos DM. 2010. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231:705-716

Vierling E, Kimpel JA 1992. Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 3:164–170

Vierling E, Kimpel JA. 1992. Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 3:164–170

Wang C, Zhang DW, Wang YC, Zheng L, and Yang CP. 2012. A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress. *Molecular Biology Reports* 39:1047–1053

Wang W, Vinocur B, and Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.

Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* 560:285–292

Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot* 62: 3289–3309

Yilmaz A, Mejia-Guerra MK, Kurz K, Liang X, Welch L, Grotewold E. 2011. AGRIS: the Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an update. *Nucleic Acids Res* 39: D1118–D1122

Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit Rev Plant Sci* 16:253–277

Zhu JK. 2001a. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

Zhu JK. 2001b. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion*

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247–73