UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

"ESTUDIO DEL DESARROLLO VEGETATIVO Y REPRODUCTIVO DE *Arabidopsis thaliana* POR EFECTO DE LA INSULINA"

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

Presenta:

ERNESTO RODRÍGUEZ ANDRADE

Asesora:

D.C. Elda Beltrán Peña

COMITÉ TUTORAL:
D.C. Ernesto García Pineda
D.C. José López Bucio
D.C. Homero Reyes de la Cruz
SUPLENTES:
D.C. Eduardo Valencia Cantero
D.C. Luis Chacón García

MORELIA, MICHOACÁN, JUNIO 2012

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN 1

I. INTRODUCCIÓN 2

1.1 Insulina 2

1.2 Humulina N y R 2

1.3 Activación de las cascadas de señalización por la insulina 3

1.4 Cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) 4

1.4.1 Activación de la cascada MAPK por estreses bióticos 4

1.4.2 Participación de la cascada MAPK en respuestas a estreses abióticos 5

1.4.3 Participación de la cascada MAPK en el desarrollo 6

1.5 Función de la insulina en plantas 8

1.6 Efecto la insulina sobre el desarrollo de *A. thaliana* y cultivos de células en suspensión NT-1 9

1.7 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio 10

1.8 Embriogénesis de *Arabidopsis thaliana* 11

1.9 Desarrollo vegetativo 12

1.10 Etapa reproductiva de *A. thaliana* 14

1.11 Genes implicados en la floración de *A. thaliana* 16

1.12 Estructura de la flor 21

1.13 Construcción de una línea mutante por inserción 21

1.14 Líneas de baja expresión con RNA de interferencia (RNAi) 22

1.15 Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) 23

II. JUSTIFICACIÓN 25

III. HIPÓTESIS 25

IV. OBJETIVOS 26

4.1 Objetivo general 26

4.2 Objetivos Específicos 26

V. MATERIALES Y MÉTODOS 27

5.1 Estrategia experimental 27

5.2 Materiales 27

5.3 Equipo 28

5.4 Desinfección y vernalización de semillas 28

5.5 Preparación del medio de cultivo 28

5.6 Preparación de las soluciones de insulina para riego 29

5.7 Siembra de semillas 29

5.8 Determinación de la cinética de germinación 29

5.9 Evaluación de los parámetros del desarrollo de *Arabidopsis* 29

5.10 Extracción y cuantificación del RNA 30

5.11 Expresión génica por RT-PCR 31

5.12 Electroforesis 32

VI. RESULTADOS 33

6.1 La insulina estimula la germinación de las semillas de *Arabidopsis* Col-0 33

6.2 Cambios en la arquitectura radicular de *A. thaliana* inducidos por la insulina 33

6.3 Estimulación del desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* por la insulina (Humulina N) 34

6.4 Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva de *Arabidopsis* 37

6.5 Efecto de la Humulina R sobre el desarrollo vegetativo en plantas de *Arabidopsis* 37

6.6 Efecto de la Humulina R sobre la etapa reproductiva de *A. thaliana* 39

6.7 Nivel de expresión de los genes *AtMPK3* y *AtMPK6* en las líneas RNAiMPK3 y *mpk6* 39

6.8 Alteración de la arquitectura radicular en plántulas RNAiMPK3 y por efecto de la insulina 40

6.9 Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas RNAiMPK3 41

6.10 Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas RNAiMPK3 44

6.11 Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas *mpk6* 44

6.12 Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas *mpk6* 46

6.13 Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas *mpk6* 48

6.14 Análisis de la expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY* 48

VII. DISCUSIÓN 51

VIII. CONCLUSIÓN 54

IX. PERSPECTIVAS 54

X. BIBLIOGRAFÍA 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Activación de las cascadas de señalización por la insulina 3

Figura 2. Función básica de la ruta de señalización MAPK 8

Figura 3. Estructura de la planta y organización de la raíz de *Arabidopsis thalian* 10

Figura 4. Origen embrionario de la estructura de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* 11

Figura 5. Organización funcional del meristemo apical 13

Figura 6. Representación esquemática de la regulación de la identidad de meristemos 14

Figura 7. Fases del desarrollo vegetal 16

Figura 8. Descripción de la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis* 20

Figura 9. La flor de *Arabidopsis* 21

Figura 10. Mutantes por inserción de T-DNA 22

Figura 11. Mecanismo de acción del RNAi 23

Figura 12. Reacción de la reverso transcriptasa y la reacción en cadena de la polimerasa 24

Figura 13. Efecto de la insulina sobre la germinación de las semillas Col-0 33

Figura 14. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana* 34

Figura 15. Efecto de la insulina (Humulina N) sobre el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* 36

Figura 16. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva de *A. thaliana* 37

Figura 17. Efecto de la Humulina R sobre el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* 38

Figura 18. Efecto de la insulina (Humulina R) sobre la etapa reproductiva de *A. thaliana* Col-0 39

Figura 19. Expresión genética en plántulas Col-0, RNAiMPK3 y *mpk6* 40

Figura 20. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas RNAiMPK3 41

Figura 21. Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas RNAiMPK3 43

Figura 22. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas RNAiMPK3 44

Figura 23. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas *mpk6* 45

Figura 24. Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas *mpk6* 47

Figura 25. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas *mpk6* 48

Figura 26. Análisis del nivel de expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY* implicados en la floración por estimulo de la insulina 50

RESUMEN

La insulina es una hormona que en metazoarios regula diversos procesos, como los niveles de glucosa en sangre. Es bien conocido que la insulina activa dos cascadas de señalización, la de las proteínas cinasas activada por mitógenos (MAPK) y la PI3K/TOR. Sin embargo, se ha reportado la presencia de sustancias parecidas a la insulina en plantas, al igual que un efecto de la insulina en la inducción de la germinación, desarrollo radicular y proliferación celular en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* y en células de *Nicotiana tabacum* en suspensión. En el presente estudio, en plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizó dicha hormona la cual estimuló el desarrollo a través de todo el ciclo de vida de la planta, desde la germinación hasta la senescencia a través de la vía MAPK. La insulina estimuló la germinación con una concentración de 1.23 nM al igual que el desarrollo radicular, efecto no observado en líneas de baja expresión para la cinasa MPK3, pero sí con una mutante *mpk6.* El desarrollo vegetativo igualmente fue estimulado por la insulina en la línea silvestre, no mostrando igual efecto la línea de baja expresión MPK3 pero si en la mutante *mpk6.* En la etapa reproductiva, la insulina estimuló en la línea silvestre la producción de silicuas y flores con 1.23nM de insulina, este efecto tampoco se observó en la línea de baja expresión, pero si en la mutante *mpk6*. De igual manera, en muestras de plántulas de los tratamientos con insulina se analizó la expresión de los genes florales *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY*, lo que dio como resultado un aumento en la expresión de los genes *FT* y *LFY* con el tratamiento de 1.23 nM de insulina.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Insulina

La insulina es una hormona liberada por las células pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre, que controla funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte 2008).

1.2. Humulina N y R

En la presente investigación se utilizaron dos tipos de insulina comercial: Humulina N y R fabricadas por la compañía farmacéutica Lilly. La Humulina se comercializa en estas dos formas, debido a las necesidades diferentes de cada paciente. La insulina Neutral Protamine Hagedorn (NPH o isofónica pura), comienza a manifestar su efecto a los 90 minutos de administración y se mantiene durante un rango de 18-24 horas, dicha hormona es una modificación de la insulina humana, a la cual se le adiciona el anticoagulante protamina, con el fin de retrasar el inicio de la acción y prolongar la duración del efecto. La Humulina N es una suspensión estéril de un precipitado blanco en un amortiguador de fosfato isotónico y se sintetiza a partir de una cepa de *Escherichia coli* no patógena alterada transgénicamente con el DNA recombinante de insulina humana, la cual se acompleja con zinc y provoca un efecto prolongado.

Por otra parte, la Humulina R es una mezcla del 30% de insulina regular o porcina y 70% de insulina NPH que permite obtener un inicio rápido de la acción y al mismo tiempo una duración prolongada del efecto que puede llegar a las 24 horas. Ésta es una solución acuosa, transparente, incolora, estéril, de insulina humana de origen recombinante (http://pi.lilly.com/us/humulin-n-ppi.pdf).

1.3. Activación de las cascadas de señalización por la insulina

La insulina se une a su receptor transmembranal (IR) y activa dos rutas de señalización diferentes. En la primera, el IR fosforila al sustrato receptor de insulina (IRS) que activa por fosforilación a la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), la cual inicia una serie de fosforilaciones de proteínas rio abajo que regulan el metabolismo de la glucosa, la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno así como la expresión específica de genes. La otra vía activada por la insulina, es la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), en la cual las proteínas con dominios de homología Src Homology 2 (SH2) como la Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) y tirosina fosfatasa 2 con homología a Src (SHP2) interactúan con el IRS, activando la ruta a través de las proteínas Ras, Raf, MAPKK y MAPK y finalizando en una expresión general de genes; ambas vías convergen en la regulación del crecimiento y diferenciación celular como se muestra en la figura 1 (Saltiel y Kahn 2001).

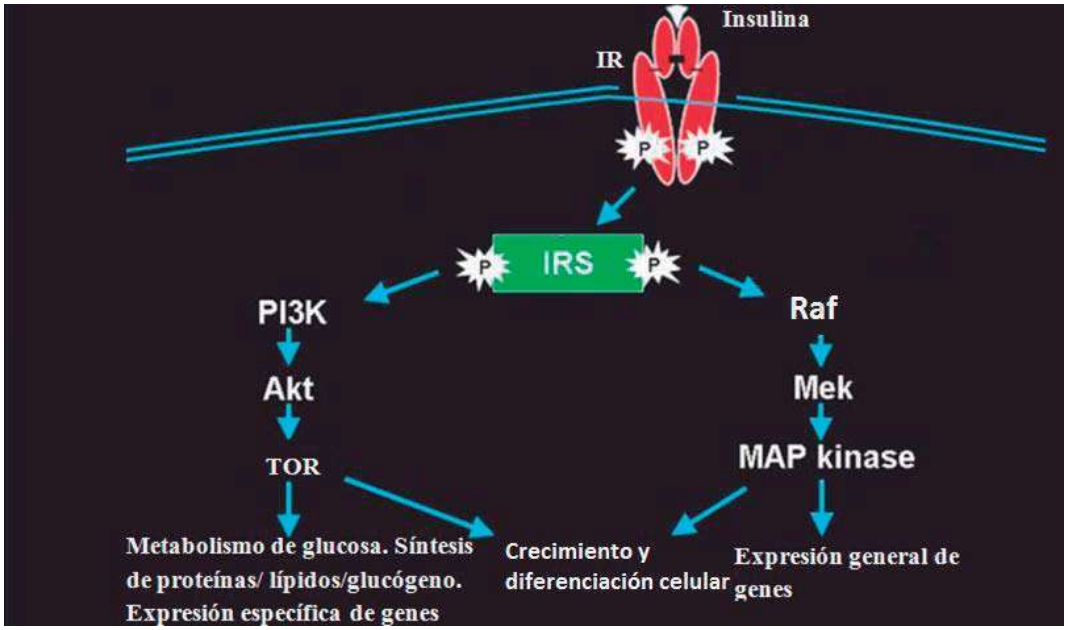


Figura 1. Activación de las cascadas de señalización por la insulina. El receptor de insulina es una tirosina cinasa que consiste en dos subunidades extracelulares, la unión de la insulina al receptor induce un cambio en la conformación que estimula la actividad cinasa del receptor que fosforila al sustrato receptor de insulina (IRS). Esta proteína interactúa con otras a través de su dominio SH2, para dar lugar a la activación de las vías PI3K/TOR y MAPK (Chiu y Cline 2010).

1.4. Cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La adaptación de las plantas a factores ambientales y endógenos, está basada en las reacciones a las señales percibidas por sistemas de señalización vegetal y la generación de respuestas. El paso de percibir las señales extracelulares que respondan a efectores requiere de rutas de transducción de señales intracelulares efectivas. Uno de los mecanismos de transducción de señales está regulado por reacciones de fosforilacion y desfosforilación, que es controlado por cinasas y fosfatasas. Una de las rutas de señalización más conservada y mejor caracterizada es la cascada de las MAPKs. Después de percibir la señal, dicha ruta media la transmisión de señales que controlan diversos procesos celulares que incluyen la división celular, diferenciación y respuestas a estreses ambientales (Ovecka y Lichtscheidl, 2009). El modelo básico de la ruta de las MAPKs está integrado por tres elementos consecutivos: MAPKKK, MAPKK y MAPK; su secuencia indica el orden en que los componentes se van activando mediante reacciones de fosforilación como se muestra en la figura 2. Los elementos que conforman dicha cascada pertenecen a una familia de proteínas cinasas Ser/Treo. Las MAPKKKs no se encuentran asociadas directamente con el receptor membranal y necesitan activarse por componentes intermediarios cuya actividad depende directamente del receptor (Saucedo García y Gavilanes Ruiz 2005). En *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que su genoma codifica para; 80 MAPKKKs, 10 MAPKKs y 20 MAPKs (Rodríguez y colaboradores 2010). De estas últimas cinasas, las más estudiadas incluyen a las MAPK 3, 4 y 6 (Mishra y colaboradores 2006).

1.4.1. Activación de la cascada MAPK por estreses bióticos

En la interacción de plantas con agentes patógenos, existen receptores en la superficie celular que desempeñan un papel fundamental, la detección de los patógenos se basa en la percepción de las moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Tena y colaboradores 2001; Nakagami y colaboradores 2005). Este paso es seguido por la activación de una serie de eventos que alteran la expresión génica, donde la cascada MAPK funciona rio abajo (Nühse y colaboradores 2000; Asai y colaboradores 2002; Nurnberger y colaboradores 2004). Un avance en las investigaciones de la participación de la vía MAPK en respuesta a patógenos en plantas, proviene de estudios con inductores bacterianos o de levaduras. Por ejemplo, la activación de la cascada MAPK en *Arabidopsis* después del tratamiento

con el un péptido bacteriano flg22 que es percibido por un receptor llamado "flagelina sensing 2" (FLS2). La interacción específica de flg22 con la proteína FLS2 ha sido demostrada en *Arabidopsis* mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para FLS2 (Chinchilla y colaboradores 2006). Se observó también que en el tratamiento con flg22, se activa transitoriamente a las cinasas sencillas AtMPK4, AtMPK6, y AtMPK3, este sistema también permitió la identificación de las dobles cinasas AtMKK1, AtMKK4 y AtMKK5 y una triple cinasa AtMEKK1 (Asai y colaboradores 2002; Nühse y colaboradores 2000; Mészáros y colaboradores 2006). El rol de la doble cinasa MKK3 en defensa a patógenos ha sido documentado en presencia de *Pseudomonas syringae* (Dóczi y colaboradores 2007). Además la triple cinasa MEKK1 se ha reportado que participa en la regulación de la homeostasis redox en *Arabidopsis*, al encontrar que la deficiencia de MEKK1 en plantas, resulta en una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteración en la señalización hormonal (Nakagami y colaboradores 2005). También respuestas a la defensa inducida por patógenos y que involucran a la vía MAPK se han descrito en la interacción de la planta con *Agrobacterium,* mediada por T-DNA que induce la activación de la cinasa MPK3 (Djamei y colaboradores 2007). Todos estos datos indican la importancia de la señalización MAPK para la activación de la respuesta de defensa en plantas contra las bacterias y hongos patógenos (Ramonell y colaboradores 2005; Zeidler y colaboradores 2004; Zipfel y colaboradores 2004). Por otra parte, Wang y colaboradores (2007) mostraron una reducción de la síntesis de camalexina (fitoalexina sintetizada por *Arabidopsis thaliana* en respuesta a un estrés de tipo biótico) en mutantes *mpk3* y un retraso en la *mpk6*. Es importante destacar que la doble mutante *mpk3/mpk6* suprimió la síntesis de la camalexina, lo que sugiere que ambas están involucradas en la producción de dicha sustancia.

1.4.2. Participación de la cascada MAPK en respuestas a estreses abióticos

La utilización de la cascada MAPK en plantas como vía de transducción de señales para varios tipos de estreses (Nakagami y colaboradores 2005), pone de manifiesto el fenómeno de que algunos componentes de la cascada MAPK son activados específicamente por determinados factores de estrés, mientras que otros son "promiscuos". Un ejemplo es el paralelismo de vías de señalización por estreses

bióticos y abióticos; algunos módulos de MAPK pueden funcionar como un puente que conecta señales rio arriba con efectores apropiados con alta selectividad o flexibilidad. La acumulación de datos sugieren que los fitoreguladores y las ROS juegan un papel clave en el cruce de señales entre las rutas de señalización para estreses bióticos y abióticos (Apel y Hirt 2004; Torres y Dangl 2005; Fujita y colaboradores 2006). Las plantas utilizan la cascada MAPK como vía de transducción de señales para varios tipos de estrés (Nakagami y colaboradores 2005). Algunos estudios sugieren que las fitohormonas y las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel clave en la interferencia entre las señales a estreses biótico y abiótico (Apel y Hirt 2004; Torres y Dangl 2005; Fujita y colaboradores 2006). Por ejemplo, se ha reportado que MPK6 está involucrada en la producción de etileno (Liu y Zhang 2004), y también es activada por estrés oxidativo (Xiong y Yang 2003), junto con MPK3 y una cascada MPK4/MPK6 se ha mostrado que funciona durante la señalización a estrés por frio y salino (Teige y colaboradores 2004). Un estudio reciente reveló que la acumulación de las ROS, después de una lesión mecánica está regulada por la MPK8 y requiere de la MKK3 (Takahashi y colaboradores 2011).

1.4.3. Participación de la cascada MAPK en el desarrollo

Estudios recientes han revelado una posible participación de la cascada MAPK en el control de la morfogénesis, en particular en la división celular y la formación de patrones. La citocinesis, última etapa de la división celular depende de la correcta formación de la placa celular. Este proceso es guiado por el fragmoplasto (Ovecka y Lichtscheidl 2009). El análisis funcional de las MAPKs en alfalfa, *Arabidopsis* y tabaco reveló su papel en la regulación de la citocinesis (Banno y colaboradores 1993). Diversos estudios han reportado que la cascada de las MAPKs además de participar en respuesta a estreses bióticos y abióticos, participa en el desarrollo, incluyendo la división celular, el inicio de las vías de desarrollo, y la muerte celular programada (Widmann y colaboradores 1999; Chen y Thorner 2007; Colcombet y Hirt 2008). Trabajos recientes sobre desarrollo han mostrado una participación más amplia de vías de señalización MAPKs en la morfogénesis de la planta. Por ejemplo el estudio donde se muestra el complejo papel de MPK6 en múltiples procesos de desarrollo. La mutación de MPK6 mostró una reducción de la fertilidad masculina y un desarrollo de las anteras anormal. Otras anomalías se observaron en la producción de semillas: las plantas *mpk6* contenían embriones que crecían de forma anormal por fuera de la

cubierta de las semillas. MPK6 por lo tanto parece estar involucrada en la regulación de múltiples aspectos de desarrollo de la planta (Bush y Krysan 2007). La participación de la cascada MAPK en los mecanismos moleculares durante el desarrollo embrionario se propuso a partir de un estudio reciente en donde se demuestran nuevas funciones sobrelapadas de las cinasas MPK3 y MPK6 en la regulación del desarrollo del óvulo. Los experimentos genéticos proporcionan una fuerte evidencia de que el fenotipo estéril en las plantas se debe a la pérdida de la función de MPK6 y la pérdida parcial de la función de MPK3 (Wang y colaboradores 2008). Otros estudios han demostrado que tanto la cinasa MPK3 como MPK6 tienen una influencia más amplia en varios programas de desarrollo, como del embrión, estomas, inflorescencia, y desarrollo de las anteras (Bush y Krysan 2007; Wang y colaboradores 2007). En investigaciones recientes se ha mostrado que las cinasas MPK4 y MPK6 están implicadas en la regulación de la estructura del citoesqueleto en *Arabidopsis* (Beck y colaboradores 2010; Kosetsu y colaboradores 2010; Muller y colaboradores 2010; Takahashi y colaboradores 2010; Beck y colaboradores 2011). Existen otros reportes de que la vía MAPK está implicada en desarrollo, Beck y colaboradores (2010) mostraron un crecimiento celular aberrante en mutantes *mpk4* incluyendo células expandidas lateralmente de diversos tejidos y sistemas radiculares ramificados. Por otra parte, Umbrasaite y colaboradores (2010) reportaron la participación de la cascada MAPK en la promoción de la diferenciación de las células del pavimento que es la parte de la lámina foliar donde se localizan los estomas.

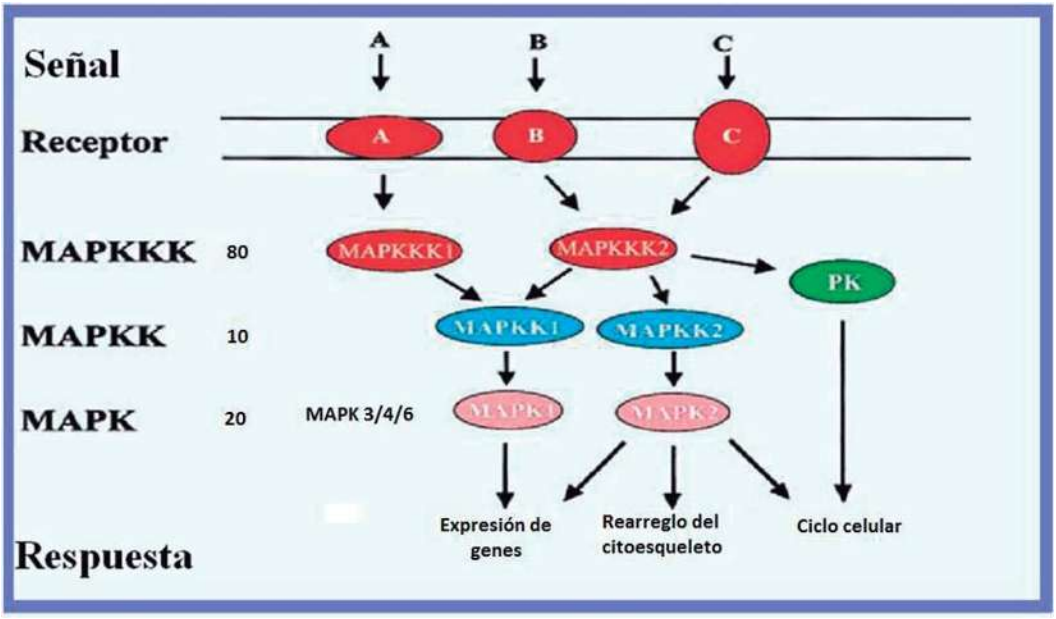


Figura 2. Función básica de la ruta de señalización MAPK. Los receptores responden a estímulos extracelulares específicos (denotado por A, B y C) y activan a las MAPKKKs a través de las proteínas G. La activación de MAPKKKs resulta en la fosforilación de MAPKKs, algunas MAPKKKs son capaces de activar proteínas cinasas de otras familias (PK) y de otras rutas. Las MAPKKs activan su vez a las MAPKs. Diferentes sustratos son blancos de las MAPKs, incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, u otras cinasas o fosfatasas las cuales están directamente relacionadas con las respuestas celulares involucradas en el ciclo celular. Las flechas indican la activación de los blancos (Miles y colaboradores 2005).

1.5. Función de la insulina en plantas

La insulina pancreática fue descubierta por Banting y colaboradores en 1922, y desde entonces dicha hormona ha sido usada como el medicamento universal para el tratamiento de la diabetes, mientras que en plantas la presencia de substancias parecidas a la insulina han sido reportadas para cebolla, hojas de lechuga, judías verdes, raíces de cebada y remolacha entre otras, a las cuales se les llamó "glucocinina", asimismo, se reportaron datos cualitativos de la acción de la insulina y la "glucocinina" sobre la germinación de maíz (Collip 1923).

Barbasov y colaboradores, 1991 aislaron de la soya un péptido de 4 kDa, denominada leginsulina, cuya secuencia de aminoácidos no mostró ninguna similitud con la de insulina, ni con la de los factores de crecimiento parecidos a insulina. Sánchez de Jiménez y colaboradores (1999) mostraron que la adición de 200 μU/ml (1.23 nM)

de insulina a semillas de maíz (*Zea mays L*. cv. Chalqueño) aceleraba la germinación y el crecimiento de las plántulas. Existen varios reportes de la presencia de "insulina" en plantas, tal es el estudio donde se detectaron antígenos parecidos a la insulina en *S. maxima* y en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Silva y colaboradores 2002). Recientemente, Rodríguez-López y colaboradores (2011), caracterizaron un péptido de maíz de 5.7 kDa (secuencia de aminoácidos no reportada) al cual llamaron factor de crecimiento parecido a insulina o "ZmIGF", con propiedades similares a la insulina, observando que ambas moléculas regulan el crecimiento y la división celular en maíz, promoviendo la síntesis de proteínas ribosomales y del DNA. En un estudio reciente se reportó que al añadir el péptido ZmIGF se regula la división y crecimiento celular en callos de maíz (Sotelo y colaboradores 2010).

1.6. Efecto la insulina sobre el desarrollo de *A. thaliana* y cultivos de células en suspensión de tabaco NT-1

Los primeros resultados del efecto de insulina sobre el crecimiento radicular de *Arabidopsis thaliana*, mostraron que 1.23 nM de insulina estimuló dicho crecimiento (Ortega-Domínguez 2007) al igual que lo reportado en maíz. Posteriormente se han realizado diferentes estudios del efecto de la insulina involucrando la vía MAPK y PI3K/TOR, donde se sugiere que la insulina posiblemente activa la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en *A. thaliana* (Juárez-Domínguez y colaboradores 2010). Otro estudio del efecto de la insulina sobre diferentes tipos de desarrollo en *A. thaliana,* fue el de Santillán-Mendoza (2011), quien determinó el efecto inductor de la insulina en el crecimiento de la raíz principal en *A. thaliana*, observando que las cinasas MAPK3 y MAPK6 podrían estar involucras en dicho efecto. También ha sido reportado el efecto promotor de dicha hormona en el desarrollo de los pelos radiculares, en el cual se determinó que de forma dosis dependiente a través de la activación de la cinasa PI3K y la cascada de las MAPKs existe un estimulo por parte de la insulina (Pascual-Morales 2011). Por otra parte, en cultivos de células de tabaco en suspensión se determinó que la insulina estimula la proliferación celular posiblemente a través de las cascadas de señalización PI3K-TOR y MAPK de forma dependiente de la vía de las auxinas (Fierros-Romero 2012).

1.7. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis es un miembro de la familia *Brassicaceae*, que incluye las especies cultivadas como la col, el rábano y la mostaza. Aunque no es de importancia agronómica, la planta ofrece ventajas importantes para la investigación básica en genética y biología molecular, debido a que posee las siguientes características: genoma totalmente secuenciado y constituido por 125 millones de bases; fácil de cultivar; crecimiento rápido, debido a que completa su ciclo vital en 6 a 8 semanas, produciendo miles de semillas. Además se conocen más de 50,000 mutantes, lo que facilita las investigaciones destinadas a individualizar los genes y conocer su función (Wilson 2000). En la figura 3A podemos observar los órganos que constituyen la parte aérea de la planta adulta. La raíz primaria se muestra en la figura 3B y presenta tres regiones diferentes: la zona de división, elongación y diferenciación celular.

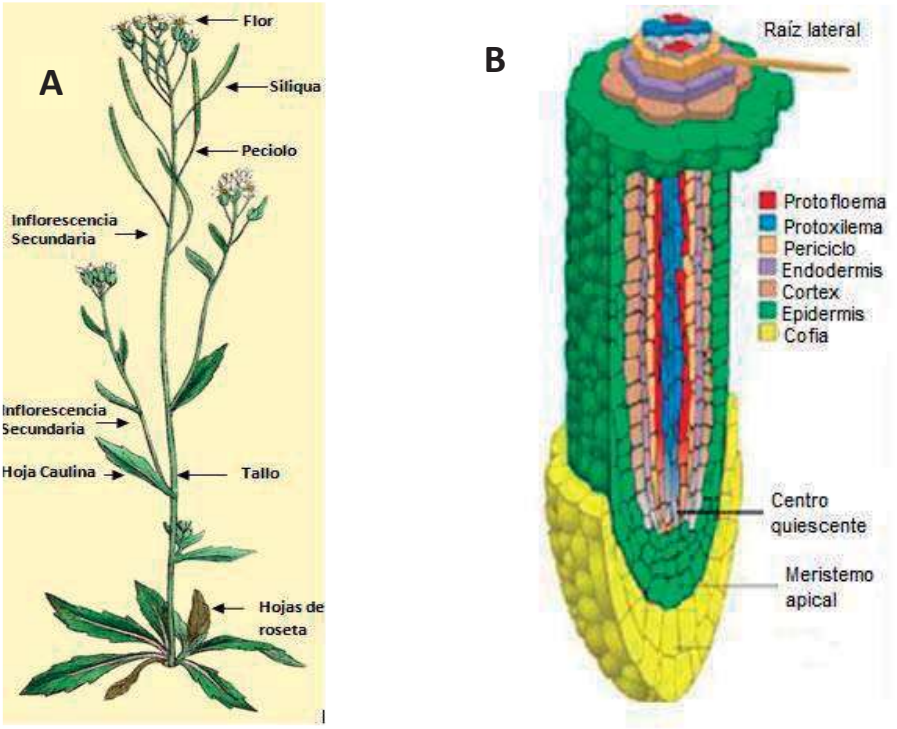


Figura 3. Estructura de la planta y organización de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A) Follaje de la planta adulta de *A. thaliana,* donde se muestran las hojas de roseta y caulinas, el tallo floral, las inflorescencias primarias y secundarias, las flores y las silicuas. B) Arquitectura radicular que muestra las diferentes zonas de la raíz primaria y las capas que forman la raíz (Montiel y colaboradores 2004).

1.8. Embriogénesis de *Arabidopsis thaliana*

Los eventos que toman lugar durante la embriogénesis de *Arabidopsis thaliana* y llevan a la formación de la planta han sido ampliamente descritos (Montiel y colaboradores 2004). En la figura 4A, se muestra al zigoto, el cual es una célula que a través de una división anticlinal y asimétrica da lugar a dos célula (cada una se representa de diferente color), a continuación, las células siguen un proceso de divisiones anticlinales y periclinales para formar una estructura con ocho células (las células representadas con diferente color darán lugar a distintas partes de la plántula), después por divisiones celulares se llega a la etapa globular (Fig. 4D), continuando con la de corazón (Fig. 4E). En esta última, se empiezan a formar los cotiledones y se puede observar que las células de cada color dieron lugar a cada una de las partes de la plántula. Se muestra en color rojo las células que forman al meristemo apical de la raíz (RAM). Posteriormente se llega a la etapa de torpedo, la cual además de mostrar las células de los tejidos en diferentes colores, presenta el meristemo apical (SAM), en color azul (Fig. 4F). Después se formará el embrión y finalmente la plántula completa (Fig. 4G) formada por los cotiledones, la raíz principal, y los meristemos, representados en diferentes colores. Ambas estructuras (SAM y RAM), permiten la formación de los órganos post embrionarios a lo largo de la vida de la planta (Capron y colaboradores 2009).

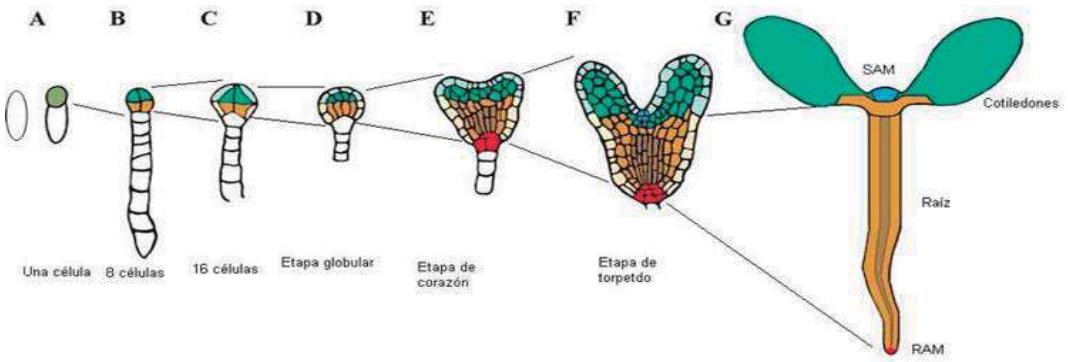


Figura 4. Origen embrionario de la estructura de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*. El desarrollo embrionario de *Arabidopsis* permite rastrear el origen de las células progenitoras de los tejidos del embrión y de los órganos de las plántulas. Los colores identifican las regiones correspondientes en el embrión y en la plántula. La subdivisión radial apical y basal se representa con diferentes colores, la parte superior es de color verde y la parte inferior de color marrón. El meristemo apical de la raíz (RAM de su acrónimo en inglés) se representa en rojo y el meristemo apical del tallo (SAM de su acrónimo en inglés) en azul (Capron y colaboradores 2009).

1.9. Desarrollo vegetativo

Después de la germinación de las semillas y antes de que sean competentes para florecer y reproducirse, las plantas transitan por una fase de crecimiento vegetativo. El desarrollo vegetativo o post-embrionario tiene su origen en los meristemos de los brotes (SAM de su acrónimo en inglés) y las raíces (RAM de su acrónimo en inglés). Dichos meristemos son estructuras capaces de auto perpetuarse, ya que además de producir órganos se regeneran a sí mismos continuamente. Las células meristemáticas o iniciales conservan la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida del organismo; cuando una de ellas se divide, una de las células hijas hereda las características indiferenciadas de la madre y la otra continuará el desarrollo (Fosket 1994). Entre los genes implicados en el mantenimiento del SAM en *A. thaliana*, el cual se puede observar en la figura 5, se encuentra *SHOOT MERISTEMLESS* (*STH*), necesario tanto para la formación como para el mantenimiento del meristemo (Barton y Poething 1993; Clark y colaboradores 1995). Otro gen implicado en el desarrollo normal del meristemo apical, es *WUSCHEL* (*WUS*), el cual participa en el mantenimiento funcional y estructural del meristemo y da identidad a la región central del SAM (Baurle y Laux 2005). Se ha observado que el gen *WUS* es necesario para conservar el meristemo en estado de proliferación, debido a que las mutantes *wus*, arrestan el crecimiento del SAM, el cual no se desarrolla más allá de

la etapa embrionaria (Laux y colaboradores 1996), *WUS* se expresa en el centro del SAM abajo de las capas L1 y L2 (Fig. 5) (Cheng y colaboradores 2010).

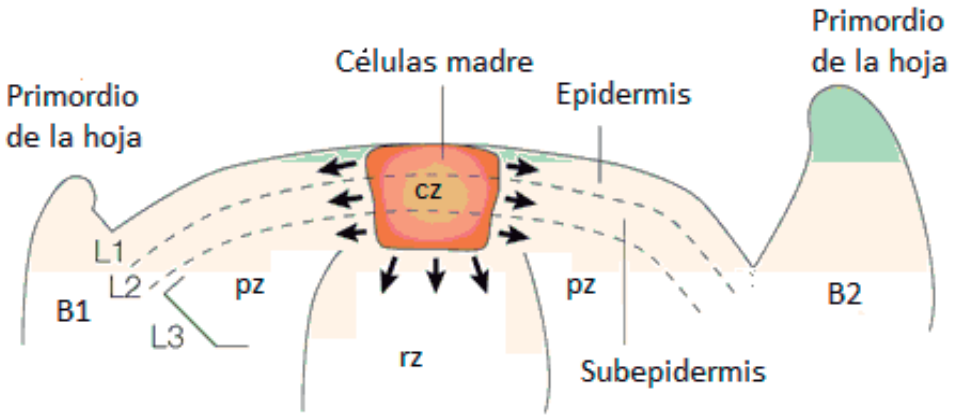


Figura 5. Organización funcional del meristemo apical. El meristemo apical está compuesto de capas (L1-L3) y presenta tres zonas (cz, zona central; pz, zona periférica; rz, zona de costilla). Cada zona contiene todas las capas. La capa L1 forma la epidermis; L2 y L3 forman el tejido subepidermal del brote, hojas y flores. La zona central es un grupo de células fuente no permanentes. La zona periférica da lugar a los primordios de hojas y flores. La zona de costilla contribuye al crecimiento del ápice. B1 y B2 son primordios de hojas (imagen modificada de Clark 2001).

Durante el desarrollo de las plantas, la floración empieza a partir del SAM, el cual produce hojas y brotes, respondiendo continuamente a factores endógenos y ambientales. Después la planta se programa (en respuesta a estímulos como la luz, frio y ácido giberélico) para producir órganos reproductivos (floración). El crecimiento y desarrollo vegetal involucran la integración de señales ambientales y endógenas (fitoreguladores), las cuales junto con el programa genético intrínseco determinan la morfofisiología de la planta (Gray 2004). En la figura 6, se muestra como el meristemo de la planta va cambiando de identidad vegetal, a meristemo de inflorescencia y finalmente a meristemo floral.

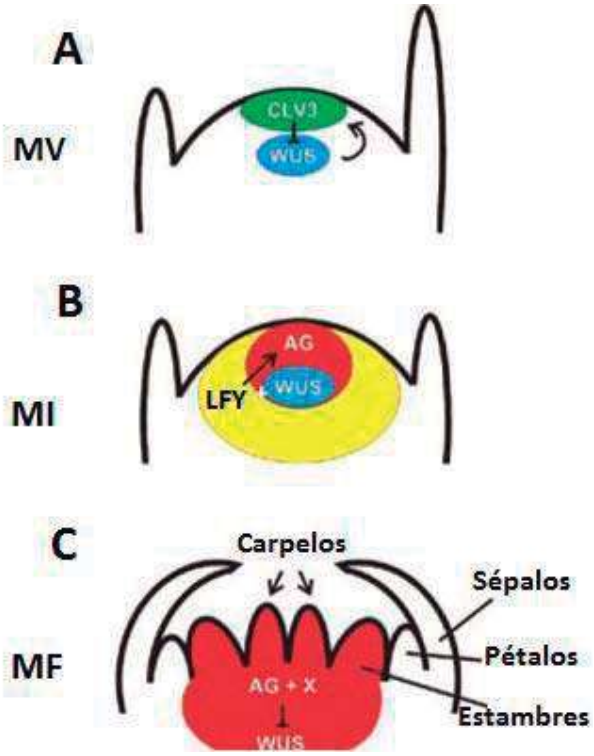


Figura 6. Representación esquemática de la regulación de la identidad de meristemos. **A**: Representación esquemática de un meristemo vegetativo apical indeterminado, mostrando la interacción entre CLV3 y WUS en sus respectivos dominios. En el meristemo vegetativo, LFY está normalmente ausente y la expresión de AG no es inducida. **B**: En el meristemo de inflorescencia, LFY comienza a ser expresado y actúa junto con WUS para inducir la transcripción de AG en el centro del desarrollo floral. **C**: En el meristemos floral, al momento de la iniciación de los carpelos, AG y un factor (X) adicional aun no identificado reprimen la expresión de WUS para determinar las actividades de las células madre y hacer un meristemo determinado (Carnier y Dornelas 2005).

1.10. Etapa reproductiva de *A. thaliana*

Con el tiempo, las plantas se vuelven competentes para la floración, aumentando su tamaño y en el SAM adquiriendo la identidad de inflorescencia y posteriormente de meristemo floral. Así, un meristemo vegetativo genera hojas, pero durante la transición a la floración, la forma del meristemo cambia y se incrementa la tasa de división celular debido a un ciclo celular más corto (Gegas y Doolan 2006). Existen dos tipos de información que regulan la iniciación de la floración: la ambiental, por ejemplo los cambios en la temperatura y/o la duración del día que refleja los cambios estacionales y, los factores endógenos como las fitohormonas o reguladores del crecimiento (Bishopp y colaboradores 2006; Kepinski 2006; Kucera y colaboradores 2005). Son varias rutas por

las cuales se detectan señales que influyen en la floración, y son referidas como vías de floración, por ejemplo, el fotoperiodo causa la floración temprana por la exposición a los días largos (Amasino 2010). Un hallazgo clave en estas vías fue la demostración por Knott (1934) que la duración del día es percibida por las hojas. Durante años, se ha investigado la floración temprana de varias especies, desde que se observó que la reducción del fotoperiodo en tabaco aceleraba la floración (Garner y Allard 1922). Curiosamente, a pesar de la enorme diversidad de estrategias reproductivas y estilos de vida de las plantas superiores, un componente móvil clave de esta señal de floración es el "florígeno", proteína codificada por un gen altamente conservado: *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Wigge y colaboradores 2005). Es importante destacar que en mutantes que solo cambia su velocidad de crecimiento pero no su número de hojas y flores no son consideradas como mutantes en tiempo de floración (Koornneef y colaboradores 1991). Las primeras flores formadas en *Arabidopsis* a menudo producen significativamente menos semillas que las siguientes, lo cual podría ser debido a un efecto arquitectónico de la inflorescencia, es decir, que dependen de la posición de la flor y no sólo a la variación ambiental (Diggle 2002). El momento correcto de la transición a la floración es de extrema importancia para todas las plantas y está bajo el control de una red genética compleja que integra la información de varias señales, tanto endógenas como del ambiente (Amasino 2010). Durante la fase de floración, el SAM da lugar a flores en lugar de brotes y hojas. En la figura 7 se muestra el cambio desde la embriogénesis a la fase vegetativa juvenil, y de ésta a la adulta, seguida de la fase reproductiva adulta, hasta terminar en la fase gametofítica (Huijser y Schmid 2011).

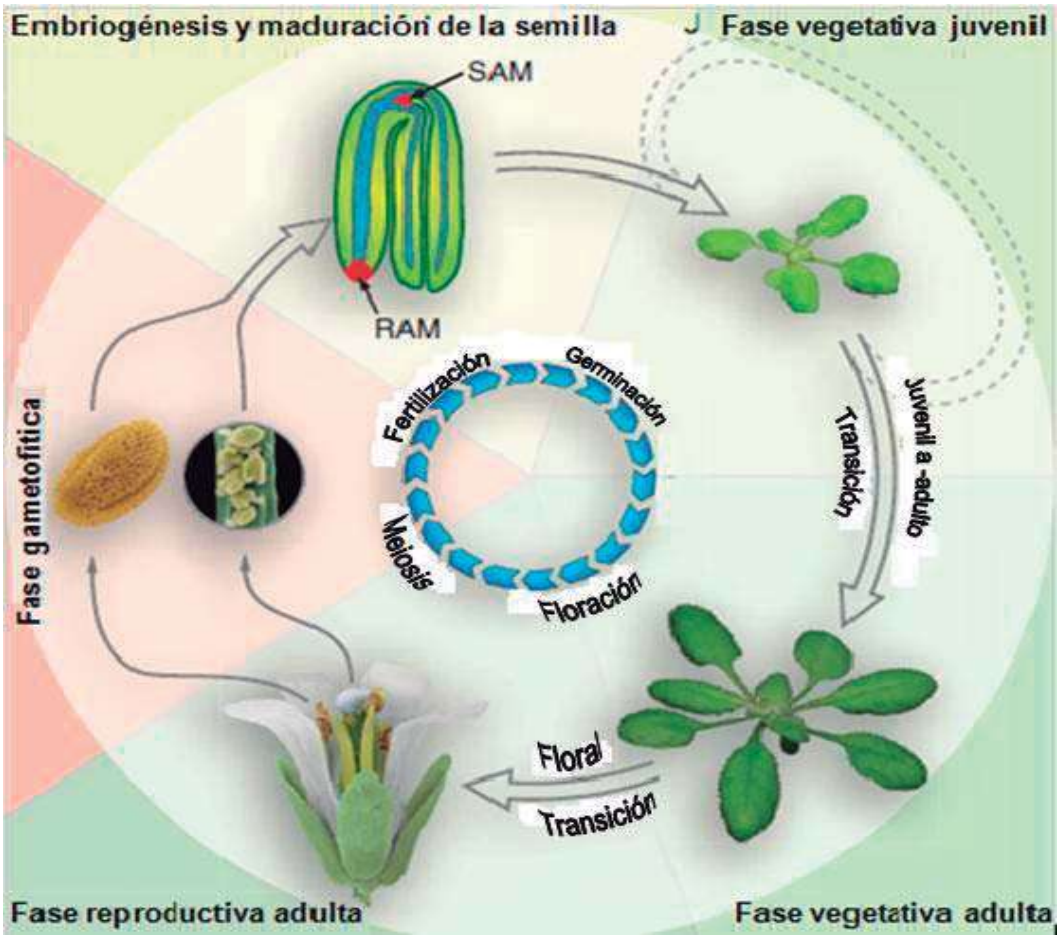


Figura 7. Fases del desarrollo vegetal. Las plantas pasan a través de una serie de transiciones de desarrollo durante su ciclo de vida. Durante la reproducción sexual, se producen los gametos (fase gametofítica). Después de la fecundación, las poblaciones de células madre se establecen en los extremos opuestos del eje primario de crecimiento del embrión en desarrollo, la formación del meristemo apical de la raíz (RAM) y el meristemo apical del brote (SAM) (rojo). Estos dan lugar a todos los órganos post-embrionarios formados a lo largo de la vida de una planta. Toda la parte aérea (tallo) de una planta se origina en el SAM. Después de la germinación, las plantas pasan a través de tres fases de desarrollo. En primer lugar, por una fase de crecimiento vegetativo, la fase de crecimiento vegetativo se puede dividir en fases juveniles y adultas. Con el tiempo, las plantas se vuelven competentes para florear y se someten a la transición del desarrollo reproductivo (Huijser y Schmid 2011).

1.11. Genes implicados en la floración de *A. thaliana*

Existen diferentes genes integradores que están implicados en la floración, cada uno de ellos está relacionado en diferentes vías, las cuales interactúan entre sí. Los genes que regulan el tiempo de floración participan en cuatro vías de promoción floral:

fotoperiodo de días largos, control por el ácido giberelico (GA), la promoción autónoma y la vernalización como se muestra en la figura 8. Los genes interactúan entre sí activándose o inhibiéndose rio abajo hasta desembocar en *LFY* y *AP1*. En términos generales, el desarrollo de flores se puede dividir en cuatro fases que se producen en una secuencia temporal. En la primera, en respuesta a las señales ambientales y endógenas, la planta cambia de crecimiento vegetativo a reproductivo, este último es controlado por un grupo de genes (*CLV3* y *WUS*) del tiempo de floración. En la segunda, cuando se integran las señales de la vía de floración se promueve la activación de un grupo de genes (*LFY, AG* y *WUS*) que cambian la identidad del meristemo vegetal al de inflorescencia. En la tercera fase, la identidad del meristemo se ve afectada por la expresión de genes (*CO, FRI, PIE1, AP1, FLC, SOC1, TFL1, FT y LFY*) que permiten la identidad de meristemo floral. Finalmente, los genes (*APETALA 1 (AP1), APETALA 2 (AP2), PISTILATA (PI) y AGAMOUS (AG)*) dan identidad a los tejidos que constituyen los órganos florales (Jack 2004). La promoción por fotoperiodo de días largos está regulada por factores como la luz, permitiendo la activación de *CONSTANS* (*CO*), factor de transcripción que presenta los dominios de dedos de zinc (Putterill y colaboradores 1995). Las mutantes *co* están retrasadas en la floración, particularmente en fotoperiodos de días largos (Koornneef y colaboradores 1991). Por el contrario, la sobreexpresión del gen *CO* resulta en una floración temprana (Onouchi y colaboradores 2000; Simon y colaboradores 1996). El papel que se ha asignado a CO es la activación de la expresión del gen *FT* (Wigge y colaboradores 2005; Yamaguchi y colaboradores 2005). Una de las primeras demostraciones de la función de CO en las hojas fue la estimulación de *FT* (An y colaboradores 2004; Ayre y Turgeon, 2004). Las mutantes en *ft* están retrasadas en la floración (Koornneef y colaboradores 1991), mientras que en las plantas 35S:*CO*, su floración fue temprana, y en la línea de sobre expresión 35S:*CO* en el fondo genético *ft*, la floración también fue temprana; lo que indica que FT está rio abajo de CO (Onouchi y colaboradores 2000; Samach y colaboradores 2000). Se ha reportado que el gen *FT* también está regulado por FLC. La integración de las señales de FLC y CO es mediada por elementos discretos en el promotor *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1* (*SOC1*), mostrado en la Figura 8 (Hepworth y colaboradores 2002). No se sabe si *FT* por si mismo integra éstas señales o si las señales están siendo integradas por un gen rio arriba de *FT* (Jack 2004). Además de que el fotoperiodo y la calidad de la luz también afectan la expresión de *FT* a través de la estabilidad de la proteína CO (Amasino 2010). Una segunda vía en el tiempo de

floración está relacionada con la promoción de la floración por el ácido giberelico (GA). Las mutantes defectuosas en la biosíntesis de GA, como la *ga1* exhibe un dramático retraso en la floración cuando crecen en días cortos pero no en días largos, sugiriendo que es GA es un estimulador importante en la ausencia de la promoción de la floración de días largos (Wilson y colaboradores 1992; Moon y colaboradores 2003). En esta vía está implicado el gen *SOC1,* que tiene como blanco a *LEAFY* (*LFY*) (Fig. 9). Durante el desarrollo floral, *LFY* es necesario y suficiente para especificar el meristemo floral (Weigel y Nilsson 1995), y permitir el funcionamiento normal del meristemo floral (Huala y Sussex 1992; Jack 2004). El desarrollo de la inflorescencia está mediado por una interacción antagónica entre *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) y LFY (Conti y Bradley 2007). Mediante exámenes de la expresión de *TFL1* y *LFY*, se confirmó que ambos genes funcionan en la diferenciación para la inflorescencia (Cheng y colaboradores 2010). Se ha estudiado en *Arabidopsis* mutantes *tfl1*, donde los meristemos del tallo se desarrollan como una flor y presentan un fenotipo de flores terminales, en lugar de inflorescencias indeterminadas (Shannon y Meeks 1991). La proteína TFL1 se relaciona estructuralmente a la FT, presentando un 50% de similitud (Kardailsky y colaboradores 1999), lo cual es sorprendente debido a que los genes *FT* y *TFL1* presentan efectos opuestos en el tiempo de floración: la mutante *ft* da como resultado una floración tardía, y la *tfl1* presenta una floración temprana (Mimida y colaboradores 2001). La expresión de *TFL1* es aumentada significativamente en la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo y es necesaria para la función normal del meristemo inflorescente en *Arabidopsis* (Bradley y colaboradores 1997; Shannon y Meeks 1991). En etapas posteriores *TFL1* es sobre expresado y reprime la expresión de genes de identidad del meristemo floral como *LFY* y *APETALA 1* (*AP1*) en el meristemo apical (Jack 2004). La tercera vía de floración, es la autónoma, funciona para controlar la floración de forma independiente a los factores exógenos, en la cual interviene *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). La cuarta vía es la de la vernalización, proceso por el cual, la exposición prolongada al frío hace a las plantas competentes para florear (Chouard 1960). La vernalización es causada por la expresión de un gen dominante llamado *FRIGIDA* (*FRI*) (Napp-Zinn 1987), que tiene como blanco a *FLC*. Este último integra las señales positivas reguladoras del gen *FRIGIDA* (*FRI)* (Johanson y colaboradores 2000). La expresión del gen *FLC* junto con *FRI*, son un requisito para la vernalización (Koornneef y colaboradores 1994; Lee y colaboradores 1994). La mutación del gen *FLC* resulta en una floración temprana, mientras que la

sobreexpresión causa una floración tardía. Hay una correlación fuerte entre los niveles del RNA/Proteína de *FLC* y el tiempo de floración: altos niveles de *FLC* correlacionan con una floración tardía, y bajos con una floración temprana (Jack 2004). La vernalización también resulta en una reducción de los niveles de RNA/Proteína de *FLC*. (Sheldon y colaboradores 2000a; Gendall y colaboradores 2001). El factor de transcripción FLC, juega un papel importante en la respuesta a la vernalización de *Arabidopsis thaliana* (Amasino 2010; Srikanth y Schmid 2011). Además las señales represivas por parte de la vía autónoma y la vernalización está integrada por el represor floral *FLC* (Michaels y Amasino 1999; Sheldon y colaboradores 2000b). En la figura 8B, se muestra la red de genes que comprenden las vías que dan lugar al meristemo floral.

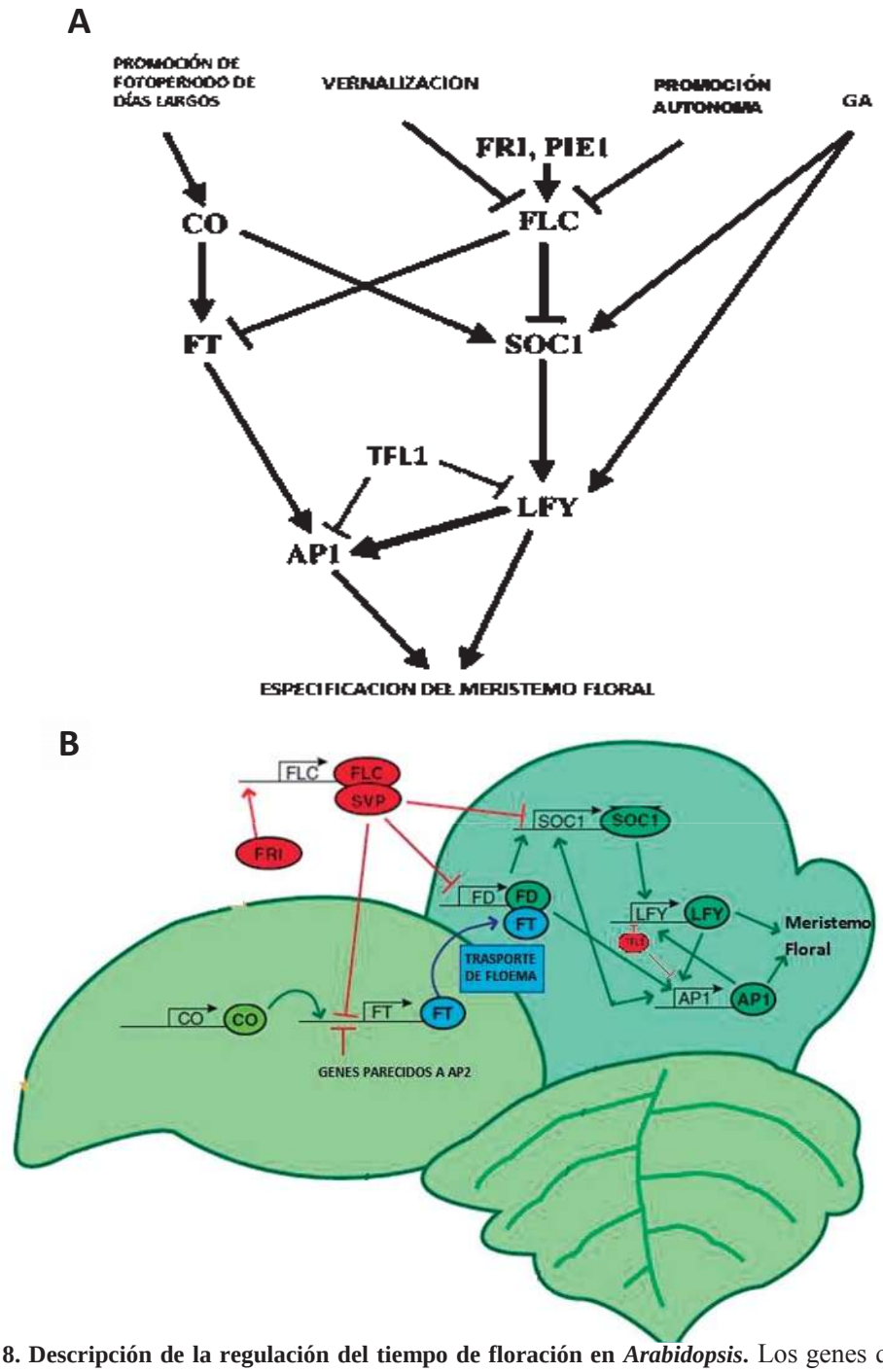


Figura 8. Descripción de la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Los genes que dan especificidad a los meristemos florales (*CO, FRI, PIE1, AP1, FLC, SOC1, TFL1, FT y LFY*), son representados en las siguientes imágenes; **A**) Las señales para las cuatro principales vías de señalización, imagen modificada de (Jack 2004); **B**) Imagen que muestra en donde se da la expresión de estos genes, la interacción directa está mostrada en flechas grises, los genes y las proteínas están representados con óvalos. Las líneas sólidas de color verde o rojo con flechas representan una promoción, y aquellas con barras perpendiculares la represión. Los componentes que promueven la floración se muestran en verde y los que la reprimen en rojo (Amasino 2010).

1.12. Estructura de la flor

La flor es la estructura reproductiva característica de las plantas espermatofitas o fanerógamas, que produce semillas a través de la reproducción sexual. Para las plantas, las semillas son la próxima generación y sirven como el principal medio a través del cual las especies se perpetúan y se propagan (Huijser y Schmid 2011). El cáliz, está formado por sépalos que superficialmente se parecen a las hojas, pero son más pequeños, carecen de estípulas, que son una especie de hojas diminutas que se encuentran en el punto donde la base del pecíolo de la hoja se une con la rama y poseen las células epidérmicas muy alargadas (Irish y Sussex, 1990). La corola, está formada por los pétalos que son hojas coloreadas en el interior de los sépalos, los estambres, son los órganos masculinos de la flor, cada antera consta de cuatro lóbulos en los que se produce microsporas, y un filamento que sirve para transportar nutrientes a las anteras (Goldberg y colaboradores 1993). El pistilo es el órgano femenino de la flor, *Arabidopsis* contiene dos carpelos o pistilos que forman el gineceo, el cual consta de un ovario en el que se desarrollan múltiples semillas. En el gineceo madura la fruta, o silicua (Ferrándiz y colaboradores 1999; Ostergaard 2009). En la figura 9, se representa la foto de una flor y su estructura.

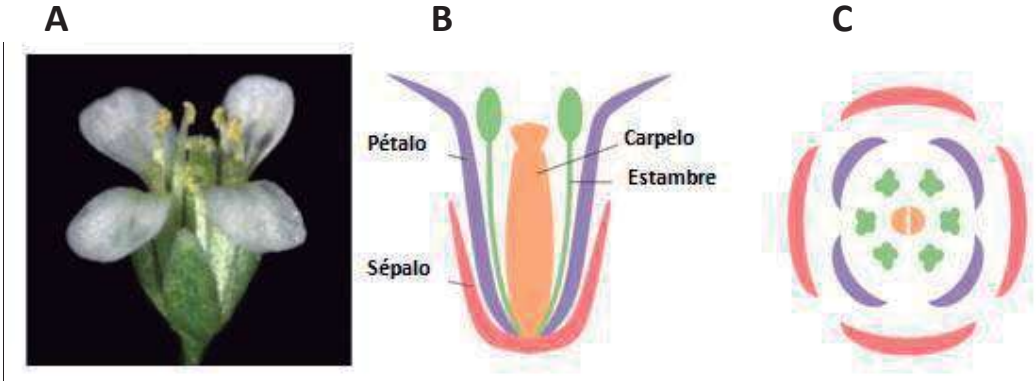


Figura 9. La flor de *Arabidopsis*. Las flores principalmente cuentan con 4 órganos; los sépalos, pétalos, estambres y carpelos. A) Flor madura de *A. thaliana*; B) Sección lateral de una flor madura; C) Diagrama floral que muestra la colocación relativa de los órganos florales (Irish 2010).

1.13. Construcción de una línea mutante por inserción

Una de las estrategias para la obtención de mutantes hace uso del T-DNA (segmento T), cuya inserción bloquea una parte específica del gen de interés para evitar su transcripción correcta. Para corroborar que dicha inserción, se haya efectuado en el

sitio de interés se amplifica una secuencia del DNA genómico cercano al sitio de inserción. La mutagénesis de inserción con T-DNA aprovecha la propiedad del sistema basado en *Agrobacterium tumefaciens*, para la transformación genética de plantas. Un ejemplo de una mutante de inserción, es la línea *xipotl* mutada en el locus At3g18000 (Fig. 10).

Figura 10. Mutantes por inserción de T-DNA. Estructura genómica del *locus At3g18000.* Los exones se indican con rectángulos grises. La localización de la inserción de T-DNA se representa con un triángulo invertido (Cruz-Ramírez y colaboradores 2004).

1.14. Líneas de baja expresión con RNA de interferencia (RNAi)

En eucariontes el RNA de doble cadena (RNAdc) puede inducir el silenciamiento de una secuencia específica. Dicho silenciamiento inicia cuando el RNAdc largo es procesado al RNA pequeño de 21 a 26 nucleótidos mediante la enzima RNAsa III Dicer. Estos RNAs pequeños se incorporan a complejos efectores de silenciamiento que son guiados a secuencias complementarias blanco. En la figura 11, se muestra que existen diferentes tipos de silenciamiento, cuyas diferencias se basan principalmente en la naturaleza de la secuencia blanco y en la composición proteica de los complejos efectores. La enzima blanco Dicer, genera pequeños RNA de interferencia de los fragmentos de RNA (siRNA) que se unen por complementariedad al mRNA blanco para su degradación, utilizando el complejo RISC. De manera natural, los siRNA se originan de transposones y virus que producen RNAdc durante su replicación, así como también de otras secuencias repetidas transcritas bidireccionalmente. Los microRNA (miRNA) son otros RNA pequeños que pueden inducir silenciamiento al unirse al mRNA blanco. Los miRNA se incorporan a un complejo similar a RISC y, dependiendo de su grado de complementariedad con el mRNA blanco, pueden presentar una represión traduccional o bien digerir al mRNA. La inducción artificial del RNAi mediante siRNA o miRNA ha sido adoptada como una herramienta para inactivar la expresión génica, tanto en células en cultivo como en organismos vivos. El análisis de este fenómeno es conocido ahora como silenciamiento

post-transcripcional de genes (PTGS por sus siglas en inglés) (Vázquez-Ortiz y colaboradores 2006).

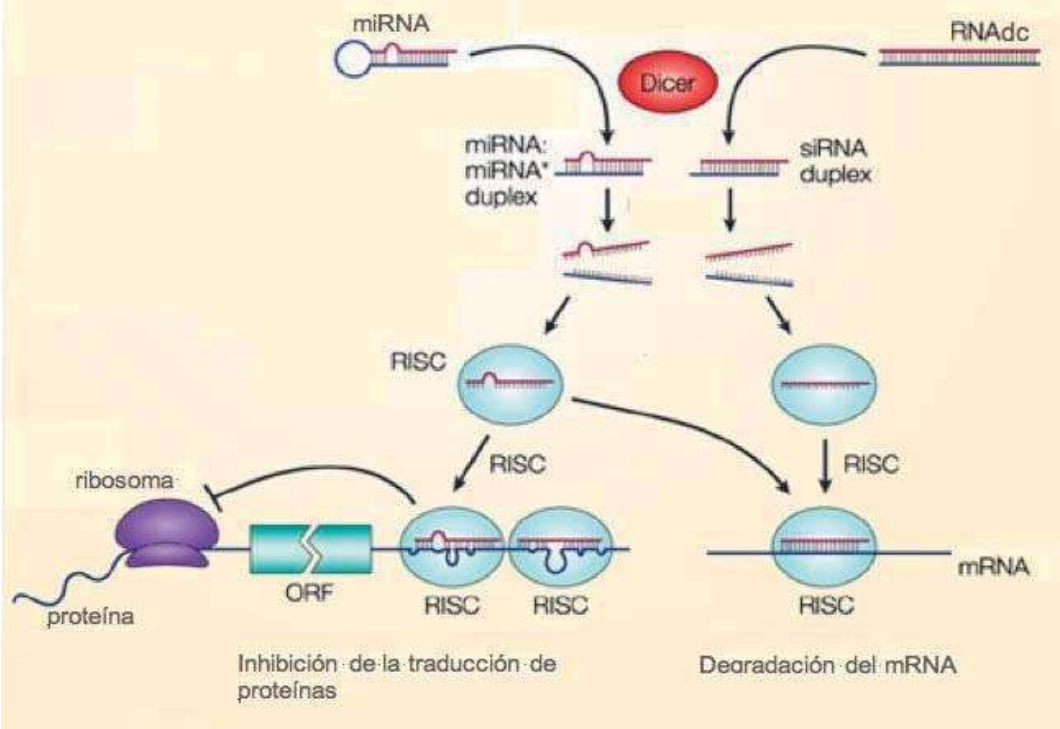


Figura 11. Mecanismo de acción del RNAi. La enzima Dicer se une al dsRNA rompiéndolo en fragmentos de alrededor de 21 nucleótidos conocidos como siRNAs. Estos siRNAs se unen al complejo enzimático RISC, el cual utiliza un filamento del siRNA para unirse al mRNA blanco (RNA de cadena sencilla) de la secuencia complementaria, al ocurrir esto la nucleasa RISC degrada el mRNA blanco con el consiguiente silenciamiento del gen (Vázquez-Ortiz y colaboradores 2006).

1.15. Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La reacción de la transcriptasa reverso y reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR) (Fig. 12), es una adaptación del PCR que sirve para detectar y medir la acumulación de mRNAs escasos en órganos, tejidos o células. Para el análisis por RT-PCR, primero se requiere de RNA total a partir del cual, el RNA específico es copiado a cDNA de una solo hebra, por medio de la transcriptasa reversa. Las moléculas de cDNA sirven de molde para la reacción de PCR usando un par de oligonucleótidos específicos para el gen estudiado. Los fragmentos de DNA amplificados son visualizados por electroforesis en gel de agarosa (Tagu y Moussard 2003).

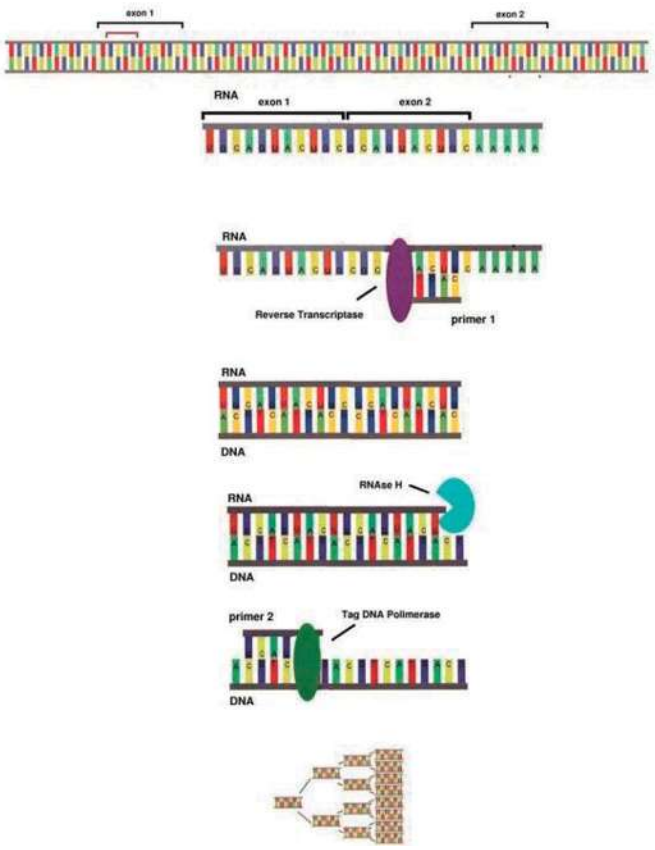


Figura 12. Reacción de la reverso transcriptasa y la reacción en cadena de la polimerasa. La desnaturalización del DNA se efectúa a temperatura elevada (cerca de 95 °C) produciendo moléculas de DNA monocatenarias. Posteriormente, se produce la reacción de alineamiento (annealing) donde los oligonucleótidos (o primers) complementan a las secuencias de los extremos del DNA a amplificar (temperatura entre 40 y 65 °C). La extensión se lleva a cabo a partir de los primers usando una DNA polimerasa (para la Taq polimerasa la temperatura optima es de 72 °C). Finalmente, se amplifica la secuencia específica para el par de oligonucleótidos (Sato y colaboradores 2010).

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a que hemos observado que la insulina afecta varios parámetros de la arquitectura radicular de plántulas de *A. thaliana,* es de gran interés determinar el efecto de dicha hormona sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo en plantas adultas de *A. thaliana*.

III. HIPÓTESIS

La insulina promueve el crecimiento vegetativo y reproductivo de *A. thaliana* a través de la vía MAPK.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la insulina sobre el crecimiento vegetativo, la floración y el rendimiento de semillas en plantas de *A. thaliana.*

4.2. Objetivos Específicos

a) Analizar el efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la germinación de *A. thaliana* Col-0.

b) Determinar la respuesta de diferentes concentraciones de insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas de *A. thaliana*.

c) Determinar el efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo por evaluación del número de hojas de roseta, diámetro de roseta, longitud del tallo floral y número de tallos de plantas de *A. thaliana*.

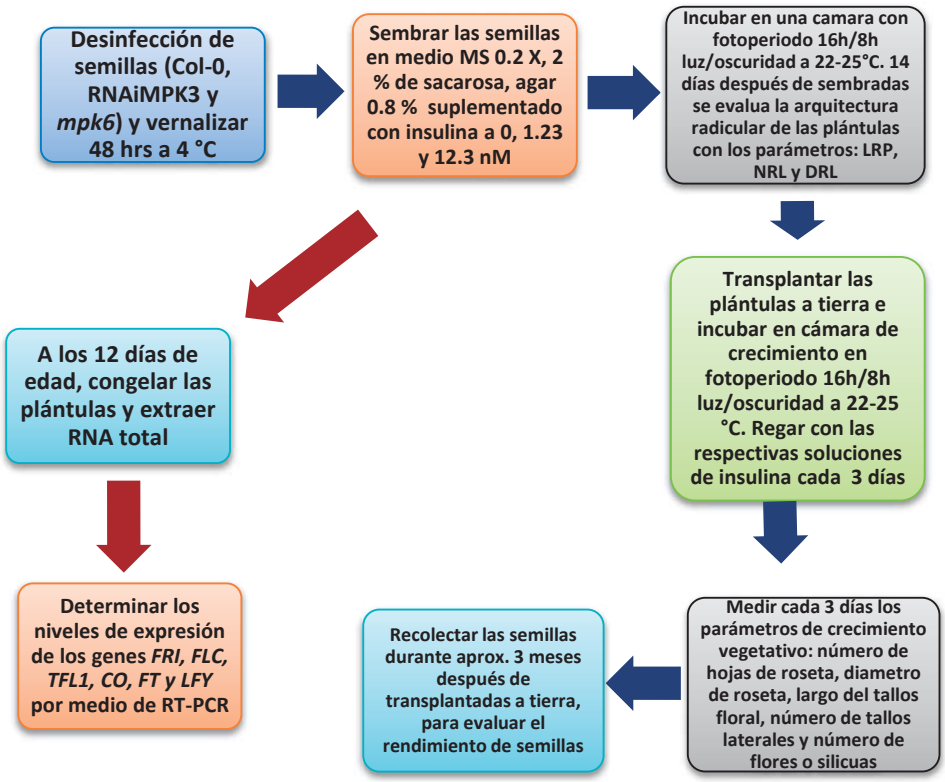
d) Estudiar el efecto de la insulina sobre la reproducción evaluando el número de flores y silicuas y el rendimiento de semillas por planta de *A. thaliana.*

e) Determinar si el efecto estimulador de la insulina sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de *A. thaliana* involucra a la vía MAPK, específicamente a través de la evaluación de los parámetros antes mencionados en las líneas RNAiMPK3 y *mpk6*.

f) Analizar la expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY* involucrados en respuesta a la adición de insulina.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estrategia experimental



5.2. Materiales

Se usaron semillas de *A. thaliana* Col-0, una línea de baja expresión en la cinasa MPK3 (RNAiMPK3), y una mutante en la cinasa MPK6 (*mpk6-/-*), las dos últimas donadas amablemente por el Dr. Ángel Guevara del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Reactivos de Sigma: sales del medio Murashige y Skoog (MS), tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, insulina porcina, gelrite y agarosa. Gel Red 10000X Biotum. Dodecil Sufato de sodio (SDS) y sacarosa. Solución comercial de hipoclorito de sodio (cloralex). Reactivos de J.T. Baker: cloroformo, alcohol isopropílico y etanol. Reactivos de Invitrogen: Trizol, Inhibidor RNasa, kit de RT-PCR SuperScrip III One-

Step RT-PCR System y marcador de pesos moleculares de 1Kb y 100pb. La Humulina N y R fueron de la marca Lilly.

5.3. Equipo

Potenciometro Daigger, 6173; Balanza Analítica, Sartorius TE612; Balanza Granataria OHAUS GA110; Termociclador Perkin Elmer 2400; Centrifuga refrigerada Hermle-labor technik 2400k; Microcentrifuga, Labnet 16 M; Nanocentrifuga Labnet SN04061572; Vortex-Genie 2 Sientific Industries G-650; Micropipetas RAININ pipet-lite 6070026; Fuente poder BIO-RAD power pactm; Basic system Documentador de geles: It 50 módulo integrado de cámara digital de alta resolución 5.0 megapixeles; Cámara de crecimiento con temperatura controlada (22 °C) y fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad; campana de flujo laminar, Thermoelectron Corporation 1839; estereomicroscopio Iroscope ES-24; Autoclave HA-300MII; Espectrofotómetro Beckman 640 y el equipo para electroforesis sumergida Owl separation systems.

5.4. Desinfección y vernalización de semillas

Se agregó a las semillas colocadas en un tubo Eppendorf un ml de agua tridestilada estéril y se incubaron con agitación ocasional durante 10 min. Después se dio un pulso en la nanocentrífuga y se retiró el agua, se adicionó un ml de etanol absoluto, y se agitó vigorosamente. Después de retirar el etanol se agregó un ml de solución desinfectante (cloro 5% y SDS 1%) con agitación constante durante 5 min. Después se centrifugó y retiró la solución, efectuándose siete lavados con agua estéril, y finalmente a las semillas se les agregó un ml de agua estéril y se vernalizaron a 4 °C durante 2 días.

5.5. Preparación del medio de cultivo

Se disolvieron 20 g de sacarosa y 0.86 g de sales MS en un litro de agua tridestilada; se ajustó el pH a 5.7, se agregaron 8 g de agar, a continuación se esterilizó. Después de esterilizarlo, al medio tibio se le agregó 200 µl/l de una solución stock de vitaminas MF (tiamina 1 mg/ml, piridoxina 5 mg/ml y ácido nicotínico 5 mg/ml, esterilizada por filtración) y la insulina (solución stock de 8.64 nM preparada con

insulina porcina liofilizada de Sigma), la cual se adicionó en la cantidad correspondiente para obtener la concentración deseada para cada tratamiento (1.23 y 12.3 nM). La insulina de la marca Sigma se utilizo, para los experimentos *in vitro* mientras que para el riego de plantas en suelo se usaron las Humulinas N y R de la marca Lilly, esto debido a que la insulina de Sigma es un reactivo muy costoso.

5.6. Preparación de las soluciones de insulina para riego

Para preparar las soluciones de insulina a concentraciones de 1.23 y 12.3 nM, se utilizó la Humulina N y R, la cual se adicionó de una solución stock de 100 UI/ml: 2 µl a un litro de agua de la llave esterilizada para la solución de 1.23 nM y 20 µl para la de 12.3 nM.

5.7. Siembra de semillas

Se sembraron diez semillas por caja Petri que contenía el medio de cultivo MS 0.2 X en condiciones estériles (campana de flujo laminar), y se sellaron con parafilm para evitar el contacto con el medio ambiente. Las cajas con las semillas de *A. thaliana* se incubaron en forma vertical para que la raíz de las plántulas creciera sobre el medio, en una cámara con fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad a 22-25 °C.

5.8. Determinación de la cinética de germinación

Se evaluó cada 2 horas el número de semillas germinadas durante 48 horas, se observó la emergencia de la radicula con ayuda del microscopio estereoscópico en los diferentes tratamientos suplementados con insulina a 0, 1.23, 12.3 nM.

5.9. Evaluación de los parámetros del desarrollo de *Arabidopsis*

Después de 14 días de sembradas, se evaluó la arquitectura radicular de las plántulas de *A. thaliana* con los parámetros de: longitud de la raíz principal (LRP) con ayuda de una regla, número de raíces laterales (NRL) bajo la lupa a 2X y densidad de

raíces laterales (DRL), que se determina dividiendo el NRL sobre la LRP. Posteriormente las plántulas se transplantaron a tierra donde fueron regadas cada 3 días con solución de insulina a las concentraciones respectivas. Los parámetros de crecimiento que se evaluaron cada tercer día fueron los siguientes: número de hojas de roseta, diámetro de roseta, largo del tallo floral, número de tallos y número de silicuas o flores, durante un mes y medio. Posteriormente, se recolectaron las semillas producidas durante aproximadamente 3 meses después de transplantadas a tierra y se determinó el rendimiento pesando las semillas y dividiendo dicho peso entre el número de plantas, el rendimiento se expresó como mg/planta.

5.10. Extracción y cuantificación del RNA

Para la extracción del RNA se tomaron plántulas de *A. thaliana* Col-0 12 días después de sembradas. Se molieron las plántulas con nitrógeno líquido, el tejido congelado y molido se transfirió a un tubo Eppendorf al que se adicionó un ml de Trizol. La muestra se homogenizó y después se incubó 5 min a temperatura ambiente, en seguida se adicionó 0.2 ml de cloroformo y se agitó por 15 seg para una posterior incubación por 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Después de centrifugar, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, donde se agregó 0.5 ml de alcohol isopropílico. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 10 min. La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70 % agitando fuertemente en un vortex para finalmente centrifugar a 7,500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Por último, se secó la pastilla en una campana de flujo laminar y se resuspendió el RNA en 30 µl de agua estéril grado biología molecular a 60 °C, la muestra se incubó10 min. Finalmente a la solución de RNA se le agregó 0.5 µl de inhibidor de la RNasa y se almacenó a -20 °C. La integridad del RNA extraído, se analizó por electroforesis en un gel de agarosa, el cual se corrió a 80 mV. El RNA íntegro se observa como dos bandas correspondientes a los RNAr y se cuantificó midiendo la absorbencia de una alícuota a 260 nm. Mediante la fórmula: µg/ml = (Abs)(40)/(1000/1).

5.11. Expresión génica por RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo con el kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase de Invitrogen. Para amplificar cada transcrito, el RNA se diluyó para tener una concentración de 1 µg/µl, de la cual se tomó 0.5 µl y se adicionó 6.25 µl de Buffer 2X, 0.5 µl del oligonucleótido sentido y anti sentido (a una concentración de 10 pM), 4.5 µl de agua y por último 0.25 µl de la mezcla de enzimas RT/ Taq, para llevar a un volumen total de 12.5 µl. Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación, así como las condiciones de amplificación para cada gen: ***MAPK3*:** Sentido 5´ AACTCACGGAGGAC AGTTCATAAG- 3´ y anti sentido 5´ GCAATTTAGCAAGGTACTG GTGAT- 3´ (Juárez Domínguez y colaboradores 2010). Condiciones de la reacción: 50 °C 30 min, y 94 °C 2 min., seguido de 25 ciclos: 94 °C 30 seg., 55 °C 1 min., 68 °C 1 min y una extensión final de 68 °C 5 min. ***MAPK6*:** Sentido 5´-GCCTCAGATGCCTGGGATTGAGAATATTC- 3´ y anti sentido 5´ CATGGAGTTAATGGACCGTAAGCCACTC- 3´ (Bush y Krysan 2007). Condiciones de reacción: 50 °C 30 min. y 94 °C 5 min, seguido de 25 ciclos: 94 °C 15 seg., 67 °C 1 min., 68 °C 45 seg. Y una extensión final de 68 °C 10 min. **UBIQUITINA:** Sentido 5´-GGAAGAAGAAGACTTACACC- 3´ y anti sentido 5´-GTCCACACTT ACCACAGTA- 3´ (Ping y colaboradores 2006). Con las siguientes condiciones: 50 °C 30 min. y 94 °C 5 min, seguido de 35 ciclos: 94 °C 15 seg., 67 °C 1 min., 68 °C 45 seg. y una extensión final de 68 °C 10 min. *LFY, TFL1, FRI* y *FLC*: ***LFY,*** sentido 5´-GGTGACGAACCAAGTATTCAGGTA-3´ y anti sentido 5´-ATAGAGAGACG AGGATGAGCGTTA-3´ (Cheng y colaboradores 2010). ***TFL1,*** sentido 5´-TATCTTTCCTAATATCCCTTCG-3´ y anti sentido 5' TTCAACTCAT CTTTGGCAGT-3´ (Cheng y colaboradores 2010). ***FRI,*** sentido 5´-AGTTGCTTG TTTTGGTGTTCCTTC-3´ y anti sentido 5´-TCCACGCTTGATACTTGATTCAAC-3´ (Geraldo y colaboradores 2009). ***FLC,*** sentido 5´-CCGAACTCATGTTGAAGCTTGTTGAG-3´ y anti sentido 5´-CGGAGATTTGTCCAGCAGGTGACATCTC-3´ (Searle y colaboradores 2006) y las condiciones: 50 °C 30 min. y 94 °C 2 min, seguido de 35 ciclos: 94 °C 15 seg., 55 °C 30 seg., 68 °C 30 seg. y una extensión final: 68 °C 5 min. ***FT*:** sentido 5´-CAAGTCCTAGCAACCCTCACC-3´ y anti sentido 5´-ATAGGCATCATCA CCGTTCGT-3´ (Morris y colaboradores 2010). Condiciones de reacción: 50 °C 30 min.

y 94 °C 2 min, seguido de 35 ciclos: 94 °C 15 seg., 60 °C 1 min., 68 °C 1 min. y una extensión final de 68 °C 5 min. ***CO*:** Sentido 5´- GAGAAATCGAAGCC CGAGGAGCA-3´ y anti sentido 5´-TCAGAATGAAGGAACAATCCCATA-3´ (Morris y colaboradores 2010). Bajo las siguientes condiciones: 50 °C 30 min. y 94 °C 2 min, seguido de 50 ciclos: 94 °C 15 seg., 60 °C 1 min., 60 °C 1 min. y una extensión final de 68 °C por 5 min.

5.12. Electroforesis

Las reacciones de amplificación se analizaron en gel de agarosa al 1% y 1.5 %. Se tomaron alícuotas de 2 a 3 µl y se mezclaron con 3 µl de buffer de carga (0.05% de xilen cianol, 0.05% de azul de bromofenol y 40 % de glicerol en agua destilada). El gel fue preparado con agarosa al 1% y 1.5% y se agregó 1 µl del colorante GelRed. El gel sólido se sumergió en la cámara de electroforesis que contenía una solución buffer TAE. Se cargaron las muestras mezcladas con el buffer de carga en los pozos del gel y se corrieron a 80 Volts. Después de la corrida, el gel se observó en un trans-iluminador con luz UV y el tamaño de los productos amplificados se compararon con el marcador de pesos moleculares.

VI. RESULTADOS

6.1. La insulina estimula la germinación de las semillas de *Arabidopsis* Col-0

Para determinar si la insulina afectaba la germinación de las semillas de *A. thaliana* Col-0, se realizó una cinética evaluando cada 2 horas el porcentaje de semillas germinadas. En la figura 13, se observa que a partir de las 28 horas empiezan a germinar las semillas en el tratamiento con 1.23 nM de insulina, mientras que a las 30h lo hacen las semillas del tratamiento con 12.3 nM de insulina y el control. A partir de las 34h y hasta las 48h observamos un incremento en el número de semillas germinadas en el tratamiento 1.23 nM. Los resultados muestran que la hormona acelera la germinación en las semillas tratadas con 1.23 nM de insulina, mientras que en el tratamiento con 12.3 nM de insulina, se observó un incremento menor que con 1. 23 nM.

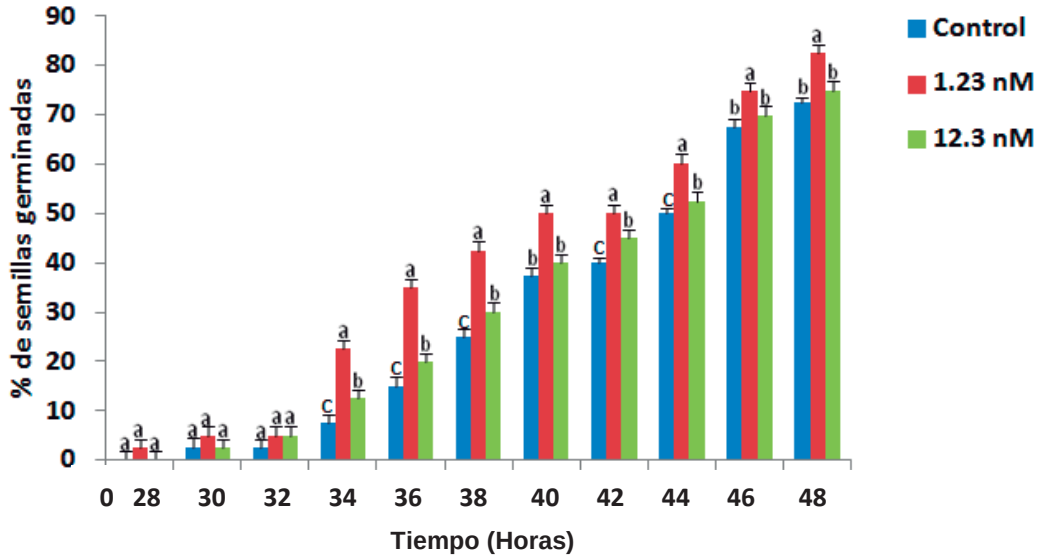


Figura 13. Efecto de la insulina sobre la germinación de las semillas Col-0. La gráfica muestra los porcentajes de germinación a partir de las 20h y hasta las 48h. Las semillas desinfestadas y vernalizadas se sembraron en medio MS 0.2X, 2% de sacarosa, agar 0.8 %, pH 5.7, suplementado con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM. Datos representativos de tres experimentos independientes.

6.2. Cambios en la arquitectura radicular de *A. thaliana* inducidos por la insulina

Para determinar si el efecto estimulador de 1.23 nM de insulina sobre la germinación se mantenía durante el crecimiento radicular, se evaluó la arquitectura de la raíz mediante los parámetros: longitud de la raíz primaria (LRP), el número de raíces

laterales (NRL), y la densidad de raíces laterales (DRL). En este experimento observamos las fotografías de las plántulas (Fig. 14A) en donde se muestra que 1.23 nM de insulina incrementó la longitud de raíz primaria, el número de raíces laterales y la densidad de raíces laterales (Fig. 14 B, C, D). Mientras que, el tratamiento con 12.3 nM de insulina no mostró diferencias respecto al control.

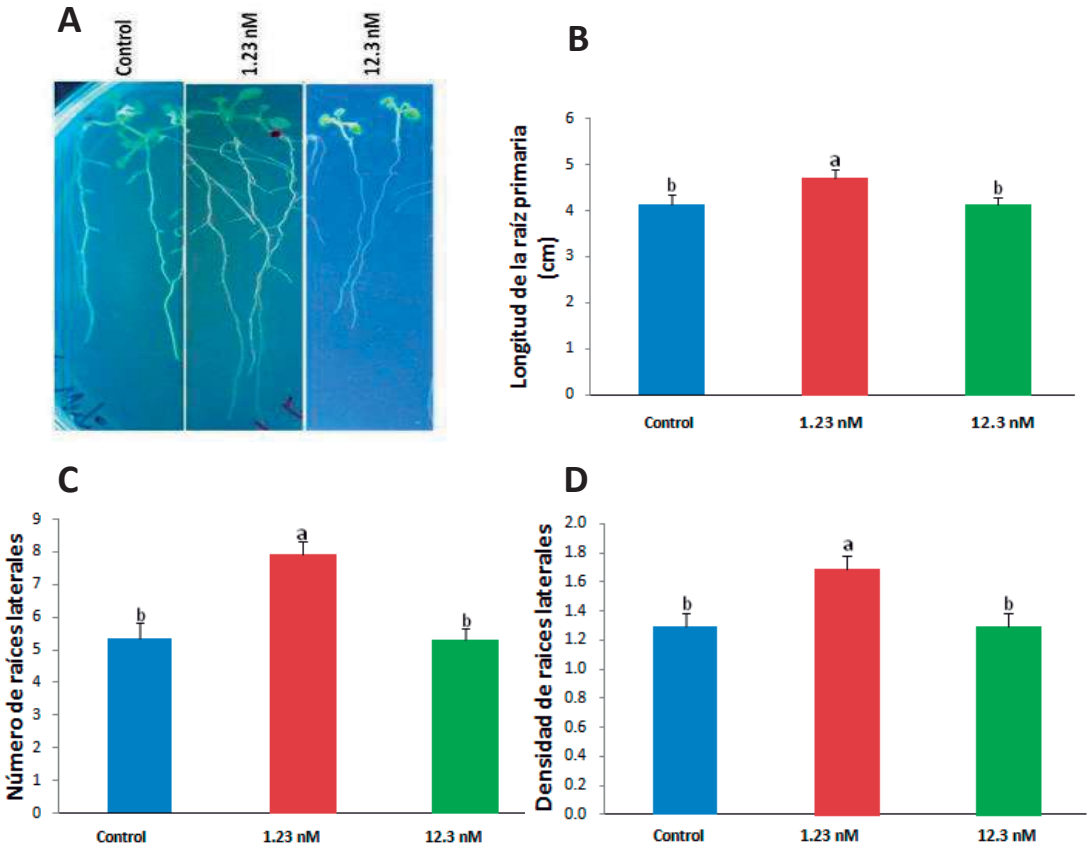


Figura 14. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*. Se sembraron semillas de *A. thaliana* Col-0 en medio MS 2X, 2 % de sacarosa, agar 0.8 %, pH 5.7, suplementado con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM. A) Fotografías representativas de las plántulas *in vitro* a los 14 días de edad, donde se evaluaron los parámetros; B) Longitud de la raíz primaria; C) Número de raíces laterales; D) Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de 40 plántulas y de tres experimentos independientes. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.3. Estimulación del desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* por la insulina (Humulina N)

Se analizó el efecto de las dos concentraciones de insulina sobre el desarrollo vegetativo de las plantas de *Arabidopsis* adultas. Las plántulas crecidas *in vitro* durante

dos semanas se transplantaron a tierra, donde se regaron con soluciones de Humulina N a concentración de 1.23 y 12.3 nM. Para regar las plantas en tierra se usó la Humulina N de la marca Lilly, esto debido a que la insulina de Sigma es un reactivo muy costoso. Los parámetros de crecimiento evaluados fueron: diámetro de la roseta de las plantas, número de hojas de la roseta, longitud del tallo floral y número de tallos. En la figura 15A se muestran las fotografías de las plantas en tierra a los 14 y 21 días, en donde se observa un mayor tamaño del tallo floral en las plantas con el tratamiento 1.23 nM a los 21 días. En la figura 15B, se observa un aumento en el número de hojas de roseta en el tratamiento con 1.23 nM de insulina a partir del día 15 y hasta los 29 días respecto al control. Por otra parte en el diámetro de la roseta, 1.23 nM de insulina no presentó diferencia respecto al control, pero sí 12.3 nM que redujo significativamente este parámetro (Fig. 15C). Por otro lado, en la figura 15D, se observa que 1.23 nM de insulina a partir del día 24 incrementó la longitud del tallo floral de manera significativa respecto al control, y dicho efecto se mantuvo durante todo el periodo de evaluación. Respecto al número de tallos, podemos observar en la figura 15E que el tratamiento con 1.23 nM de insulina no mostró diferencia respecto al control, sin embargo, 12.3 nM de insulina provocó una disminución significativa comparada con el control. Los resultados anteriores muestran que 1.23 nM de insulina estimuló el desarrollo vegetativo, incrementando el número de hojas de roseta y la longitud del tallo floral, en tanto que el tratamiento con 12.3 nM de insulina disminuyó significativamente el diámetro de la roseta y el número de tallos. Llegado el tiempo de floración se analizó el efecto de la insulina en la etapa reproductiva de la planta.

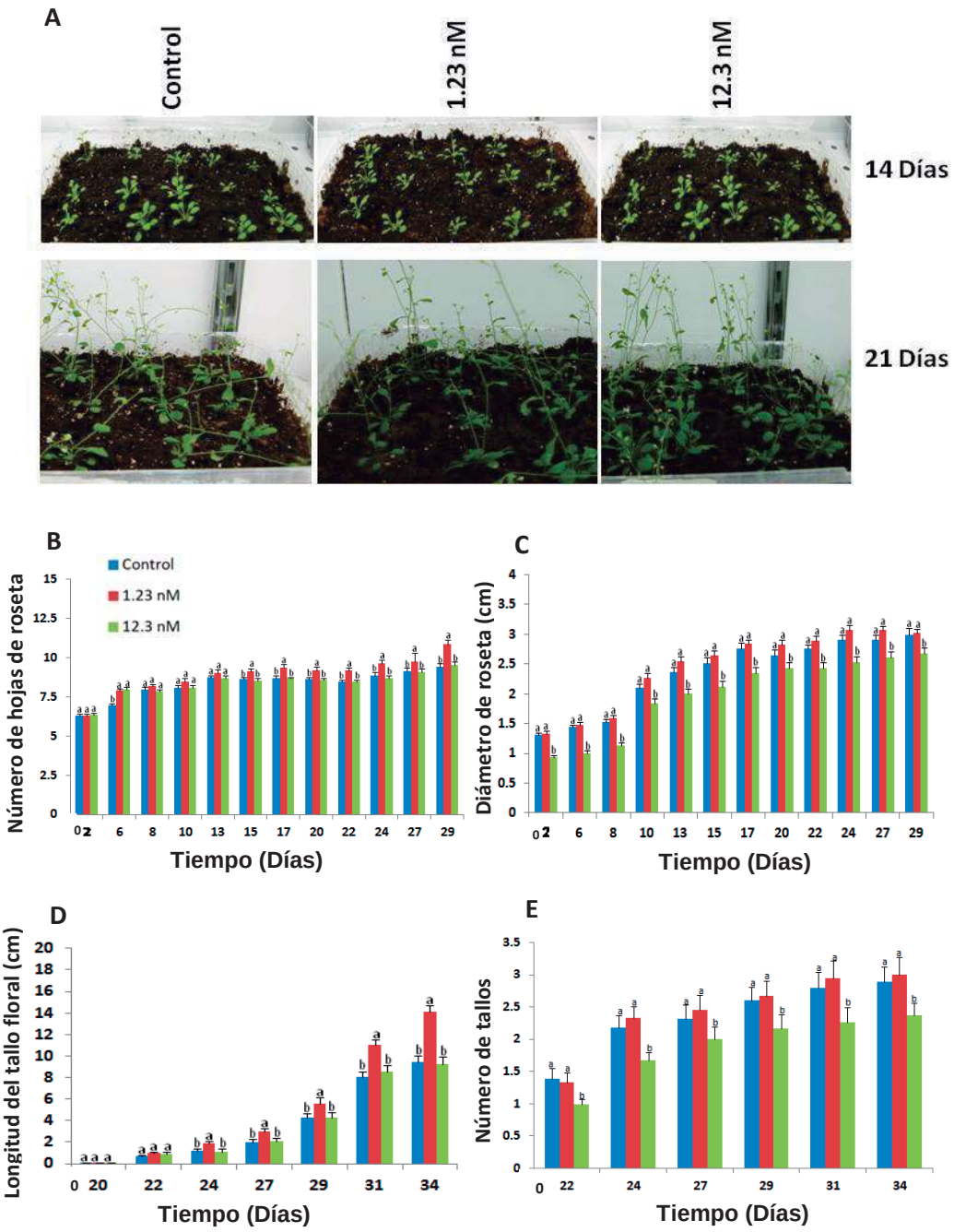


Figura 15. Efecto de la insulina (Humulina N) sobre el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis.* Las plántulas se transplantaron en tierra a los 14 días de edad y se incubaron en una cámara con fotoperiodo 16h luz y 8h oscuridad a 22-25°C. A) Fotografías representativas en los días 14 y 21 después de transplantadas, donde se evaluaron los parámetro siguientes; B) Número de hojas de roseta por planta; C) Diámetro de roseta; D) Longitud del tallo floral; E) Número de tallos; Promedio de 30 plantas y de tres experimentos independientes. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.4. Efecto de la insulina (Humulina N) sobre la etapa reproductiva de *Arabidopsis*

A partir del día 20 empezaron a florecer las plantas y se evaluó el número de flores y silicuas hasta el día 34. Posteriormente, se recolectaron diariamente las semillas maduras para determinar el rendimiento por planta, hasta la etapa de senescencia que fue alrededor de tres meses. Como podemos observar, el tratamiento con 1.23 nM de insulina incrementó el número de flores y silicuas por planta (Fig 16A), al igual que la producción de semillas, la cual aumentó un 75% respecto al control (Fig. 16B). Estos resultados muestran que el efecto de 1.23 nM de insulina, se mantuvo durante el desarrollo de la planta.

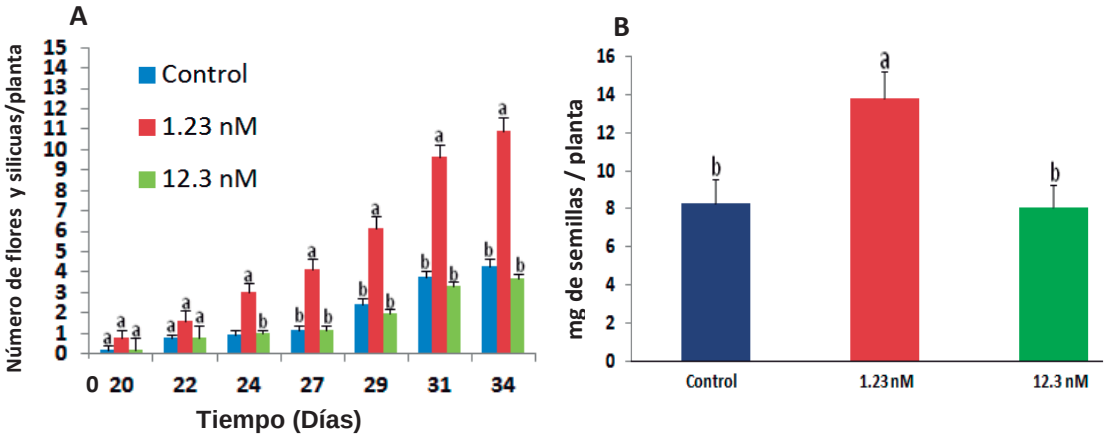


Figura 16. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva de *A. thaliana*. Las plantas en tierra fueron evaluadas cada tres días. Éstas permanecieron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo 16h luz y 8h oscuridad a 22 - 25 °C, y se evaluaron los siguientes parámetros: A) Número de flores o silicuas; B) Rendimiento de semillas (mg) por planta. Promedio de 30 plantas y tres experimentos independientes. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.5. Efecto de la Humulina R sobre el desarrollo vegetativo en plantas de *Arabidopsis*

Para descartar la posibilidad de que la Humulina N estuviera estimulando a las plantas de *A. thaliana* por la presencia del zinc en su molécula, evaluamos el efecto de la Humulina R en plántulas transplantadas a tierra de donde se determinaron: el número de hojas de roseta, diámetro de roseta, longitud del tallo floral y número de tallos. En la figura 17A, se muestra que el número de hojas de roseta se incrementó con 1.23 nM de insulina durante toda la cinética, mientras que la concentración de 12.3 nM no mostró

diferencia respecto al control. En el diámetro de roseta no se presentaron diferencias en ninguno de los tratamientos de insulina respecto al control (Fig. 17B). Se puede observar que 1.23 nM de insulina incrementó la longitud del tallo floral desde el día 21 hasta el final de la cinética (Fig. 17C). En el número de tallos se presentó una disminución en el tratamiento con 12.3 nM de insulina respecto al control (Fig. 17D). Los resultados muestran que la Humulina R tuvo un efecto similar a la N (Fig. 15), sin embargo no fue el mismo resultado, siendo más destacado el efecto con la Humulina N en el tratamiento 1.23 nM de insulina, mientras que el de 12.3 nM de Humulina R no presentó la disminución en el desarrollo vegetativo observado con la N (Diámetro de la roseta y Número de tallos), los resultados anteriores sugieren que la insulina independientemente del zinc esta estimulando el desarrollo vegetativo a una concentración de 1.23 nM.

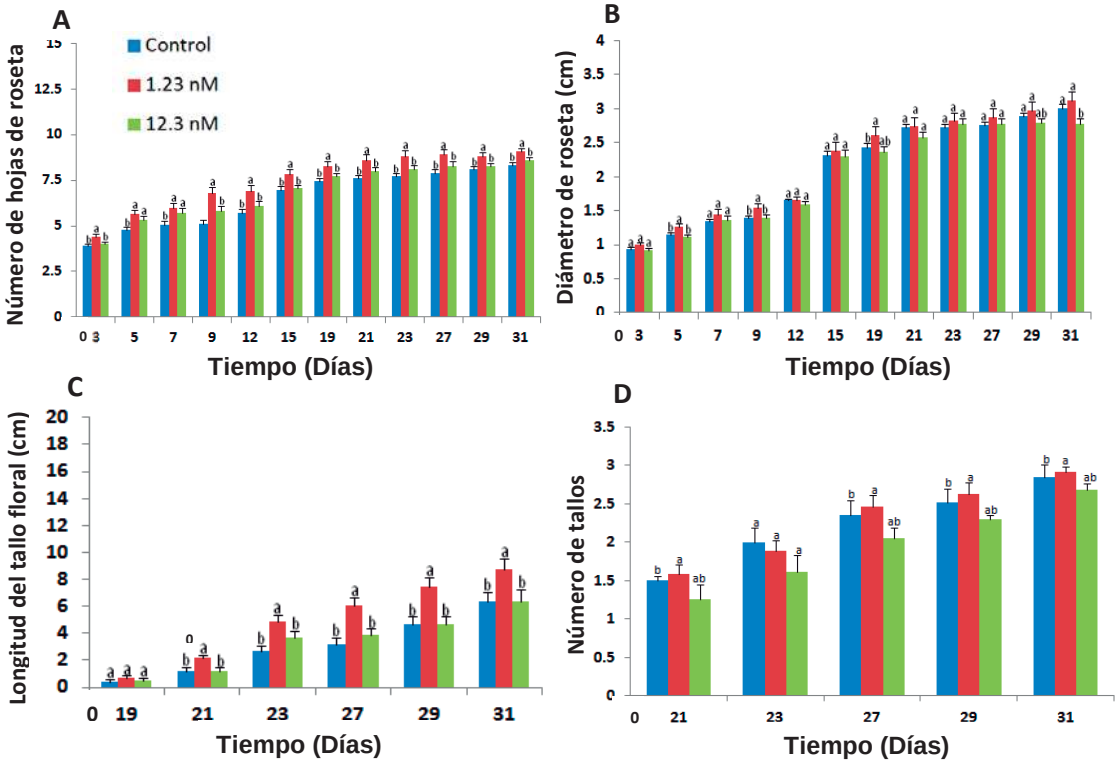


Figura 17. Efecto de la Humulina R sobre el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis*. Las plántulas se transplantaron a tierra a los 14 días de sembradas en medio MS suplementado con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM. Las plantas se incubaron en una cámara de fotoperiodo 16h luz y 8h oscuridad a 22 - 25 °C. A partir de ese día se evaluaron los parámetros siguientes; A) Número de hojas de roseta por planta; B) Diámetro de roseta; C) Longitud del tallo floral; D) Número de tallos; Promedio de 30 plantas. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.6. Efecto de la Humulina R sobre la etapa reproductiva de *A. thaliana*

Al igual que el experimento anterior, se evaluó el efecto de la Humulina R hasta la etapa reproductiva. A partir del día 19 hasta el 31 se contó el número de flores y silicuas. El tratamiento con 1.23 nM de insulina mostró un aumento en el número de flores y silicuas, en un 85% respecto al control, mientras que con 12.3 nM no se observaron diferencias (Fig. 18A). También se evaluó el rendimiento de semillas (mg) por planta, en el cual se observa que 1.23 nM de insulina indujo un aumento del 70% en el rendimiento (Fig. 18B). Estos resultados muestran que la Humulina R y N inducen un efecto similar (Fig. 16), por esta razón, en los experimentos posteriores solamente se utilizó la Humulina N.

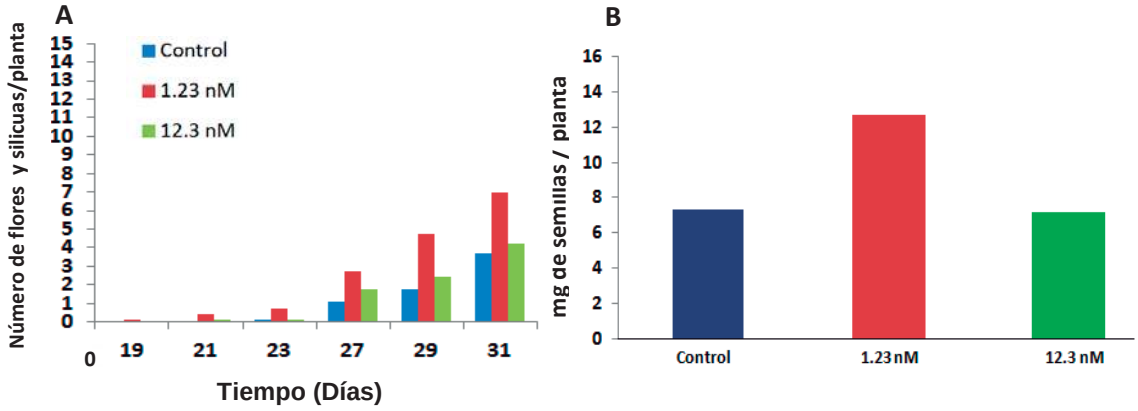


Figura 18. Efecto de la insulina (Humulina R) sobre la etapa reproductiva de *A. thaliana* Col-0. Las plantas en tierra fueron evaluadas cada tres días. Éstas permanecieron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo 16h luz y 8h oscuridad a 22 - 25 °C, y se evaluaron los siguientes parámetros: A) Número de flores o silicuas; B) Rendimiento de semillas (mg) por planta.

6.7. Nivel de expresión de los genes *AtMAPK3* y *AtMAPK6* en las líneas RNAiMPK3 y *mpk6* respectivamente

Una vez que se demostró que la insulina modifica el desarrollo vegetativo y reproductivo, se procedió a determinar si la vía MAPK está involucrada en el efecto estimulador observado por la insulina. Por esta razón se ensayaron las líneas de baja expresión para la cinasa MPK3 (RNAiMPK3) y una mutante en la cinasa MPK6 (*mpk6*). Primero se determinaron los niveles de expresión por RT-PCR de los genes *AtMAPK3* y *AtMAPK6* en las líneas Col-0, RNAiMPK3 y *mpk6* de plántulas de 14 días de edad. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% en donde

se muestra que la expresión de *AtMPK3* está disminuida en la línea RNAiMPK3 comparado al control y que en *mpk6* como se esperaba, no se observó la expresión del gen *AtMPK6* (Fig. 19A, B). Los resultados mostraron que en líneas RNAiMPK3 y *mpk6* efectivamente presentan una baja y nula expresión en sus genes respectivos.

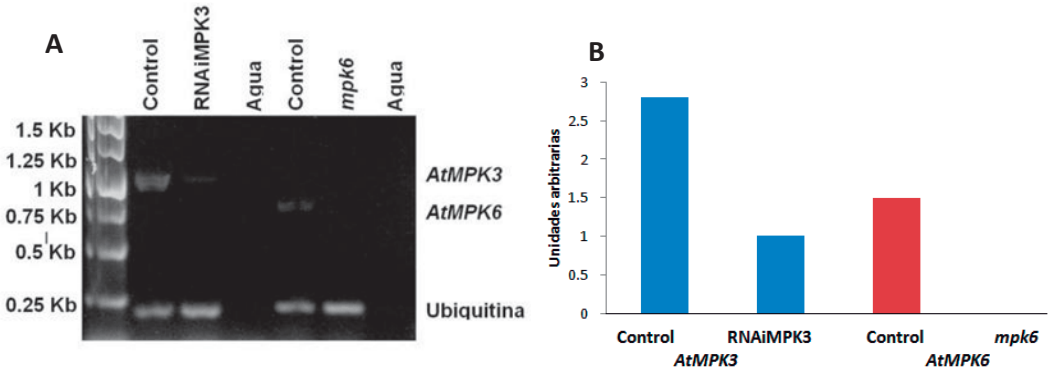


Figura 19. Expresión genética en plántulas Col-0, RNAiMPK3 y *mpk6*. Los productos de amplificación se corrieron en un gel, el cual fue observado bajo luz UV y por medio del programa J image se analizó la intensidad de las bandas. A) Fotografía del gel de agarosa, donde se observan los productos de amplificación de los genes por RT-PCR; B) Gráfica de las unidades arbitrarias de los genes *AtMPK3* y *AtMPK6*. Mostrando como control a la línea Col.0.

6.8. Alteración de la arquitectura radicular en plántulas RNAiMPK3

Para determinar si la cinasa MAPK3 podría estar implicada en la estimulación por la insulina en el desarrollo de la arquitectura radicular, se sembraron las semillas de la línea RNAiMPK3 en medio control, 0, 1.23 y 12.3 nM de insulina y se midieron los parámetros de la arquitectura radicular. Se muestra en las figura 20A, las fotografías de las plántulas *in vitro* en donde se observa que las raíces con la insulina tienen mayor LRP que las control, datos representados en la figura 20B, donde se puede observar un ligero incremento en LRP en ambos tratamientos. Mientras que el NRL disminuyó ligeramente en el tratamiento con 1.23 nM de insulina (Fig. 20C). La figura 20D muestra que hubo una disminución en la DRL con 1.23 nM de insulina y en 12.3 nM de insulina no hubo diferencia respecto al control. Comparando estos resultados con los de la línea silvestre Col-0 (Fig. 14), se observa que el único parámetro estimulado ligeramente por la insulina fue la LRP, a diferencia de la Col-0 donde todos los parámetros fueron incrementados por 1.23nM de insulina.

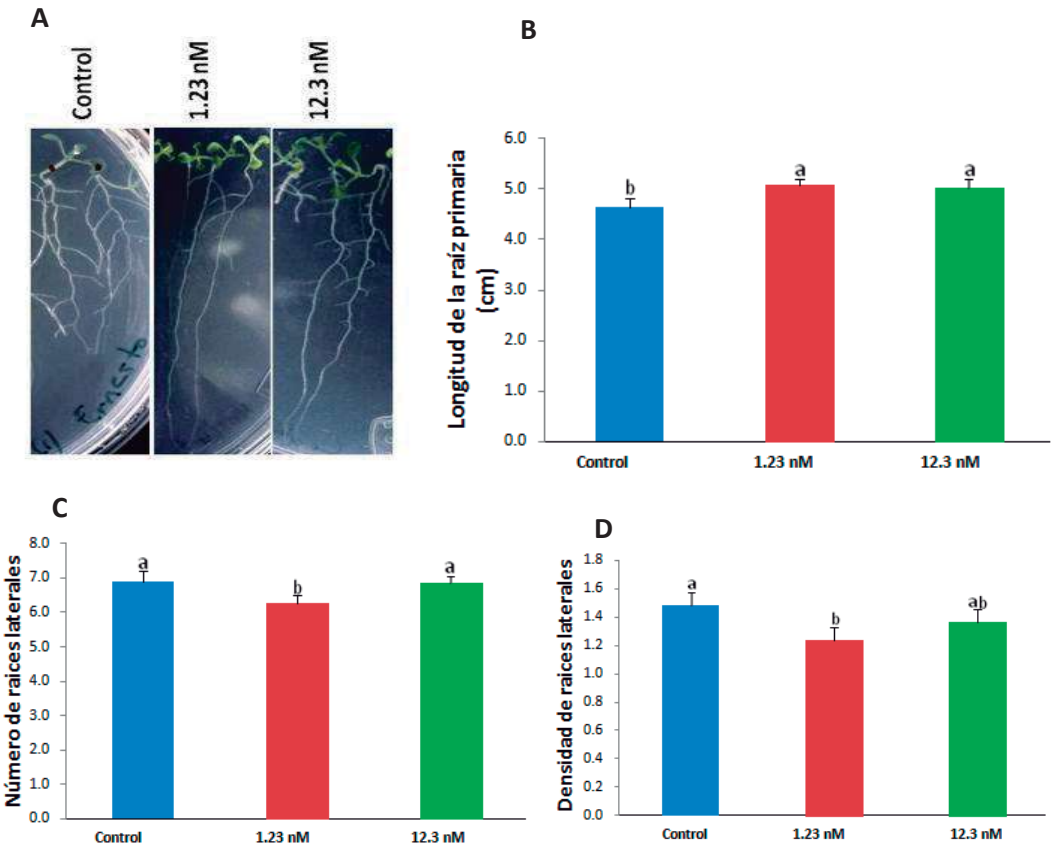


Figura 20. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas RNAiMPK3. Se sembraron semillas de la línea RNAiMPK3 en medio MS 2X, 2 % de sacarosa, agar 0.8 %, pH 5.7, suplementado con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM. A) Fotografías representativas de las plántulas *in vitro* a los 14 días de edad, donde se evaluaron los parámetros; B) Longitud de la raíz principal; C) Número de raíces laterales; D) Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de 40 plántulas. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.9. Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas RNAiMPK3

Los experimentos anteriores, mostraron que la línea RNAiMPK3 presentó un efecto con 1.23 nM de insulina diferente a lo observado en plántulas silvestres con el tratamiento similar de insulina. Las fotografías muestran que las planta en tierra a la edad de 21 días son de mayor tamaño que las tratadas con insulina (Fig 21A). La figura 21B muestra el desarrollo vegetativo y se puede observar que la insulina a 12.3 nM disminuyó el número de hojas de la roseta. No se observó ninguna diferencia en la concentración de 1.23 nM, en relación al control. Respecto al diámetro de la roseta, ambas concentraciones de insulina indujeron una disminución respecto al control (Fig.

21C). Se puede observar en la figura 21D que el tratamiento con 1.23 nM de insulina no afectó la longitud del tallo floral respecto al control, en cambio con 12.3 nM sí disminuyó dicha longitud. En relación al número de tallos, el tratamiento con 1.23 nM de insulina se conservó igual al control, a diferencia de 12.3 nM de insulina que provocó su disminución (Fig. 21E). Comparando los resultados de los experimentos de la línea RNAiMPK3 con la línea silvestre Col-0 (Fig. 15), en la cual 1.23 nM de insulina estimuló el número de hojas de la roseta y la longitud del tallo floral, en la línea RNAiMPK3 no se observaron estos aumentos. Lo anterior sugiere que la cinasa MAPK3 podría estar implicada en el crecimiento vegetal, ya que el efecto estimulador de 1.23 nM de insulina observado en la Col-0 no se presenta en estas plantas.

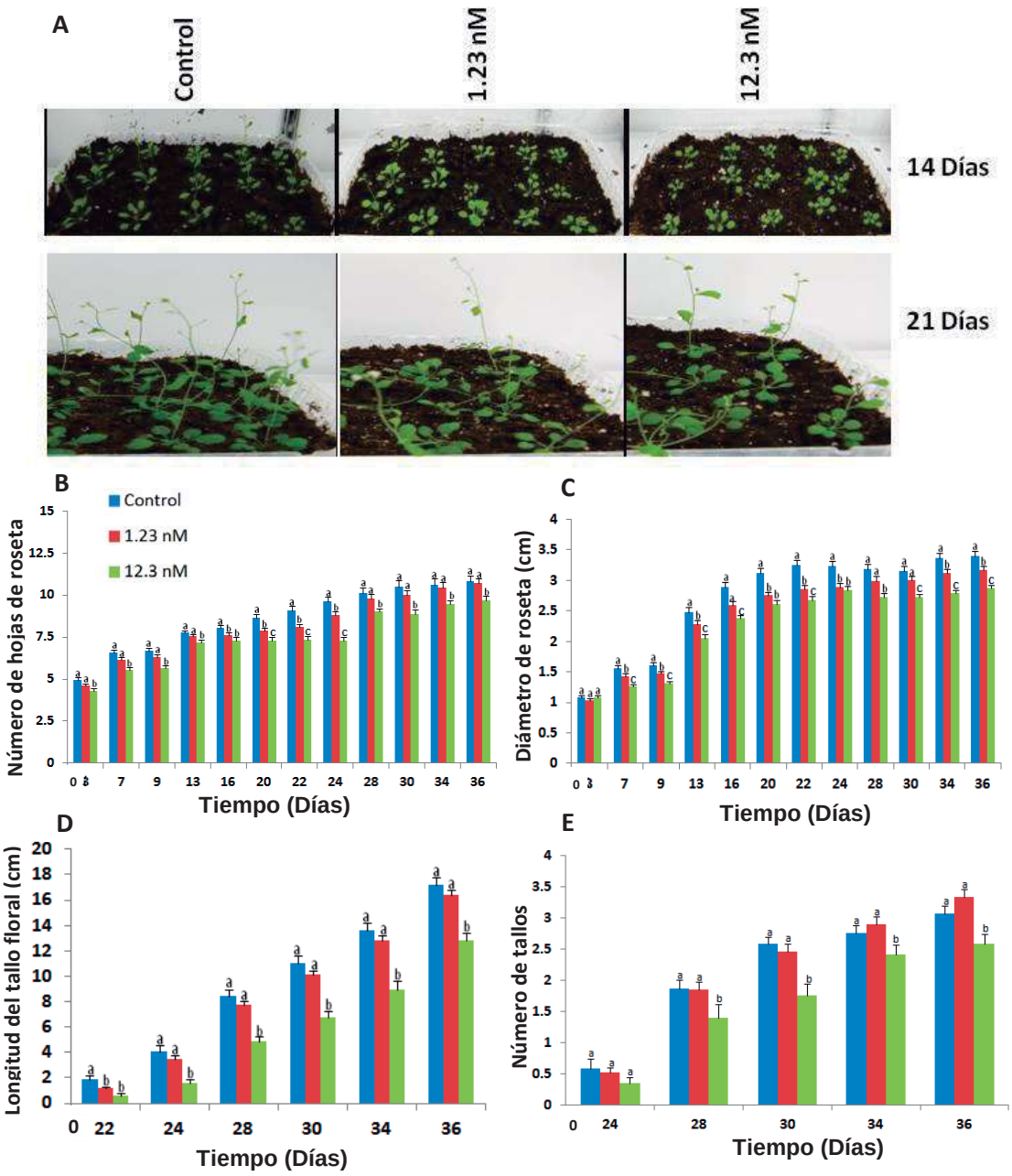


Figura 21. Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas RNAiMPK3. Las plántulas se transplantaron a tierra a los 14 días de sembradas en medio MS suplementado con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM. Las plantas se incubaron en una cámara de fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad a 22 - 25 °C. A) Fotografías en los días 14 y 21 después de transplantadas; B) Número de hojas de roseta por planta; C) Diámetro de roseta; D) Longitud del tallo floral; E) Número de tallos; Promedio de 30 plantas. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.10. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas RNAiMPK3

Al encontrar en los experimentos anteriores que la línea RNAiMPK3 presentaba un comportamiento diferente a la línea silvestre (Col-0), se decidió investigar el efecto de la insulina en la etapa reproductiva. A partir del día 22, las plantas empezaron a florear y se evaluó el número de flores y silicuas. Se puede observar que este último parámetro disminuyó alrededor de un 30% en el tratamiento con 1.23 nM de insulina respecto al control, mientras que 12.3 nM indujo una disminución aun mayor (Fig. 22A). Asimismo, ambas concentraciones de insulina provocaron una disminución en el rendimiento de semillas respecto al control (Fig. 22B). De igual manera, al comparar los resultados con la etapa reproductiva de las plantas Col-0 (Fig. 16) respecto a la línea RNAiMPK3, en esta última no se observó el efecto estimulador de 1.23 nM de insulina, lo que sugiere también que la cinasa MAPK3 podría estar implicada en dicho efecto.

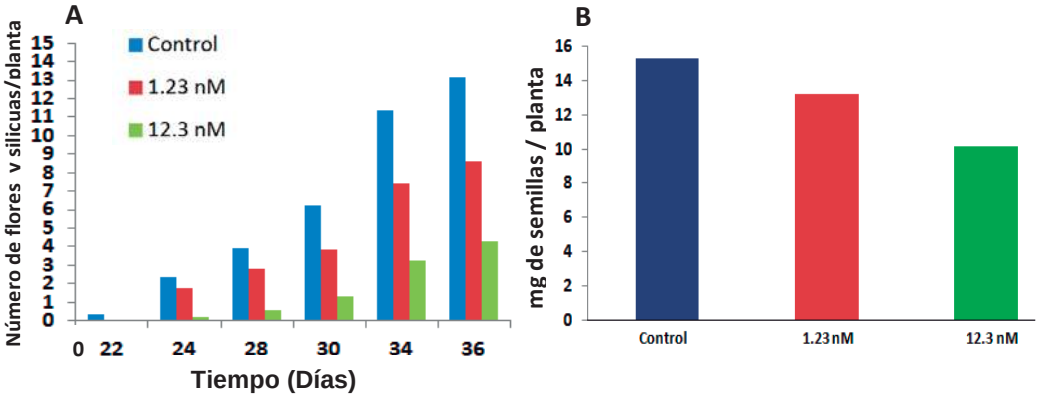


Figura 22. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas RNAiMPK3. Las plantas en tierra fueron evaluadas cada tres días. Estas se incubaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo 16h luz /8h oscuridad a 22°C - 25 °C y se evaluaron los siguientes parámetros: A) Número de flores o silicuas; B) Rendimiento de semillas (mg) por planta. Promedio de 30 plantas de dos experimentos independientes.

6.11. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas *mpk6*

En *Arabidopsis thaliana* Col-0, se determinó que la concentración de 1.23 nM de insulina estimuló desde la germinación hasta la etapa reproductiva, mientras que la línea RNAiMPK3 no mostró dicho estímulo. Como ha sido ampliamente reportado las cinasas MPK3 y MPK6 están involucradas en diferentes procesos biológicos (Komis y colaboradores 2011), por lo antes mencionado se procedió a determinar si la cinasa

MPK6 podría estar participando en el efecto estimulador de la insulina sobre *Arabidopsis thaliana*. Se analizó la línea mutante *mpk6* y se determinaron los parámetros de la arquitectura radicular. En la figura 23A se muestran las fotografías de las plántulas *in vitro*, en donde se puede observar que ambos tratamientos (1.23 y 12.3 nM de insulina) estimularon la LRP respecto al control representado en la figura 23B. Y que 1.23 nM de insulina no mostró diferencias en el NRL, mientras que 12.3 nM lo incrementó (Fig. 23C). Ambos tratamientos de insulina no presentaron diferencia en la DRL respecto al control (Fig. 23D). Comparando estos resultados con los observados en Col-0 y con la línea RNAiMPK3, en donde 1.23 nM de insulina daba un aumento en los tres parámetros (LRP, NRL y DRL) para la primera y un aumento muy discreto de LRP en la segunda, permite concluir que *in vitro* la cinasa MAPK6 estaría participando en el efecto estimulador de la insulina sobre la arquitectura radicular en menor grado que la cinasa MPK3, debido a que no se observa ni un ligero aumento en los parámetros de la raíz.

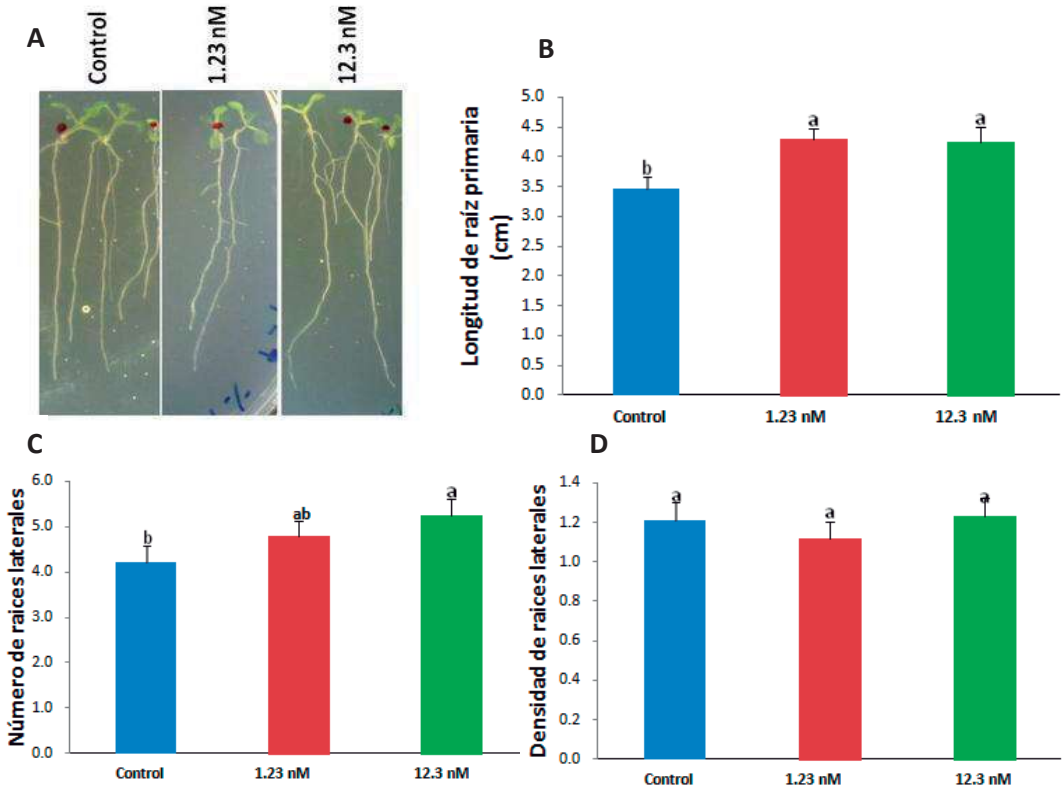


Figura 23. Efecto de la insulina sobre la arquitectura radicular en plántulas *mpk6*. Semillas sembradas de una línea mutante en la cinasa MPK6 de *A. thaliana (mpk6);* A) Fotografías representativas de las plántulas *in vitro* a los 14 días de edad, y se evaluaron los parámetros; B) Longitud de la raíz principal; C) Número de raíces laterales; D) Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de 40 plántulas. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.12. Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas *mpk6*

Para determinar la participación de la cinasa MAPK6 en el efecto de la insulina sobre el crecimiento vegetal, se evaluó el efecto de la insulina en plantas adultas *mpk6*. En la figura 24A se muestra las fotografías a los 14 y 21 días de edad, en donde se observa que las plantas con 12.3 nM de insulina muestran un aumento en el desarrollo vegetativo. En la figura 24B, se observa que en el número de hojas de roseta, el tratamiento con 1.23 nM no muestra diferencia respecto al control, mientras que 12.3 nM lo estimuló desde el día 17 hasta el último día de evaluación respecto al control. La figura 24C, muestra que sólo 1.23 nM de insulina estimuló el diámetro de la roseta y la longitud del tallo floral de las plantas en tierra (Fig. 24D). En la figura 24E, se observa que el número de tallos es estimulado en ambos tratamientos. Los resultados obtenidos de este experimento, no son del todo diferentes a los del Col-0, mostrando similitud en la longitud y número de tallos florales. Sin embargo, en esta línea mutada en MPK6, el tratamiento de 12.3 nM de insulina fue el que estimuló el número de hojas de roseta, diámetro de roseta y número de tallos, los cuales se mantuvieron reducidos en el experimento con Col-0. El único resultado similar al control fue el de longitud del tallo floral, donde se observó que el tratamiento 1.23 nM lo estimuló y 12.3 nM fue igual al control.

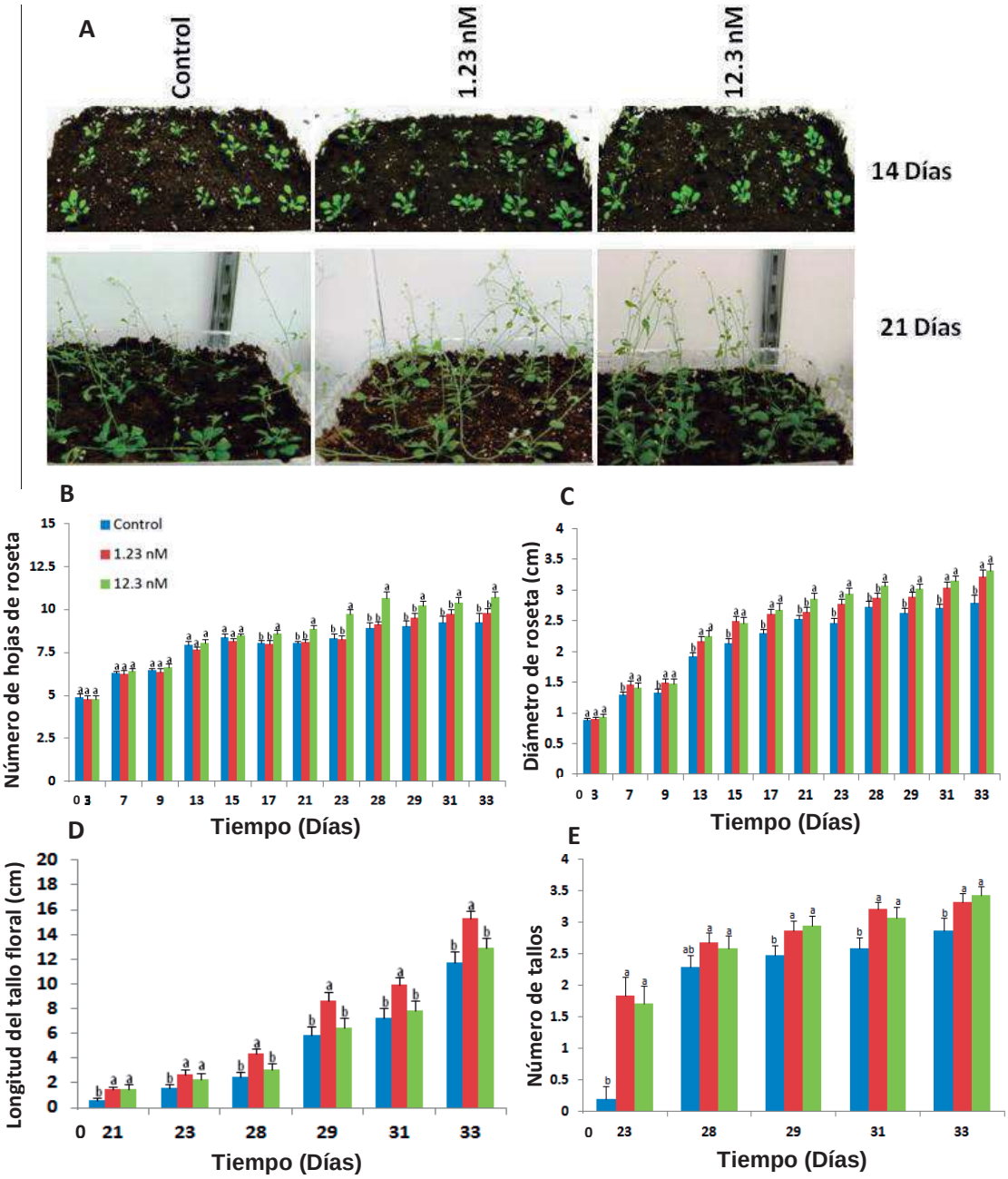


Figura 24. Efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo en plantas *mpk6*. Las plántulas se transplantaron a tierra a los 14 días de sembradas en medio MS suplementado con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM. Las plantas se incubaron en una cámara de fotoperiodo 16h luz y 8h oscuridad a 22 - 25 °C. A) Fotografías de las plantas en el día 14 y 21 después de transplantadas, se evaluaron los parámetro siguientes; B) Número de hojas de roseta por planta; C) Diámetro de roseta; D) Longitud del tallo floral; E) Número de tallos; Promedio de 30 plantas. Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

6.13. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas *mpk6*

A partir del día 17 se evaluó el número de flores y silicuas. Las evaluaciones se realizaron hasta el día 33. En la figura 25A, se muestra el número de flores y silicuas por planta, en donde se observa que los tratamientos 1.23 y 12.3 nM de insulina incrementaron la producción de flores y silicuas, cerca de un 30% con 1.23 nM y un 25% en 12.3 nM respecto al control. En la figura 25B, se observa un aumento en la producción de semillas en los tratamiento de insulina, siendo mayor el rendimiento en 12.3 nM de insulina. Igualmente, al comparar los resultados respecto a las semillas de las plantas Col-0. Observamos que son similares a la Col-0, excepto la concentración de 12.3 nM. Lo anterior sugiere que esta cinasa podría no estar implicada en el efecto estimulador de la insulina sobre el número de silicuas o flores y el rendimiento de semillas por planta a diferencia de la cinasa MPK3.

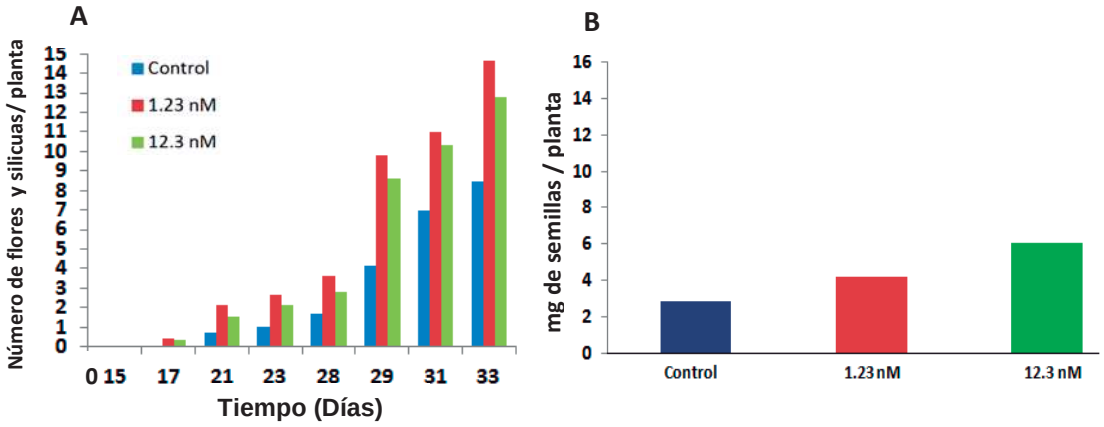


Figura 25. Efecto de la insulina sobre la etapa reproductiva en plantas *mpk6*. Las plantas en tierra fueron evaluadas cada tres días. Éstas permanecieron incubadas en una cámara de fotoperiodo 16h luz y 8h oscuridad a 22 - 25 °C y se evaluaron los siguientes parámetros: A) Número de flores o silicuas; B) Rendimiento de semillas (mg) por planta. Promedio de 30 plantas de dos experimentos independientes.

6.14. Análisis de la expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY*

Por medio de RT-PCR se realizó el análisis de la expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY,* utilizando la ubiquitina como control de carga de muestras de plántulas a los 12 días de edad en tratamientos con insulina a concentraciones de 0, 1.23 y 12.3 nM. Como se aprecia en la figura 26 el nivel de expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1* y *CO* no varió (Fig. 26 A, B, C y D). Interesantemente, los niveles de expresión de los genes florales *FT* y *LFY* se incrementaron significativamente por el

tratamiento con 1.23 nM de insulina. Estos resultados indican que la insulina estimuló la expresión de los genes a los 12 días, lo que nos sugiere que existe un efecto promotor de la insulina sobre los genes florales *FT* y *LFY*, lo que demostraría el aumento en la floración.

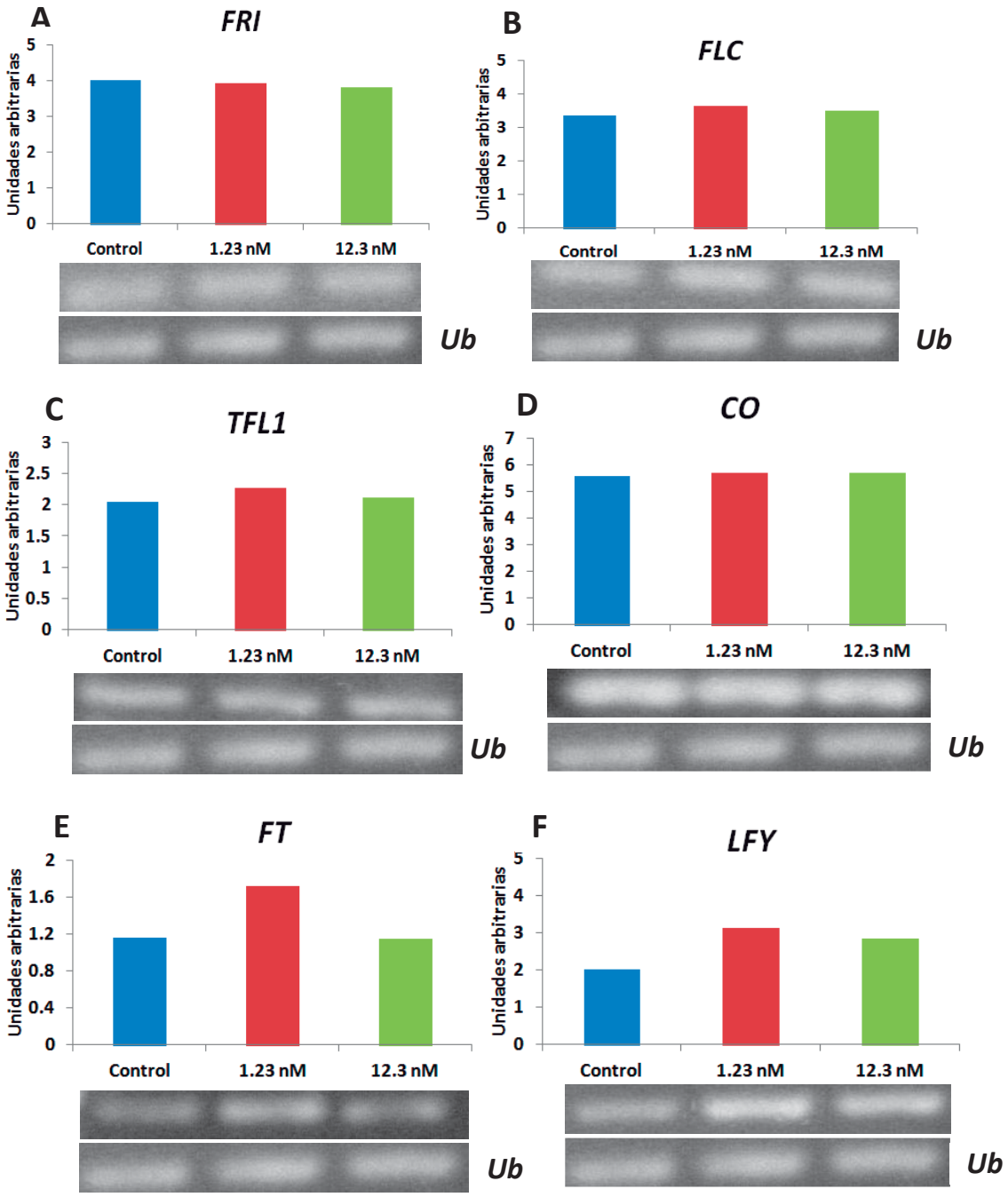


Figura 26. Análisis del nivel de expresión de los genes *FRI, FLC, TFL1, CO, FT* y *LFY* implicados en la floración por estimulo de la insulina. Los geles fueron analizados por medio de luz UV y con el programa J image se analizó la intensidad de las bandas. En esta imagen se puede ver; A) Gráfica de las unidades arbitrarias del gen *FRI*; B) Gráfica de las unidades arbitrarias del gen *FLC;* C) Gráfica de las unidades arbitrarias del gen *TFL1;* D) Gráfica de las unidades arbitrarias del gen *CO;* E) Gráfica de las unidades arbitrarias del gen *FT;* F) Gráfica de las unidades arbitrarias del gen *LFY*.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron que 1.23 nM de insulina estimuló la germinación de las semillas silvestres Col-0 (Fig. 13); los parámetros que caracterizan la arquitectura radicular de las plántulas: LRP, NRL y DRL (Fig. 14), el desarrollo vegetativo (específicamente incrementó el número de hojas y la longitud del tallo floral) (Fig. 15) y el rendimiento de semillas (Fig. 16). Respecto al efecto de la insulina sobre la germinación, dicho comportamiento ya había sido reportado en semillas de maíz (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) (Sánchez de Jiménez y colaboradores 1999). La estimulación del desarrollo radicular por la hormona en plántulas de *Arabidopsis*, había sido previamente determinada (Ortega-Domínguez 2007 y Juárez-Domínguez y colaboradores 2010).

En el presente estudio se evaluó por vez primera el efecto de la insulina sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis*, donde se observó que ambos parámetros se incrementaron significativamente (Figs. 15 y 16). Los resultados sobre el desarrollo reproductivo, mostraron un incremento del 175% en el número de flores y vainas y un 75% en el rendimiento de las semillas por planta en el tratamiento con insulina. Lo anterior muestra el impacto que tendría utilizar insulina en plantas de interés agrícola, ya que el rendimiento es el rasgo más importante en el mejoramiento de las plantas que se requiere para satisfacer la creciente demanda de alimentos (Bartrina y colaboradores 2011). El mejoramiento en el rendimiento es un asunto central en la agenda agrícola global. El rendimiento es una característica compleja que es regulada por varios genes, donde cada uno contribuye con una pequeña parte en el rendimiento total. Por lo tanto es muy difícil conseguir grandes aumentos en el rendimiento de semillas mediante la alteración de uno o unos pocos genes. En promedio, los aumentos anuales obtenidos por métodos clásicos de mejoramiento de las plantas de interés agrícola están en el intervalo de 1 a 2% por año (Aizen y colaboradores 2008). En un estudio reciente se reportó un 47% de aumento de la producción de semillas de Arabidopsis en una doble mutante *ckx3/ckx5* (citocinina oxidasa/deshidrogenasa que al mutarse incrementa los niveles de dicha hormona) comparada con la silvestre (110 mg/planta en las mutantes comparado con 75 mg/planta en la silvestre) (Bartrina y colaboradores 2011). Podemos observar que nuestro rendimiento de 8 mg/planta en la línea silvestre fue bajo comparado con el obtenido en el estudio anterior, creemos que tal diferencia podría deberse a que se usaron diferentes suelos y que la densidad de plantas en nuestro estudio fue mayor, lo que ocasionó una competencia por los nutrientes. También se determinó el efecto de la Humulina R (Figs. 17 y 18), para descartar que la estimulación de la insulina fuese por el zinc que contiene la Humulina N, y se observó que el comportamiento con ambas Humulinas fue similar lo que indica que el zinc no está involucrado en el efecto de la insulina.

Como mencionamos antes, la insulina en mamíferos activa la cascada de las MAPK, a pesar de que en dicha vía participan en plantas alrededor de 20 cinasas del tipo MAPK, solamente dos de ellas han sido frecuentemente implicadas en respuesta a estreses bióticos y abióticos y en desarrollo, MAPK3 y MAPK6 (Ichimura y colaboradores 2002). Por lo antes mencionado, en el presente trabajo se ensayaron estas dos cinasas para determinar su posible participación en la modulación por la hormona, se utilizó una línea de baja expresión para MPK3 (RNAiMAPK3) y una mutante para MPK6. Los resultados obtenidos para la línea de baja expresión respecto al efecto de la hormona sobre el desarrollo de la raíz, el crecimiento vegetativo y reproductivo (Fig. 20, 21 y 22 respectivamente) mostraron que la cinasa MAPK3 podría estar implicada en dicho proceso, debido a que no presentó el efecto estimulador de la insulina, sobre los parámetros antes mencionados, como fue observado en la línea silvestre. Cabe mencionar que en trabajos previos, se había sugerido que la cinasa MAPK3 podría estar involucrada en el efecto promotor de la insulina sobre el desarrollo radicular de *A. thaliana* (Juárez-Domínguez y colaboradores 2010; Santillán-Mendoza 2011). En relación a la mutante *mpk6*, la insulina mostró un efecto estimulador similar al que presentó en la línea silvestre sobre el desarrollo radicular, vegetativo y reproductivo (Figs. 23, 24 y 25). Los resultados anteriores sugieren que la cascada MAPK podría estar involucrada en el efecto de la hormona sobre el desarrollo de la planta, implicando solamente a la cinasa MPK3, resultado similar al reportado por Pascual Morales (2011), donde se reportó que solamente la cinasa MPK3 podría estar participando en la estimulación de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis*. En otro reporte se involucró a la cinasa MPK4 en el desarrollo estomatal (Wang y colaboradores 2007), lo cual refuerza la participación de esta vía durante el desarrollo.

Debido a que se observó una mayor cantidad de flores, siliquas y semillas en las plantas tratadas con insulina (Fig. 16), se analizó la expresión de los genes florales *FRI, FLC, TFL1, CO, FT y LFY* en plántulas de 12 días de edad. Se analizaron las muestras a este tiempo, debido a que en diversas investigaciones se ha reportado la expresión de dichos genes florales a esa edad (Moon y colaboradores 2003; Jung y colaboradores 2007; Tapia-López y colaboradores, 2008; Farrona y colaboradores 2011). Al evaluar la expresión de los genes florales (Fig. 26), se observó que *FRI y FLC* no mostraron diferencia en su expresión con insulina en ningún tratamiento comparado al control, se sabe que la expresión de dichos genes es un requisito en la vernalización (Koornneef y colaboradores 1994; Lee y colaboradores 1994), lo que indicaría que la vía de la vernalización no está siendo afectada con insulina. Los genes de diferenciación del meristemo floral interactúan entre sí activándose o inhibiéndose rio abajo hasta desembocar a *LFY* y *AP1* (Jack 2004). Como observamos en la figura 26, la insulina a una concentración de 1.23 nM solamente incrementó la expresión de *FT* y *LFY*, donde este último es necesario y suficiente para especificar al meristemo floral (Weigel y Nilsson 1995). Inicialmente se pensaba

que la expresión de *LFY* era independiente de *FT*, sin embargo evidencias recientes sugieren que *FT* podría ser capaz de inducir a *LFY* (Schmid y colaboradores 2003). Además, también se observó un retraso en la expresión de *AP1* en mutantes *lfy* y *ft* (Lohmann y colaboradores 2001). Lo antes mencionado, nos permite sugerir que el incremento en la floración de *A. thaliana* por efecto de la insulina, se debe a la estimulación en la expresión de los genes *FT* y *LFY*, lo que está de acuerdo con lo reportado por Kardailsky y colaboradores 1999; Kobayashi y colaboradores 1999, donde observaron una floración acelerada por la expresión constitutiva de *FT* y *LFY*. En relación a la estimulación de la expresión genética por insulina en plantas, recientemente Fierros Romero (2012) en cultivos celulares de *N. tabacum*, mostró que 1.23 nM de insulina incremento la expresión de genes reguladores del ciclo celular como *E2F* y *CICLINA B*. En análisis preliminares, en el presente estudio también observamos que en plántulas de *Arabidopsis thaliana* se incrementó la expresión del gen *E2F* por efecto de insulina (datos no mostrados).

VIII. CONCLUSION

La insulina estimula el desarrollo radicular, vegetal y reproductivo a través de la cascada MAPK, involucrando específicamente a la cinasa MAPK3, además también estimula la expresión de los genes florales *FT* y *LFY* ocasionando con ello un incremento en la floración y rendimiento de semillas.

IX. PERSPECTIVAS

1- Analizar otros componentes de la vía MAPK, como la triple cinasa MEKK 1-1 y MAPK4, por medio de líneas mutantes en estas cinasas, para determinar el efecto estimulador de la insulina sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

2- Analizar si la otra vía de señalización PI3K/TOR activada por la insulina en mamíferos, también estaría participando en el efecto estimulador de la insulina, para este análisis se utilizarían la mutante *s6k*, y las líneas de sobreexpresión OvS6k y OvTOR .

X. BIBLIOGRAFÍA

Aizen M.A., Garibaldi L.A., Cunningham S.A., and Klein A.M. 2008. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. Curr. Biol. 18: 1572–1575.

Amasino R. 2010. Seasonal and developmental timing of flowering. Plant J. 61: 1001-1013.

An H., Roussot C. and Suarez P. 2004. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. Development 131: 3615–3626.

Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann. Rev. Plant Biol. 55: 373 – 399.

Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M., Chiu W., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. and Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity . Nature 415: 977–983.

Ayre B. and Turgeon R. 2004. Graft transmission of a floral stimulant derived from CONSTANS. Plant Physiol. 135: 2271–2278.

Banno H., Hirano K., Nakamura T., Irie K., Nomoto S., Matsumoto K. and Machida Y. 1993. NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases . Mol. Cell Biol. 13: 4745–4752.

Banting F., Best C., Collip J., Campbell W. and Fletcher A. 1922. Pancreatic Extracts in the Treatment of diabetes mellitus: Preliminary Report. Can. Med. Assoc. J. 87: 1062-1067.

Barbasov S., Egorov T. and Kochkina V. 1991. Isolation and characterization of soybean insulin-binding proteins. Bioorg. Khim. 17:421-423.

Barton M. and Poething R. 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild-type and shoot meristemless mutant. Development 119: 823-831.

Bartrina I., Otto E. Strnad M.,Wermer T. and Schmulling T. 2011. Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and, Thus, Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell doi/10.1105/tpc.110.079079.

Báurle I. and Laux T. 2005. Regulation of *wuschel* transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. Plant Cell 17: 2271-2280.

Beck M., Komis G., Muller J., Menzel D. and Samaj J. 2010. *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. Plant Cell 22: 755-771.

Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D. and Samaj J. 2011. Mitogenactivated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol. 189: 1069-1083.

Bishopp A., Mähonen A. and Helariutta Y. 2006. Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. Development 133:1857-69.

Bradley D., Ratcliffe O., Vincent C., Carpenter R. and Coen E. 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. Science 275: 80–83.

Bush S. and Krysan P. 2007. Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development . J. Exp. Bot. 58 : 2181–2191.

Carnier M. and Dornelas O. 2005. From leaf to flower: revisiting Goethe's concepts on the ¨metamorphosis¨ of plants. Plant Physiol., 17: 335-343.

Capron A., Chatfield S., Provart N. and Berleth T. 2009. Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell .The Arabidopsis Book. 7: e0123. doi:10.1199/tab.0123.

Chen R., and Thorner J. 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. 1773: 1311–1340.

Cheng Z., Zhu S., Gao X. and Zhang S. 2010. Cytokinin and auxin regulates WUS induction and inflorescence regeneration *in vitro* in *Arabidopsis*. Plant Cell 29: 927-933.

Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T. and Felix G. 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception . Plant Cell 18: 465–476.

Chiu S. and Cline H. 2010. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. Neural Dev. 10: 5-7.

Chouard P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. Plant Physiol. 11: 191–238.

Clark S. 2001. Cell signalling at the shoot meristem. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 2: 276-284.

Clark S., Running M. and Meyerowitz E. 1995. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. Development 21: 2057-2067.

Colcombet J. and Hirt H. 2008. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. Biochem. J. 413: 217-226.

Collip J. 1923. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. J. Biol. Chem. 56: 513-543.

Conti L. and Bradley D. 2007. TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. Plant Cell 19: 767–778.

Cruz-Ramírez A., Lopéz-Bucio J., Ramírez-Pimentel G., Zurita-Silva A., Sánchez-Calderón L., Ramírez-Chávez E., González-Ortega E. and Herrera-Estrella L. 2004. The xipotl Mutant of Arabidopsis Reveals a Critical Role for Phospholipid Metabolism in Root System Development and Epidermal Cell Integrity. Plant Cell 16: 2020–2034.

Diggle P.K. 2002. Architectural efects on floral form and function: a review. In T. Stuessy, E. Horandl and V. Mayer (eds). Deep morphology: toward a renaissance of morphology in plant systematic. pp 63-80. Systematics. Koeltz, Konigstein.

Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I. and Hirt H. 2007. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: Abusing MAPK defense signalling . Science 318: 453–456.

Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M. and Hirt H. 2007. The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group

C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signalling. Plant Cell 19: 3266–3279.

Farrona S., Hurtado L., Díaz-March R., Schmitz R., Florencio F., Turck F., Amasino R. and Reyes J. 2011. Brahma Is Required for Proper Expression of the Floral Repressor FLC in *Arabidopsis*. PLOS ONE doi:10.1371/journal.pone.0017997.

Ferrandiz C., Pelaz S. and Yanofsky M. 1999. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. Biochem. 68: 321–354.

Fierros Romero G. 2012. Tesis de Maestría: "Efecto de la insulina en la activación de las cascadas PI3K-TOR y MAPK en cultivos de células de tabaco NT-1". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Fosket E. 1994. Plant growth and development: A molecular approach. Academic Press 103: 111-434.

Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 436 – 442.

Garner W. and Allard H. 1922. Photoperiodism, the response of the plant to relative length of day and night. Science 55: 582-583.

Gegas V. and Doonan J. 2006. Expression cell cycle genes in shoot apical meristems. Plant Mol. Biol. 60: 947-961.

Gendall A., Levy Y., Wilson A. and Dean C. 2001. The VERNALIZATION2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. Cell 107: 525–535.

Geraldo N., Baurle I., Kidou S., Hu X and Dean C. 2009. FRIGIDA Delays Flowering in *Arabidopsis* via a Cotranscriptional Mechanism Involving Direct Interaction with the Nuclear Cap-Binding Complex. Plant Physiol. 150: 1611–1618.

Gray W. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. PLoS Biol. 2: 1270-1273.

Goldberg R., Beals T. and Sanders P. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. Plant Cell 5: 1217–1229.

Hepworth S., Valverde F., Ravenscroft D., Mouradov A. and Coupland G. 2002. Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. EMBO J. 21: 4327–4337.

Huala E. and Sussex I. 1992. LEAFY interactes with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. Plant Cell 4: 901–903.

Huijser P. and Schmid M. 2011. The control of developmental phase transitions in plants. Development 138: 4117-4129.

Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle E., Ellis B. E., Morris P., Innes R., Ecker J., Scheel D., Klessig D., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y. and Walker J. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. Trends Plant Sci. 7: 301–308.

Irish F. 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. Plant J. 61: 1014–1028.

Irish V. and Sussex I. 1990. Function of the apetala-1 gene during *Arabidopsis* floral development. Plant Cell 2: 741–753.

Jack T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. Plant Cell 16:S1–S17.

Johanson U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R., and Dean C. 2000. Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. Science 290: 344–347.

Juárez Domínguez A., Mellado Rojas M. y Beltrán Peña E. 2010. Insulina estimula el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la cinasa MAPK3. Biológicas 12: 14-19.

Jung H., Seo Y., Seo P., Reyes J., Yun J., Chua N. and Park C. 2007. The GIGANTEA-Regulated MicroRNA172 Mediates Photoperiodic Flowering Independent of CONSTANS in *Arabidopsis*. Plant Cell 19: 2736–2748.

Kardailsky I., Shukla V., Ahn J., Dagenais N., Christensen S., Nguyen J., Chory J., Harrison M. and Weigel D. 1999. Activation tagging of the floral inducer FT. Science 286: 1962–1965.
Kepinski S. 2006. Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. Plant Biol. 9: 28-34.

Knott J.E.1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. Proc. Soc. Hortic. Sci. 31:152–154.

Kobayashi Y., Kaya H., Goto K., Iwabuchi M. and Araki T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science 286: 1960-1962.

Komis G., Illés P., Beck M. and Samaj J. 2011. Microtubules and mitogen-activated protein kinase signaling. Plant Biol. 14: 650-7.

Koornneef M., Hanhart C. and Vanderveen J. 1991. A genetic and physiological analysis of late flowering mutations in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 229: 57–66.

Koornneef M., Blankestijn-de Vries H., Hanhart C., Soppe W. and Peeters T. 1994 The phenotype of some late-flowering mutants is enhanced by a locus on chromosome 5 that is not effective in the Landsberg erecta wild type. Plant J. 6: 911–919.

Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H. and Machida Y. 2010. TheMAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 22: 3778-3790.

Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Sci. Res. 15: 281-307.

Laux T., Mayer K., Berger J. and Jurgens G. 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development 122: 87–96.

Lee I., Michaels S., Masshardt A. and Amasino R. 1994. The lateflowering phenotype of FRIGIDA and LUMINIDEPENDENS is suppressed in the Landsberg erecta strain of *Arabidopsis*. Plant J. 6: 903–909.

Liu Y. and Zhang S. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 3386 – 3399.

Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R. and Weigel D. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. Cell 105: 793-803.

Mészáros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy V., Teige M., Koncz C. and Peck S Bögre L. 2006. The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin . Plant J. 48: 485–498.

Michaels S. and Amasino R. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. Plant Cell 11: 949–956.

Miles G., Samuel M., Zhang Y. and Ellis B. 2005. RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMAPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMAPK3. Environ. Pollut. 138: 230–237.

Mimida N., Goto, K. Kobayashi, Y., Araki T., Ahn J., Weigel D., Murata M., Motoyoshi F. and Sakamoto W. 2001. Functional divergence of the TFL1-like gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. Genes to Cells 6: 327–336.

Mishra N., Tuteja R. and Tuteja N. 2006. Signaling through MAP kinase networks in plants. Arch. Biochem. Biophys. 452: 55–68.

Montiel G., Pascal G., Allemand C. and Breton C. 2004. Transcription Factor Netwoks. Pathways to the Knowledge of Root Development. Plant Physiol. 136: 3478-3485.

Moon J., Suh S., Lee H., Choi K., Hong C., Paek N., Kim S. and Lee I. 2003. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. Plant J. 35: 613–623.

Morris K., Thornber S., Codrai L., Richardson C., Craig A., Sadanandom A., Thomas B. and Jackson S. 2010. DAY NEUTRAL FLOWERING represses CONSTANS to prevent *Arabidopsis* flowering early in short days. Plant Cell 22: 1118-1128.

Muller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D. and Samaj J. 2010. *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. Plant J. 61: 234-248.

Nakagami H., Pitzschke A. and Hirt H. 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. Trends Plant Sci. 10: 339–346.

Napp-Zinn K. 1987. Vernalization: Environmental and genetic regulation. In Manipulation of Flowering. ed. London: Butterworths. pp. 123–132.

Nühse T., Peck S., Hirt H. and Boller T. 2000. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6 . J. Biol. Chem. 275: 7521–7526.

Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol Rev. 198: 249–266.

Olivares-Reyes J.A. y Arellano-Plancarte A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. REB. 27: 9-18.

Onouchi H., Igeno M., Perilleaux C., Graves K., and Coupland G. 2000. Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. Plant Cell 12: 885–900.

Ortega Domínguez B. 2007. Tesis de Licenciatura. Efecto de la insulina sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Ostergaard L. 2009. Don't 'leaf' now. The making of a fruit. Curr. Opin. Plant Biol. 12: 36–41.

Ovecka M. and Lichtscheidl I. K. 2009. MAPK Signalling. In Signalling in plants. (ED. Baluska F. and Mancuso S.) Springer-Verlag Berlin Heildelberg 51-69.

Pascual Morales E. J. 2011. Tesis de Licenciatura "Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en *Arabidopsis thaliana*". Facultad de Biología U.M.S.N.H.

Ping C., Lall S., Nettleton D. and Howell S.H. 2006. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in arabidopsis tissue culture. Plant Physiol. 141: 620-637.

Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R. and Coupland G. 1995. The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. Cell 80: 847–857.

Ramonell K., Berrocal-Lobo M., Koh S., Wan J., Edwards H., Stacey G. and Somerville S. 2005. Lossof- function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. Plant Physiol. 138: 1027–1036.

Rodríguez-Lopéz C., Rodríguez-Romero A., Aguilar R. and Sanchéz de Jimenéz E. 2011. Biochemical Characterization of a New Maize (Zea mays L.) Peptide Growth Factor. Protein & Peptide Letters 18: 84-91.

Rodriguez M.C., Petersen M. and Mundy J. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant. Ann. Rev. Plant Biol. 61: 621-649.

Saltiel R. and Khan R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414: 799-806.

Samach A., Onouchi H., Gold S., Ditta G., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M. and Coupland G. 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development in *Arabidopsis*. Science 288: 1613–1616.

Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E. and Ortiz-López A. 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. Physiol. Plant. 105: 148-155.

Santillán Mendoza R. 2011. Tesis de Licenciatura "Activación de la cascada de señalización MAPK de *Arabidopsis thaliana* por insulina". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Sato E., Furuta R. and Miyazawa T. 2010. An Endogenous Murine Leukemia Viral Genome Contaminant in a Commercial RT-PCR Kit is Amplified Using Standard Primers for XMRV. BioMed. 7: 110.

Saucedo García M. y Gavilanes Ruiz M. 2005. Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. REB. 24: 4-1.

Schmid M., Uhlenhaut N.H., Godard F., Demar M., Bressan R., Weigel D. and Lohmann J.U. 2003. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. Development 130: 6001-6012.

Searle I., He Y., Turck T., Vincent C., Fornara F., Kröber S., Amasino A., and Coupland G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis.* Gen. Devel. 20: 898–912.

Shannon S. and Meeks D. 1991. A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. Plant Cell 3: 877–892.

Sheldon C.C., Finnegan E.J., Rouse D.T., Tadege M., Bagnall D., Helliwell C., Peacock W.J. and Dennis E.S. 2000a. The control of flowering by vernalization. Plant Biol. 3: 418–422.

Sheldon C.C., Rouse D.T., Finnegan E.J., Peacock W.J. and Dennis E.S. 2000b. The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 3753– 3758.

Silva L., Santos S., Azevedo C., Cruz M., Venâncio T., Cavalcante C., Uchoa A., Astolfi S., Oliveira A., Fernandes K. and Xavier-Filho J. 2002. The leaves of green plants as well as a cyanobacterium, a red alga, and fungi contain insulin-like antigens. Med. Biol. 35: 297-303.

Simon R., Igeño I., and Coupland G. 1996. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. Nature 384: 59–62.

Sotelo R., Garrocho-Villegas V., Aguilar R., Calderón Ma. E. y Sánchez de Jiménez E. 2010. Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays L.*) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. Cell. Dev. Biol. 46:578–586.

Srikanth A. and Schmid M. 2011. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cell Mol. Life Sci. 68: 2013–2037.

Tagu D. and Moussard C. 2003. Fundamentos de las técnicas de biología molecular. Editorial Acribia S. A. Francia. 20-25, 78-79, 98-105, 126-129.

Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K. and Shinozaki K. 2011. Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. Mol. Cell 41: 649-660.

Takahashi Y., Soyano T., Kosetsu K., Sasabe M. and Machida Y. 2010. HINKEL kinesin, ANP MAPKKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 51: 1766-1776.

Tapia-López R., García-Ponce B., Dubrovsky J.G., Garay-Arroyo A., Pérez-Ruíz R.V., Kim S-H., Acevedo F., Pelaz S. and Alvarez-Buylla E.R. 2008. An *AGAMOUS*-Related MADS-Box Gene, *XAL1* (*AGL12*), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. Plant Physiol. 146:1182-1192.

Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L. and Hirt H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis* . Mol. Cell 15 : 141 – 152.

Tena G., Asai T., Chiu W. and Sheen J. 2001. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades . Curr. Opin. Plant Biol. 4: 392–400.

Torres M. and Dangl J. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development . Curr. Opin. Plant Biol. 8: 397–403.

Umbrasaite J., Schweighofer A., Kazanaviciute V., Magyar Z., Ayatollahi Z., Unterwurzacher V., Choopayak C., Boniecka J., Murray J. A. H., Bogre L. and Meskiene I. 2010. MAPK Phosphatase AP2C3 Induces Ectopic Proliferation of Epidermal Cells Leading to Stomata Development in *Arabidopsis*. Plos One 5: 1-18.

Vásquez-Ortiz G., Piña-Sánchez P. y Salcedo M. 2006. Grandes alcances de los RNAs pequeños, RNA de interferencia y microRNA. Invest. Clin. 58: 335-349.

Wang H., Liu Y., Bruffett K., Lee J., Hause G., Walker J. and Zhang S. 2008. Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsi*s ovule development . Plant Cell 20: 602–613.

Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. and Zhang S. 2007. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase in *Arabidopsis*. Plant Cell 19: 63-73.

Weigel D. and Nilsson O. 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. Nature 377: 495–500.

Widmann C., Gibson S., Jarpe M. and Johnson G. 1999. Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol. Rev. 79: 143–180.

Wigge P., Kim M., Jaeger K., Busch W., Schmid M., Lohmann J. and Weigel D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. Science 309: 1056–1059.

Wilson R., Heckman J., and Somerville C. 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. Plant Physiol. 100: 403–408.

Wilson Z. A. 2000. *Arabidopsis*. Editorial Oxford University Press., USA. pp. 1-4.

Xiong L. and Yang Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acidinducible mitogen activated protein kinase. Plant Cell 15: 745 – 759 .

Yamaguchi A., Kobayashi Y., Goto K., Abe M., and Araki T. 2005. TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. Plant Cell Physiol. 46: 1175-1189.

Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P., Durner J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana* : lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 15811–15816.

Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E., Jones J., Felix G. and Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. Nature 428: 764–767.

Páginas de internet consultadas

(http://pi.lilly.com/us/humulin-n-ppi.pdf)