



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Licenciatura en Biología
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

T E S I S

Participación de la combinatoria de proteínas con dominio MADS
AGL24, XAL2 y SOC1 en el crecimiento de la raíz primaria de
Arabidopsis thaliana en condiciones control y de estrés osmótico.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

SANDRA CAROLINA PATIÑO OLVERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ADRIANA GARAY ARROYO

Cd. Mx. Septiembre, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de contenido

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3
<i>Genes MADS-box</i>	7
<i>XANTAL 2/ AGL14</i>	10
<i>SOC1 y AGL24</i>	12
<i>Genes MADS-box y estrés</i>	15
PREGUNTA BIOLÓGICA.....	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
<i>Líneas mutantes</i>	21
<i>Genotipificación de la línea soc1-6 agl24-4</i>	21
<i>Genotipificación de las línea 35S::AGL24 SOC1101D</i>	22
<i>Cinética de crecimiento en condiciones control, estrés osmótico y auxinas</i>	22
<i>Extracción de ARN</i>	25
<i>Análisis de expresión por medio de RT-PCR tiempo real en raíz primaria</i>	25
<i>Localización de la proteína AGL24 en la raíz primaria en condiciones control y estrés osmótico moderado (100mM de manitol)</i>	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
<i>Expresión de AGL24 y SOC1 en la raíz de Arabidopsis</i>	27
<i>Obtención de las líneas homocigotas agl24-4 soc1-6</i>	27
<i>Localización de la proteína AGL24 en la raíz primaria de Arabidopsis</i>	29
<i>Cinética de crecimiento en medio MS</i>	30
<i>Cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés osmótico</i>	33
<i>Cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés osmótico y auxinas</i>	36
<i>Regulación transcripcional entre los genes AGL24, SOC1 y XAL2 en raíz</i>	38
CONCLUSIONES	40
LITERATURA CONSULTADA.....	42
ANEXO.....	49

RESUMEN

Los genes MADS-box codifican para proteínas que actúan como factores de transcripción. Esta familia de proteínas se encuentra altamente diversificada en plantas, aunque también han sido encontradas en menor número en animales y hongos. Los genes MADS han sido ampliamente estudiados en la parte aérea de las plantas, principalmente en procesos implicados en la transición a la floración y el desarrollo floral en donde se ha descrito que diferentes complejos de proteínas MADS dan lugar a órganos florales específicos. Sin embargo, hasta ahora son pocos los estudios sobre el papel de estos genes en el desarrollo de la raíz. Recientemente en el laboratorio se caracterizaron las proteínas XAL1 y XAL2, en donde se ha visto su papel regulador en el desarrollo de la raíz primaria. En el caso de XAL2, se ha reportado que la línea de pérdida de función de este gen *xal2-2*, presenta un fenotipo de raíz corta debido a cambios en el transporte de las auxinas. Por otro lado, en análisis de doble híbrido, se ha visto que XAL2 interactúa con otras dos proteínas MADS, SOC1 y AGL24, las cuales promueven la transición a la floración junto con XAL2 en Arabidopsis. Además de esto se ha reportado que las líneas sobreexpresoras y de pérdida de función de AGL24, SOC1 y XAL2 comparten un fenotipo muy similar de transición a la floración. De acuerdo con bases de datos recabados en repositorios públicos y ensayos de RT-PCR se ha reportado la expresión de AGL24 y SOC1 en la raíz primaria de Arabidopsis, así como cambios en la expresión de los genes XAL2 y AGL24 en raíz cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés osmótico y auxinas. Finalmente, también se ha visto que las auxinas pueden ayudar a contender el efecto del estrés osmótico en el tamaño de la raíz. Por todas estas razones, consideramos muy interesante estudiar el papel de estos tres genes en conjunto con las auxinas para determinar el desarrollo de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico. Mediante cinéticas de crecimiento de líneas mutantes de pérdida de función y sobreexpresoras de estos genes, hemos podido concluir que AGL24 y SOC1, actúan como represores del crecimiento de la raíz primaria en una vía alterna a la de XAL2. La sobreexpresión de AGL24 y SOC1, puede ayudar a contender el efecto del estrés osmótico bajo y moderado en el tamaño de la raíz, mientras que XAL2 actúa como un represor del crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico severo. Los ensayos de cinéticas de crecimiento con estrés osmótico y auxinas, mostraron que XAL2 y SOC1 ayudan a contender el efecto de las auxinas en la disminución del tamaño de la raíz primaria cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés osmótico. Mientras que los ensayos de RT-PCR indicaron que la regulación transcripcional entre XAL2, SOC1 y AGL24 es diferente a lo que ocurre en parte aérea. Y finalmente estos mismos ensayos de RT-PCR, nos ayudaron a entender mejor la regulación de los genes en la raíz y explicar los fenotipos de las líneas de pérdida de función.

INTRODUCCIÓN

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana (de aquí en adelante *Arabidopsis*) es una planta herbácea perteneciente a la familia Brassicaceae. Su ciclo de vida se completa en 8-9 semanas aproximadamente, es una planta pequeña que se autopoliniza y puede cultivarse fácilmente en condiciones de laboratorio. Sus flores se componen de afuera hacia adentro por cuatro sépalos verdes, cuatro pétalos blancos, seis estambres con polen y un gineceo central. Las plantas pueden llegar a medir hasta 20 cm de altura y producen una gran cantidad de semillas (Meinke *et al.*, 1998).

Arabidopsis es considerada un organismo modelo ya que presenta características que la hacen fácil de estudiar como un ciclo de vida corto, tamaño pequeño, producción prolífica de semillas por medio de autopolinización (Koornneef & Meinke, 2010), facilidad para realizar cruza, rápido tiempo de floración además de la posibilidad de hacer mutagénesis, ya que es posible transformarla fácilmente con ADN exógeno (Meyerowitz, 2001) y se tienen disponibles un gran número de semillas de tipo silvestre y mutantes, así como clones de ADNc específicos (Meyerowitz, 2001). Por muchas de estas razones, Laibachen en 1943 la propone como un organismo modelo. *Arabidopsis* fue la primera planta completamente secuenciada y se liberó la secuencia de su genoma en el año 2000 (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000); hoy sabemos que presenta un genoma pequeño en comparación con otras plantas. Finalmente, se cuenta con una base de datos pública de secuencias en Internet "TAIR" y "BAR Toronto" donde se puede consultar una gran cantidad de información pública de todos los 25,498 genes codificados por esta planta (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000).

Aunque *Arabidopsis* es utilizada principalmente en estudios genéticos, su variación natural es muy grande ya que tiene una gran cantidad de accesiones (Columbia y Landsberg han sido las más estudiadas) las cuales han sido recolectadas de sus poblaciones naturales principalmente en Europa, Asia y América del Norte. Esta variación natural, brinda la oportunidad de estudiar características importantes de la

ecología evolutiva a nivel molecular (Koornneef & Meinke, 2010). El uso de *Arabidopsis* como organismo modelo ha permitido integrar el estudio de la genética y la fisiología con los procesos moleculares y de desarrollo, como por ejemplo el desarrollo de flores, frutos y la raíz, la inducción floral, el desarrollo embrionario y la respuesta a estrés entre otros (Meyerowitz, 2001).

La raíz de *Arabidopsis* funciona como un excelente modelo de estudio para conocer los procesos de diferenciación y proliferación celular, *in vivo*, debido a que presenta una organización celular simple, es hialina, se encuentra formada por pocas células cuya posición en tiempo y en espacio se tienen bien caracterizadas, por lo que es posible estudiar cualitativa y cuantitativamente los procesos de división y alargamiento celular en este órgano *in vivo*, así como cambios en el desarrollo debido a alteraciones genéticas o ambientales (Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016; Petricka *et al.*, 2012). Sumado a esto, el estudio de la raíz de *Arabidopsis* como sistema modelo durante más de 25 años, ha permitido tener información con gran detalle de su morfología y desarrollo en comparación con otros órganos (Petricka *et al.*, 2012).

En el eje longitudinal de la raíz de *Arabidopsis* encontramos tres zonas que se pueden distinguir fácilmente: el meristemo apical de raíz o RAM (por sus siglas en inglés; Root Apical Meristem) donde las células se mantienen en constante división, una Zona de Alargamiento (ZE) en la cual las células pierden su capacidad para dividirse e incrementan su longitud y finalmente una zona de diferenciación celular (ZD), donde las células adquieren sus características y funciones específicas finales (Figura 2A) (Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016; Petricka *et al.*, 2012; Ivanov & Dubrovsky, 2013). Asimismo, a lo ancho de la raíz, encontramos cilindros concéntricos alrededor del haz vascular, iniciando por la parte radial más externa encontramos la cofia lateral de la raíz (únicamente en el meristemo), la epidermis, el córtex, la endodermis, el periciclo y el estele o haz vascular (Lee *et al.*, 2013).

Por otro lado, el meristemo apical de la raíz o RAM se encuentra conformado por dos partes: un dominio de proliferación celular (DP) y un dominio de transición (DT) (Ivanov y Dubrovsky, 2013). El DP contiene el nicho de células troncales (NCT por

sus siglas en inglés Stem Cell Niche) formado por el centro quiescente (CQ) que a su vez se encuentra rodeado por los cuatro diferentes tipos de células iniciales: columela, epidermis/cofia lateral, córtex/endodermis y cilindro vascular (Figura 1B) (Dolan *et al.*, 1993; Lee Y. *et al.*, 2013; Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016). En el DP las células están en constante división celular, mientras que en el dominio de transición (DT) hay menos células dividiéndose, aunque lo hacen a la misma tasa que en el DP. La ZE es donde células de diferentes tejidos simultáneamente comienzan un alargamiento rápido a tasas mucho más altas que en el RAM y, finalmente, en la ZD, el alargamiento de las células termina y adquieren sus características finales como son la presencia de pelos radiculares en las células epidérmicas (Pacheco-Escobedo *et al.* 2016).

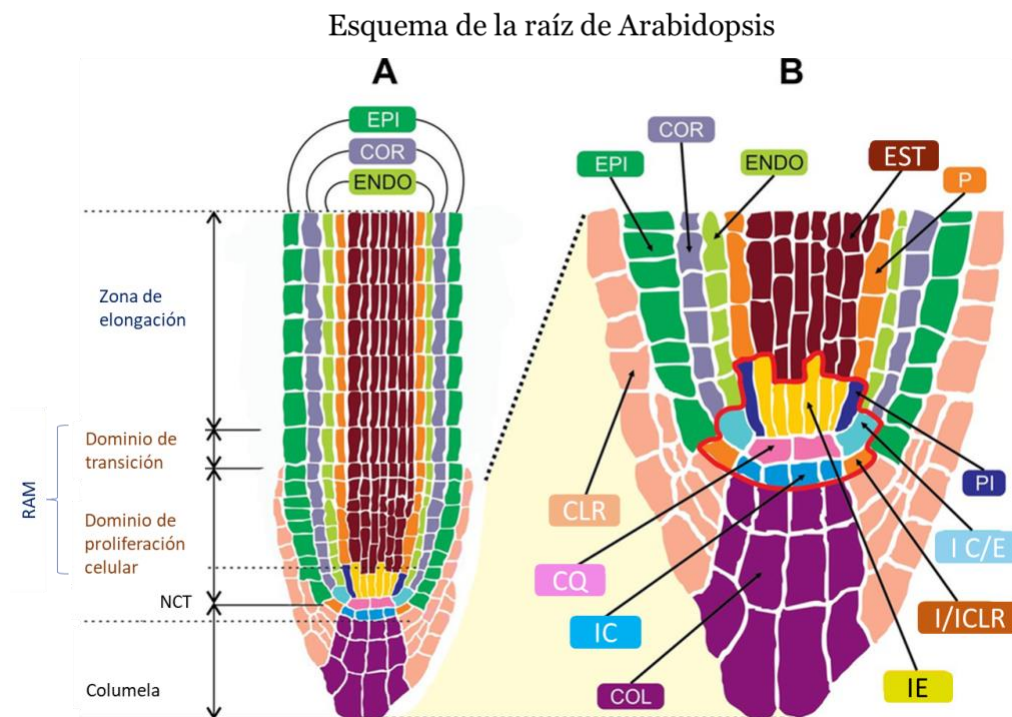


Figura 1. A) Sección longitudinal de la raíz de Arabidopsis donde se observan el RAM (Root Apical Meristem) conformado por los dominios de proliferación celular y de transición, además de la zona de alargamiento. B) Ampliación de la punta de la raíz de Arabidopsis en (A) El área delineada con rojo constituye el NCT Nicho de células troncales, donde se observa el centro quiescente (CQ) rodeado por las células iniciales de columela (IC), epidermis/cofia lateral (I/ICLR), córtex/endodermis (I C/E) y del estelo o cilindro vascular (IE) (Modificado de Lee Y.,2012).

Se ha visto que durante el desarrollo de la raíz primaria en *Arabidopsis* se requiere de una compleja interacción entre distintas hormonas vegetales entre las que se incluyen las auxinas, el etileno, las citocininas y los brasinoestroides (Liu, et al, 2010; Rowe et al, 2016; Müssig, C, 2003). El IAA (ácido indol-3-acético) es la principal auxina biológica en plantas superiores (Bartel, 1997) y se ha demostrado que su presencia en las células es muy importante para un correcto desarrollo y crecimiento de las plantas. Las auxinas tienen un papel muy relevante en el desarrollo de la raíz primaria debido a que estas, junto con las citocininas, regulan la actividad meristemática en la raíz de *Arabidopsis*. Esto lo llevan a cabo por medio de papeles antagónicos, ya que se ha reportado que las auxinas en bajas concentraciones incrementan el tamaño del meristemo y promueven su crecimiento a diferencia de las citocininas que lo reducen e incrementan la diferenciación celular (Ioio et al., 2008). Además, se ha visto que los gradientes de concentración de auxinas en los diferentes tejidos tiene un efecto en los procesos morfogénéticos (Ikeda *et al.*, 2009) como son la división, la expansión y la diferenciación celular (Pagnussat et al., 2002b). La biosíntesis de auxinas se lleva a cabo tanto en la parte aérea de la planta así como en las raíces (Gomes G., Scortecci., 2021). En raíces las auxinas se sintetizan predominantemente en la zona meristemática de la punta de la raíz primaria y raíces laterales (Ljung, K., et al., 2005).

Además de dar sostén a las plantas, las raíces son de gran importancia para la absorción de agua y nutrientes. El desarrollo y crecimiento de las raíces, no solo está determinado por la genética, sino que también está influenciado por diferentes variables ambientales, entre las que se encuentran la disponibilidad de agua y nutrientes. De manera interesante se ha demostrado que las raíces pueden detectar cambios en factores abióticos como el estado del agua del suelo (Comstock, 2002) y reprogramar su desarrollo para adaptarse al medio ambiente en el cual se está desarrollando la planta. Específicamente, en condiciones estrés osmótico, se ha visto que la arquitectura del sistema de raíces, así como la distribución de las mismas, son determinantes clave de la capacidad de una planta para absorber agua en condiciones de sequía (Yu *et al.*, 2013).

Como mencioné anteriormente la secuenciación de *Arabidopsis thaliana* se logró en el año 2000, lo cual ha brindado la oportunidad de estudiarla mejor a nivel genético y molecular. Con lo que se ha podido determinar que aproximadamente, el 5-10% de los genes de esta planta, más de 1500, codifican para factores de transcripción (Riechmann J., 2002). Genes que son fundamentales para la regulación de la expresión génica y que intervienen en muchos procesos a lo largo del ciclo de vida de las plantas como el desarrollo y la respuesta a estrés (Riechmann *et al.* 2000; Singh., 2002). Una de las familias de factores de transcripción que han sido ampliamente estudiadas en plantas es la familia de genes *MADS*.

Genes *MADS*-box

En un inicio los estudios se centraron en investigar el papel de estos genes en los procesos del desarrollo de las flores (Rounsley *et al.*, 1995) pero conforme aumentaron las investigaciones, se ha visto que esta familia de factores de transcripción desempeñan muchas otras funciones en casi todos los procesos de desarrollo de las plantas (Smaczniak *et al.*, 2012). Las proteínas *MADS* han sido de particular interés en el estudio de la evolución de las plantas ya que, durante la aparición y evolución de las plantas terrestres, estos genes incrementaron notablemente en número y diversidad además de que han habido cambios en la estructura, expresión y función de estas proteínas, teniendo un impacto muy grande en las innovaciones del desarrollo reproductivo durante la evolución de las plantas tales como el origen de las semillas, las flores y los frutos (Günter Theissen *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2005).

La palabra *MADS*, proviene del acrónimo derivado de la primera letra de los miembros fundadores de la familia: *Mini Chromosome Maintenance 1* (*MCM1*) presente en la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), *DEFICIENS* (*DEF*) de *Antirrhinum majus* y *Serum Response Factor* (*SRF*) de humanos (*Homo sapiens*). En plantas hay

muchos genes de esta familia (más de 100) respecto a los que se presentan en animales y hongos; en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado 4 genes *MADS-box* *MCM1*, *Arg80*, *Rlm1* y *Smp1*, mientras que en animales se han encontrado 5 genes *MADS-box*, un *SRF* y 4 de tipo *MEF2* que son *mef2A*, *mef2B*, *mef2C* y *mef2D*, que participan en la diferenciación y proliferación celular muscular. Por otro lado, en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* únicamente se ha encontrado el gen *mef2D* (Messenguy F., 2003).

Resulta muy interesante que esta familia de factores de transcripción está presente en plantas con y sin semillas: algas, briófitas, licofitas y helechos, (Theissen et al., 2000; Thangavel, G. y Nayar, S. 2018). El genoma de *Arabidopsis* codifica para 108 genes *MADS* y se ha demostrado la participación de estos durante todo el ciclo de vida en *Arabidopsis thaliana*: en la homeostasis del meristemo aéreo y de la raíz, el desarrollo de las hojas, el desarrollo de la raíz, la dehiscencia de los frutos y el tiempo de floración, entre otros (Parenicová et al., 2003).

Con base en análisis filogenéticos, los genes *MADS* han sido divididos en dos grandes grupos, los genes de tipo I y tipo II, los cuales se separaron después de que ocurrió una duplicación en un gen ancestral antes de la divergencia de animales y plantas. Los *MADS* de tipo II tienen más de cinco, usualmente seis u ocho exones y se caracterizan por presentar una estructura proteica que ha sido denominada *MIKC*, la cual es exclusiva de plantas y les permite tener complejas interacciones con otras proteínas. La estructura proteica *MIKC* tienen cuatro dominios: el dominio *MADS* (M), el cual es requerido para la unión a la caja CarG (CC[A/T]6GG) del ADN y la dimerización de proteínas, el dominio intermedio (I) el cual ayuda a la formación selectiva de dímeros de unión a ADN. El siguiente dominio llamado (K) contribuye a la dimerización de proteínas y la formación de complejos multiméricos. Finalmente, el último dominio se encuentra en el carboxilo terminal (C) y es el dominio más variable que intervine tanto en la actividad transcripcional como en las interacciones proteicas ya que es un potenciador y estabilizador de las interacciones mediadas por el dominio K. Con base en la diversidad de los dominios I y K, con respecto a secuencia y estructura, las proteínas *MADS* de tipo II se subdividen en las de tipo *MIKC^C* y el tipo *MIKC^{*}*. Las *MIKC^{*}* son proteínas que presentan largos

dominios I y dominios K menos conservados que las MIKC^c (Smaczniak *et al.*, 2012). Los genes MADS-box tipo II forman un grupo monofilético con los MADS de tipo *MEF2* de animales y se ha visto que participan en procesos de desarrollo como la identidad meristemática, tiempo de floración y desarrollo de flor, semillas, frutos y raíz (Zhang and Forde, 1998; Ng and Yanofsky, 2001; Giovannoni, 2004; Whipple *et al.*, 2004; L. Colombo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Masiero *et al.*, 2011).

Por otro lado, los genes MADS-box tipo I de plantas carecen del dominio K y del dominio I y forman un grupo con los genes MADS-box de tipo *SRF* de animales y hongos. Los genes MADS tipo I han sido subdivididos en los grupos M α , M β y M γ con base en diferencias en la secuencia del dominio MADS y siempre presentan uno o dos exones (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000). Aunque este grupo ha sido menos estudiado en plantas que los genes MADS-box tipo II, se ha visto que dos de las proteínas con dominio MADS de tipo I, *AGL80* y la proteína *DIANA* (*DIA*; *AGL61*), participan en la diferenciación de la célula central durante la gametogénesis y el desarrollo de las semillas (Smaczniak *et al.*, 2012) y se ha visto que algunos MADS-box tipo I pueden constituir un circuito regulador que vincula mecanismos epigenéticos con la regulación de los genes expresados durante el desarrollo temprano del endospermo y el tamaño de la semilla (Zhang, S. *et al.*, 2018)

Las proteínas MADS se unen a la caja CArG del ADN como homodímeros o heterodímeros y activan la transcripción en tetrámeros (Shore and Sharrocks, 1995; Kaufmann *et al.*, 2005; Zobell *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008, de Folter *et al.*, 2005), aunque actualmente también se sabe que estas proteínas pueden funcionar como parte de complejos de factores de transcripción alternos que implican proteínas que no son del dominio MADS (Kaufmann *et al.*, 2005). Por otro lado, genes pertenecientes a la familia MADS-box tipo II codifican para cuatro de los cinco genes homeóticos del modelo ABC y participan en la formación de todos los órganos florales: sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Theißen, *et al.*, 2016). Finalmente, hay estudios que comprueban la participación de los genes *MIKC* en el desarrollo de la raíz. Específicamente, en nuestro laboratorio se demostró la participación de dos proteínas con dominio MADS como promotores del crecimiento de la raíz primaria: *XAANTAL1* *AGL12/XAL1* (Tapia-Lopez *et al.*, 2008; Zluhan Martínez,

2017) y *XAANTAL2* *XAL2/AGL14* en *Arabidopsis thaliana*. (Garay-Arroyo *et al.*, 2013)

XAANTAL 2/AGL14

El estudio de *XAANTAL2* o *AGL14* (Agamous-like 14) inicia poco antes de 1995, cuando (Rounsley *et al.*, 1995) aíslan y comienzan la caracterización de 6 nuevos genes MADS-box tipo II. Lo más novedoso de su estudio fue que ellos encontraron que 3 de los genes MADS aislados (*AGL14*, *AGL17* y *AGL12*) se expresan preferentemente en tejidos de la raíz; estos fueron los primeros genes MADS-box en los que se reportó su expresión en este tejido. Ya que previo a este estudio, los genes MADS-box, únicamente se habían reportado en procesos de desarrollo floral. A partir de este análisis de expresión, se quiso investigar si estos factores de transcripción también pudieran intervenir en otros procesos de desarrollo en diferentes tejidos de las plantas, además del desarrollo de los órganos florales. Casi una década después, (Zimmermann *et al.*, 2004) reportan de igual forma una alta expresión de *XAL2* en raíces laterales y radícula, mientras que (Gan, *et al.*, 2005) observaron que los niveles de expresión de este gen, son regulados por la concentración de nitrógeno. Asimismo (Nawy *et al.*, 2005) y en nuestro laboratorio (Garay-Arroyo *et al.*, 2013), se reportó, que *AGL14* renombrado como *XAANTAL2* o *XAL2*, se expresa en la cofia lateral de la raíz, la epidermis y la endodermis en la región meristemática, en la columela, en el cilindro vascular de la raíz primaria y en los primordios de raíces laterales. En nuestro laboratorio se realizó la caracterización funcional de *XAL2* en la raíz de *Arabidopsis*, y se observó que este gen es necesario para la organización espacial del nicho de células troncales, así como para mantener la homeostasis del meristemo. Esto se concluyó ya que mutantes de pérdida de función de *XAL2* (*xal2-2*), presentan una disminución en la longitud de la raíz primaria de *Arabidopsis* debido a varios factores: alteraciones en el nicho de células troncales, un menor número de células meristemáticas con una baja tasa de proliferación celular y una zona de alargamiento más corta respecto a la WT (Figura 2).

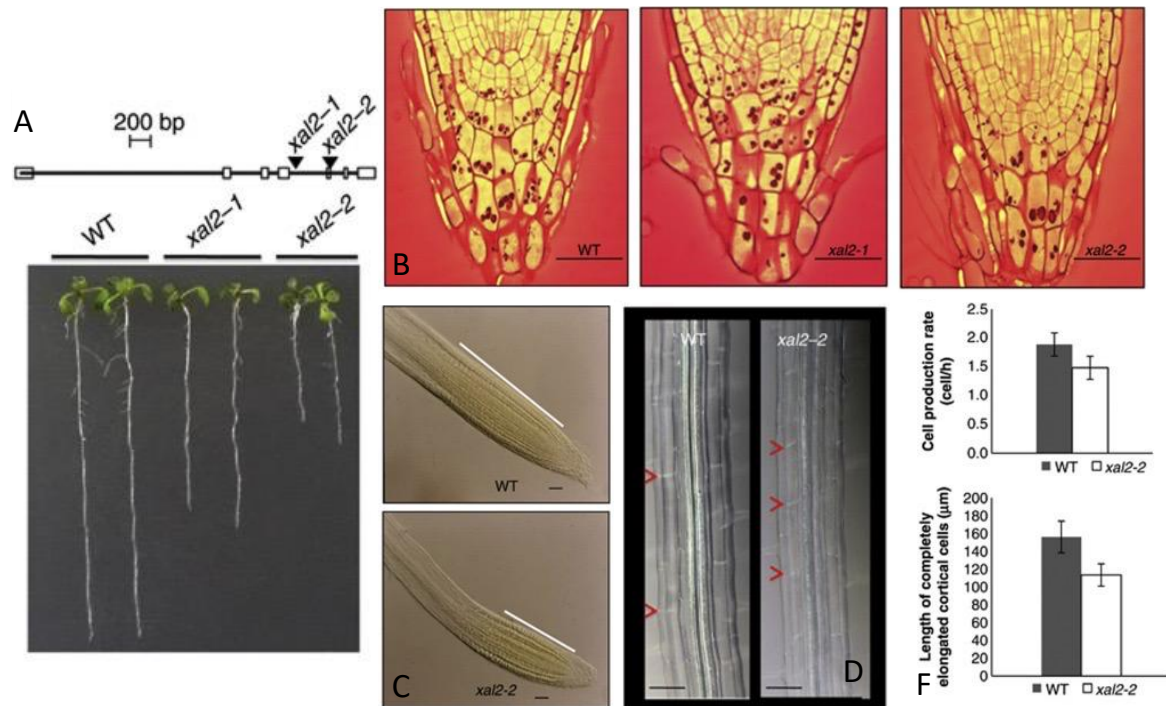


Figura 2. Fenotipo de la raíz primaria de mutantes de pérdida de función de *XAL2*. A) Se observa el fenotipo de raíz corta de dos mutantes de pérdida de función de *XAL2* (*xal2-1* y *xal2-2*). B) La mutante *xal2-2* presenta una desorganización del CQ y de las células iniciales. C) Se observa que las mutantes *xal2-2* presentan un meristemo más pequeño respecto a la WT. D y F) Las mutantes *xal2-2* presentan una menor tasa de proliferación celular, así como células completamente alargadas más pequeñas respecto a la WT. Tomado y editado de (Garay-Arroyo *et al.*, 2013).

Además, se vio que la concentración de las auxinas estaba alterada en la mutante *xal2-2*, hormonas muy importantes tanto en el mantenimiento del nicho de células troncales como en diferentes procesos de desarrollo de la raíz primaria. Para entender porque estaba alterada la concentración de las auxinas en la mutante de *XAL2*, se midió la expresión de varios transportadores de auxinas y se encontró que *XAL2* regula positivamente la expresión tanto de *PIN1* como de *PIN4* (transportadores de eflujo de auxinas) causando acumulación de esta hormona en el centro quiescente; sin embargo, la pérdida de función de *PIN1* y *PIN4* no es suficiente para explicar el fenotipo de raíz primaria corta de la línea *xal2-2* (Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Finalmente, también se reportó en nuestro laboratorio que *XAL2*

es necesario para la transición a la floración y el mantenimiento y determinación del meristemo floral (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015), al igual que los genes *AGL24* (*Agamous-like 24*) y *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*), los cuales también pertenecen a la familia de genes *MADS-box*. Por otro lado, en ensayos de doble híbrido en levadura, se ha reportado que la proteína XAL2 interactúa con SOC1 y AGL24.

SOC1 y AGL24

Estas dos proteínas, AGL24 y SOC1, han sido estudiadas a profundidad en la parte aérea de *Arabidopsis*, en donde se ha visto que junto con XAL2, promueven la transición a la floración (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015)(Figura3), ya que las líneas que sobreexpresan XAL2 presentan fenotipos de floración temprana similares a los de sobreexpresión de AGL24 y SOC1 (Figura 3 B, C y D) y por el contrario, líneas de pérdida de función de estos genes presentan un fenotipo de floración tardía (Liu *et al.*, 2008; Immink *et al.*, 2012; Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). Al analizar el papel de XAL2 en la transición a la floración, por medio de RT-PCR cuantitativa, se observó que SOC1 y AGL24 estaban regulados a la baja en *xal2-2*, lo que indica que XAL2 regula positivamente ambos genes. Mientras que la sobreexpresión de XAL2 reprimió drásticamente SOC1 y AGL24. De igual forma se observó que XAL2 estaba fuertemente reprimida sólo en la línea de sobreexpresión de SOC1 (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015).

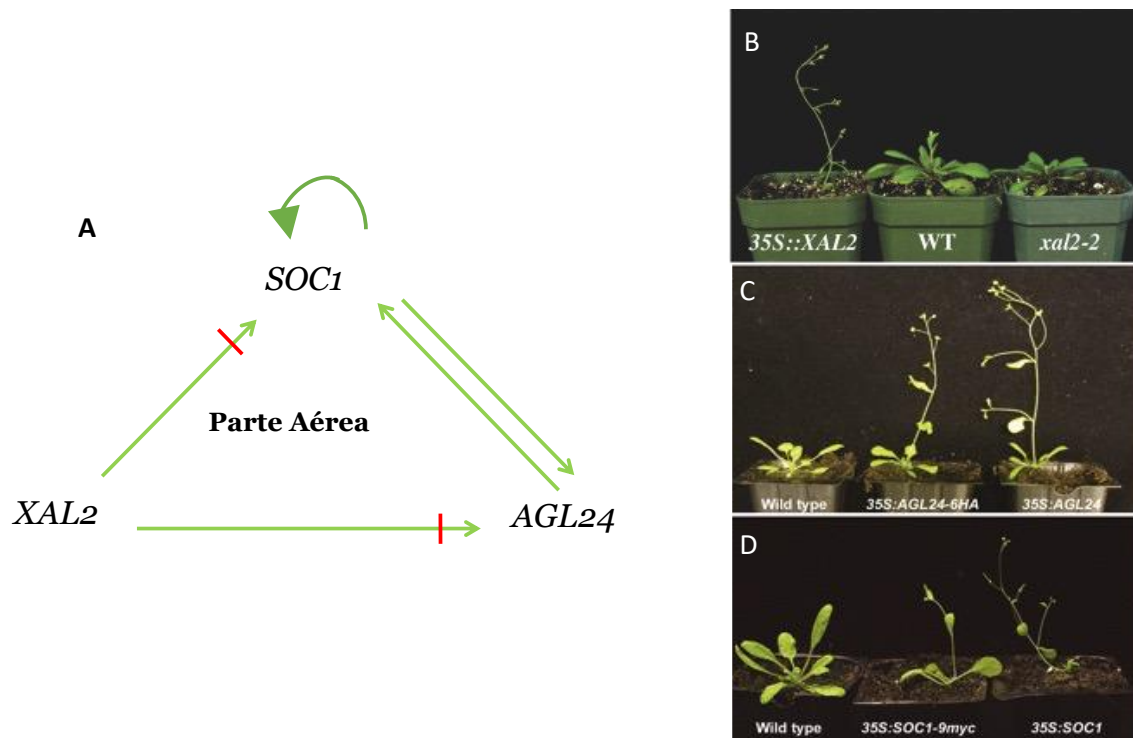


Figura 3 A) Regulación de la expresión de los genes *XAL2*, *SOC1* y *AGL24*, durante el desarrollo de la flor en *Arabidopsis* (modificado de Pérez-Ruiz *et al.*, 2015), B) Plantas *xal2-2*, se observa que son de floración tardía mientras que la línea de sobreexpresión *35S::XAL2* es de floración temprana (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015), C) Plantas sobreexpresoras de *AGL24*, donde se observa un fenotipo de floración temprana (Liu *et al.*, 2008). D) Plantas sobreexpresoras de *SOC1*, donde se observa un fenotipo de floración temprana (Immink *et al.*, 2012).

Específicamente, se ha reportado que *SOC1*, controla la transición a la floración (Kimura *et al.*, 2015) e integra señales del fotoperiodo, de la vernalización y de las vías de inducción floral autónomas que regulan la expresión de los genes homéoticos B y C para promover la transición a la floración en *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2000; Michaels *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008 ; Kimura *et al.*, 2015). Asimismo, junto con *AGL24*, media los efectos de las fitohormonas giberelinas en la floración en condiciones de día corto, y regula la expresión de *LEAFY (LFY)* (Gregis *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado en ensayos de doble híbrido en levadura, que *AGL24* y *SOC1* interactúan proteína-proteína (de Folter *et al.*, 2005) y en protoplastos de *Arabidopsis* se ha visto que es necesaria la formación de un

heterodímero entre *SOC1* y *AGL24* para que *SOC1* pueda translocarse al núcleo (Lee et al., 2008). Sin embargo, no hay estudios acerca de la función de estos dos factores de transcripción (*AGL24* y *SOC1*) en el desarrollo de la raíz; a pesar de que se ha demostrado que *SOC1* y *AGL24* se expresan en este órgano (Gan et al., 2005)(Yu et al., 2002)(Schmid et al., 2005).

De acuerdo con bases de datos recabados en repositorios públicos y ensayos de RT-PCR, se ha reportado la expresión de los genes MADS box *XAL2* y *AGL24* en la raíz de *Arabidopsis*. (Figura 4 y 5). Además de que se ha visto que *XAL2* y *AGL24* presentan persentan DREB's (Elementos de respuesta a la deshidratación) en su secuencia reguladora, de tipo ARF, GTCGAC, sitios de unión a los que se unen los factores de transcripción de tipo DREB, los cuales desempeñan un papel crucial en el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al estrés de las plantas. Sumado esto, se tiene datos reportados en Gen Investigator de que la expresión de *XAL2* y *AGL24* en la raíz se incrementa en condiciones de estrés osmótico y auxinas exógenas (Figura 5).

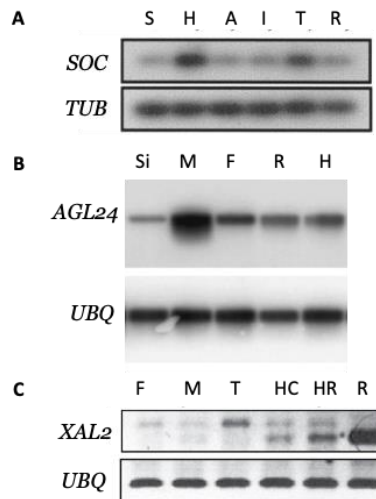


Figura 4 A) Análisis de expresión de *SOC1* en diferentes órganos de *Arabidopsis*: Semillas (S), Hojas (H), Ápice (A), Inflorescencia (I), Tallo (T) y Raíz (R), tomado y modificado de (Lee H. et al., 2000) B)

Análisis de expresión de *AGL24* en diferentes organos de *Arabidopsis*: Silicuas (Si), Meristemo de la inflorescencia (M), Flores abiertas (F), Raíces (R) y Hojas (H), tomado y modificado de (Michaels S., et al., 2002), C) Análisis de expresión de *XAL2* en diferentes organos de *Arabidopsis*: Flores (F), Meristemo de la inflorescencia (I), Tallo (T), Hojas caulinares (HC), Hojas de la roseta (HR), y Raíz (R) Tomado y modificado de (Garay-Arroyo et al., 2013).

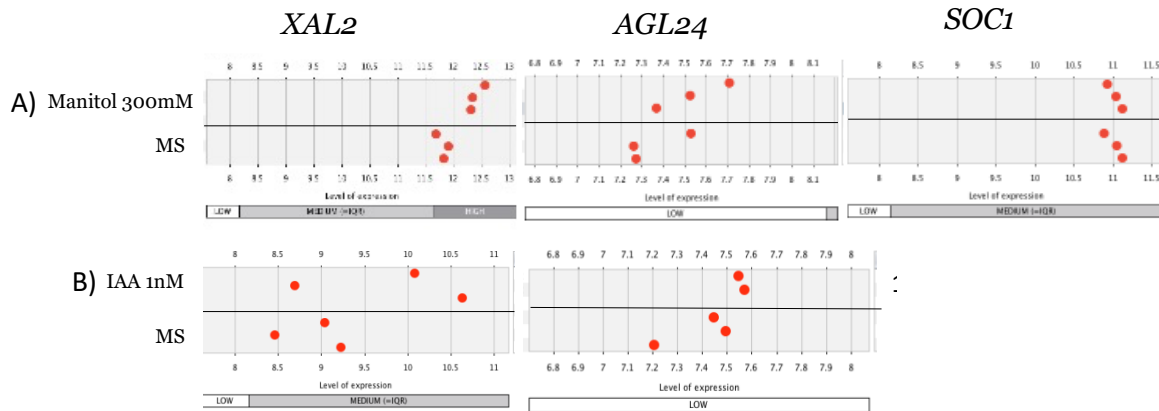


Figura 5 A) Cambio en la expresión relativa de los genes *XAL2*, *AGL24* y *SOC1*, en la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones de estrés osmótico inducido con manitol 300mM, en plántulas de 8 días. Datos obtenidos de la página de Gen Investigator (<https://geneinvestigator.com/>). B) Cambio en la expresión relativa de los genes *XAL2*, *AGL24* y *SOC1*, en la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, al añadir auxinas exógenas 1nM al medio en plántulas de 8 días. Datos obtenidos de la página de Gen Investigator (<https://geneinvestigator.com/>).

Genes MADS-box y estrés

Como mencioné anteriormente los factores de transcripción tienen un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes en respuesta a condiciones de estrés como son la salinidad, la sequía, las temperaturas extremas, el estrés oxidativo y el ataque de patógenos, entre otros tipos de estrés (Chen *et al*, 2019). Algunas de las familias de factores de transcripción que se sabe regulan la respuesta a estrés osmótico a nivel transcripcional son: *DREBs* (*dehydration responsive element binding*), *AP2* (*APETALA2*) *EREBP* (*ethylene-responsive element binding proteins*), *basic-domain leucine zipper (bZIP)*, *ethylene response factor (ERF)*, *NAC*, *WRKY*, y *MYB*, los cuales se ha demostrado que participan en

la respuesta a una condición de estrés (Lata *et al* 2011, Chen *et al.*, 2019). Sin embargo, en estudios recientes también se ha reportado la participación de algunos genes *MADS-box* en la regulación de diferentes genes en respuesta a estrés abiótico como la salinidad, la sequía y el estrés por frío (Lata *et al.*, 2011; Castelán-Muñoz *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha demostrado la participación funcional de proteínas con dominio MADS en la respuesta a diferentes condiciones de estrés además de que se ha demostrado su regulación transcripcional (ver Tabla 1). Por ejemplo, se ha reportado que la sobre expresión del gen *CaMADS* de la pimienta (que se induce con NaCl y manitol) aumenta significativamente el peso fresco de las plantas cuando estas son sembradas en condiciones de estrés osmótico y salino (150mM de NaCl y 200mM manitol). Además, se ha visto en arroz que el gen *MADS-box*, *OsMADS26* que se induce por manitol, regula negativamente la respuesta a estrés ya que mutantes de este gen presentaron un mayor contenido de agua relativa después de dos semanas en sequía, en comparación con la línea WT. Por otro lado, las líneas de plantas que sobre expresan este gen, tienen un mayor número de hojas marchitas y completamente secas. Finalmente, se vio que este factor de transcripción también afecta la expresión de un gran número de genes que participan en respuesta a estrés (Khong *et al.*, 2015).

Tabla 1. Genes MADS-box en plantas que cambian su expresión en condiciones de estrés.

Gen	Organismo	Regulación transcripcional por estrés.	Autor
<i>AGL91</i>	Arabidopsis	Es regulado por estrés por frío inducido por ICE1.	(Lee, Byeong-h., 2005)
<i>OsMADS18</i> <i>OsMADS22</i>	Arroz	Aumenta su expresión en semillas cuando se exponen a estrés salino.	(Arora <i>et al.</i> , 2007)
<i>OsMADS26/AGL12</i>	Arroz	Aumenta su expresión en semillas por estrés por frío, deshidratación y salinidad.	(Arora <i>et al.</i> , 2007)

OsMADS27	Arroz	Aumenta su expresión en semillas por estrés por frío y salinidad.	(Arora <i>et al.</i> , 2007)
OsMADS2	Arroz	Disminuye su expresión en semillas por estrés por frío, deshidratación y salinidad.	(Arora <i>et al.</i> , 2007)
OsMADS30	Arroz	Disminuye su expresión en semillas por estrés por frío y deshidratación.	(Arora <i>et al.</i> , 2007)
OsMADS55	Arroz	Disminuye su expresión en semillas por estrés por deshidratación y salinidad.	(Arora <i>et al.</i> , 2007)
ZMM7-L/ AGL2	Trigo	Aumenta su expresión en raíz en condiciones de estrés osmótico	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)
SIMBP11/ AGL15	Tomate	El silenciamiento de <i>SIMBP11</i> aumenta la sensibilidad del crecimiento de las plántulas al estrés salino.	(Guo <i>et al.</i> , 2016)
BrMADS11, 12, 14, 20, 23, 24, 36, 38, 39 40, 44, 103 y 127	<i>Brassica rapa</i>	La expresión de todos se regula por estrés por frío, 8 de estos cambian su expresión en condiciones de estrés osmótico y 6 por estrés salino.	(Saha <i>et al.</i> , 2015)
CaMADS	Pimienta	Es muy importante para la tolerancia a estrés por frío, salinidad y osmótico.	(Chen <i>et al.</i> , 2019)
LCMADS1, LCMADS2, LCMADS3 y LCMADS9	<i>Leymus chinensis</i>	Aumenta significativamente su expresión en estrés inducido con manitol 300 mM.	Jia <i>et al.</i> , 2018)
AGL15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Se induce rápidamente por estrés abiótico como salinidad, deshidratación y heridas.	(Chen <i>et al.</i> , 2019)

Debido a que las plantas son organismos sésiles, necesitan de estrategias que les ayuden a lidiar con cambios en el ambiente. Uno de los factores ambientales que más impactan en el desarrollo y crecimiento de las plantas es el estrés hídrico, que puede ser provocado por la sequía, la salinidad y el congelamiento. (Royer M., 2016). Estos tres tipos de estrés modifican el potencial del agua o estado de energía libre de las moléculas de agua y generan un estrés osmótico, afectando las actividades celulares y en ocasiones, causando la muerte de la planta. Afortunadamente las plantas han desarrollado mecanismos para lidiar con una baja disponibilidad de agua, presentando una gran cantidad de respuestas a nivel molecular, celular, fisiológico, bioquímico y morfológico. A nivel fisiológico, se aumenta la absorción del agua por el sistema radicular y se cierran las estomas para minimizar la pérdida de agua (Yu et al., 2008). A nivel celular se ha visto que la presión de turgencia de las células disminuye muy rápidamente lo que ocasiona que se detenga el crecimiento y, además, la arquitectura de las raíces cambia (Royer M., 2016). Por otro lado, en una condición de estrés osmótico, hay cambios en el ciclo de vida, ya que se retrasa el crecimiento de los brotes, ocurre un ajuste en el transporte de iones, así como síntesis de osmolitos compatibles. Se presentan cambios en las concentraciones de fitohormonas que participan en esta respuesta a estrés como son el ácido abscísico (ABA) y el etileno que, a su vez, regulan la expresión de una gran cantidad de genes que le ayudan a las plantas a contender con este tipo de estrés (Royer M., 2016). Finalmente, también se ha reportado que las auxinas pueden ayudar a contender con un estrés osmótico moderado sin afectar tanto el desarrollo de la raíz primaria (Rowe et al., 2016).

Además del ácido abscísico y el etileno, se ha visto que las auxinas son fitohormonas importantes en la respuesta al estrés hídrico, ya que plantas que crecen en estrés osmótico o salino presentan una menor concentración de auxinas, respecto a las de condiciones normales (W. Liu *et al.*, 2015; Zolla, *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha reportado que líneas mutantes que sobre expresan genes de biosíntesis de auxinas o que fueron tratadas con auxinas exógenas, presentan una mayor resistencia al estrés osmótico, respecto a sus controles (Shi *et al.*, 2014).

De manera interesante también se ha visto que al inducir un estrés osmótico o salino, se inhibe el crecimiento de la raíz primaria en *Arabidopsis* y bajan los niveles de IAA, debido a una expresión alterada de los transportadores de auxinas, (Zola *et al.*, 2010; W. Liu *et al.*, 2015; Rowe *et al.*, 2016). De igual forma ha sido reportado que el estrés osmótico afecta la expresión de *PIN1* (transportador de eflujo de auxinas) y su localización intracelular en meristemas apicales de brotes de tomate (Nakayama *et al.*, 2012) y que aumenta la internalización de las proteínas *PIN1* y *PIN2* en *Arabidopsis*, cuando las plantas se encuentran en estrés osmótico (Zwiewka, *et al.*, 2015). Por otro lado, en estudios donde se trabaja con estrés salino en *Arabidopsis*, se reporta una menor concentración de auxinas en estas condiciones de estrés, lo cual se debe a una alteración en la expresión de los transportadores de salida de auxinas *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* (W. Liu *et al.*, 2015). Finalmente, se ha visto que plantas de *Arabidopsis* tratadas con auxinas exógenas o que sobre expresan genes participantes en la biosíntesis de auxinas, tienen una mejor resistencia al estrés osmótico salino (Shi *et al.*, 2014).

En condiciones de estrés osmótico inducido con PEG, se ha reportado que disminuye la longitud de la raíz primaria de *Arabidopsis* (Rowe *et al.*, 2016) debido a una reducción en el tamaño tanto del meristemo como del número de células del mismo. Los autores plantean que una posible explicación de esto es que al estar las plantas de *Arabidopsis* en condiciones de estrés osmótico, se produce un aumento en la concentración de etileno y una baja en la concentración de auxinas en la raíz, lo cual se debe a que la expresión de tanto de *PIN1* y *PIN4* (transportadores de salida de auxinas) como de *AUX1* (transportador de entrada) disminuye, mientras que la de *PIN2* aumenta. Ellos no reportan incrementos en la concentración de citocininas por lo que asumen que la reducción del meristemo se debe a una alteración en la concentración de auxinas. En este estudio (Rowe *et al.*, 2016) logran aminorar significativamente el efecto del estrés osmótico moderado -0.37Mpa inducido con PEG, en la longitud de la raíz primaria al añadir 1 nM de IAA, ya que plantas cultivadas en estrés osmótico a las cuales se les aplicó auxinas exógenas presentan raíces significativamente más largas respecto a las que no se les añadió IAA.

PREGUNTA BIOLÓGICA

¿La regulación genética entre los genes MADS-box *XAL2*, *AGL24* y *SOC1* afecta el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* en condiciones de estrés osmótico y auxinas?

HIPÓTESIS

Los genes MADS-box *SOC1* y *AGL24* promueven el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* al igual que *XAL2* y estos tres regulan el desarrollo de la raíz primaria junto con las auxinas en condiciones de estrés osmótico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los genes *MADS-box XAL2*, *AGL24* y *SOC1* determinan la longitud de la raíz primaria de *Arabidopsis* junto con las auxinas en condiciones de estrés osmótico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar los niveles de expresión relativa de *AGL24* y *SOC1* en la raíz primaria de *Arabidopsis*.
- 2) Estudiar la expresión y localización de la proteína *AGL24* en la raíz de *Arabidopsis* en condiciones control y de estrés osmótico.
- 3) Determinar si los factores de transcripción *SOC1* y *AGL24* promueven el desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis*, y estudiar si participan en la regulación del tamaño de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico bajo, moderado, y severo junto con *XAL2*, mediante el uso de líneas mutantes sencillas, dobles y triples.
- 4) Estudiar si los genes *SOC1*, *AGL24* y *XAL2* participan en la vía de las auxinas regulando el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico.

- 5) Determinar si los niveles de expresión relativa de los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* se ven alterados en sus líneas de pérdida de función y sobreexpresoras en la raíz de *Arabidopsis* y observar si los niveles de expresión se comportan igual a los reportados en la parte aérea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas mutantes

Todas las líneas con las que se trabajó están en la accesión Columbia (Col-0). Se utilizaron las mutantes de pérdida de función *soc1-6* (SALK_138131; Wang et al., 2009), *agl24-4* (GK674F05.03/N385337), *xal2-2* (Garay-Arroyo et al., 2012) y las líneas sobreexpresoras *35S::AGL24* (Yu et al., 2004), *soc1-101D* (Lee, 2000).

Las dobles y triples mutantes fueron realizadas y genotipificadas previamente en nuestro laboratorio y durante este trabajo se obtuvieron las líneas dobles mutantes de pérdida de función y sobreexpresoras *soc1-6 agl24-4* y *35S::AGL24 soc1-101D*.

Genotipificación de la línea *soc1-6 agl24-4*

La genotipificación de esta línea se llevó a cabo por PCR y por resistencia a sulfadiazina (Figura 7). En todos los casos se muestra la secuencia de los oligos en la dirección 5´- 3´.

- Selección de la mutante *agl24-4*

Para seleccionar la mutante de *agl24-4*, se sembraron las plantas de la generación filial 2 en medio MS 0.2X, suplementado con sulfadiazina 0.35mg/L, se seleccionaron las que presentaban la resistencia a sulfadiazina: 1.3, 1.9, 1.12, 1.13, 1.19 y 4.10. Posteriormente se genotipificaron por PCR usando los oligos AGL24RKim (GTCTTCATGCAAGTAACATCAAC) y GKTDNA (CCATTTGGACGTGAATGTAGACAC) para genotipificar la inserción de tDNA en el

gen *AGL24* y los oligos AGL24FKim (GATCCAGCAGAGTTGACTTCGATGGA) y AGL24RKim (GTCTTCATGCAAGTAACATCAAC) para genotipificar el ADN endógeno y seleccionar las líneas homocigotas (Figura 7).

- Selección de la mutante *soc1-6*

Para genotipificar la mutante *soc1-6* se usaron los oligos lbb1 (TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG) y SALK 138131 R (AAGCAGAGAGAGAAGAGACGAGTG) con los cuales se genotipificó la inserción de tADN en el gen SOC1 y los oligos SALK 138131 F (TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG) y SALK 138131 R (AAGCAGAGAGAGAAGAGACGAGTG) para amplificar el ADN endógeno y seleccionar las plantas homocigotas (Figura 7).

Genotipificación de las línea 35S::*AGL24 SOC1101D*.

Para genotipificar la doble mutante *35SAGL24* y *soc1-101D* se seleccionaron por resistencia a kanamicina 50 ug/L las líneas homocigotas de la mutante *35SAGL24* y por resistencia a BASTA 6 mg/L, la línea *soc1-101D*. Para llevar a cabo la selección, se sembró la generación filial 2 en cajas con kanamicina 50 ug/L y las plantas resistentes de la generación filial 3 se sembraron en cajas con medio MS 0.2X para ambos tratamientos BASTA 6 mg/L y kanamicina 50 ug/L por separado, la planta 1.16.7 fue homocigota para ambos genes *35SAGL24* y *soc1-101D*.

Cinética de crecimiento en condiciones control, estrés osmótico y auxinas.

Para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento usamos semillas que tuviesen un tiempo de colecta lo más reciente posible y que todas fueran de una colecta menor a un año. Las semillas fueron esterilizadas con una solución de cloro comercial al 60% y tween 0.02% por 5 minutos y estratificadas a 4° C durante 2 días. Después de dos días en estratificación, las semillas se sembraron en medio MS 0.2X

(sacarosa 1%, MES 0.005%, MS 0.2% y agar 1%) al cual se le ajustó el pH a 5.6 con KOH. Estas cajas se colocaron verticalmente en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 oscuridad a 22-24°C. El día 5 después de la siembra, 40 plántulas de cada línea fueron trasplantadas a los tratamientos de la tabla 2. A fin de poder comparar la longitud de la raíz primaria para todas las líneas, se marcó la punta de la raíz durante el día 5 al 7 a la misma hora y las cajas fueron rotadas todos los días a fin de igualar las condiciones de crecimiento, empleando una n de 40 plantas. Las longitudes de las raíces fueron medidas usando el programa ImageJ para cada día. Finalmente se realizó una prueba de normalidad, un ANOVA por cada tratamiento y una prueba de Tukey en los casos en que el ANOVA indicaba diferencias entre las líneas.

Tabla 2. Tratamientos y líneas empleadas en las cinéticas de crecimiento.

Tratamientos	MS 0.2X (Control)
	MS 0.2X + Manitol 100mM
	MS 0.2X + Manitol 200mM
	MS 0.2X + Manitol 300mM
Líneas	WT Col-0
	<i>agl24-4</i>
	<i>soc1-6</i>
	<i>xal2-2</i>
	<i>soc1-101D</i>
	<i>35S::AGL24</i>
	<i>xal2-2 soc1-6</i>
	<i>xal2-2 agl24-4</i>
	<i>soc1-6 agl24-4</i>
	<i>xal2-2 soc1-6 agl24-4</i>
	<i>35S::AGL24 soc1-101D</i>

- Tratamiento con auxinas y estrés

Las semillas de las líneas *soc1-6*, *agl24-4*, *xal2-2*, *xal2-2/agl24-4* y *xal2-2/soc1-6* fueron esterilizadas con una solución de cloro comercial y tween 0.02% por 5 minutos y estratificadas a 4° C durante 3-5 días. Posteriormente, se sembraron en medio MS 0.2X (sacarosa 1%, MES, MS 0.2% y agar 1%) al cual se le ajustó el ph a 5.6 con KOH. Estas cajas se pusieron verticalmente en cámaras de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 oscuridad a 22-24°c. El día cinco después de la siembra (ds) se trasplantaron 10 plantas de cada línea a cuatro tratamientos distintos (MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con tres diferentes tratamientos: auxinas (ácido indolacético; IAA) 1nM, con Manitol 150mm y con Manitol 150mm e IAA 1nM). A fin de poder comparar la longitud de raíz primaria para todas las líneas, se marcó la punta de la raíz durante 5 a 7 días a la misma hora y las cajas fueron rotadas todos los días a fin de igualar las condiciones de crecimiento. El IAA fue diluido en etanol 100%, y, para las posteriores diluciones, se usó agua bidestilada hasta que se llegó a la concentración final 1nM en el medio antes de la gelificación. Las longitudes de las raíces fueron medidas usando el programa ImageJ y cada experimento constó de 30 plantulas. Finalmente se realizó una prueba de normalidad, un ANOVA por cada tratamiento y una prueba de Tukey en los casos en que el ANOVA indicaba diferencias entre las líneas.

Tabla. 3 Tratamientos y líneas empleadas.

Tratamientos	MS 0.2X (Control)
	MS 0.2X + Manitol 150mM
	MS 0.2X + IAA 1nM
	MS 0.2X + Manitol 150mM+ IAA 1nM
Líneas	WT Col-0
	<i>agl24-4</i>
	<i>soc1-6</i>
	<i>xal2-2</i>
	<i>xal2-2/agl24-4</i>
	<i>xal2-2/soc1-6</i>

Extracción de ARN

Para determinar la expresión relativa de los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* en la raíz de *Arabidopsis*, se utilizaron raíces de todas las líneas empleadas en la tabla 2, en un estado de desarrollo de 7 días después de la siembra. Se empleó una *n* de 30 raíces por cada placa y tres repeticiones. Las raíces fueron recolectadas y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C . La extracción de ARN se realizó utilizando el kit Quick-ARN Miniprep (Zymo Research), y se transcribieron inversamente 2 μg de ARN total con transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Análisis de expresión por medio de RT-PCR tiempo real en raíz primaria.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando 5 μl de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), oligos directos e inversos (Tabla 4) a una concentración final de 0,2 μM y 10 ng de cADN molde en un volumen de reacción total de 10 μl . Los controles sin plantilla (NTC) y las muestras se analizaron por triplicado. Todas las reacciones de qPCR se realizaron en un Instrumento StepOne de Applied Biosystems. El programa utilizado fue: 2 min a 50°C , 10 min a 95°C ; 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 30 segundos; seguido de una curva de fusión (60°C - 95°C). La eficiencia de amplificación por PCR (%) de cada gen se calculó en función de la pendiente de las curvas estándar (200 a 0,32 ng de diluciones en serie de 5 veces de ADNc de tipo silvestre) utilizando el software StepOne de Applied Biosystems. La expresión relativa de ARNm se cuantificó de acuerdo con el método comparativo $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizando ARNH, PDF2 y UPL7 como genes de control de mantenimiento, y Col-0 (WT) como línea de control.

Tabla 4. Oligos empleados en el RT-PCR

Gene	Primer name	Direction	Primer sequence
<i>RNAH</i>	RNAH_Y_qF	forward	5'-CCATTCTACTTTTTGGCGGCT-3'
	RNAH_Y_qR	reverse	5'-TCAATGGTAACTGATCCACTCTGATG-3'
<i>PDF2</i>	PDF2-F1_TR_RC	forward	5'-TAACGTGGCCAAAATGATGC-3'

	PDF2-R1_TR_RC	reverse	5'-GTTCTCCACAACCGCTTGGT-3'
<i>UPL7</i>	UPL7-F1_TR_RC	forward	5'-TTCAAATACTTGCAGCCAACCTT-3'
	UPL7-R1_TR_RC	reverse	5'-CCCAAAGAGAGGTATCACAAGAGACT-3'
<i>XAL2</i>	XAL2-Q-F2	forward	5'-GATAATTCACAGCAATCGAAGG-3'
	XAL2-Q-R2	reverse	5'-GGTTCTCCAATTGTTGTAAGTC-3'
<i>SOC1</i>	SOC1_SQ_qF2	forward	5'-CTCTCTGAAAAGTGGGGATC-3'
	SOC1_SQ_qR2	reverse	5'-AGAAGCTGGGCTACTCTCTTC-3'
<i>AGL24</i>	AGL24-Real-Time-F	forward	5'-GAGGCTTTGGAGACAGAGTCGGTGA-3'
	AGL24-Real-time-R	reverse	5'-AGATGGAAGCCCAAGCTTCAGGGAA-3'
<i>SHR</i>	QRT_SHRF	forward	5'-GCCAACGTAAAGGGTTGTTTT-3'
	QRT_SHRR	reverse	5'-TCAATCTCAAAGCCCATCATC-3'
<i>SCR</i>	QRT_SCRF	forward	5'-CTTGGACGCCTCGTTCTTAG-3'
	QRT_SCRR	reverse	5'-CCACCAATCAGGTAGCCAAT-3'
<i>PLT1</i>	QRT_PLT1F	forward	5'-CAAACCCTGGTGGTGTTC-3'
	QRT_PLT1R	reverse	5'-CTACCAAAAAGCCCCCTCTA-3'
<i>PLT2</i>	QRT_PLT2F	forward	5'-ATCCAGGAGGTGTTTTACAG-3'
	QRT_PLT2R	reverse	5'-AGAAGACTCCAGCCGATCCT-3'

Localización de la proteína *AGL24* en la raíz primaria en condiciones control y estrés osmótico moderado (100mM de manitol).

Para identificar la localización de la proteína *AGL24* en la raíz de *Arabidopsis*, se usó la construcción *pAGL24:AGL24:RFP* (Gregis V. et al., 2009). Con la ayuda de un microscopio confocal, se observó la localización de la proteína *AGL24* en la raíz primaria de plantulas de 8 días cultivadas en medio MS y manitol 100mM usando una n de 30.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de *AGL24* y *SOC1* en la raíz de *Arabidopsis*.

De acuerdo con bases de datos recabados en repositorios públicos y ensayos de RT-PCR (Figura 4 y 5), esperabamos que al igual que *XAL2*, los genes *MADS-box AGL24* y *SOC1* se expresaran en la raíz primaria de *Arabidopsis*. Conforme a lo reportado pudimos ver en los ensayos de RT-PCR, realizados en el laboratorio por la doctora Arrizubieta M., que estos genes se expresan en la raíz primaria de *Arabidopsis* (Anexo, Figura 6) y sorprendentemente se observó una expresión relativa muy alta de *SOC1* en la raíz, esto nos llamó la atención ya que en ensayos anteriores de RT-PCR en raíz se había reportado una muy baja expresión de *SOC1* en la raíz, (Lee H. et al., 2000). Esta diferencia en la expresión puede deberse a que las muestras no se tomaron en el mismo día y conforme a lo reportado, la expresión de *SOC1* es variable de acuerdo con los días que tenga la planta de germinada (Lee H. et al., 2000). Para asegurar que las muestras fueron tomadas correctamente, también se midió la expresión relativa en las hojas de *Arabidopsis* y conforme a lo reportado la expresión de *SOC1* fue muy alta en las hojas (Lee H. et al., 2000) y significativamente mayor a la de *XAL2* y *AGL24* (Figura 4). Contrario a *SOC1* la expresión relativa de *AGL24*, fue muy baja en la raíz.

Obtención de las líneas homocigotas *agl24-4 soc1-6*

Debido a que la línea *agl24-4* presenta resistencia a sulfadiazina, la generación filial 2, se sembró en medio MS 0.5X suplementado con sulfadiazina 0.7uL/ml, donde se determinó que las plantas F2. 1. 3, 1.9, 1.12, 1.13 y F2 4.10 presentaron resistencia a la sulfadiazina.

Posteriormente estas plantas fueron genotipificadas por PCR para corroborar que se encontrara la inserción de tDNA en el gen *AGL24*. Se amplificó la inserción de tADN en el gen *AGL24* (Figura 7C) y el ADN endógeno de *AGL24* (Figura 7B), para

deteminar si las plantas eran homocigotas conforme a los fragmentos de DNA esperados (Figura 5A).

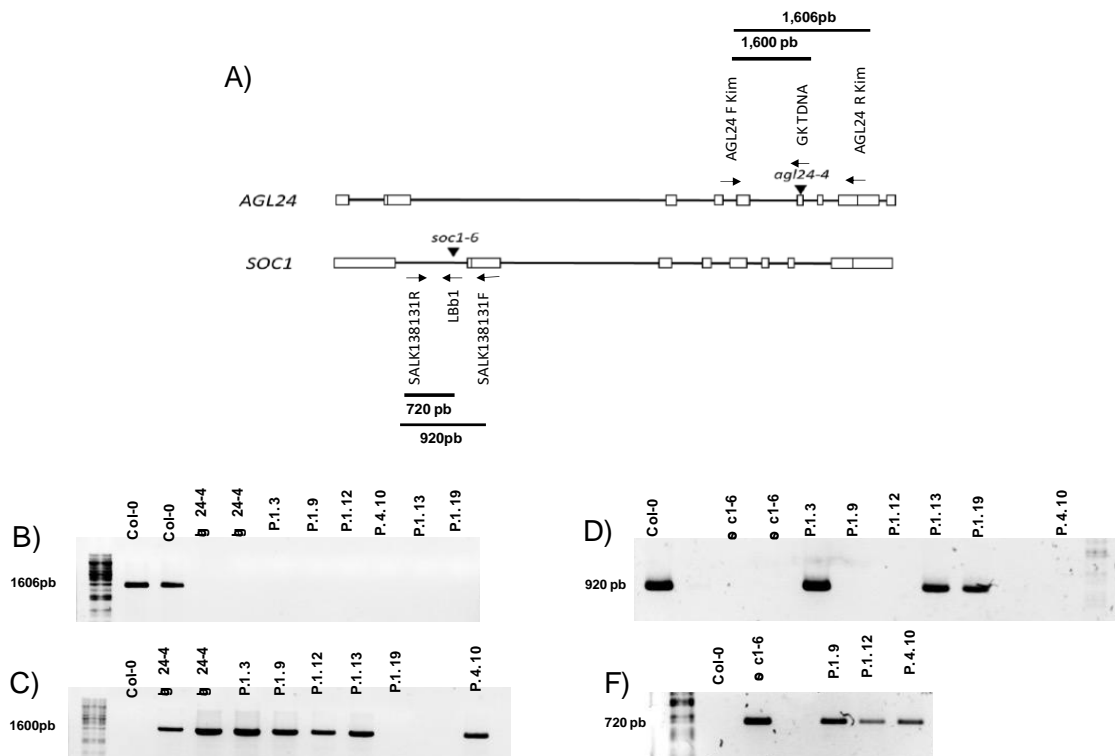


Figura 7. Genotipificación por PCR de la línea *soc1-6 agl24-4*. A) Inserciones de tADN en los genes *AGL24* y *SOC1*. Se muestran las pares de bases esperadas al amplificar la inserción y el ADN genómico de estos genes. B) Amplificación del DNA genómico de *AGL24*, C) Amplificación de la inserción de tADN en el gen *AGL24*, todas las plántulas a excepción de la 1.19, presentaron la inserción de ADN en el gen *AGL24* y fueron homocigotas. D) Amplificación del DNA genómico de *SOC1*, F) Amplificación de la inserción de tADN en el gen *SOC1*, Sólo las plántulas 1.9, 1.12 y 4.10 fueron homocigotas.

Como podemos observar en los geles (Figura 7 B y C), todas las plantulas que presentaron resistencia a sulfadiazina tenían la inserción de tDNA en el gen *AGL24* (Figura 7B) y las plantulas 1.3, 1.9, 1.12,1.13 y 4.10 fueron homocigotas para la inserción de tDNA en el gen *AGL24* (Figura 7C).

Las plantas homocigotas *agl24-4*, fueron nuevamente genotipificadas para seleccionar las homocigotas con la inserción de tDNA en el gen *SOC1*. Como se observa en los geles (Figura 7 D) sólo las plantas 1.9, 1.12 y 4.10 fueron homocigotas *soc1-6*.

A partir de esto, la planta 1.9 que fue homocigota *agl24-4* y *soc1-6*, fue la que continuamos usando para los ensayos posteriores.

Localización de la proteína AGL24 en la raíz primaria de Arabidopsis.

En un inicio el objetivo fue observar la localización de las proteínas SOC1, AGL24 y XAL2 en la raíz de Arabidopsis. Debido a falta de tiempo para terminar las construcciones, únicamente se logró observar la expresión de AGL24, usando la construcción *pAGL24:AGL24:RFP* (Gregis V. *et al.*, 2009), con la cual pudimos determinar que la proteína AGL24 se localiza entre el centro quiescente y la columela de la raíz primaria (Figura 12) y que su expresión es muy baja. Lo cual hace sentido, ya que la expresión relativa de *AGL24* fue muy baja en raíz (Figura 6), y además se ha reportado que esta proteína se degrada muy rápidamente en las hojas (Huang *et al.*, 2020).

Finalmente plantulas de Arabidopsis con la construcción *pAGL24:AGL24:RFP* (Gregis V. *et al.*, 2009), fueron sembradas en condiciones de estrés osmótico moderado inducido con manitol 100mM, con el objetivo de observar si había cambios en la localización y concentración de la proteína en las raíces, ya que como había mencionado anteriormente esta proteína es importante para regular el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico, sin embargo no observamos cambios en la concentración ni en la localización (Figura 13). Por lo que sería importante probarlo en un estrés más severo.

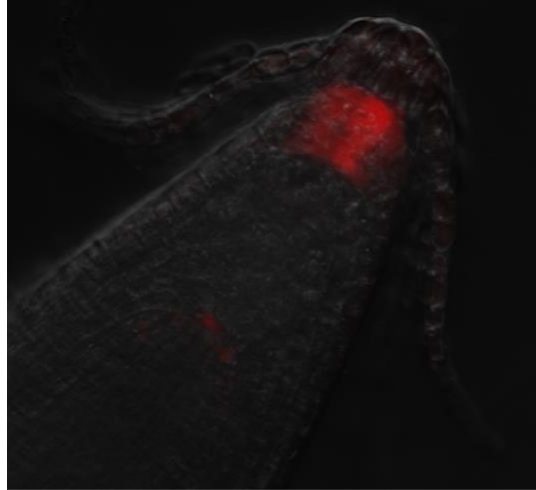


Figura 13. Localización de la proteína AGL24 en la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, usando la construcción *pAGL24:AGL24:RFP* a los 5 días de germinada. (Gregis V. et al., 2009)

Cinética de crecimiento en medio MS

Se realizó una cinética del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* con las líneas de pérdida y sobreexpresoras de los genes *SOC1* y *AGL24*, en medio MS 0.2X a fin de comprobar si los genes con dominio MADS *AGL24* y *SOC1* participan en el desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis*.

Nuestra hipótesis inicial fue que *AGL24* y *SOC1*, ayudaban a promover el crecimiento de la raíz primaria al igual que *XAL2*, ya que en parte aérea se ha reportado un fenotipo similar en las líneas de sobreexpresión y pérdida de función de estos tres genes (Liu et al., 2008; Immink et al., 2012; Pérez-Ruiz et al., 2015). En estudios previos en nuestro laboratorio se ha visto que *XAL2* es un promotor del crecimiento de la raíz primaria en *Arabidopsis*, debido a que líneas de pérdida de función de este gen (*xal2-2*), tienen raíces significativamente más cortas respecto a la WT (Garay-Arroyo, et al., 2013). Por el contrario, los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento en MS (Figura 8), mostraron que las líneas de pérdida de función de *AGL24* y *SOC1*, presentan una raíz un poco más larga que la WT pero no estadísticamente diferente. Pero de manera interesante pudimos ver que la línea *soc1-6 agl24-4*, presentó una raíz significativamente más larga que la WT y

estadísticamente diferente tanto a la WT como a las líneas *soc1-6* y *agl24-4*. Lo que sugiere que estos genes en conjunto reprimen el crecimiento de la raíz primaria probablemente de forma redundante, es decir al no expresarse *AGL24*, *SOC1* cumple el papel de ambas proteínas, y de igual forma al no estar *SOC1*, *AGL24* puede ejercer el papel de ambas en la represión, sin embargo al no expresarse *SOC1* y *AGL24*, es cuando se tiene un efecto en el fenotipo, presentando raíces significativamente más largas que la WT.

La línea sobreexpresora de *SOC1*, presentó un fenotipo de raíz muy similar al de la WT, mientras que la línea sobreexpresora de *AGL24*, presentó una raíz significativamente más larga a la WT, lo que nos indica que el nivel de expresión de *AGL24* es muy importante en la determinación de la longitud de la raíz primaria. Por lo que consideramos importante medir los niveles de expresión relativa en esta mutante.

De forma contaria, la línea *35SAGL24 SOC1101D*, presentó una raíz significativamente más corta que la WT (figura 8), lo que reafirma el papel de *SOC1* y *AGL24* como represores del crecimiento de la raíz primaria.

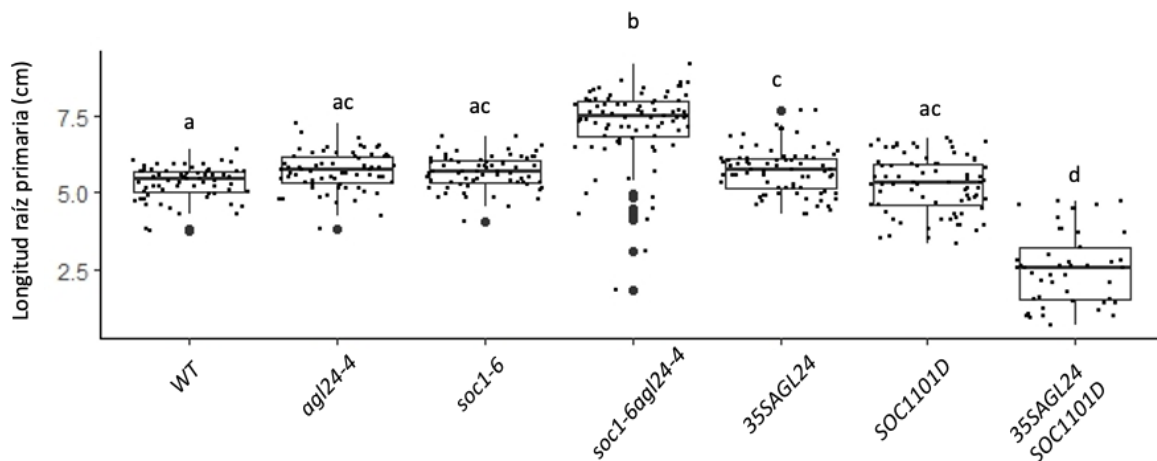


Figura 8. Cinética de crecimiento de la raíz primaria en medio MS 0.2x, de las líneas *agl24-4*, *soc1-6*, *soc1-6 agl24-4*, *35SAGL24*, *SOC1101D* y *35SAGL24 SOC1101D*. Las letras representan las diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey, post Hoc al ANOVA. En plantulas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

Posteriormente se realizó una cinética de crecimiento de las líneas *xal2-2 soc1-6*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, donde se observó que todas estas líneas presentaban una raíz significativamente más corta que la WT (Figura9).

Las líneas *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* presentaron raíces significativamente más largas que la línea *xal2-2* y más cortas que las líneas *agl24-4* y *soc1-6*, lo que nos indica que *XAL2* participa en una vía independiente a *SOC1* y *AGL24* en la determinación del tamaño de la raíz. Finalmente la línea *xal2-2 agl24-4 soc1-6* presentó raíces significativamente más largas que *xal2-2* y más cortas que la línea *soc1-6 agl24-4*, lo que indica que *XAL2* actúa como promotor en el crecimiento final de la raíz en la línea *soc1-6 agl24-4* y que *SOC1* y *AGL24* funcionan como represores en el crecimiento final en la línea *xal2-2*.

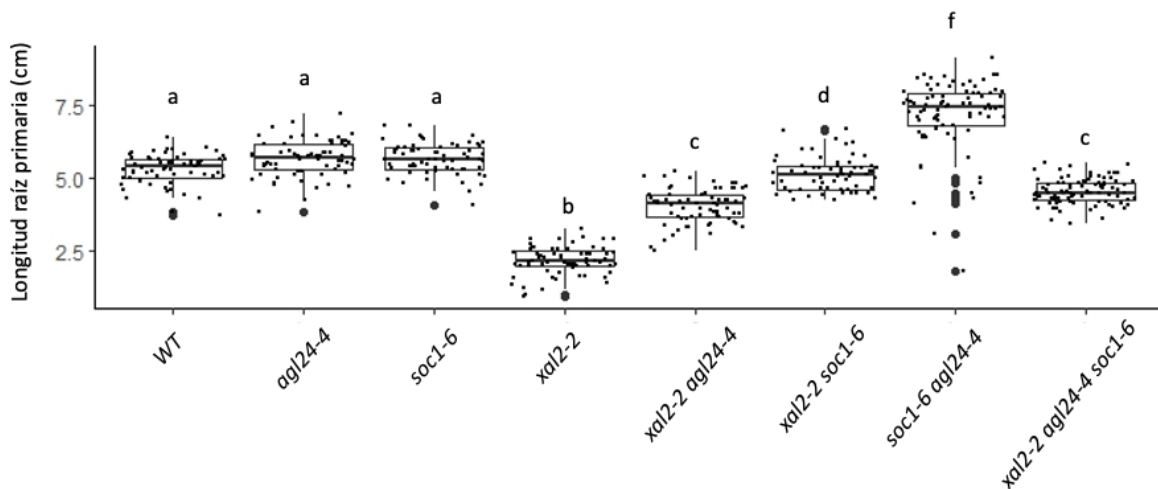


Figura 9. Cinética de crecimiento de la raíz primaria en medio MS 0.2x, de las líneas *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2*, *xal2-2 agl24-4*, *xal2-2 soc1-6*, *soc1-6 agl24-4* y *xal2-2 agl24-4 soc1-6*. Las letras representan las diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey, post Hoc al ANOVA de tres factores. En plantulas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

Cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés osmótico.

Con el objetivo de comprobar si la expresión de los genes *MADS XAL2*, *SOC1* y *AGL24*, determinan el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico, se realizaron cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés inducido con manitol a diferentes concentraciones 100mM (estrés bajo), manitol 200mM (estrés moderado) y manitol 300mM (estrés severo) empleando las diferentes líneas (Tabla 2).

Conforme a lo reportado (Rowe et al., 2016), observamos que el estrés osmótico causó una disminución significativa en la longitud de la raíz primaria (Figura 10). Y que a mayor concentración de manitol menor era la longitud de la raíz.

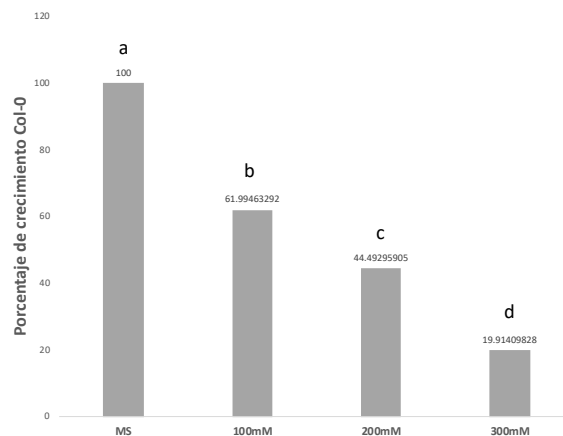


Figura 10. Porcentaje de crecimiento del ecotipo Columbia, en manitol 100mM, (estrés bajo), manitol 200mM (estrés moderado) y manitol 300mM (estrés severo). Las letras representan las diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey, post Hoc al ANOVA, en plantas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

En el caso del estrés osmótico bajo (Figura 11), se observó que sobreexpresar los genes *SOC1* y *AGL24*, ayuda a contener el efecto del estrés osmótico en el tamaño de la raíz primaria. Ya que la línea sobreexpresora *35SAGL24 SOC1101D*, tuvo un mayor porcentaje de crecimiento respecto a su control en MS, al compararlo con todas las otras líneas y la WT (Figura 11). Resulta interesante que la sobreexpresión única de *AGL24* ó *SOC1* en las líneas *35SAGL24* y *SOC1101D*, no es suficiente para contener el efecto del estrés osmótico en el tamaño de la raíz, ya que como

puede verse en la figura 11, estas líneas no presentaron diferencias significativas respecto a la WT.

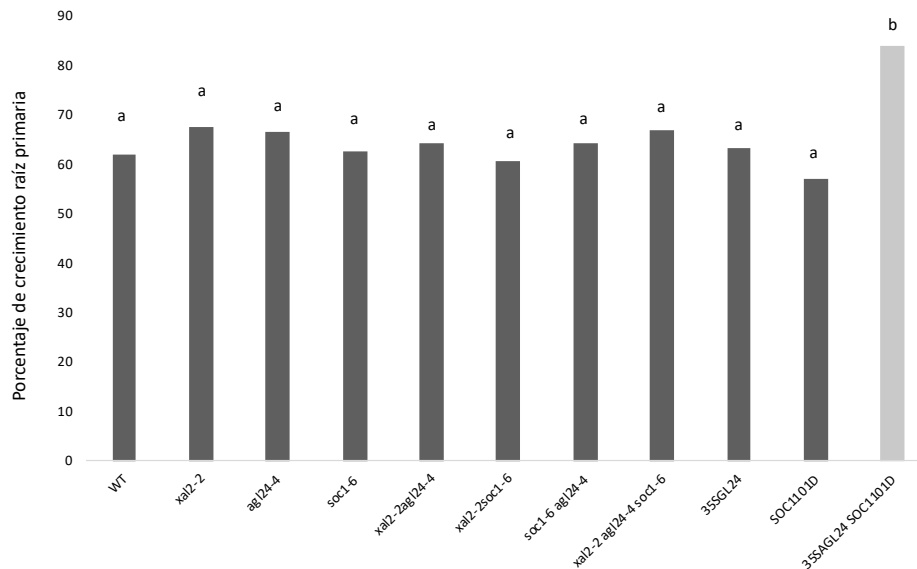


Figura 11. Porcentaje de crecimiento de las líneas *xal2-2*, *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4*, *xal2-2 soc1-6*, *soc1-6 agl24-4*, *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, *35SAGL24*, *SOC1101D* y *35SAGL24 SOC1101D*, en manitol 100mM, respecto a su control en MS. Las letras representan las diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey, post Hoc al ANOVA, en plantas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

Las cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés moderado inducido con manitol 200mM, mostraron que de igual forma, la línea *35SAGL24 SOC1101D*, presentó un porcentaje de crecimiento significativamente mayor respecto a su control en MS, al compararlo con todas las otras líneas y la WT, igual a lo que ocurre en manitol 100mM. Por el contrario se observó que la línea sobreexpresora *SOC101D*, presentó un menor porcentaje de crecimiento de la raíz primaria respecto a su control en MS al compararlo con la WT, pero no estadísticamente diferente a la línea sobreexpresora de *AGL24*, lo que sugiere que para que se pueda ayudar a contener el efecto del estrés osmótico moderado en el tamaño de la raíz primaria es necesaria la sobreexpresión de *SOC1* y *AGL24* igual a lo que ocurre en

estrés bajo. Respecto a las otras líneas, al igual que en estrés osmótico bajo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento de la raíz al compararlas con la WT.

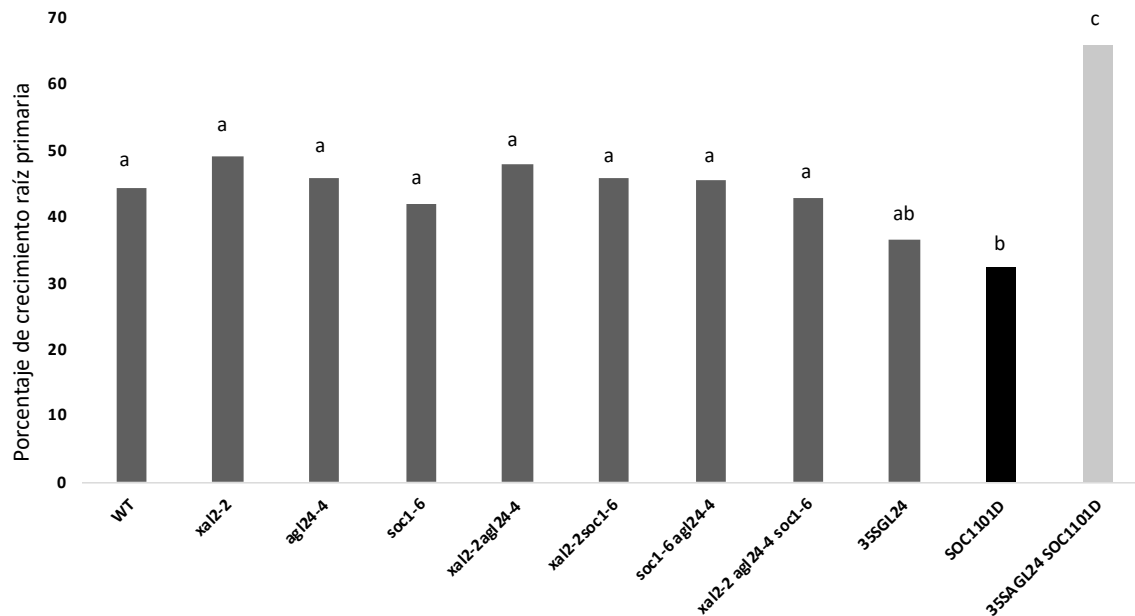


Figura 11. Porcentaje de crecimiento de las líneas *xal2-2*, *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4*, *xal2-2 soc1-6*, *soc1-6 agl24-4*, *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, *35SAGL24*, *SOC1101D* y *35SAGL24 SOC1101D*, en manitol 200mM, respecto a su control en MS. Las letras representan las diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey, post Hoc al ANOVA, en plantas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

Finalmente realizamos una cinética de crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico severo inducido con manitol 300mM. En estas condiciones de estrés observamos que todas las líneas a excepción de *xal2-2*, presentaron un crecimiento de la raíz primaria muy similar al de WT (Figura 12). La línea de pérdida de función de *XAL2*, *xal2-2*, presentó un porcentaje de crecimiento mayor al de la WT y al de las otras líneas en estas condiciones. Lo que sugiere que *XAL2*, actúa como represor del crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico severo. Mientras que *AGL24* y *SOC1*, actúan como promotores del crecimiento en *xal2-2*, ya que las líneas *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*, no

presentaron diferencias respecto a la WT a pesar de no estar presente XAL2. Resulta interesante ver que en este tipo de estrés tan alto, el aumentar la expresión de *AGL24* y *SOC1*, ya no ayuda a contener el efecto del estrés osmótico en el tamaño final de la raíz primaria, como en el caso de estrés osmótico bajo y moderado.

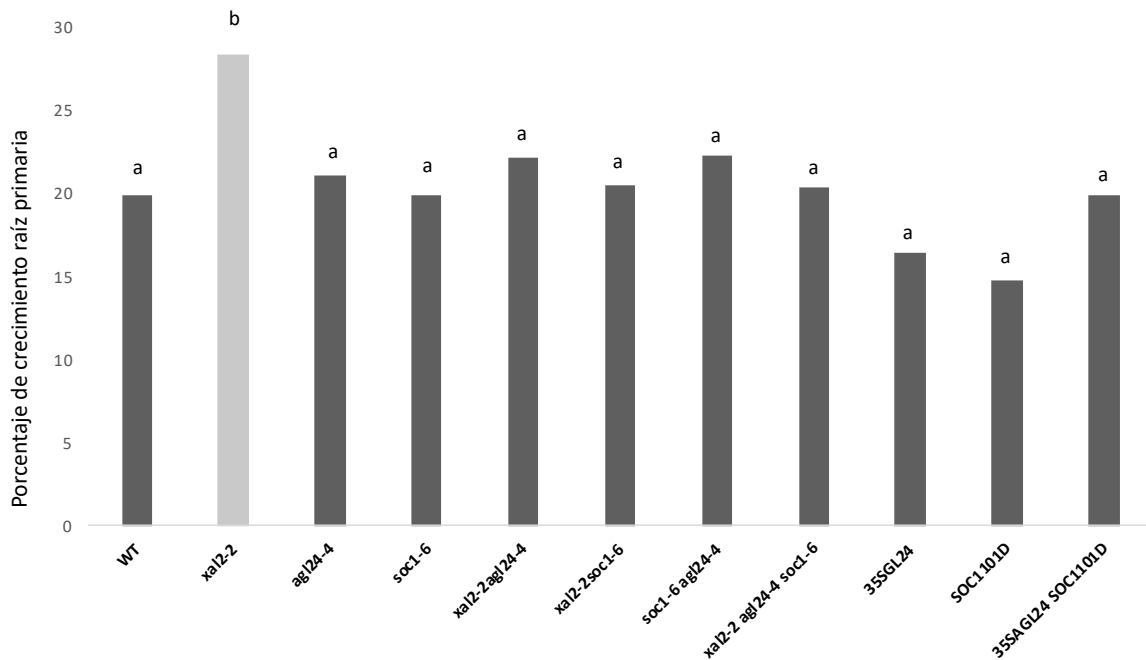


Figura 12. Porcentaje de crecimiento de las líneas *xal2-2*, *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4*, *xal2-2 soc1-6*, *soc1-6 agl24-4*, *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, *35SAGL24*, *SOC1101D* y *35SAGL24 SOC1101D*, en manitol 300mM, respecto a su control en MS. Las letras representan las diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey, post Hoc al ANOVA, en plántulas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

Cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés osmótico y auxinas

Con el objetivo de estudiar si los genes *SOC1*, *AGL24* y *XAL2* participan en la vía de las auxinas regulando el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico, se realizó una cinética de crecimiento de las líneas *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* en cuatro condiciones de crecimiento MS 0.2X (control), MS con IAA 1nM, Manitol 150mM y Manitol 150mM con IAA 1nM,

empleando una n de 30 plantulas. Las plantulas fueron germinadas en medio MS 0.2 X durante 5 días y posteriormente trasplantadas a los tratamientos mencionados por 7 días

Todas las líneas mutantes así como la planta WT, presentaron una disminución en la longitud promedio de la raíz primaria cuando las plantulas eran sembradas en condiciones de estrés osmótico inducido con manitol 150mM.

En el caso del medio MS suplementado con auxinas no hubo diferencias respecto a las condiciones control.

Finalmente se calculó el porcentaje de crecimiento que tuvo la raíz primaria de cada línea en condiciones de estrés osmótico inducido con manitol 150mM y condiciones de estrés con auxinas, a fin de determinar si había diferencias entre ambos tratamientos, realizando una prueba de T. Conforme a lo reportado (Rowe et al., 2016), esperabamos que las auxinas disminuyeran el efecto del estrés osmótico en el tamaño final de la raíz primaria de la WT, y se tuviera un porcentaje de crecimiento mayor en el medio con manitol y auxinas, ya que se ha reportado que las plantulas que crecen en condiciones de estrés osmótico, presentan una menor concentración de auxinas, respecto a las de condiciones normales (W. Liu *et al.*, 2015; Zolla, *et al.*, 2010). Sin embargo no hubo diferencias significativas entre el tamaño de la WT en condiciones de estrés y de estrés con auxinas. Esta diferencia podría deberse al proceso técnico, ya que en esta publicación (Rowe et al., 2016) emplean PEG para inducir estrés osmótico y no añadieron sacarosa al medio donde crecian sus plantas.

De manera interesante observamos que la línea *xal2-2 soc1-6*, presentó un crecimiento significativamente menor al crecer en condiciones de estrés osmótico con auxinas respecto a su crecimiento en manitol. Lo que indica que al no estar presente *XAL2* y *SOC1*, las auxinas exógenas en esta concentración 1nM, actúan como represoras del crecimiento en condiciones de estrés. Y que *XAL2* y *SOC1*, inhiben el efecto de las auxinas como represoras del crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico, probablemente de forma redundante, ya que las

líneas *xal2-2* y *soc1-6* no se vieron afectadas. De igual forma sería interesante medir la concentración y localización de las auxinas en esta línea en condiciones de estrés osmótico, así como realizar cinéticas de crecimiento de *xal2-2 soc1-6* con inhibidores de auxinas.

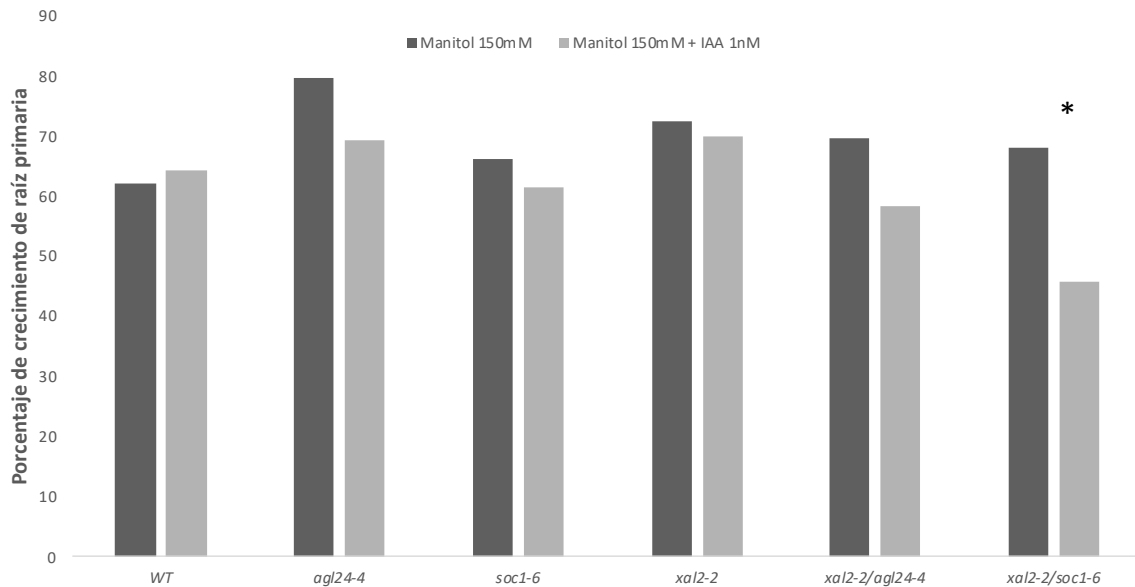


Figura 13. Porcentaje de crecimiento de la raíz primaria de las líneas *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*, en Manitol 150mM y Manitol 150mM + IAA 1nM, respecto a su control, MS 0.2X y MS 0.2X+ IAA 1nM. El asterisco representa diferencias significativas entre el porcentaje de crecimiento en Manitol 150mM y Manitol 150mM + IAA 1nM al realizar un prueba de t-student bilateral $p < 0.05$. En plantulas de 7 días después del trasplante a los tratamientos.

Regulación transcripcional entre los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* en raíz.

Por otro lado, quisimos ver los niveles de expresión relativa de todos los alelos con los que trabajamos ya que consideramos que algunos fenotipos se podrían explicar por los niveles de expresión. Los experimentos de RT-PCR fueron realizados en el laboratorio, por la doctora Arrizubieta, M. y aparecen el anexo, ya que fue un proyecto en conjunto. Como se puede ver en el (Anexo, Figura 14), la mutante

sencilla *agl24-4* presentó una expresión casi nula en la raíz, mientras que la mutante *soc1-6*, presentó un nivel muy bajo de expresión.

Posteriormente se midieron los niveles de expresión de *XAL2*, *AGL24* y *SOC1*, en donde esperabamos ver que la regulación transcripcional ocurriera similar a lo reportado en la parte aérea (Figura 3), en donde *SOC1* y *AGL24* se regulan positivamente entre sí, y *XAL2* regula tanto positiva como negativamente la expresión de *AGL24* y *SOC1* de acuerdo a los niveles de expresión de este (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015).

Los resultados de las RT-PCR (Anexo, Figura 15) mostraron que la regulación transcripcional en la raíz es diferente a lo que ocurre en la parte aérea de *Arabidopsis* (Anexo, Figura 16). La línea *xal2-2*, presentó niveles significativamente más bajos de *AGL24* respecto a la WT, lo que indica que *XAL2* actúa regulando positivamente la expresión de *AGL24* algo que no ocurre en la parte aérea de la planta. Mientras que la línea *agl24-4*, presentó niveles de expresión significativamente más altos de *SOC1* y *XAL2*, respecto al control, lo que sugiere que *AGL24*, actúa como represor de la expresión de *XAL2* y *SOC1* en raíz, algo que tampoco ocurre en la parte aérea. De igual forma la línea *soc1-6*, presentó niveles muy altos de *XAL2*, lo que indica que *SOC1* actúa como represor de la expresión de *XAL2*, algo que tampoco se presenta en la parte aérea de las plantas.

De manera interesante la línea *agl24-4 soc1-6*, presenta niveles significativamente altos de *XAL2*, cerca del doble de los que presentan las líneas *soc1-6* y *agl24-4*, lo cual nos parece interesante ya que anteriormente se ha reportado que *XAL2* es un promotor del crecimiento de la raíz primaria (Garay-Arroyo, *et al.*, 2013) y esto puede ayudar a explicar el fenotipo de raíz larga que tiene esta línea. Mientras que las líneas *xal2-2 agl24-4*, *xal2-2 soc1-6* y *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, presentan niveles bajos de expresión de *XAL2*, y un fenotipo de raíz significativamente más corto que la WT y la línea *soc1-6 agl24-4*.

De forma contraria, la línea *xal2-2*, presenta niveles de expresión muy bajos de *XAL2*, y niveles bajos de *AGL24*, sin embargo la expresión de *SOC1* se mantiene muy similar a la de la WT, lo cual puede estar ocasionando el tamaño pequeño de

raíz ya que como habíamos visto en las cinéticas *SOC1* actúa como un represor del crecimiento.

Finalmente es importante recordar que en las cinéticas de crecimiento en MS las líneas *xal2-2 agl24-4*, y *xal2-2 agl24-4 soc1-6* presentaron el mismo fenotipo de raíz, significativamente más cortas que la línea *xal2-2 soc1-6*. Lo cual puede deberse a que estas dos líneas presentan niveles sumamente bajos de *XAL2*, aún menores a los de *xal2-2 soc1-6*, y *XAL2* es un promotor del crecimiento de la raíz.

CONCLUSIONES

Se determinó que los genes MADS-box, *AGL24* y *SOC1*, se expresan en la raíz primaria de *Arabidopsis* y que la expresión de *SOC1* es muy alta en la raíz, aún mayor a la de *XAL2*. Mientras que la expresión de *AGL24* fue significativamente menor a la de *XAL2* y *SOC1*.

La proteína *AGL24* presenta una expresión baja en el centro quiescente y la columela de la raíz primaria. La localización y expresión de esta proteína no presenta diferencias en condiciones de estrés osmótico bajo respecto a condiciones control, aunque sería interesante probar concentraciones de estrés osmótico más altas.

Contrario a lo que esperamos, *AGL24* y *SOC1* actúan como represores del crecimiento de la raíz primaria, a diferencia de *XAL2* que es un promotor del crecimiento de la raíz (Garay-Arroyo et al., 2013). Y a partir de las cinéticas, pudimos concluir que *XAL2*, actúa en una vía alterna a *AGL24* y *SOC1* para determinar el crecimiento de la raíz.

Respecto a las cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés osmótico, se concluyó que, el estrés causa una disminución significativa en la longitud de la raíz primaria, a mayor estrés menor tamaño tiene las raíces. También se observó que la sobreexpresión de *AGL24* y *SOC1*, puede ayudar a contener significativamente los efectos del estrés osmótico en el crecimiento de la raíz, en condiciones de estrés bajo y moderado. Sin embargo en condiciones de estrés osmótico muy alto

sobreexpresar estos genes ya no es suficiente para promover el crecimiento de la raíz.

La línea de pérdida de función de *XAL2*, *xal2-2*, presentó un porcentaje de crecimiento mayor al de la WT y al de las otras líneas en condiciones de estrés osmótico severo. Lo que indica que *XAL2*, actúa como represor del crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico severo.

Se determinó que *XAL2* y *SOC1*, inhiben el efecto de las auxinas como represoras del crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico, ya que la línea *xal2-2 soc1-6*, presenta raíces más cortas al crecer en condiciones de estrés osmótico con auxinas respecto a sólo condiciones de estrés.

La regulación transcripcional entre los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* en raíz es muy diferente a lo que ocurre en la parte aérea de *Arabidopsis*. En raíz *XAL2* actúa regulando positivamente la expresión de *AGL24*, *AGL24* actúa como represor de la expresión de *XAL2* y *SOC1* y finalmente *SOC1* actúa como represor de la expresión de *XAL2*.

Los ensayos de RT-PCR, nos ayudaron a entender mejor la regulación de los genes en la raíz, ya que pudimos ver que la línea *agl24-4 soc1-6* presentó niveles sumamente altos de *XAL2*, lo que puede ayudar a explicar el fenotipo de raíz larga debido a que este gen promueve el crecimiento de la raíz. Mientras que de forma contraria, la línea *xal2-2*, presentó niveles de *SOC1* muy similares a los de la WT, el cuál es un represor del crecimiento de la raíz primaria (de acuerdo a las cinéticas de crecimiento que se realizaron) y explicando el fenotipo de raíz corta en *xal2-2*. Finalmente las líneas *xal2-2 agl24-4*, y *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, presentaron niveles sumamente bajos de *XAL2*, aún menores a los de *xal2-2 soc1-6*, lo que explica que *xal2-2 agl24-4*, y *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, presenten fenotipos muy similares y raíces más cortas a las de *xal2-2 soc1-6*, ya que como mencioné anteriormente *XAL2* promueve el crecimiento de la raíz.

LITERATURA CONSULTADA

Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C. J., Blankestijn-de Vries, H., & Koornneef, M. (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 164(2), 711–729.

Alvarez-Buylla, E. R., García-Ponce, B., & Garay-Arroyo, A. (2006). Unique and redundant functional domains of APETALA1 and CAULIFLOWER, two recently duplicated *Arabidopsis thaliana* floral MADS-box genes. *JouARNI of Experimental Botany*, 57(12), 3099–3107.

Alvarez-Buylla, E. R., Pelaz, S., Liljegren, S. J., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., ... Yanofsky, M. F. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5328–5333.

Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A., Singh, V., Tyagi, A. K., & Kapoor, S. (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*, 8(1), 242.

Bartel, B. (1997). AUXIN BIOSYNTHESIS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 51–66

Baumann, E., Lewald, J., Saedler, H., Schulz, B., & Wisman, E. (1998). Successful PCR-based reverse genetic screens using an En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5–6), 729–734.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433(7021), 39–44.

Boer, D. R., Freire-Rios, A., van den Berg, W. A. M., Saaki, T., Manfield, I. W., Kepinski, S., ... Coll, M. (2014). Structural Basis for ADN Binding Specificity by the Auxin-Dependent ARF Transcription Factors. *Cell*, 156(3), 577–589.

Castelán-Muñoz, N., Herrera, J., Cajero-Sánchez, W., Arrizubieta, M., Trejo, C., García-Ponce, B., Sánchez, M. P., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2019). MADS-Box Genes Are Key Components of Genetic Regulatory Networks Involved in Abiotic Stress and Plastic Developmental Responses in Plants. *Frontiers in plant science*, 10, 853.

Chen, R., Ma, J., Luo, D., Hou, X., Ma, F., Zhang, Y., ... Guo, W. (2019). CaMADS, a MADS-box transcription factor from pepper, plays an important role in the response to cold, salt, and osmotic stress. *Plant Science*, 280(November 2018), 164–174.

Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M.M., and Colombo, L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 54: 1037–1048.

Comstock J.P. (2002) Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *JouARNI of Experimental Botany*, 53, pp. 195-200

de Folter, S., Immink, R. G. H., Kieffer, M., Parenicová, L., Henz, S. R., Weigel, D., ... Angenent, G. C. (2005). Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *The Plant Cell*, 17(5), 1424–1433.

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. (1993) *Development*. 119(1):71-84.

Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., & Forde, B. G. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 222(4), 730–742.

Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., ... Álvarez-Buylla, E. R. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *The EMBO Journals*, 32(21), 2884–2895.

Giovannoni, J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16 (suppl.): S170–S180.

Gomes, G., & Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 23(6), 894–904.

Grebe, M., Petersson, S. V., Sandberg, G., Johansson, A. I., Ljung, K., Benfey, P. N., ... Kowalczyk, M. (2009). An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *The Plant Cell Online*, 21(6), 1659–1668.

Gregis V., Sessa A., Dorca-Fornell C., Kater M. (2009) The Arabidopsis floral meristem identity genes AP1, AGL24 and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes. *The Plant JouARNI* 60, 626–637.

Guo, X., Chen, G., Cui, B., Gao, Q., Guo, J.-E., Li, A., ... Hu, Z. (2016). Solanum lycopersicum agamous-like MADS-box protein AGL15-like gene, SIMBP11, confers salt stress tolerance. *Molecular Breeding*, 36(9), 125.

Hardtke, C. S., & Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *The EMBO JouARNI*, 17(5), 1405–1411.

Huang N, Tien H, Yu T. (2020.) The movement of a leaf-derived mobile *AGL24* mRNA specifies floral organ identity in Arabidopsis. *bioRxiv*.

Ikeda, Y., Men, S., Fischer, U., Stepanova, A. N., Alonso, J. M., Ljung, K., & Grebe, M. (2009). Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in Arabidopsis. *Nature Cell Biology*, 11(6), 731–73

Ioio, R. D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., ... Sabatini, S. (2008). A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science*, 322(5906), 1380–1384.

Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237–243.

Jia, J., Zhao, P., Cheng, L., Yuan, G., Yang, W., Liu, S., ... Li, X. (2018). MADS-box family genes in sheepsgrass and their involvement in abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*, 18(1), 42

Kaufmann, K., Melzer, R., & Theißen, G. (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 347(2), 183–198.

Khong, G. N., Pati, P. K., Richaud, F., Parizot, B., Bidzinski, P., Mai, C. D., ... Gantet, P. (2015). OsMADS26 Negatively Regulates Resistance to Pathogens and Drought Tolerance in Rice. *Plant Physiology*, 169(4), 2935–2949

Kimura, Y., Aoki, S., Ando, E., Kitatsuji, A., Watanabe, A., Ohnishi, M., ... Kinoshita, T. (2015). A Flowering Integrator, SOC1, Affects Stomatal Opening in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 56(4), 640–649

Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.04086.x>

Lee, Byeong-ha., H. D. and Z. J.-K. (2005). The *Arabidopsis* Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *THE PLANT CELL ONLINE*, 17(1), 3155–3175.

Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M., & Lee, I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes & development*, 14(18), 2366–2376.

Lee, J., Oh, M., Park, H., & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. *The Plant Journal*, 55(5), 832–843.

Lee J., Lee I., May (2010), Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator, *JouARNI of Experimental Botany*, Pages 2247–225.

Lee, Y., Lee, W. S., & Kim, S.-H. (2013). Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. *JouARNI of Experimental Botany*, 64(5), 1153–1165.

Liu, C., Chen, H., Er, H. L., Soo, H. M., Kumar, P. P., Han, J.-H., ... Yu, H. (2008). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development*, 135(8), 1481–1491.

Liu, J., Mehdi, S., Topping, J., Tarkowski, P., & Lindsey, K. (2010). Modelling and experimental analysis of hormonal crosstalk in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology*, 6, 373.

Liu, W., Li, R.-J., Han, T.-T., Cai, W., Fu, Z.-W., & Lu, Y.-T. (2015). Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 168(1), 343–356.

- Ljung, K., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (2002). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28(4), 465–474.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 17(4), 1090–1104.
- Masiero, S., Colombo, L., Grini, P. E., Schnittger, A., & Kater, M. M. (2011). The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction. *The Plant Cell*, 23(3), 865–872.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5389), 662, 679–682.
- Meyerowitz, E. M. (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology*, 125(1), 15–19.
- Messenguy, F., & Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, 316, 1–21.
- Michaels, S. D., Amasino, R. M., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., ... Colombo, L. (1999). Flowering Locus C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *THE PLANT CELL ONLINE*, 11(5), 949–956.
- Michaels, S. D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M., & Amasino, R. M. (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vein patterning. *The Plant Journal for cell and molecular biology*, 33(5), 867–874.
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5997), 1306–1311.
- Müssig, C., Shin, G. H., & Altmann, T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 133(3), 1261–1271.
- Nakayama, N., Smith, R. S., Mandel, T., Robinson, S., Kimura, S., Boudaoud, A., & Kuhlemeier, C. (2012). Mechanical Regulation of Auxin-Mediated Growth. *Current Biology*, 22(16), 1468–1476.
- Nawy, T., Lee, J.-Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malamy, J. E., ... Benfey, P. N. (2005). Transcriptional Profile of the *Arabidopsis* Root Quiescent Center. *THE PLANT CELL ONLINE*, 17(7), 1908–1925.
- Ng, M., and Yanofsky, M.F. (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev. Genet.* 2: 186–195.
- Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov, V. B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I. A., ... Garay-Arroyo, A. (2016). Longitudinal zonation pattern in *Arabidopsis* root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany*, 118(4), 763–776.
- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., Scheible, W., & Lu, Y.-T. (2002a). Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 129(3), 954–956.

- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., Scheible, W., & Lu, Y.-T. (2002b). Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 129(3), 954–956.
- Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., ... 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.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200–203.
- Pérez-Ruiz, R. V., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., Ugartechea-Chirino, Y., Villajuana-Bonequi, M., de Folter, S., ... Álvarez-Buylla, E. R. (2015). XAANTAL2 (AGL14) Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network that Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions. *Molecular Plant*, 8(5), 796–813.
- Petricka, J. J., Winter, C. M., & Benfey, P. N. (2012). Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 563–590.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., ... Yu, G. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5499), 2105–2110.
- Riechmann, J. L., Krizek, B. A., & Meyerowitz, E. M. (1996). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 4793–4798.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., & Yu, G. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5499), 2105–2110.
- Rounsley, S. D., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *The Plant Cell*, 7(8), 1259–1269.
- Royer, M., Cohen, D., Aubry, N., Vendramin, V., Scalabrin, S., Cattonaro, F., Bogeat-Triboulot, M. B., & Hummel, I. (2016). The build-up of osmotic stress responses within the growing root apex using kinematics and ARN-sequencing. *JouARNI of experimental botany*, 67(21), 5961–5973
- Rowe, J. H., Topping, J. F., Liu, J., & Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist*, 211(1), 225–239.
- Saha, G., Park, J.-I., Jung, H.-J., Ahmed, N. U., Kayum, M. A., Chung, M.-Y., ... Nou, I.-S. (2015). Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to organ development and stress resistance in *Brassica rapa*. *BMC Genomics*, 16(1), 178.

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., ... Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*, 37(5), 501–506. <https://doi.org/10.1038/ng1543>

Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., & Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 209–217.

Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C., & Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development (Cambridge, England)*, 139(17), 3081–3098.

Tapia-Lopez, R., Garcia-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Perez-Ruiz, R. V., Kim, S.-H., ... Alvarez-Buylla, E. R. (2008). An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(3), 1182–1192.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815 (2000).

Theißen, G., Melzer, R., & Rümpler, F. (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development*, 143(18), 3259–3271.

Theissen, G., Kim, J. T., & Saedler, H. (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *JouARNI of Molecular Evolution*, 43(5), 484–516.

Theissen, Günter, Becker, A., Rosa, A. Di, Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., ... Saedler, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 42). Retrieved from [h](#)

Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., & Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development (Cambridge, England)*, 132(20), 4521–4531.

Whipple, C.J., Ciceri, P., Padilla, C.M., Ambrose, B.A., Bandong, S.L., and Schmidt, R.J. (2004). Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*. *Development* 131: 6083–6091.

Xiong, L., & Zhu, J.-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 131–139. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00782.x>

Yu, H., Xu, Y., Tan, E. L., & Kumar, P. P. (2002). AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16336–16341.

Yu, L., Chen, X., Wang, Z., Wang, S., Wang, Y., Zhu, Q., Li, S., & Xiang, C. (2013). *Arabidopsis* enhanced drought tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11 confers drought tolerance in transgenic rice without yield penalty. *Plant physiology*, 162(3), 1378–1391.

Zhang, H., and Forde, B.G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407–409.

Zhang, Z., Li, H., Zhang, D., Liu, Y., Fu, J., Shi, Y., ... Li, Y. (2012). Characterization and expression analysis of six MADS-box genes in maize (*Zea mays* L.). *JouARNI of Plant Physiology*, 169(8), 797–806.

Zhang, S., Wang, D., Zhang, H., Skaggs, M. I., Lloyd, A., Ran, D., An, L., Schumaker, K. S., Drews, G. N., & Yadegari, R. (2018). FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED-Polycomb Repressive Complex 2 Plays a Dual Role in Regulating Type I MADS-Box Genes in Early Endosperm Development. *Plant physiology*, 177(1), 285–299. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00534>

Zluhan Martínez, Estephania, sustentante Papel de XAANTAL1 en módulos que regulan la proliferación y la diferenciación celular durante el desarrollo de la raíz de *arabidopsis thaliana* / 2017

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox.

Zolla, G., Heimer, Y. M., & Barak, S. (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *JouARNI of Experimental Botany*, 61(1), 211–224.

Zwiewka, M., Nodzyński, T., Robert, S., Vanneste, S., & Friml, J. (2015). Osmotic Stress Modulates the Balance between Exocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 8(8), 1175–1187.

ANEXO

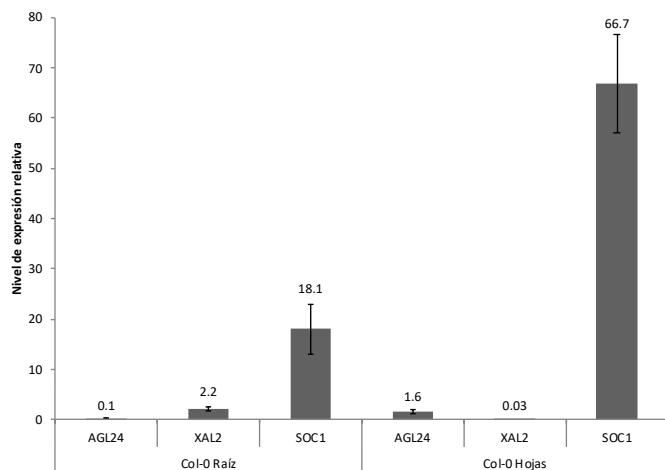


Figura 6 . Expresión relativa de *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* en la raíz y hojas de *Arabidopsis thaliana* en plantulas de 7 días, usando *RNAH* como gen de referencia. (Arrizubieta M., en proceso de publicación).

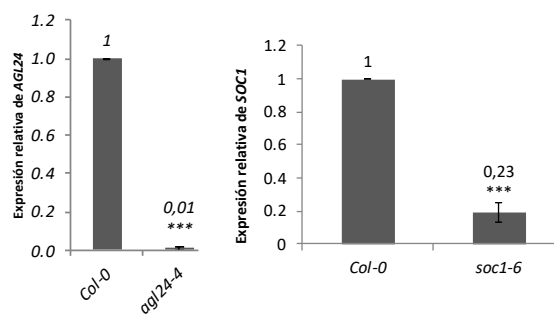


Figura 14. Expresión relativa de *AGL24* y *SOC1* las líneas *agl24-4* y *soc1-6* en la raíz de plantulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 días. Usando *RNAH*, *PDF2* y *UPL7* como genes de referencia. Los asteriscos representan diferencias significativas al realizar una t de student ($P < 0.01$, *** $P < 0.001$), en plantulas de 7 días., comparando cada línea con la WT. (Arrizubieta M., en proceso de publicación).

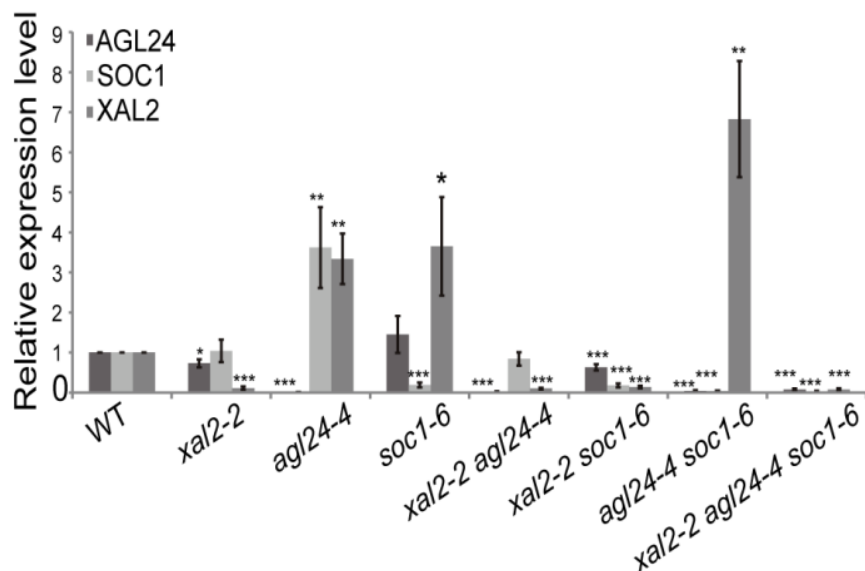


Figura 15. Expresión relativa de XAL2, AGL24 y SOC1 en las diferentes líneas, Las muestras fueron tomadas de la raíz de plantulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 días. Usando *RNAH*, *PDF2* y *UPL7* como genes de referencia. Los asteriscos representan diferencias significativas al realizar una t de student ($P < 0.01$, *** $P < 0.001$), en plantulas de 7 días., comparando cada línea con la WT. (Arrizubieta M., en proceso de publicación).

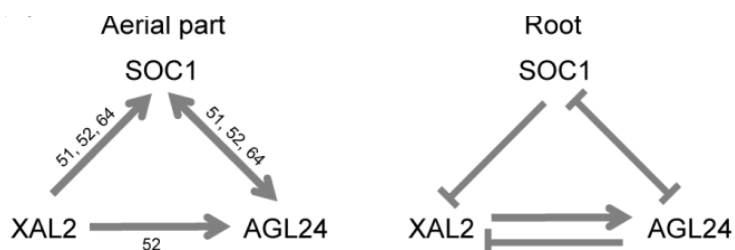


Figura 16. Modelo de regulación entre los genes *XAL2*, *AGL24* y *SOC1* en la parte aérea de la planta y en la raíz de *Arabidopsis*. Las flechas y barras indican la inducción o represión. (Arrizubieta M., en proceso de publicación).