

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL.

**GENERACION DE UNA CONSTRUCCION CON EL GEN MADS BOX (AGL16) Y  
UN GEN REPORTERO PARA LA POSTERIOR TRANSFORMACION DE  
PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*.**

Prestador de servicio social.

Isai Amado González.

Matrícula: 2152031299

Asesores.

Interno: Dra. Alma Amparo Piñeyro Nelson.

Número económico: 39484

Externo: Dra. Adriana Garay Arroyo.

Cédula profesional/número económico: 1607299

Lugar de realización: Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas ubicado en circuito exterior s/n, anexo al Jardín Botánico exterior de Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México. CP 04500

Fechas de inicio y de terminación:

Inicio: 22 de Octubre de 2018    Terminación: 13 de Junio del 2019

## Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	4
<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
Genes MADS-box.....	4
AGL16.....	5
Objetivos.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
Metodología.....	7
Actividades realizadas.....	10
Objetivos y metas alcanzados.....	10
Resultados, discusión y conclusiones.....	10
Resultados.....	10
Discusión.....	12
Conclusiones.....	13
Recomendaciones.....	13
Agradecimientos.....	14
Bibliografía.....	14

## Resumen

La familia de genes MADS-box codifican para factores de transcripción que regulan la expresión de una gran variedad de genes que tienen funciones importantes en el desarrollo de las plantas. Específicamente, en *Arabidopsis thaliana* se han identificado alrededor de 107 genes de esta familia divididos en dos grupos: los de tipo I y los de tipo II. Se ha visto que los de tipo I participan principalmente en el desarrollo de los gametos mientras que los de tipo II participan en todos los procesos de desarrollo de las plantas. Sin embargo, se sabe relativamente poco de la función de estos genes en la regulación del desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. Estudios previos del laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de plantas del Instituto de Ecología de la UNAM, mostraron que hay varios genes MADS-box que se expresan fuertemente en raíz (*AGAMOUS LIKE 16 (AGL16)*, *AGAMOUS LIKE 17 (AGL17)*, *AGAMOUS LIKE 19 (AGL19)*, *AGAMOUS LIKE 21 (AGL21)*, *XAANTAL 1 (XAL1)* y *XAANTAL 2 (XAL2)* aunque sólo se ha demostrado la función de algunos de ellos (*XAL1* y *XAL2*). Además, se ha demostrado la participación de muchos de estos genes en diferentes procesos de desarrollo de *Arabidopsis*. Específicamente, se ha visto que la proteína codificada por *AGL16*, interviene en diversos procesos como son la transición a la floración y la diferenciación de células guarda. Por otro lado, se ha visto que los transcritos de *AGL16* se acumulan fuertemente en la raíz cuando las plantas están creciendo bajo diversos factores de estrés como son la salinidad, el estrés osmótico, la sequía y el estrés oxidativo (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>).

Debido a que uno de los intereses del laboratorio en el cual hice mi Servicio Social es entender las bases moleculares de la respuesta de genes de *Arabidopsis* a diferentes condiciones de estrés, en particular cuando hay baja disponibilidad de agua, nos propusimos clonar la región completa de este gen con su propio promotor para fusionarlo a dos genes reporteros (*GFP*, Green Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés y *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase)) y poder ver, *in vivo*, en qué tipos celulares de la raíz se expresa y si cambia su patrón de expresión bajo

diferentes condiciones de estrés. En este trabajo se realizó el diseño de los oligos (Forward y Reverse) y la estandarización del protocolo de PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) para la amplificación del gen completo de *AGL16* (promotor + secuencia genómica).

## **Introducción**

*Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia de las Brassicaceae y es una planta nativa de Europa y Asia central que cuenta con más de 7 mil “ecotipos” (o accesiones) distribuidos principalmente en el hemisferio norte (Al-Shehbaz & O’kane 2002).

Esta planta se convirtió en un organismo modelo a partir de los primeros estudios de genética del desarrollo realizados en los años ochenta del siglo pasado y, desde entonces, ha permitido estudiar, identificar y determinar cómo funcionan y se regulan algunos de los mecanismos de desarrollo molecular en las plantas (Moubayidin et al., 2010). Para inicios de los noventa del siglo pasado, el estudio de mutantes homeóticos florales en *Arabidopsis* y *Antirrhinum majus* llevó al establecimiento del modelo combinatorio “ABC”, que describía las interacciones espaciales entre un grupo de cinco genes homeóticos que subyacen a la formación de los cuatro verticilos florales canónicos (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) (Bowman et al., 1991). De los cinco genes considerados entonces, 4 pertenecían a la familia de factores de transcripción MADS-box tipo II (Bowman et al., 1991).

La familia de genes MADS-box codifica para factores transcripcionales que participan en funciones biológicas importantes en eucariontes (Alvarez-Buylla et al., 2000). Estos genes están agrupados en dos linajes: tipo I y tipo II, según su secuencia y características estructurales (Álvarez-Buylla et al., 2000). De manera interesante, la similitud de los genes de cada tipo dentro de un organismo (plantas o animales) es mayor que la que presentan estos genes con los de su tipo en estos organismos, lo que evidencia que estos linajes, se fijaron antes de la separación entre plantas y animales (Alvarez-Buylla et al., 2000; Panchy et al,

2016). Los primeros genes MADS-box caracterizados en plantas fueron los involucrados en el desarrollo de órganos florales usando *Arabidopsis* y *Antirrhinum majus* como modelos de estudio. En *Arabidopsis*, se ha demostrado que los genes MADS-box tipo I participan en el desarrollo del gametofito femenino y de la semilla, mientras que los MADS-box tipo II participan en casi cualquiera de los procesos del desarrollo en los que se han buscado (Smaczniak et al., 2012). Los genes MADS-box tipo II en plantas codifican para proteínas que tienen una estructura de cuatro dominios (M, I, K y C) y son llamadas MIKC (Parenicová et al., 2003). Se sabe relativamente poco de la función de los genes MADS-box en la regulación del desarrollo de la raíz, a pesar de que hay más de 100 genes de esta familia de factores transcripcionales en *Arabidopsis* y más del 50% de los mismos se acumulan en la raíz (Alvarez-Buylla et al., 2019).

A pesar de que *Arabidopsis* es considerada una planta modelo que ha ayudado a entender los mecanismos moleculares de diferentes procesos de desarrollo, se ha convertido también en un modelo valioso para entender los componentes moleculares que subyacen a las enfermedades humanas. La comparación de los genomas de *Arabidopsis* y el humano revelan un porcentaje alto de similitud de genes implicados en enfermedades como el cáncer, Alzheimer y Parkinson en mamíferos (Xu & Møller, 2011). Por otro lado, el uso de plantas para entender la función de estos genes es fundamental, cuando pensamos que algunos de los mutantes de genes MADS box en animales suelen ser letales, mientras que en su mayoría no son letales en plantas (Xu & Møller 2011). El conocimiento de la función de estos genes en plantas, se puede utilizar para entender las redes de regulación genética en la que participan dichos genes, tanto en plantas como en animales y poder en algún momento aplicar este conocimiento para poder resolver un problema o fin común. Finalmente, pese a que los genes MADS-box son reguladores clave del desarrollo en eucariotas, su papel en la proliferación celular y la modulación de la diferenciación en las plantas sigue siendo poco estudiado.

## **Marco teórico**

### ***Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia de las Brassicaceae y es una planta nativa de Europa y Asia central (Al-Shehbaz & O'kane 2002). Cuenta con más de 7 mil "ecotipos" (o accesiones) distribuidos principalmente en el hemisferio norte. *Arabidopsis* es una planta herbácea anual dicotiledónea, pequeña, de entre 10 y 30 cm de altura, con un ciclo de vida corto que oscila entre los 3-4 meses, dependiendo de la accesión estudiada. Se propaga por vía sexual, con un alto porcentaje de autofertilización y produce cientos de semillas por planta; las semillas en general miden de 0.4 a 0.5 mm y son de germinación precoz. Sus hojas son ovaladas con borde aserrado y se disponen en roseta. El escapo se diferencia a partir del meristemo apical, donde las flores maduran de manera basipétala. La raíz es pivotante con múltiples raíces secundarias y con pelos radiculares simples (Maarten, et al., 2004; Koornneef, et al., 2001; Serino & Gusmaroli, 2001).

Algunas de las características que la han hecho convertirse en un sistema modelo es que tiene un genoma relativamente pequeño, con aproximadamente 130 megabases (mb), organizado en 5 cromosomas. Además, se tienen actualmente más de 1000 genomas secuenciados de las accesiones; siendo Columbia (Col-0) la accesión más usada, ya que se cuenta con mutantes para todos los genes codificados en esta planta (aproximadamente 26,000).

### **Genes MADS-box**

La familia de genes tipo MADS-box codifica para factores de transcripción que participan en funciones biológicas importantes en eucariontes, donde se encuentran conservados en la mayoría de todos los linajes de plantas estudiados (Alvarez-Buylla et al., 2000). Su nombre deriva de los primeros genes de este tipo que fueron clonados, *MCM1*, de *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS*, de *Arabidopsis thaliana*, *DEFICIENS* de *Antirrhinum majus* y SRF de humanos (Schwarz-Sommer et al., 1990).

El estudio filogenético de los genes MADS-box ha permitido subdividir a la familia en dos linajes: los del tipo I cuyas proteínas poseen una estructura de tipo MC (en donde M se refiere al dominio MADS y C al dominio carboxi terminal) y los de tipo II que, en plantas, las proteínas tienen una estructura MIKC; M se refiere al dominio MADS que es el encargado de unirse al DNA; el dominio I interviene en la interacción proteína-proteína; el dominio K interviene en las interacciones proteína-proteína y ayuda a la formación de los dímeros y tetrámeros proteicos y por último el dominio C, que es el menos conservado y tiene diversas funciones, está implicado en la formación de complejos tetraméricos, como la formación de multímeros o la transactivación (Smaczniak et al., 2012; Parenicová et al., 2003). Las proteínas codificadas por los genes del tipo I participan, principalmente en el desarrollo de la semilla (saco embrionario, gametos femeninos) aunque se expresan en toda la planta. Por otro lado, las proteínas codificadas por los genes del tipo II juegan un papel muy importante en el desarrollo y todo el ciclo de vida de *Arabidopsis* (Martínez-Castilla et al., 2003; Theißen & Gramzow, 2016).

### **AGL16**

El gen MADS-box *AGL16* se ubica en el cromosoma III del genoma de *Arabidopsis*, está compuesto por siete intrones y siete exones los cuales sintetizan una proteína de 240 aminoácidos. Como todos los miembros de esta familia, posee una caja MADS seguida de una región I, una región K y una región divergente C-terminal (Parenicová et al., 2003; Smaczniak et al., 2012). Se ha demostrado que la expresión de este gen está regulada negativamente por el microRNA824 (miR824) y por la presencia de nitrógeno en el medio de crecimiento (Hu et al., 2014).

*AGL16* se expresa principalmente en las hojas, después en los tallos, en las raíces y en menor cantidad se encuentra en las flores; la expresión de este gen en la raíz se limita principalmente al centro quiescente (QC) del meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés Root Apical Meristem) y algunos datos preliminares sugieren que también se expresan en las células epidérmicas de la raíz (Alvarez-Buylla et al., 2019). Se sabe que mutantes de pérdida de función de

este gen tienen una floración temprana en condiciones de no vernalización mientras que, en vernalización no hay un cambio significativo en la transición a la floración comparado con las plantas control (Hu. et al., 2014).

Por otro lado, este gen ha sido caracterizado como importante en la diferenciación de las células guarda (Le et al., 2014). A su vez, estudios preliminares del Departamento de Biología Celular y de Sistemas de la Universidad de Toronto en Canadá sugieren que puede estar involucrado en la diferenciación y/o ciclo celular en la raíz por sus altos niveles de expresión en las diferentes zonas de la raíz así como en su expresión ante diversos factores de estrés.

Con el fin de contribuir al entendimiento de la función de AGL16 en Arabidopsis, en este trabajo se avanzó en la clonación de la secuencia genómica de este gen, con el fin de realizar construcciones reporteras que permitan entender con mayor detalle espacio-temporal, el papel de AGL16 en el desarrollo y crecimiento de la raíz.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Elaborar una construcción que contenga el promotor del gen MADS-box tipo II *AGAMOUS LIKE-16 (AGL16)* y la región genómica unido a la proteína GFP para la posterior transformación de plantas de Arabidopsis.

### **Objetivos Específicos**

- Amplificar tanto la región promotora como el gen completo de *AGL16* por medio de la técnica de RT-PCR.
- Introducir la amplificación del promotor-gen de *AGL16* en un plásmido que tiene como gen reportero a la proteína GFP.
- Transformar una cepa de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$  o TOP10) con la construcción anterior para replicar el plásmido.
- Mandar a secuenciar las clonas que tengan el inserto y que estén en la orientación correcta.



- Transformar cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* con los plásmidos que contengan el inserto deseado.
- Transformar plantas de *Arabidopsis* con las cepas seleccionadas de *Agrobacterium*.
- Documentar el patrón de expresión espacio-temporal de *AGL16* en la raíz de las plantas reporteras generadas.

## **Metodología**

### **Material biológico**

- Para la realización de este proyecto se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0).
- Para propagar los plásmidos con las diferentes construcciones, se usaron células electro competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$ .
- Para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58

### **Condiciones de crecimiento**

Las semillas de los ecotipos usados fueron desinfectadas con una solución de EtOH al 100% durante 5 minutos, seguido de una solución de Cloro 5% y SDS 1% durante 13 minutos y finalmente con 3 lavados con agua estéril. Con el fin de sincronizar el metabolismo y la germinación, las semillas fueron estratificadas durante 48 horas a 4°C en oscuridad.

Las semillas fueron sembradas en cajas Petri de 12x12cm con medio MS que contiene: MS (Murashige y Skoog) al 0.2X, MES monohidratado al 0.00005%, sacarosa al 1% y agar al 1% y un pH de 5.6 ajustado con KOH al 1M. Todas las plantas se germinaron y crecieron en condiciones de día largo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 22°C con luz blanca y un fotoperiodo de 110 $\mu$ Em<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>. De 8 a 10 días después de la siembra, las plántulas se transfirieron a cámaras de crecimiento en sustrato Growing mix #1 y Vermiculita en porciones 3:1 a. para su posterior uso.

## **Construcción genética.**

Para la construcción genética del promotor del gen *AGL16*, se realizaron los pasos que se describen a continuación:

### **1) Extracción de DNA genómico.**

El DNA genómico se extrajo de hojas de *Arabidopsis*. Se tomó aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de una hoja y se colocó en un tubo eppendorf que fue congelado con nitrógeno líquido y triturado con la ayuda de un pistilo hasta formar un polvo fino. A este polvo se le adicionaron 500µl de buffer de extracción: TrisHCl 1M-pH 8, EDTA 0.5M, SDS al 10% y LiCl, 0.01M y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, se agregaron 4µl de Proteinasa K, se mezcló por inmersión durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 3500 rpm a 4°C. El sobrenadante (SN) se pasó a un tubo eppendorf, se agregó 1µl de RNasa y se dejó incubar por 30 minutos a una temperatura de 37°C.

Posteriormente se mezcló este SN con 500µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico FCI (25:24:1), dejando reposar las muestras de 2-3 minutos para después centrifugar a 13000 rpm por 10min a 4°C. El SN obtenido se pasó a un tubo eppendorf y se repitió el paso de FCI. Se agregaron 125 µl de acetato de amonio 10M y 500 µl de etanol al 100% y se incubó la mezcla 1 hora a -20°C y 5 minutos a temperatura ambiente para después centrifugarse a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Las muestras se lavaron dos veces con 500µl de alcohol al 70% para subsecuentemente dejar secar el pellet, finalmente re-suspender en agua grado molecular.

### **2) Diseño de oligos**

Se buscó la secuencia completa del gen *AGL16* en la base de datos TAIR por sus siglas en inglés: The Arabidopsis Information Resource (<https://www.arabidopsis.org/>), para determinar la zona en la cual se iban a unir los oligos. El oligo que se llama forward, porque va en la dirección 5´-3´ de la secuencia de *Arabidopsis*, se diseñó en la región intergenica río arriba del promotor y, el oligo reverse, se diseñó un nucleótido antes del codón de paro. Por

medio del software libre “oligo analyzer” (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) se calculó el tamaño de los oligos de tal forma que cumplieran con ciertas características como son: el porcentaje Guanina:Citosina de 40 a 60%, una Tm mayor a 55°C y que no se unieran uno al otro en una horquilla. Una vez que se diseñaron los oligos se realizó un BLAST en la página de NCBI (por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) para comparar la secuencia de los oligos contra todo el genoma de *Arabidopsis* y verificar que el sitio de unión sea único para nuestro gen de interés.

### **3) Amplificación de la secuencia del promotor más el gen (región codificante) de *AGL16*.**

El DNA obtenido fue cuantificado en un nanodrop (Nanodrop 2000 Thermo scientific) y se realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa o PCR para amplificar un fragmento de 3.478 kb río arriba del codón de terminación (TAA), utilizando los oligos AGAP16 y AGL16-I. El DNA se amplificó con la enzima AccuPrime™ TaqDNA Polymerase, High Fidelity (Invitrogen), con las siguientes condiciones de ciclaje:

Un ciclo de desnaturalización del DNA a 94°C por 3 min; posteriormente 30 ciclos dividido en tres etapas: una etapa para desnaturalizar el DNA a 94°C por 30 segundos, la siguiente etapa para que se unan los oligos a su secuencia en el DNA a 55°C por 30 segundos y una tercera etapa para extensión y polimerización 72°C por 3.3 minutos; finalmente se da un ciclo de 72°C por 10 minutos para que la polimerasa acabe de amplificar.

Para verificar el tamaño de los amplicones, se corrieron geles de agarosa al 1% en cámaras de electroforesis con 2µl de buffer de carga, 5µl de muestra y un marcador de peso molecular de fago lambda digerido por HIND III y PST I. Se vieron los diferentes fragmentos mediante un fotodocumentador BioRad.

## Actividades realizadas

Durante el servicio social realice las metodologías antes mencionadas para la amplificación del gen *AGL16*; además, se realizaron otras actividades como llevar a cabo cinéticas de crecimiento de la raíz de mutantes de pérdida de función del gen *AGL16*. Esto se llevó a cabo tanto en condiciones de crecimiento normales como en condiciones de estrés osmótico con la finalidad de determinar si el gen *AGL16* participa en la respuesta de la raíz ante condiciones de estrés osmótico. Finalmente, se están haciendo cruces de una línea mutante (*t-agl16*) con diferentes líneas reporteras para observar si la expresión espacio temporal de éstas líneas cambia en las mutantes y nos pueden ayudar a explicar los fenotipos observados.

## Objetivos y metas alcanzadas

Debido a complicaciones metodológicas, se cumplieron sólo dos de los siete objetivos que se plantearon. Sin embargo, tengo resultados preliminares que sugieren que este gen es un regulador negativo de la respuesta de la raíz de *Arabidopsis* a crecer en condiciones de estrés osmótico.

## Resultados, discusión y conclusiones

### Resultados

Análisis in silico del gen *AGL16* de *Arabidopsis thaliana*



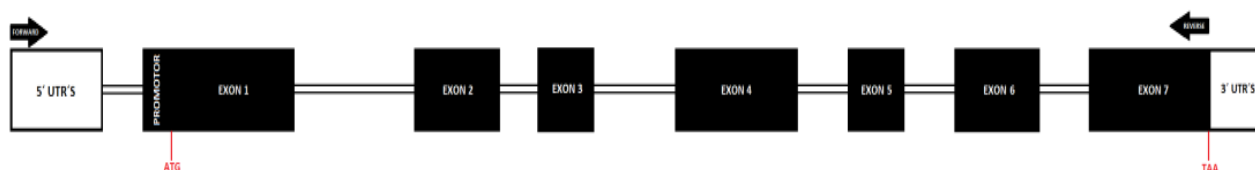
**Figura 1.** Esquema estructural del gen *AGL16* en donde observamos la región promotora, los extremos 5' y 3'UTRs y la región codificante dividida en exones (en cajas negras) e intrones (en rayas que se encuentran entre los exones).

En la página web de TAIR se obtuvo la secuencia completa del gen de *AGL16* que se encuentra en el cromosoma número 3. En la Figura 1 se puede observar la estructura del gen el cual tiene 7 intrones y 7 exones. En la Tabla 1 se resumen otras características estructurales del gen *AGL16*.

**Tabla 1 Características estructurales del gen *AGL16* de Arabidopsis.**

Gen	AGL16
Tamaño	2962 nt
5'- 3' UTR'S	1-323
3'- 5' UTR'S	3390-3745
Exones	7
Intrones	7
Aminoácidos	240
Cromosoma	3

Se buscó amplificar una secuencia de *AGL16* de 3478 pb con los oligos diseñados (secuencia mostrada en la tabla 2). Esta amplificación empezaría 414 pares de base (bp) río arriba del promotor e incluiría la secuencia genómica (intrones + exones) sin el codón de paro como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2. Zona flanqueada por los oligos forward y reverse, las flechas indican la dirección.**

**Tabla 2. Secuencia y características de los oligos utilizados para amplificar el gen de *AGL16***

Nombre	Dirección	Secuencia	TM (°C)	Tamaño	GC%
AGAP16	Forward	TAAAGTTTTGCTAATATAGCATGC	57	24	29.2%
AGL16-I	Reverse	CTCAACTATTTTTCTTCATTGCA	56	24	33.3%

Al estandarizar las condiciones de la PCR se pudo amplificar el gen completo *AGL16* (promotor más región codificante), el producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% el cual podemos observar en la figura 3.

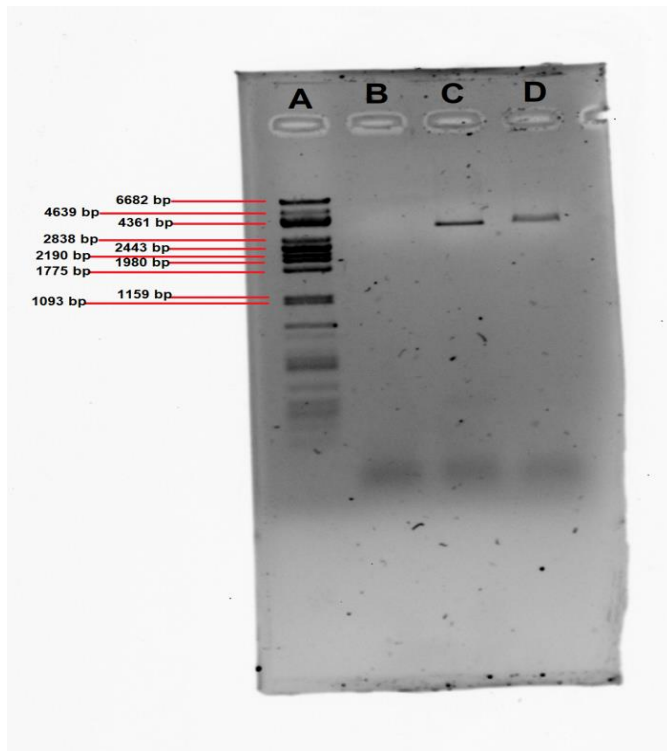


Figura 3. Amplificación de *AGL16* (3479 bp). A) Marcador de peso molecular B) Control negativo C y D) Muestras con la amplificación del gen completo.

## Discusión

Los oligos son una parte fundamental para muchas de las técnicas que se realizan en biología molecular por lo que realizar un buen diseño y tener todas las condiciones específicas son vitales para un resultado positivo, durante el periodo de experimentación se tuvieron una serie de problemas los cuales se fueron solucionando por medio de herramientas en la web, de búsqueda en la literatura de estrategias experimentales y la gran mayoría mediante prueba y error de diferentes condiciones experimentales para optimizar la PCR.

En este trabajo se diseñaron los oligos necesarios para amplificar el gen *AGL16*, por lo que al tener los oligos y las condiciones estandarizadas para la amplificación del gen mediante la técnica de la PCR podre continuar con la parte

experimental en la cual se generaran dos construcciones génicas, una con GFP y otra con GUS los cuales me podrán ayudar a complementar y entender diversos experimentos que realice en paralelo con el diseño de los oligos (durante el lapso de tiempo en el que se presentaron dificultades experimentales antes mencionadas) como, cinética de crecimiento de mutantes simples de *agl16* en condiciones óptimas y en estrés osmótico las cuales arrojaron resultados interesantes (fenotipos) que podrían sugerir que *AGL16* tiene un papel importante en el desarrollo de raíz en estas condiciones. Con los resultados de esta investigación seguiré investigando y continuare realizando diversos experimentos que me ayuden a entender más la función de *AGL16* en el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana* y así poder crear más información para futuras investigaciones.

## **Conclusiones**

Si bien no se logró terminar todas las etapas contempladas para este servicio social, sí hubo un avance en los procesos para llegar a la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones reporteras, ya que logró clonar el fragmento genómico deseado de *AGL16*. Este proyecto continúa y será útil para entender uno de los genes involucrados en redes e interacciones génicas importantes para el desarrollo de las plantas, además de que se podrán realizar experimentos futuros.

## **Recomendaciones**

Para realizar este tipo de trabajos que buscan realizar todo una metodología desde el diseño de oligos hasta la transformación de planta y su estudio espacio temporal de la expresión de un gen, se deben tener las metodologías necesarias previamente montadas y calcular bien los tiempos que requerirá cada etapa experimental, ya que el trabajo de laboratorio típicamente presenta varios retos a solucionar, por esto se debe considerar que se puede requerir de más tiempo para estas investigaciones.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de las Dras. Adriana Garay Arroyo del Instituto de Ecología y Alma Piñeyro Nelson de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

## Bibliografía

- Al-Shehbaz, I. A., & O'Kane Jr, S. L. (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*, e0001.
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal*, 24(4), 457-466.
- Alvarez-Buylla, E.R., García-Ponce, B., de la Paz Sánchez, María, Espinosa-Soto, C., García-Gómez, M.L., Piñeyro-Nelson, A. & Garay-Arroyo. (2019). MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms, *The New phytologist*,.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., & Meyerowitz, E. M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, 112(1), 1-20.
- Hu, J. Y., Zhou, Y., He, F., Dong, X., Liu, L. Y., Coupland, G., ... & de Meaux, J. (2014). miR824-regulated AGAMOUS-LIKE16 contributes to flowering time repression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(5), 2024-2037.
- Koornneef, M., & Scheres, B. (2001). *Arabidopsis thaliana* as an experimental organism. *eLS*.
- Le, J., Zou, J., Yang, K., & Wang, M. (2014). Signaling to stomatal initiation and cell division. *Frontiers in plant science*, 5, 297.
- Maarten, K., Carlos, A. & Vreugdenhil., D., (2004). Naturally Occurring Genetic Variation in *Arabidopsis Thaliana*. *Annual Review of Plant Biology*, pp. 141-172.



- Moubayidin, L., Perilli, S., Ioio, R. D., Di Mambro, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Current Biology*, 20(12), 1138-1143.
- Martínez-Castilla, L. P., & Alvarez-Buylla, E. R. (2003). Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13407-13412.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., & Shiu, S. H. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant physiology*, 171(4), 2294–2316.
- Pařenicová, L., Folter, S.d., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. & Colombo, L. (2003), Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World, *The Plant Cell*, 15(7), 1538-1551.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., & Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250(4983), 931-936.
- Serino, G., & Gusmaroli, G. (2001). Arabidopsis thaliana as an Experimental Organism. *e LS*.
- Smaczniak, C., Immink, R. G., Angenent, G. C., & Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 139(17), 3081-3098.
- Theißen, G., & Gramzow, L. (2016). Structure and evolution of plant MADS domain transcription factors. In *Plant Transcription Factors* 127-138.
- Xu, X. M., & Møller, S. G. (2011). The value of Arabidopsis research in understanding human disease states. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 300-307.