



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

Maestría en ciencias en biología experimental

Tesis

**La activación de TOR por insulina estimula el desarrollo
de los pelos radiculares de *A. thaliana*.**

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Experimental

PRESENTA:

Biol. Edgar José Pascual Morales

ASESORA DE TESIS:

D.C. ELDA MARÍA BELTRÁN PEÑA
Doctora en ciencias en bioquímica

COMITÉ TUTORAL

D. C. ERNESTO GARCÍA PINEDA
Doctor en ciencias en biotecnología de plantas

D.C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO
Doctor en ciencias en biotecnología de plantas

D.C. VÍCTOR MEZA CARMEN
Doctor en ciencias en biología experimental

D. C. Eduardo Valencia Cantero
Doctor en ciencias en biotecnología de plantas

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. ANTECEDENTES	3
1.1.Reguladores del crecimiento vegetal	3
1.2.Reguladores del crecimiento vegetal de naturaleza peptídica	5
1.3.Participación de los péptidos de señalización en el crecimiento unidireccional	8
1.4 Cascadas de señalización activadas por insulina	10
1.5 Vía de señalización PI3K/TOR	10
1.6 Factores de crecimiento parecidos a insulina en plantas	11
1.7 Vía de señalización PI3K/TOR en plantas	13
1.8 Cinasa TOR involucrada en el desarrollo vegetal	15
1.9 Participación de TOR en el crecimiento de los pelos radiculares	18
1.10 Participación de ROS en la regulación del desarrollo vegetal	19
1.11 Efecto de las ROS sobre el crecimiento de los pelos radiculares	20
1.12 Pelos radiculares como modelo de estudio	23
II. JUSTIFICACIÓN	26
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1.Material biológico y condiciones de crecimiento	27
5.2. Preparación de los medios de cultivo	27
5.3. Experimentos con insulina e inhibidores de TOR en medio sólido	28
5.4. Experimentos con insulina e inhibidores de TOR en medio líquido	28
5.5. Experimentos con la mutante condicionada tor-es1	28
5.6. Análisis de pelos radiculares	29
5.7. Producción de ROS en los pelos radiculares de <i>Arabidopsis</i> determinada por tinción histoquímica con el colorante 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H ₂ DCFDA)	29
5.8. Evaluación de los niveles de ROS en los pelos radiculares de la línea HyPer de <i>Arabidopsis</i>	39
5.9. Microscopía de epifluorescencia	31
VI. RESULTADOS	32
6.1. Efecto de la insulina sobre la longitud de los pelos radiculares	32
6.2. Participación de TOR en el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina	33
6.2.1. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de <i>Arabidopsis</i>	33

6.2.2. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea 25c	34
6.2.3. Efecto de los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares	36
6.2.4. Efecto de los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas 25c crecidas en medio líquido	38
6.2.5. Efecto de los solventes utilizados en la preparación de rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares	40
6.2.6. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en la línea de baja expresión inducible por estradiol <i>tor-es1</i>	42
6.3. Participación de las ROS sobre el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina	44
6.3.1. Efecto de la insulina e inhibidores de TOR sobre la producción de ROS	44
6.3.2. Efecto de la insulina sobre la producción de H ₂ O ₂	45
6.3.3. Cambio de los patrones del H ₂ O ₂ en respuesta a la insulina	46
6.3.4. Alteraciones en los niveles oscilatorios de H ₂ O ₂ en respuesta a los inhibidores de TOR	48
VII. DISCUSIÓN	50
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. PERSPECTIVAS	55
X. CITAS BIBLIOGRAFICAS	56

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	Pág.
Figura 1. Señalización de péptidos pequeños en el crecimiento y desarrollo	6
Figura 2. Vía de señalización PI3K/TOR en mamíferos	11
Figura 3. Ruta PI3K/TOR/S6K putativa en plantas	15
Figura 4. Modelos que explican la distribución de ROS y la localización de la proteína RBOHC en los pelos radiculares en crecimiento	22
Figura 5. Desarrollo y elongación de pelos radiculares de <i>Arabidopsis</i>	25
Figura 6. Crecimiento de los pelos radiculares en respuesta a diferentes concentraciones de insulina	32
Figura 7. Efecto de la insulina y la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de <i>Arabidopsis</i>	34
Figura 8. Efecto de la insulina y la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea 25c de <i>Arabidopsis</i>	35
Figura 9. Efecto de la insulina y los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares en <i>Arabidopsis</i>	37
Figura 10. Efecto de la insulina y los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea 25c de <i>Arabidopsis</i>	39
Figura 11. Efecto de la rapamicina disuelta en DMSO sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea silvestre y 25c de <i>Arabidopsis</i>	41
Figura 12. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en la mutante tor-es1 inducible por estradiol	43
Figura 13. Efecto de la insulina e inhibidores de TOR sobre la producción de ROS en los pelos radiculares de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	45
Figura 14. Efecto de la insulina sobre los niveles de H ₂ O ₂ en la línea	46

HyPer de *Arabidopsis*

Figura 15. Cambios en los patrones oscilatorios de H ₂ O ₂ en la línea HyPer en respuesta a la insulina	47
Figura 16. Efecto de la inhibición de TOR en las oscilaciones de H ₂ O ₂ en plántulas HyPer tratadas con insulina	49
Tabla 1. Familia de péptidos y su función biológica	8
Tabla 2. Proteínas de la vía PI3K/TOR/S6K descritas para <i>Arabidopsis</i>	13

RESUMEN

Los organismos vegetales integran múltiples estímulos ambientales que alteran sus patrones de crecimiento y desarrollo, se ha sugerido que estos procesos son controlados por pequeños compuestos orgánicos llamados fitohormonas, sin embargo el número reducido de estas hormonas es insuficiente para explicar la gran diversidad de procesos del desarrollo en vegetales, lo que sugiere que otro tipo de fitorreguladores también podrían tener un papel importante en su crecimiento. Se conoce que en los vegetales existen también reguladores del crecimiento de naturaleza peptídica y los reportes que implican a este tipo de compuestos son cada vez más frecuentes. Algunos de estos péptidos son la insulina y los factores de crecimiento parecidos a insulina, que en vegetales presentan actividad biológica similar a la presentada en animales. En el presente trabajo se demostró que la insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares en *Arabidopsis thaliana*, dicho crecimiento no se presentó bajo la inhibición de TOR con rapamicina y torin1, lo que sugiere que el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina involucra la actividad de TOR ya que la vía de señalización PI3K/TOR/S6K está altamente conservada en *Arabidopsis*, y el desarrollo de estos órganos está altamente influenciado por esta cinasa; acompañando a este efecto se observó abultamiento y deslocalización de las ROS en la punta de los pelos tratados con rapamicina y torin1. Mediante la sonda *HyPer* la cual revela la producción de H₂O₂ en tiempo real se determinó que esta hormona aumenta los patrones oscilatorios de H₂O₂ en el ápice del pelo lo que indica una mayor actividad y crecimiento al igual que induce mayor producción de H₂O₂. Estos efectos fueron abatidos por la adición del inhibidor torin1, lo que indica que río abajo de TOR existen blancos que regulan la producción de ROS en los pelos radiculares de *Arabidopsis* y que el efecto de la insulina sobre estos órganos depende de la participación de TOR.

Palabras clave: Insulina, TOR, pelos radiculares de *Arabidopsis*, ROS, rapamicina

ABSTRACT

Plants integrate multiple environmental stimuli that alter their growth patterns and development, it has been suggested that these processes are controlled by small organic compounds called plant hormones, however the reduced number of these hormones is insufficient to explain the wide range of developmental processes in plants, suggesting that other type of growth regulators may also have an important role in its growth. It is known that in plant to exist growth regulators of peptide nature too and, reports involving such compounds are increasingly frequent. Some of these peptides are the insulin and insulin-like growth factors that in plants exhibit biological activity similar to that presented in animals. In the present work it was shown that insulin stimulates the root hairs growth in *Arabidopsis thaliana*, this growth was not presented under TOR inhibition with rapamycin and torin1, suggesting root hairs growth involves TOR insulin-stimulated activity since PI3K/TOR/S6K signaling pathway is highly conserved in *Arabidopsis*, and the development of these organs is highly influenced by this kinase, accompanying this effect was observed swelling and relocation of ROS on tip hairs treated with rapamycin and torin1. By Hyper probe which reveals H₂O₂ production in real time was determined that this hormone increases H₂O₂ oscillatory patterns in the hair tip which indicates a greater activity and growth as well as induce increased production of H₂O₂. These effects were reduced by the inhibitor torin1 addition, indicating that downstream of TOR exist targets that regulate ROS production in *Arabidopsis* root hairs and that insulin effect on organs depends of TOR participation.

Keywords: Insulin, TOR, Root hair of *Arabidopsis*, ROS, rapamycin

I. ANTECEDENTES

1.1. Reguladores del crecimiento vegetal

Las plantas integran múltiples estímulos ambientales para regular su crecimiento y desarrollo, dichos estímulos activan vías de señalización específicas a través de moléculas reguladoras del crecimiento. Estas últimas comprenden a los fitoreguladores clásicos como las auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico entre otros. Las auxinas se han relacionado en procesos como respuestas trópicas a la luz y la gravedad, en la arquitectura general de la raíz y follaje, la formación de los órganos, el desarrollo vascular y el crecimiento de explantes en cultivo de tejidos (Teale *et al.*, 2006). La auxina natural en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA) (Kende y Zeevaart, 1997). El AIA actúa como molécula señal durante los procesos de división, elongación y diferenciación celular desde la embriogénesis, donde establece la polaridad basal-apical y la formación de los meristemas de la raíz y el follaje hasta el desarrollo post-embriionario (Bishopp *et al.*, 2006; Teale *et al.*, 2006). La biosíntesis de auxinas ocurre tanto en el follaje como en la raíz de la planta, siendo las hojas jóvenes de gran importancia en este proceso (Ljung *et al.*, 2001). Una vez sintetizadas las auxinas son movilizadas a través de transportadores específicos hasta sus tejidos blanco, lo que permite la formación de un gradiente de auxinas (Benjamins y Scheres, 2008). La acumulación diferencial de auxinas en la punta de la raíz ocasiona una redistribución posterior hacia la zona de diferenciación celular, donde es esencial para los distintos procesos morfogenéticos (Rashotte *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2001). Otras fitohormonas frecuentemente estudiadas son las citocininas, las cuales originalmente fueron identificadas como moléculas capaces de inducir la división celular en plantas (Miller *et al.*, 1955). Posteriormente, se determinó que las citocininas inician la división celular activando el ciclo celular a través de la Ciclina D3 (CYCD3) (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Dewitte *et al.*, 2007). Las citocininas se han implicado en el control de las células fuente, en el desarrollo del follaje y la raíz, la diferenciación vascular, la biogénesis de los cloroplastos, el desarrollo y ramificación del follaje, raíz e inflorescencias, el balance de nutrientes, la senescencia de las hojas, la tolerancia al estrés y el desarrollo de las semillas (Kieber, 2002; Müller y Sheen, 2007). Las giberelinas (GAs) son una gran familia con más de 100 miembros de compuestos diterpenoides sintetizados a partir de geranyl difosfato (GDP). Sin embargo, solo algunos de ellos son reguladores

bioactivos del crecimiento que controlan diversos procesos como la germinación de las semillas, la elongación de los tallos, la expansión de las hojas, el desarrollo de tricomas y de flores y frutos (Olszewski *et al.*, 2002; Yamaguchi, 2008). Durante la germinación, las GAs promueven el crecimiento del embrión y/o reducen las restricciones físicas impuestas por el endospermo y la testa que impiden la salida de la radícula. En el endospermo y el córtex de ejes embrionarios de semillas de *Arabidopsis* se sintetizan las GAs bioactivas, particularmente en los sitios donde las células se expanden rápidamente (Olszewski *et al.*, 2002). Uno de los efectos de las GAs es promover la diferenciación de órganos al perder la identidad meristemática. El ácido abscísico (ABA) regula la maduración de las semillas y su dormancia, la apertura de los estomas y la tasa de crecimiento en respuesta a estrés ambiental incluyendo sequía, frío y salinidad. El ABA se sintetiza principalmente en los tejidos vasculares y es movilizado al tejido blanco, aunque también puede ser producido en el sitio donde se utiliza. El ABA actúa a través de una cadena de señalización formada por una gran cantidad de componentes que incluyen factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, cinasas y fosfatasas. La señalización del ABA incluye a las proteínas G, lipasas, fosfatasas y cinasas en los primeros eventos, seguidos de la liberación de un segundo mensajero como el inositol trifosfato (IP₃), Ca⁺ y K⁺ que actúan regulando las funciones estomáticas y la expresión de genes de respuesta a estrés, aparentemente a través de cascadas de fosforilación (Finkelstein *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2007). En la mayoría de los tejidos vegetativos los genes regulados por ABA están involucrados en respuesta a estrés abiótico, principalmente en respuesta a la deshidratación celular. En semillas en proceso de maduración los genes regulados por ABA incluyen aquellos necesarios para la síntesis de reservas lo que les confiere tolerancia a desecación (Finkelstein *et al.*, 2002). En resumen, se han mencionado algunos de los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados, todos ellos son pequeñas moléculas orgánicas con distintas propiedades bioquímicas, sin embargo se considera que su número es pequeño en comparación con la gran cantidad de procesos biológicos en los que participan, tal diversidad de respuestas podría ser explicada si se considera la existencia en plantas de un tipo diferente de moléculas de señalización de naturaleza peptídica.

1.2. Reguladores del crecimiento vegetal de naturaleza peptídica

Las fitohormonas son moléculas importantes para el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, las plantas adicionalmente controlan estos procesos a través de pequeños péptidos señalizadores. En el genoma de *Arabidopsis* se han reportado aproximadamente 1000 secuencias de péptidos potenciales con actividad de señalización. A la fecha, un número reducido de estos pequeños péptidos señalizadores ha sido funcionalmente caracterizado y muy pocos han sido ligados a un receptor específico (Czyzewicz *et al.*, 2013). Estos péptidos formados por 5 a 75 aminoácidos (aa), presentan un peso que va de 5 a 75 kDa. Una gran cantidad de ellos son productos de péptidos precursores modificados postraduccionalmente, siendo tales modificaciones críticas para su función. Los péptidos pequeños señalizadores maduros y funcionales son secretados y percibidos por receptores asociados a membranas, regulando rutas de transducción de señales y algunos actúan directamente en la célula (Butenko *et al.*, 2009; Matsuzaki *et al.*, 2010; Matsubayashi, 2011; Murphy *et al.*, 2012). A la fecha, solo un número reducido de péptidos pequeños señalizadores han sido funcionalmente caracterizados y pocos se han asociado a un receptor (Butenko *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2012). En el genoma de *Arabidopsis* se han detectados aproximadamente 600 receptores putativos tipo proteínas cinasas (Shiu y Bleecker, 2001) y alrededor de 1000 secuencias que podrían codificar para péptidos señal (Lease y Walker, 2006). Algunos procesos fisiológicos y de desarrollo en los que están implicados los péptidos señalizadores en vegetales se muestran en la figura 1.

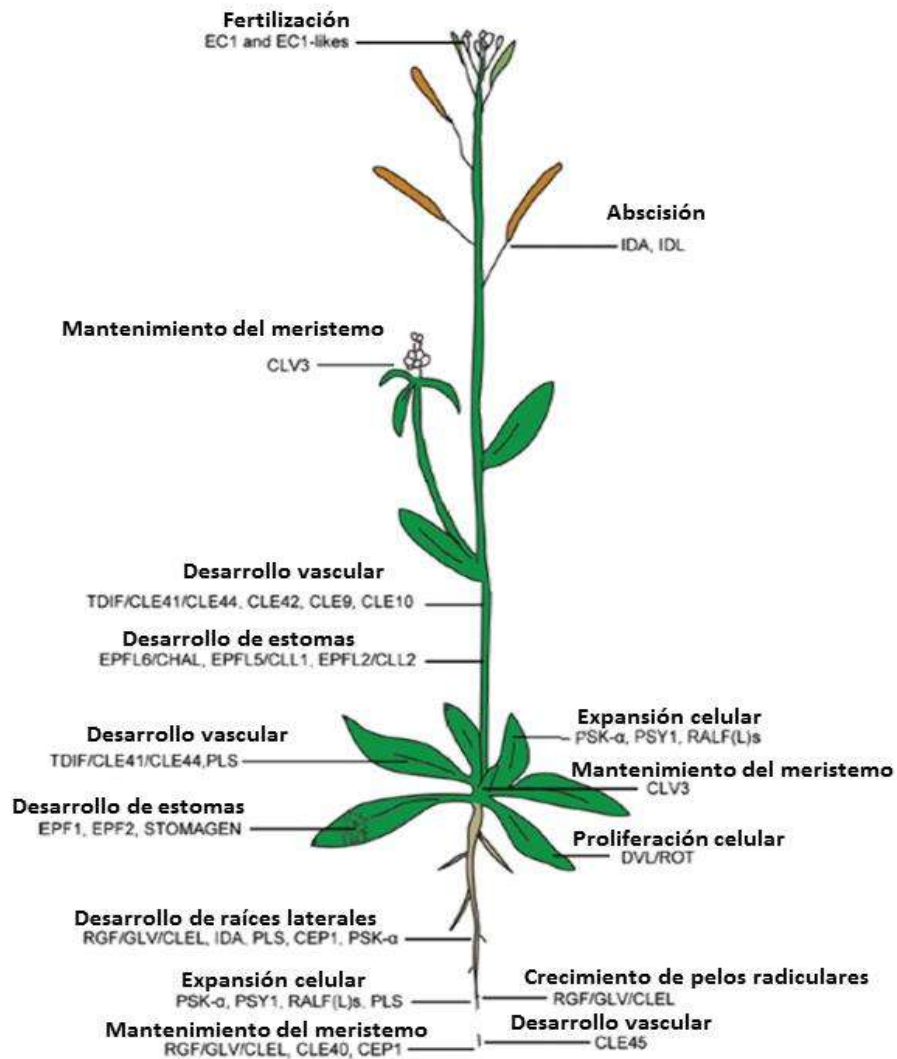


Figura 1. Señalización de péptidos pequeños en el crecimiento y desarrollo. Una ilustración simplificada de *Arabidopsis* donde se indica la participación de los péptidos pequeños de señalización en alguno de los principales procesos de desarrollo (Czyzewicz *et al.*, 2013).

Por ejemplo, la regulación de la división y diferenciación celular en los meristemos radicular y apical es crítica para el correcto desarrollo de la planta (Scheres, 2007). Algunos de los péptidos que controlan dicho proceso pertenecen a la familia de proteínas CLAVATA (CLV)/EMBRYO SURROUNDING REGION (ESR)-RELATED PROTEIN (CLE) los cuales participan en el mantenimiento de los meristemos florales, apicales y la división celular. La familia de proteínas CLE de *Arabidopsis* comprende 32 péptidos, cada uno formado por 12 a 13 aa (Strabala *et al.*, 2006; Betsuyaku *et al.*, 2011). Se ha

encontrado que CLV3 funciona como una señal móvil que controla el tamaño del meristemo apical (SAM) de *Arabidopsis* (Suzaki *et al.*, 2008). Los péptidos ROOT GROWTH FACTOR (RGF)/GOLVEN (GLV)/ CLE-LIKE (CLEL) pertenecen a una familia de 11 miembros de 13 a 18 aa siete de los cuales son expresados en el RAM (Matsuzaki *et al.*, 2010; Whitford *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013a; Fernández *et al.*, 2013b). La sobreexpresión del péptido RGF1 resulta en un alargamiento de la región meristemática, mientras que la triple mutante *rgf1 rgf2 rgf3* muestra fenotipo de raíz corta, lo que sugiere que regula el mantenimiento del crecimiento del meristemo (Matsuzaki *et al.*, 2010). Otro péptido implicado en la regulación de la raíz es C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP). La sobreexpresión de (CEP1) presenta un fenotipo de raíz corta, con reducido número de células fuente en la zona meristemática y tamaño celular pequeño en la región madura. Un efecto similar fue observado en el tratamiento con el péptido CEP1 que provocó un arresto en el crecimiento (Ohyama *et al.*, 2008). Además de la regulación del desarrollo de la raíz, existen péptidos implicados en la expansión celular. Dos péptidos sulfatados PHYTOSULFOKINE- α (PSK- α) y el glicopéptido de 18 aa. PLANT PEPTIDE CONTAINING SULFATED TYROSINE 1 (PSY1), promueven la proliferación celular de cultivos (Matsubayashi *et al.*, 2006; Matsubayashi y Sakagami, 1996; Yang *et al.*, 2001; Amano *et al.*, 2007; Komori *et al.*, 2009). Sin embargo, *in planta*, los PSK- α y PSY1 parecen estar asociados con la expansión celular. El tratamiento con PSK- α resultó en un incremento significativo en la longitud de la raíz primaria de las plántulas silvestres, como consecuencia de un incremento en la elongación de las células meristemáticas (Kutschmar *et al.*, 2009). Las proteínas PIN son acarreadores de eflujo de auxinas esenciales para el establecimiento de un máximo de auxinas que regula el patrón morfológico de la raíz (Grunewald y Friml, 2010). Respecto a la función de los péptidos de señalización, se reportó que la mutante *pin2* es resistente al tratamiento con GLV, al observar que el nivel de PIN2 se incrementó en la membrana, mientras que la polaridad de PIN2 y otros transportadores como AUX1, PIN1 y PIN3 no se alteró. Lo anterior sugiere que PIN2 podría ser un miembro de la vía de señalización de GLV que afecta el transporte de auxinas y la respuesta gravitrópica (Whitford *et al.*, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Familia de péptidos y su función biológica.

Familia peptídica	Número de péptidos en la familia	Aminoácidos del péptido maduro	Función biológica
CEP	5	15 (CEP1)	Desarrollo de raíces laterales
CLE	32	12–13 (CLV3)	Mantenimiento del meristemo, división de las células fuente, y desarrollo vascular
DVL/ROT: DEVIL/ROTUNDIFOLIA	24	41–145	Proliferación celular (tricomas y hojas)
EC1	5	?	Activación espermática
EPF–EPFL: EPIDERMAL PATTERNING FACTOR–EPF-LIKE	11	44 (STOMAGEN) –76	Desarrollo de estomas
IDA–IDL: INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION–IDA-LIKE	6	20	Abscisión de órganos, emergencia de raíces laterales
PLS POLARIS	1	36	Expansión celular, desarrollo de raíces, desarrollo vascular y formación de las hojas
PSK-α	6	5	Proliferación celular y diferenciación, expansión celular
PSY1	3	16–18	Proliferación celular y diferenciación, expansión celular
RALF–RALFL: RAPID ALKALINIZATION FACTOR–RALF-LIKE	34	49	Expansión celular
RGF/GLV/CLEL	11	13 (RGF1) –14 (GLV1) –18	Mantenimiento del nicho de las células fuente del meristemo radicular, gravitropismo y desarrollo de las raíces laterales
TPD1: TAPETUM DETERMINANT 1	1	?	Desarrollo de anteras

? Desconocido o no investigado. (Modificada de Czyzewicz et al., 2013).

1.3. Participación de los péptidos de señalización en el crecimiento unidireccional

Las células con crecimiento unidireccional son un modelo biológico importante para entender los procesos de elongación celular, en vegetales algunas de estas células son los tricomas, los pelos radiculares y el tubo polínico. Los pelos radiculares consisten en una sola célula (tricoblasto) que se diferencia en respuesta a su posición sobre la conjunción de

dos células del córtex (Grebe, 2012) (Ver Fig. 3.1. Capítulo 3. Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de las Plantas, 2013). Tal proceso, involucra a los péptidos GLV4 y GLV8, miembros de la familia RGF/GLV/CLEL. Dichos péptidos, son expresados en la rizodermis y regulan tanto el tamaño como la forma de los pelos radiculares. GLV4 se expresa en todas las células epidérmicas, mientras que GLV8 solo lo hace en las células que no forman pelos (atricoblastos). Las raíces de la mutante con pérdida de función *glv8* y *ami4Rglv4* muestran pelos radiculares cortos comparados con la línea silvestre. En contraste, la sobre expresión de GLV4, GLV5 y GLV8 incrementó el número de pelos radiculares ramificados (Fernández *et al.*, 2013a). Por otra parte, la baja expresión de NaRALF en *Nicotiana attenuata* inhibe el crecimiento en punta de los tricoblastos y muestra un hinchamiento y frecuentes explosiones de estos órganos (Wu *et al.*, 2007). La atracción química del tubo polínico, es otro ejemplo de los efectos de los péptidos sobre el crecimiento polar. Estos órganos crecen mediante la extensión de la membrana (Campanoni y Blatt, 2007), promovida por el péptido ZmEA1, el cual funciona como un atractor químico al ser internalizado por acción vesicular y degradado rápidamente (Márton *et al.*, 2012). También el desarrollo que involucra la percepción de péptidos por los pelos radiculares, es la formación de nódulos por las leguminosas. Este fenómeno inicia cuando los factores de nodulación son detectados por los pelos radiculares, desencadenando así la formación del nódulo y permitiendo la proliferación de la rizobia en un ambiente óptimo para convertir el nitrógeno atmosférico en amonio. Lo anterior permite el crecimiento de las plantas en suelos deficientes en nitrato (Osipova *et al.*, 2012). RIC1 (RHIZOBIA INDUCED CLE1), RIC2 y NIC1 (NITRATE INDUCED CLE1) pertenecen a la familia de péptidos CLE presentes en las raíces de legumbres. Dichos péptidos están involucradas en la auto regulación de la nodulación de las raíces, como un mecanismo de la inhibición de la formación del nódulo por la existencia de nódulos ya presentes en la raíz (Reid *et al.*, 2013). Aunque existen reportes de algunos péptidos señalizadores en el desarrollo de pelos radiculares, se desconoce cuáles podrían ser sus posibles receptores; FERONIA (FER) es uno de los pocos ejemplos de receptores involucrados en el crecimiento de estos órganos. FER es un receptor tipo cinasa que se ha ligado a la señalización por RHO GTPasa. La mutante *fer* presenta alteraciones en el desarrollo de pelos radiculares, además se ha sugerido que FER regula la acumulación de ROS dependiente de NADPH y mediada por

RAC/ROP. Esta última, regula la distribución de ROS en los pelos radiculares, al tratar mutantes *fer* con el colorante de ROS-H₂DFDA estas plantas mostraron niveles significativamente menores a las silvestres (Duan *et al.*, 2010).

1.4. Cascadas de señalización activadas por insulina

La insulina es una hormona peptídica de 5.8 kDa, secretada por el páncreas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre. Su función más conocida es la de mantener la concentración de glucosa en sangre. Sin embargo no es la única función de la hormona, ya que también regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos. Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelulares en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tir) lleva a una serie de eventos de fosforilación/ desfosforilación de cinasas de Tir y serina/treonina (Ser/Tre). Estas cinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula (Avruch, 1998; Saltiel y Kahn, 2001). Además del efecto de la insulina sobre la regulación de los niveles de glucosa, una vez que la hormona interactúa con su receptor y éste se activa, se inicia la activación de dos vías de transducción de señales: MAPK y PI3K/TOR. Ambas regulan la mayoría de los efectos de la insulina asociados al metabolismo energético, la expresión genética y efectos mitogénicos (Fig. 2) (Avruch, 1998; Myers *et al.*, 2002).

1.5. Vía de señalización PI3K/TOR

La vía PI3K/TOR es regulada principalmente por insulina y se activa cuando el receptor une a la hormona y se autofosforila, interactuando y fosforilando al sustrato receptor de insulina (IRS). Este último, al ser fosforilado se convierte en el sitio de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), como la fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K) (Virkamaki *et al.*, 1999). La interacción entre ambas proteínas provoca que la cinasa PI3K, fosforile al lípido de membrana PI4,5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) generando al PIP3 (PI3,4,5-trisfosfato). PIP3 sirve como sitio de unión para la cinasa PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos-1) y Akt /PKB (Engelman *et al.*, 2006). La cascada de la PI3K incluye a otras cinasas que median la

respuesta de la insulina, entre ellas mTOR la cual regula la síntesis proteica a través de la fosforilación y activación de la cinasa S6K/S6 y la proteína 4EBP1/eIF4 (Fig. 2) (Virkamaki *et al.*, 1999; Engelman *et al.*, 2006).

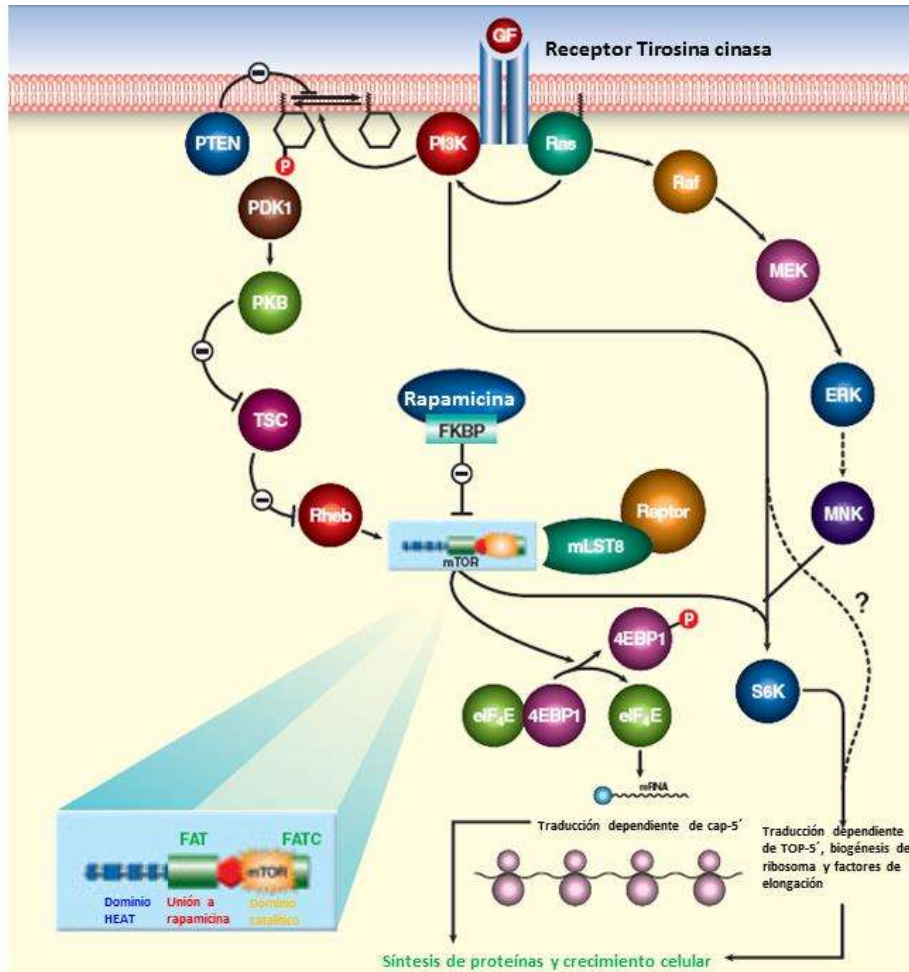


Figura 2. Vía de señalización PI3K/TOR en mamíferos. Los factores de crecimiento regulan a mTOR a través de la cinasa PI3K que cataliza la generación de 3-polifosfatidilinositidos. La activación de PI3K neutraliza la acción del complejo de esclerosis tuberosa (TSC). Las GTPasas pequeñas como la Rheb enlazan la actividad del TSC y mTOR. La activación de mTOR depende de varios estímulos: nutrientes (aminoácidos), energía (ATP) y factores de crecimiento y ejerce su efecto fosforilando a la proteína de unión al factor de inicio de la traducción de eucariotes (4EBP1) y liberando al eIF4E lo que permite la traducción de los transcritos 5'-cap. Además, mTOR fosforila y activa a la cinasa S6K. Los ribosomas fosforilados en S6 reclutan y traducen mRNAs específicos que contienen tramos de polipirimidinas en el extremo 5' TOP. Estos últimos transcritos codifican para varias proteínas ribosomales y factores de elongación promoviendo la biogénesis del ribosoma y el proceso de traducción (Carrera, 2004).

1.6. Factores de crecimiento parecidos a insulina en plantas

Desde los primeros estudios de la insulina reportados en animales, existen evidencias que muestran la presencia de sustancias similares a esta hormona en varias especies vegetales como cebolla y remolacha entre otras (Best y Scott, 1923) y en germinados de papa y arroz.

Ellis y Eyster (1923), reportaron que la insulina aceleraba la germinación del maíz. Khanna et al., (1974) detectaron la presencia de insulina en plantas y patentaron un proceso para la obtención de una proteína a partir de frutos de *Momordica charantia* (melón amargo) a la que se denominaron v-insulina, polipéptido-p o p-insulina. Esta proteína mostró actividad hipoglucémica, pero no reaccionó con el anticuerpo contra insulina bovina y su composición de aminoácidos fue diferente a la hormona animal. Así, parece ser que en plantas existen péptidos similares a la insulina. Sin embargo, con todos estos péptidos la mayor parte de las investigaciones se enfocaron en mostrar su propiedad hipoglucemiante en mamíferos, mientras que su función como molécula de señalización en vegetales no fue abordada hasta principios de los 90s. Goodman y Davis (1993), reportaron que la adición de insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF-I, IGF-II) aceleraban el desarrollo post-germinativo de semillas de girasol, melón y pepino. Experimentos de inmunodetección con el anticuerpo de insulina bovina evidenciaron la presencia de péptidos similares a insulina en zanahoria y frijol (Watanabe, 1994). En múltiples eucariontes se ha demostrado que la cascada de transducción de señales conservada evolutivamente, PI3K/TOR/S6K, regula el crecimiento y la proliferación celular. Esta cascada finaliza con la activación del aparato traduccional de la célula, el cual induce selectivamente la traducción de mRNAs ribosomales y estimula la transición de las fases G1/S del ciclo celular. La vía es activada por señales como nutrientes, niveles energéticos, y factores de crecimiento como la insulina, cuya adición estimula la fosforilación de la proteína S6K y acelera la síntesis de las proteínas ribosomales durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1999), o factores de crecimiento parecidos a insulina (IGFs), que permite a los organismos regular su crecimiento y división celular en respuesta a tales estímulos (Garrocho-Villegas y Sánchez de Jiménez, 2012). Rodríguez-López *et al.*, (2011) aislaron de maíz un péptido de 6 kDa, al cual denominaron ZmIGF y que al igual que la insulina, activaba la cascada PI3K/TOR/S6K induciendo con ello el crecimiento y la síntesis de proteínas ribosomales y del DNA. Así, parece ser que los metazoarios superiores y las plantas conservan vías bioquímicas similares para regular el crecimiento celular a través de agonistas y blancos equivalentes que conducen a la activación de la cascada PI3K/TOR/S6K. En *Arabidopsis*, se ha observado que la insulina estimula el aumento de la densidad de las raíces laterales, el crecimiento de hojas, flores,

silicuas y de los pelos radiculares (Pascual-Morales *et al.*, 2012; Rodríguez-Andrade, 2012).

1.7. Vía de señalización PI3K/TOR en plantas

Los mecanismos que modulan el crecimiento y la proliferación celular han sido descritos en animales (Fingar *et al.*, 2004; Shanbazian *et al.*, 2006) y plantas (Robaglia *et al.*, 2004; Dinkova *et al.*, 2007; Xiong y Sheen, 2014). La insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina (IGFs) son efectores de la vía PI3K/TOR que regula el desarrollo de metazoarios (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000; Ruvinsky *et al.*, 2005). En plantas, un número creciente de reportes han mostrado la existencia de varios componentes de la vía de señalización PI3K/TOR como TOR, RAPTOR, S6K1 y S6K2 (Menand *et al.*, 2002; Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Mahfouz *et al.*, 2006) y otras proteínas involucradas en la regulación de la actividad de TOR como la FKBP12 (Menand *et al.*, 2002; Sormani *et al.*, 2007) y la proteína TCTP (Berkowitz *et al.*, 2008). En las bases de datos del genoma de *Arabidopsis* se encuentran reportadas proteínas putativas de la vía de señalización PI3K/TOR (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas de la vía PI3K/TOR/S6K descritas para *Arabidopsis*

Proteína	Gen para <i>Arabidopsis</i>
PI3K	At1g60490
PDK1	At5g04510
TOR	At1g50030
FKBP12	At5g64350
mLST8	At3g18140 At2g22040
Raptor	At5g01010 At3g01015
S6K	At3g08730 At3g08720
S6	At4g31700

En maíz se ha descrito que existen ortólogos de TOR y S6K (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Agredano-Moreno *et al.*, 2007). Sin embargo, casi no hay información respecto a los factores de crecimiento que activan esta ruta en vegetales, en *Arabidopsis*, se conoce que esta vía es activada por los niveles energéticos, nitrógeno, fitohormonas, estrés y glucosa, pero, los intermediarios que regulan el censado de estos compuestos y la actividad de TOR no se han esclarecido del todo (Xiong y Sheen, 2012; Xiong y Sheen, 2014). En maíz, el péptido ZmIGF (maize insulin-like growth factor), similar estructuralmente a la insulina, promueve el crecimiento e incrementa la síntesis de DNA y proteínas ribosomales en ejes embrionarios y callos de maíz (Garrocho-Villegas y Sánchez de Jiménez, 2013). Además ZmIGF al igual que la insulina induce la fosforilación de dos componentes principales de esta vía TOR y S6K y acelera la síntesis de proteínas ribosomales. Estos datos, además son consistentes con una gran movilización de sRNAm TOP 5' a polisomas, permitiendo una traducción selectiva durante la germinación (Jiménez-López *et al.*, 2011). ZmIGF e insulina, además de ser reconocidos por anticuerpos contra esta hormona, comparten una estructura terciaria demostrada por ensayos de dicroísmo circular (Rodríguez-López *et al.*, 2011). Los ensayos de modelado molecular en base a la secuencia de aminoácidos, revelaron que el ZmIGF adquiere una conformación espacial con plegamientos de tipo α hélice en la cadena β , característica de la familia de factores de crecimiento parecidos a insulina (IGFs) e insulina. El receptor putativo de este péptido también fue propuesto al ser reconocido por el anticuerpo contra el receptor de insulina y por ensayos de competencia (Garrocho- Villegas *et al.*, 2013) (Fig. 3).

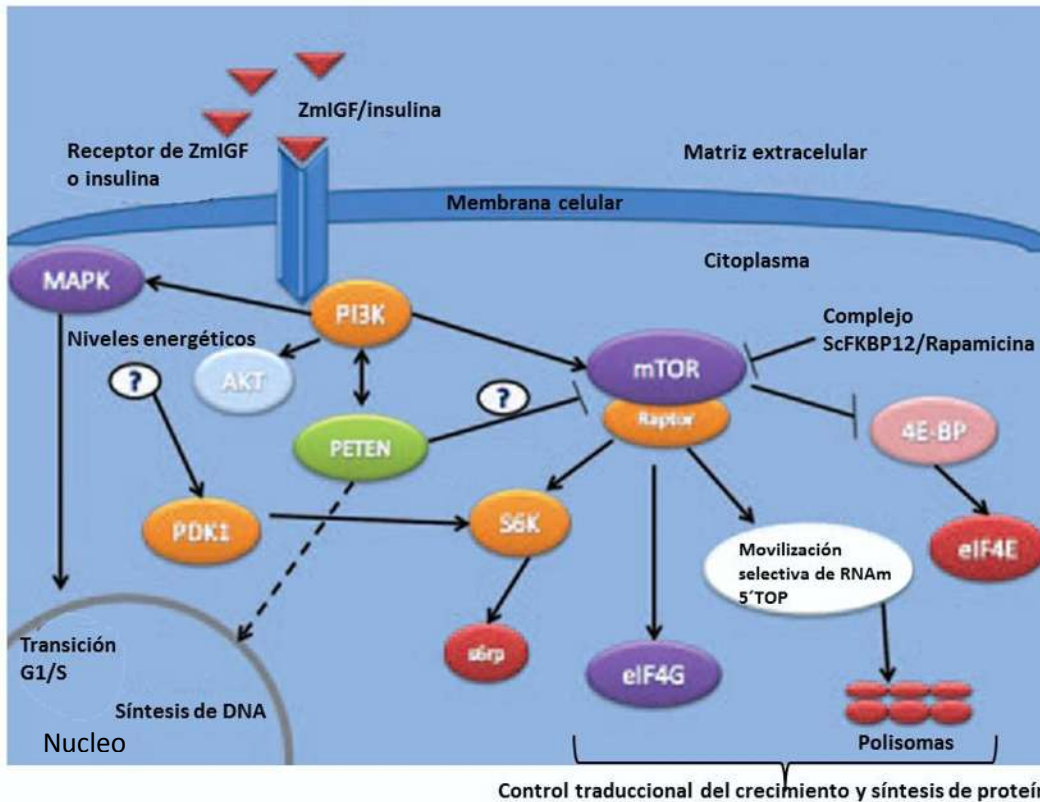


Figura 3. Ruta PI3K/TOR/S6K putativa en plantas. La activación de la vía por insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina (ZmIGF) activan una cascada de reacciones que culminan con la fosforilación de las cinasas TOR y S6K. Las flechas indican activación mientras que las líneas truncadas inhibición, los signos de interrogación denotan funciones no confirmadas (Modificado de Garrocho Villegas y Sánchez de Jiménez, 2012).

1.8. Cinasa TOR involucrada en el desarrollo vegetal

TOR pertenece a la familia de proteínas (PIKK) relacionadas al fosfatidil inositol que representan un grupo de proteínas cinasas serina/treonina. TOR en la región N- terminal presenta un grupo de 20 dominios HEAT (Huntingtin, elongation factor 3 [EF3], protein phosphatase 2A [PP2A], yeast PI3-kinase TOR1) en tándem, seguidos del FAT (FRAP/ATM/TRRAP), el FRB, y el dominio cinasa FATC (Fig. 2). El nombre de TOR (Target Of Rapamicin) describe su característica principal es decir, su inhibición por rapamicina, este último compuesto de origen bacteriano consiste de un anillo de lactonas. Esta sensibilidad de la cinasa TOR a la rapamicina, la convierte en una herramienta muy importante para la investigación clínica y básica por su capacidad anticancerígena al modular directamente la actividad del regulador central del crecimiento (Schmelzle y Hall, 2000; Huang *et al.*, 2003; Schieke y Finkel, 2006). La inhibición de TOR por rapamicina requiere de la formación de un complejo ternario entre la rapamicina, la peptidil-prolil

cis/trans isomerasa FKBP12 y el dominio FRB (FKBP12 rapamycin binding) de TOR (Schmelzle y Hall, 2000; Wullschleger *et al.*, 2006; Soulard y Hall, 2009). En eucariontes la cinasa TOR muestra un alto grado de conservación y en *Arabidopsis* posee un solo gen que codifica para esta proteína (Menand *et al.*, 2002). Se ha reportado que diferentes organismos presentan variados grados de sensibilidad a la rapamicina (Huang *et al.*, 2003). En animales la actividad de TOR puede ser inhibida por rapamicina, de igual manera en maíz y en algas unicelulares como *Chlamydomonas reinhardtii* (Crespo *et al.*, 2005; Cunningham *et al.*, 2007; Sotelo *et al.*, 2010). Sin embargo, algunos autores han sugerido que las plantas terrestres perdieron la sensibilidad al macrólido (Xu *et al.*, 1998). En *Arabidopsis* se reportó que dicha pérdida de la sensibilidad a la rapamicina se debía al cambio en algunos aminoácidos clave de la FKBP12 involucrados en la interacción con la rapamicina (Sormani *et al.*, 2007). Por lo anterior, para restaurar la sensibilidad de *Arabidopsis* a la rapamicina, se crearon líneas transgénicas que expresan FKBP12 de *Saccharomyces cerevisiae* (Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012) o FKBP12 humana (Xiong y Sheen, 2012; Xiong *et al.*, 2013). Tanto en plantas como en animales, TOR ejerce funciones generales en los procesos anabólicos como el crecimiento y catabólicos como la autofagia. La construcción del promotor de GUS fusionado a TOR reveló su expresión durante el desarrollo temprano del endospermo, tejidos embrionarios y proliferativos. En plántulas y plantas adultas la expresión de TOR fue alta en los meristemas primarios, lo que sugiere que TOR participa durante la proliferación celular acoplada con el crecimiento citosólico. Lo anterior, contrasta con las células de mamífero y *Drosophila*, donde la expresión de TOR ocurre en todos los tejidos (Brown *et al.*, 1994; Chiu *et al.*, 1994; Menand *et al.*, 2002). Datos de microarreglos mostraron que la expresión de TOR se presenta en todos los tejidos de *Arabidopsis* (Zimmermann *et al.*, 2004), mientras que en maíz su expresión inicia durante la germinación (12h) y se incrementa hasta su más alto nivel a las 48h. Además, TOR está presente en todos los tejidos de 13 días de edad a niveles similares sin importar su estado de desarrollo (Agredano-Moreno *et al.*, 2007). El estudio de las funciones de TOR por mutaciones en *Arabidopsis*, ha sido limitado debido a que mutantes KO de TOR son letales a nivel embrionario (Menand *et al.*, 2002). Por lo antes mencionado, se han tratado de caracterizar algunas funciones de TOR usando líneas de baja expresión (RNAi) inducibles por etanol o estradiol (Deprost *et al.*,

2007; Xiong y Sheen, 2012). Después de ser inducido el silenciamiento de TOR, las plantas muestran un arresto total en el crecimiento de hojas y, síntomas ligados a la senescencia como el amarillamiento debido a la ruptura de la clorofila, acumulación de azúcares solubles en alto grado en las hojas y, niveles de actividad de la glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa 2 a 3 veces más altos que el control (Deprost *et al.*, 2007). Mientras que líneas de baja expresión de TOR inducibles por estradiol mostraron bajos niveles de fosforilación en la proteína S6K, fenómeno acompañado de una disminución en el crecimiento general de la planta y de los pelos radiculares (Xiong y Sheen, 2012). Otro fenómeno asociado con la baja expresión de TOR fue el incremento en la autofagia constitutiva (Kim *et al.*, 2011). El silenciamiento de TOR también impactó en la eficiencia en la traducción de RNAm, reflejada por una reducción en la abundancia de polisomas de alto peso molecular y decremento en la síntesis de proteínas solubles. Por otra parte, altos niveles de RNAm de TOR estimularon el crecimiento de órganos y producción de semillas (Deprost *et al.*, 2007). Plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés osmótico presentaron raíces primarias cortas; sin embargo, cuando TOR se expresó constitutivamente, dicho efecto no se observó (Deprost *et al.*, 2007). La cinasa TOR ha sido encontrada en gran cantidad de genomas de eucariontes, excepto en algunos patógenos intracelulares pertenecientes a especies de micropodios (Garbardi y Baroletti, 2010). La totalidad de los organismos fotosintéticos incluyendo a *Arabidopsis* contienen al menos un gen para TOR. La secuencia de los genes de TOR ha sido relativamente conservada en levaduras y animales; alrededor de un 40% de identidad total, 70% en FATC, mientras que el dominio FRB12 (FKBP12 (FK506-binding protein 12)-rapamycin-binding) está pobremente conservado. El gen TOR parece que se expresa en todos los tejidos de *Arabidopsis*, mientras que la proteína TOR se encuentra principalmente en los tejidos jóvenes en crecimiento como las puntas de las raíces y las hojas emergentes, lo que sugiere una regulación traduccional. Sorprendentemente, el crecimiento de una gran cantidad de plantas terrestres, desde musgos hasta angiospermas, parece no estar afectado por la presencia de rapamicina incluso a concentraciones altas (McMahon *et al.*, 2011). Xiong y Sheen (2012), recientemente reportaron que *Arabidopsis* es sensible a la rapamicina a 10 μM , mientras que en maíz, Sánchez de Jiménez *et al.*, (1999) determinaron sensibilidad a este fármaco a una concentración de 100 nM, la cual ha sido usada reiteradamente (Reyes de la Cruz *et al.*,

2004; Agredano-Moreno *et al.*, 2007; Rodríguez- López *et al.*, 2011; Jiménez-López *et al.*, 2011; Garrocho-Villegas y Sánchez de Jiménez, 2012; Garrocho-Villegas *et al.*, 2013). Además, las algas verdes unicelulares como *C. reinhardtii* presentan sensibilidad a rapamicina (Knutson, 2010). La carencia de efectos de la rapamicina en plantas terrestres se ha atribuido a que los homólogos de la proteína FKBP12 son ineficientes para enlazarla (Soulard y Hall, 2009), mientras que el dominio FRB de TOR, si es capaz de formar el complejo ternario entre la rapamicina y FKBP12 de levaduras (Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2011) o humana (Dames *et al.*, 2005).

1.9. Participación de TOR en el crecimiento de los pelos radiculares

Existen varios antecedentes de la participación de TOR en el crecimiento de los pelos radiculares y en general en el desarrollo vegetal. En plántulas de *Arabidopsis* con baja expresión de TOR, se ha observado que se detiene el crecimiento de los pelos radiculares, al igual que al interrumpir la señalización de TOR con rapamicina (Xiong y Sheen, 2012). La represión del crecimiento de los pelos radiculares mediante rapamicina en *Arabidopsis*, se ha relacionado con la disminución en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), importantes para el crecimiento de los pelos radiculares. Leiber *et al.*, 2010, sugirieron que TOR regula las propiedades de la pared celular, modulando la dureza de la misma para permitir su crecimiento (Baumberger *et al.*, 2001; Baumberger *et al.*, 2003). La mutante de *Arabidopsis lrx1*, que no forma la proteína LRX (LRR- extensina 1) presentó defectos en la formación de pelos radiculares, fenómeno restaurado por otra mutación en *rol5* -represor de *lrx1_5*-. La doble mutante *lrx1 rol5* presentó características similares a la línea silvestre, mientras que la mutante simple *rol5* desarrolló pelos radiculares y células epidérmicas cortas y alteraciones en la estructura de la pared celular (Leiber *et al.*, 2010). La proteína ROL5 presentó 54% de identidad y 70% de similitud con Ncs6p/Tuc1 de levadura. Ncs6p y las proteínas parecidas a Ncs6p de diferentes organismos muestran motivos conservados incluso un dominio PP-loop con actividad ATP pirofosfatasa el cual también está presente en ROL5. Mutantes Δ ncs6 son hipersensibles a la rapamicina, lo que sugiere una función potencial de Ncs6p en la señalización de TOR (Bork *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2000; Goehring *et al.*, 2003; Björk *et al.*, 2007). Un segundo fenotipo presentado por la mutante Δ ncs6 fue la carencia de uridinas tioladas en la posición bamboleante de los

anticodones de los RNAt. Estas modificaciones no son cruciales para la viabilidad celular pero si para una eficiente traducción de proteínas (Leidel *et al.*, 2009). Una construcción con la proteína completa de ROL de *Arabidopsis*, fue capaz de complementar el fenotipo de la mutante *Δncs6*, de levadura mostrando así que ROL5 es funcionalmente similar a Ncs6p. Otros estudios han mostrado acumulación de tRNAs en el núcleo lleva a una actividad reducida de TORC1 (Leidel *et al.*, 2009). Estos hallazgos sugieren un enlace entre la señalización de TOR y la abundancia de tRNAs. Para probar si ROL5 estaba involucrado en la señalización de TOR en *Arabidopsis*, mutantes *rol5* en plantas sensibles a la rapamicina por sobre-expresión de *ScFKBP12*, en presencia del fármaco presentaron raíces más cortas respecto al control. Esto demostró que la mutación de *rol5* hace a las plantas hipersensibles a la rapamicina, lo que sugiere que ROL5 es un componente en la vía de señalización de TOR (Leiber *et al.*, 2010).

1.10. Participación de ROS en la regulación del desarrollo vegetal

Las ROS incluyen la siguientes moléculas: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, las cuales han acompañado el metabolismo aerobio desde hace aproximadamente 2.7 billones de años (Halliwell *et al.*, 2007) oxidando múltiples sustratos. Dichas moléculas presentan múltiples funciones en la señalización de diferentes organismos desde bacterias hasta animales. Inicialmente se reportaron como subproductos tóxicos del metabolismo aerobio, sin embargo actualmente la percepción ha cambiado y ahora se consideran moléculas clave en la red de señalización de las células (Mittler *et al.*, 2004). Se propone que las ROS activan respuestas rápidas en vegetales (Miller *et al.*, 2009), llevando mensajes a distancias largas, incluso se ha reportado que esta señal puede ser propagada a una tasa superior a 8.4 cm/min en *Arabidopsis* (Miller *et al.*, 2009). El superóxido $O_2^{\cdot-}$ es una molécula cargada bajo múltiples condiciones fisiológicas que no puede ser transferida de manera pasiva a través de la membrana. Sin embargo, dicha molécula puede ser fácilmente convertida en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es transferido a través de la membrana pasivamente o mediante canales de agua (Miller *et al.*, 2010). El superóxido y el H_2O_2 median la formación de lípidos peroxidados solubles en membrana. Las ROS tienen ventajas sobre otro tipo de moléculas de señalización al ser compuestos versátiles con múltiples propiedades y movilidad en la célula y su alta reactividad. Además, como parte de las redes de

señalización celular, las ROS pueden integrar rutas de señalización ligadas a ellas como los gradientes de calcio y vías de fosforilación de proteínas, como el caso de las ROS producidas por RBOHC (proteína NADPH oxidasa) que contiene el dominio EF de unión a calcio activado por fosforilación (Kobayashi *et al.*, 2007; Ogasawara *et al.*, 2008). Además, los niveles de ROS están relacionados a las redes que regulan el estado redox en la célula como las tiorredoxinas, peroxirredoxinas, glutarredoxinas y/o NADPH (Moon *et al.*, 2003; Dietz *et al.*, 2010; Rouhier, 2011). Otro punto importante en el estudio de las especies reactivas de oxígeno es la dinámica de su naturaleza rápida en las células, que resulta de la producción y de la actividad de los sistemas barredores de ROS, es decir, la homeostasis de las ROS (Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Foyer y Noctor, 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007). Usando herramientas de imagen como microscopía confocal o microscopía de epifluorescencia, a nivel de tejidos en plantas completas se ha revelado que la explosión de ROS puede disparar una cascada de eventos de comunicación célula a célula usando esta molécula como señal hacia otros tejidos (Miller *et al.*, 2009). Debido a que las plantas tienen la capacidad de barrer las ROS, los aspectos de la señalización a larga distancia pueden ser explicados por una producción continua de ROS en células individuales que mantiene la red encendida (Miller *et al.*, 2009). Se ha observado que existen cambios en los niveles de ROS y patrones oscilatorios en pelos radiculares, células guarda, polen y, en la interacción polen-estigma (McInnis *et al.*, 2006; Monshausen *et al.*, 2007; Jammes *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2010)

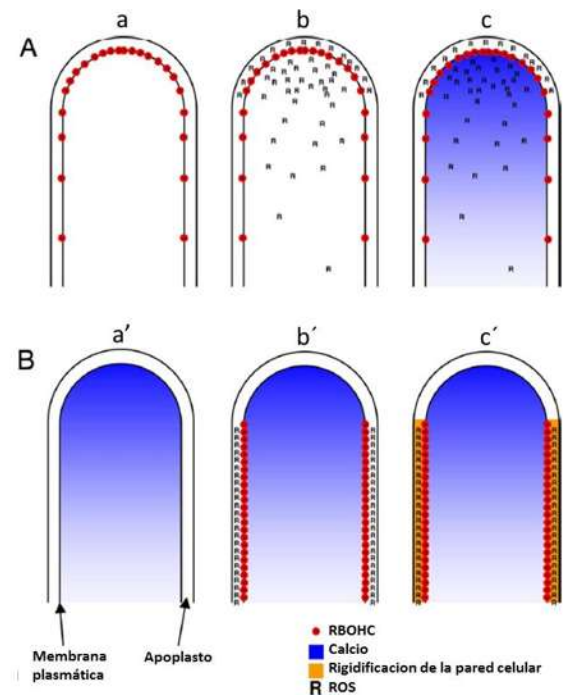
1.11. Efecto de las ROS sobre el crecimiento de los pelos radiculares

En plantas, los pelos radiculares son un modelo experimental para la investigación de procesos de elongación que han permitido determinar la participación de componentes clave para el crecimiento como los gradientes de protones y las ROS (Herrmann y Felle, 1995; Jones *et al.*, 1995; Foreman *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007). El pH ha sido especialmente implicado en el control de la expansión celular (Consgrove, 1999) incluyendo a los pelos radiculares (Bibikova *et al.*, 1998). Se ha reportado que la RBOHC (respiratory burst oxidase homologue) (RBOHC/RHD2/ homólogo de gp91 en mamíferos que corresponde a una NADPH oxidasa) es necesaria para el establecimiento de un gradiente de calcio en el ápice de crecimiento (Schiefelbein y Somerville, 1990; Foreman *et*

al., 2003; Carol *et al.*, 2005). En este sentido, Monshausen *et al.*, 2007 reportaron que el crecimiento de los pelos radiculares no es un proceso constante, sino que ocurre en episodios discretos seguidos de lapsos sin crecimiento. Dichos autores observaron que cada periodo de crecimiento correlaciona con la alcalinización del pH externo, lo que coincide con la acidificación intracelular, sugiriendo que se lleva a cabo un influjo de protones al interior del pelo radicular. Debido a que este influjo coincidió con la fase de crecimiento, estos autores proponen que la acidificación en el apoplasto, guía el crecimiento polar durante la fase de elongación (que coincide con la pérdida de componentes de la pared celular en el ápice del pelo para permitir su crecimiento). En este contexto el crecimiento de los pelos radiculares está limitado solo a la punta, mientras que los flancos muestran paredes celulares reforzadas que previenen su expansión. También observaron que la elevación artificial del pH externo, detiene el crecimiento a la par de una rigidificación global de la pared celular lo que concuerda con esta hipótesis. La reducción en el pH, llevó a la explosión de los pelos radiculares, causada por una expansión celular no localizada y desregulada (Monshausen *et al.*, 2007). Estos datos son consistentes con trabajos previos donde el pH regula las propiedades de la pared celular (Bibikova *et al.*, 1998; Consgrove, 1999). Monshausen *et al.*, (2007) también mostraron el nuevo papel de las ROS sobre el crecimiento de los pelos radiculares, similar al observado en las oscilaciones de pH. En este caso la oscilación de la concentración apoplástica de ROS en los flancos de los pelos radiculares se detectó mediante el colorante OXIBURST-BSA impermeable a la membrana. Las oscilaciones de ROS correlacionaron en forma negativa con las tasas de crecimiento de los pelos radiculares y la manipulación artificial de la concentración de ROS reveló que el incremento en los niveles de ROS en el apoplasto conlleva a una inhibición en el crecimiento de los pelos radiculares, mientras que la reducción de ROS produce el estallamiento de los pelos radiculares (Monshausen *et al.*, 2007). Estos datos son consistentes con el papel reportado para las ROS en la regulación de la capacidad de extensión de la pared celular (Schopfer, 1996; Pedreira *et al.*, 2004). Debido a que RBOHC ha sido implicada en el crecimiento de los pelos radiculares, diversos autores decidieron evaluar el papel de esta proteína en su crecimiento. Encontrando que las mutantes *rbohC*, presentan un número reducido de pelos radiculares elongados (Schiefelbein y Somerville 1990; Wymer *et al.*, 1997; Foreman *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007; Carol *et al.*, 2005).

Algunos reportes previos sugieren que el desarrollo de los pelos radiculares en *rbohC* se detiene antes de la iniciación (Schiefelbein y Somerville, 1990; Foreman *et al.*, 2003; Carol *et al.*, 2005) y otros reportaron que los pelos radiculares explotan después de la iniciación (Jones *et al.*, 2007; Monshausen *et al.*, 2007). Monshausen y colaboradores, observaron que niveles bajos de las ROS en el apoplasto de la mutante *rbohC*, llevó a una expansión celular descontrolada y no polarizada. RBOHC media la actividad de los gradientes de calcio a través de su producto de ROS (Schiefelbein y Somerville, 1990; Cramer y Jones, 1996; Wymer *et al.*, 1997; Foreman *et al.*, 2003). Las ROS también están involucradas en la regulación de la flexibilidad de la pared celular, en la mutante *rbohC* el crecimiento de los pelos radiculares puede ser rescatado al crecer las plántulas en pH alcalinos (Monshausen *et al.*, 2007). Los resultados anteriores muestran que RBOHC a pesar de no ser una molécula esencial para el crecimiento de los pelos radiculares, está implicada en dos procesos indispensables: la regulación de la dureza de la pared celular y la señalización que activa componentes para el desarrollo, un modelo que engloba estas dos propuestas se muestra en la figura 4.

Figura 4. Modelos que explican los patrones de las ROS y la localización de la proteína RBOHC en los pelos radiculares en crecimiento. (A) RBOHC produce ROS (específicamente el radical hidroxilo) en la punta del pelo radicular (a y b), aquí se considera que existe un gradiente de ROS en la punta de crecimiento del pelo radicular basado en la actividad de RBOHC en la punta. El radical hidroxilo estimula los canales de Ca^{2+} para producir un gradiente enfocado en la punta (c). (B) este modelo propone que los gradientes de Ca^{2+} , son independientes de ROS (a'). A pHs alcalinos, RBOHC genera el radical hidroxilo en la región del apoplasto justo por debajo del ápice (b'). Estos radicales son las responsables de la rigidificación de la pared celular durante la fase de no crecimiento (c'). La fase de crecimiento subsecuente correlaciona los niveles reducidos del anión superóxido (Modificado de Knight, 2007).



1.12. Pelos radiculares como modelo de estudio

Los pelos radiculares son un ejemplo de células con crecimiento polarizado. Estas células al igual que otras en las plantas, crecen a través de la secreción de componentes de la pared celular flexible en un sitio particular. Así, regulan la presión de turgencia, lo que dirige la expansión celular por la formación de un sitio de crecimiento específico, denominado punta. El crecimiento unidireccional depende de una señalización intracelular de gradientes iónicos y regulación de los componentes del citoesqueleto (Cheung y Wu, 2008; Michard *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Konrad *et al.*, 2011; Craddock *et al.*, 2012; Hepler *et al.*, 2012). Sin embargo, el crecimiento de estos órganos depende de múltiples factores (ver figuras 3.3, 3.4 y 3.5. Capítulo 3. Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de las Plantas). El crecimiento de los pelos radiculares es análogo al de estructuras celulares de crecimiento en punta de linajes inferiores de plantas vasculares como las licofitas y monilofitas que contribuyen al igual que los pelos radiculares al anclaje del organismo al suelo (Jones y Dolan, 2012). Entender los procesos implicados en el crecimiento polarizado, ayudaría a comprender el crecimiento de organismos como el protonema en los musgos, el tubo polínico para la propagación de especies y los hongos. Así como los mecanismos que confieren la plasticidad en las dendritas de las neuronas (Carol y Dolan, 2002). Los pelos radiculares de angiospermas como *Arabidopsis* son un excelente sistema para estudiar las bases moleculares del crecimiento polarizado. Como modelo genético molecular en plantas es una herramienta importante para el estudio de la función de genes. El hecho de que los pelos radiculares no son esenciales para la viabilidad de las plantas, la identificación de varias mutantes afectadas en su crecimiento y diferenciación ha sido posible. Gran cantidad de estas mutaciones se presentan en genes que codifican para factores de transcripción esenciales para la diferenciación de las células epidérmicas (ver figura 3.1. Capítulo 3. Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de las Plantas) (Schiefelbein *et al.*, 2009). Otras mutaciones interrumpen los genes que codifican para proteínas asociadas con el citoesqueleto y vías secretoras, las cuales están implicadas en el crecimiento de los pelos (Libault *et al.*, 2010). Además, los pelos radiculares son fácilmente observables, accesibles y altamente sensibles a las condiciones ambientales. Algunos de los mecanismos que controlan el crecimiento de los pelos radiculares se esquematizan en el modelo propuesto

por Libault *et al.*, (2010) (Fig. 5), donde después de la diferenciación de las células epidérmicas y del establecimiento de la polaridad, comienza la fase de elongación. Esta última, se produce por exocitosis de vesículas a la membrana plasmática y de componentes de la pared celular al ápice de la célula. Dicho proceso, también requiere de moléculas involucradas en el rearrreglo de componentes del citoesqueleto, como la ACTINA 2 y ACTINA7 (ACT2 y ACT7) (He *et al.*, 2006; Ketelaar *et al.*, 2007; Kandasamy *et al.*, 2009); miosinas de la clase XI (Ojangu *et al.*, 2007; Peremyslov *et al.*, 2008; Prokhnevsky *et al.*, 2008) y tubulinas (Bibikova *et al.*, 1999; Bao *et al.*, 2001). Todas las proteínas antes mencionadas constituyentes del citoesqueleto, son esenciales para el crecimiento polarizado. Algunos cambios fisiológicos que ocurren durante la elongación de los pelos radiculares son: i) una alta concentración de calcio citológico (Ca^{2+}) en el ápice de los pelos radiculares, ii) oscilaciones de pH en los niveles intra y extracelulares y iii) la producción de ROS extracelulares. Además, moléculas señalizadoras importantes han sido propuestas, como los fosfolípidos reguladores de la polaridad y la liberación de Ca^{2+} mitocondrial al citosol después de la ruptura de los filamentos de actina, lo cual resalta las relaciones entre la integridad del citoesqueleto y el incremento polarizado de Ca^{2+} (Wang *et al.*, 2010) (Fig. 5)

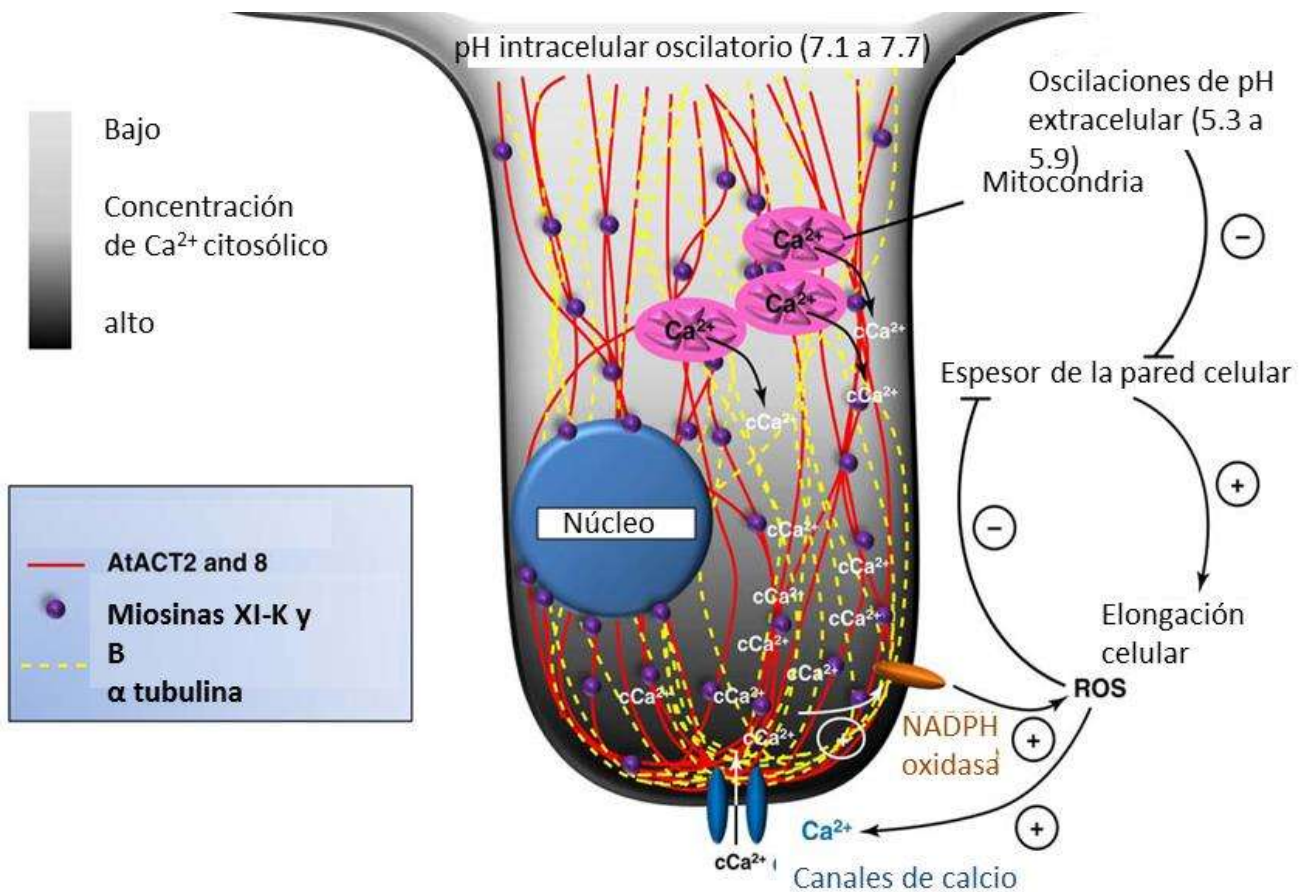


Figura 5. Desarrollo y elongación de pelos radiculares de *Arabidopsis*. El citoesqueleto y sus proteínas asociadas son componentes importantes en la elongación del pelo radicular. A pesar de las funciones bioquímicas redundantes, algunas actinas parecen estar preferentemente involucradas en los procesos de elongación de los pelos radiculares (AtACT2 y AtACT8). La polimerización y despolimerización de actinas en los pelos radiculares depende de proteínas AIP1 que interactúan con la actina. Además las miosinas interactúan con la actina XI-K, XI-2 y XI-B contribuyendo a la regulación del crecimiento del pelo. La perturbación en el tráfico de los sacos de Golgi, peroxisomas y mitocondrias en las mutantes XI-K y XI-2 sugieren un papel crucial del tráfico del retículo y organelos durante la elongación del pelo radicular. A diferencia de las actinas, los microtúbulos juegan un papel importante en la dirección del crecimiento polar más que en la elongación. Variaciones en iones y metabolitos ocurren durante la elongación de los pelos radiculares. Los cambios en las concentraciones de calcio citoplásmico (cCa^{2+}) estimulan la actividad de la NADPH oxidasa (RHD2) permitiendo la producción de las ROS extracelulares. Además, las ROS actúan como moduladores positivos del influjo de Ca^{2+} en las células de la raíz en elongación a través de la regulación de los canales de calcio. Como se ha sugerido previamente, estos datos soportan una posible retroalimentación entre la (cCa^{2+}) y la producción de ROS a través de la activación de la NADPH oxidasa y canales de calcio localizados en el ápice de los pelos radiculares (Modificado de Lilbaul *et al.*, 2010).

II. JUSTIFICACIÓN

En mamíferos la insulina activa a TOR, y en *Arabidopsis* esta cinasa ha sido implicada en el crecimiento de los pelos radiculares y en la producción de ROS. En el presente estudio determinaremos si el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina depende de la activación de TOR a través de alteraciones en los niveles de ROS.

III. HIPÓTESIS

La insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares aumentando la producción y localización de ROS en el ápice del pelo radicular a través de la activación de TOR

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar si el crecimiento de los pelos radiculares inducido por insulina depende de la actividad de TOR así como de los cambios en la producción de ROS

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la participación de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina mediante los inhibidores rapamicina y torin1 en medio sólido y líquido.
- Evaluar el efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en la línea de baja expresión de TOR (*tor-es1*) inducible por estradiol.
- Determinar la participación de las ROS sobre el crecimiento de los pelos radiculares mediante el análisis de sus niveles por tinción histoquímica con H₂DFDA
- Analizar en tiempo real los patrones de producción de peróxido de hidrógeno por efecto de la insulina y del inhibidor de TOR, torin1, en la línea transgénica de *Arabidopsis*, *HyPer*.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Material biológico y condiciones de crecimiento.

Semillas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col-O), de líneas transgénicas 25c que sobreexpresan el gen *ScFKBP12* (Sormani *et al.*, 2007), mutantes *tor-es1* inducibles por estradiol (Xiong y Sheen, 2012) y la línea transgénica *-HyPer-* que expresa el sensor del H₂O₂, OxyR (Hernández-Barrera *et al.*, 2013) fueron usadas en los experimentos. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con 1 ml de etanol al 95% por un minuto y 1 ml de hipoclorito de sodio y 10% de SDS por 5 min, lavadas seis veces con 1 ml de agua estéril y vernalizadas a 4 °C por dos días. Posteriormente, las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri (con 0.8% phytoagar) o en pozos de cajas de microtítulo que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X, 2% (w/v) sacarosa a pH 5.7. Después de la esterilización, el medio fue suplementado con 200 µl de un stock de vitaminas (tiamina 1 mg/ml, piridoxina 5 mg/ml, y ácido nicotínico 5 mg/ml) e insulina porcina de Sigma a 1.23 o 12.3 nM.

5.2. Preparación de los medios de cultivo

Las sales de Murashige-Skoog (MS), se disolvieron en la cantidad correspondiente a una concentración de 0.2X y 2% de sacarosa, se ajustó el pH a 5.7, posteriormente se agregó 0.8 g/l de agar. El medio se esterilizó a 121°C durante 20 min. Una vez tibio el medio, se agregó insulina porcina a 1.23 y 12.3 nM esterilizada por filtración a partir de una solución stock (1405 µU/µl que corresponde a 8.6 nM) y 200 µl/l de una solución stock de vitaminas (tiamina 1mg/ml, piridoxina 5 mg/ml y ácido nicotínico 5 mg/ml). Otros medios fueron suplementados con rapamicina 200 nM para la línea 25c y 500 nM para la línea silvestre a partir de un stock de rapamicina 0.5 mM disuelta en etanol. Para los experimentos con la mutante *tor-es1* al medio de cultivo se añadió, además de la insulina, estradiol a una concentración 10 µM así como DMSO. En los experimentos donde se usó medio líquido, este se preparó de manera similar al descrito antes, excepto que no se suplementó con agar.

5.3. Experimentos con insulina e inhibidores de TOR en medio sólido

Las semillas silvestres (Wt) y 25c previamente desinfectadas, se sembraron en medios de cultivo suplementados con insulina a 0, 1.23 y 12.3 nM, donde se incubaron por 4 y 7 días en una cámara con fotoperiodo de 16-h luz y 8-h oscuridad a 22-24 °C. Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas e incubadas por 24 h en los medios de cultivo antes mencionados, pero suplementados con rapamicina (disuelta en etanol) a una concentración de 500 nM para la línea Wt y 200 nM para la 25c. Las cajas fueron colocadas en posición vertical para permitir que la raíz creciera a lo largo de la superficie del agar en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 22-24 °C.

5.4. Experimentos con insulina e inhibidores de TOR en medio líquido

Lotes de 10 semillas Wt y 25c (para cada pozo) previamente desinfectadas, fueron germinadas y crecidas en placas de 6 pozos que contenían 1 ml de medio líquido (0.2X MS y 2 % sacarosa) suplementado con las concentraciones de insulina antes mencionadas donde se incubaron por 4 y 7 días en agitación en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 22-24 °C. Transcurrido este tiempo el medio fue cambiado por los medios antes mencionados, pero suplementados con rapamicina 200 y 500 nM (disuelta en etanol o DMSO) para las plántulas 25c y Wt respectivamente y torin1 a 250 nM . Las cajas entonces se incubaron otras 24 h en las condiciones de temperatura y fotoperiodo anteriores.

5.5. Experimentos con la mutante condicionada *tor-es1*

Lotes de 10 semillas *tor-es1* (para cada pozo) y Wt previamente desinfectadas, fueron germinadas y crecidas en placas de 6 pozos que contenían 1 ml de medio líquido (0.2X MS y 2 % sacarosa) suplementado con las concentraciones de insulina antes mencionadas donde se incubaron por 4 y 7 días. Transcurrido este tiempo el medio fue cambiado por los medios antes mencionados, pero suplementados con DMSO o estradiol 10 µM (disuelto en

DMSO). Las cajas entonces se incubaron otras 24 h en las condiciones de temperatura y fotoperiodo anteriores.

5.6. Análisis de la longitud de los pelos radiculares

Las fotografías se tomaron a dos aumentos 1X y 2X en la zona de diferenciación de pelos radiculares de la raíz primaria de plántulas de 5 y 8 días de edad con una cámara acoplada a un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (marca Leica Microsystems, Wetzlar Germany). Mediante el programa IMAGEJ se midió la longitud de los pelos radiculares de las plántulas de cada tratamiento, una vez obtenidos los datos se procesaron con el programa STATISTICA 7 con un análisis de ANOVA y con una prueba de Tukey se determinó el valor en la significancia de los resultados.

5.7. Determinación de la producción de ROS en los pelos radiculares de *Arabidopsis* determinada por tinción histoquímica con el colorante 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA)

La tinción histoquímica se realizó con el colorante -H₂DCFDA- que tiñe a las ROS. Dicho colorante es un bioindicador de los niveles de ROS que difunde de manera pasiva al interior de las células. Los grupos acetato del colorante son escindidos por las esterasas intracelulares de la planta y entonces los grupos tiol clorometilo reaccionan con el glutatión y otros tioles. La oxidación subsecuente del glutatión permite la formación del producto fluorescente el cual es impermeable y permanece en el interior de la célula (Molecular Probes, <http://probes.invitrogen.com>). 30 plántulas crecidas en presencia de insulina y los inhibidores de TOR se incuban 60 min en una solución de H₂DCFDA 20 µM disuelto en DMSO. Posteriormente las plántulas se incubaron por 60 min a temperatura ambiente en una mezcla de las soluciones KCl 0.1 mM y CaCl₂ 0.1 mM, ambas ajustadas a pH 6.0 (Ren *et al.*, 2012).

5.8. Evaluación de los niveles de ROS en los pelos radiculares de la línea *HyPer* de *Arabidopsis*

La desinfección y vernalización de las semillas se lleva a cabo como se indicó antes. Las semillas se siembran depositándolas en el medio a una profundidad aproximada de 5 mm en cajas de Petri modificadas (un fragmento del fondo de la caja se elimina y reemplaza con un vidrio) suplementadas con los medios de cultivo MS que contienen insulina y los inhibidores de TOR. Las placas se colocan en una cámara de crecimiento con las condiciones antes mencionadas y se incuban por 3 días, cuando la raíz primaria alcanza el fondo de la caja, las cajas se colocan en posición vertical para que la raíz continúe su crecimiento entre la interface del cristal y el medio. Generalmente seis días después de la germinación la raíz primaria alcanza 1 cm de longitud, el cual es un buen momento para el análisis microscópico (Hernández-Barrera *et al.*, 2013). Se realizaron dos tipos de experimentos en el primero las plantas fueron crecidas en medio de cultivo sin insulina. Para evaluar la velocidad del efecto de la insulina sobre la producción de H₂O₂, se hizo un pequeño orificio con una punta de micropipeta de 1 ml en el agar, hasta tocar el cubre objetos, a un costado de la raíz de la plántula. Después de esto se colocó en posición de observación la plántula en el microscopio de epifluorescencia y se capturó su imagen; al minuto de observación se adicionó en el orificio 70 µl de insulina 1.23 y 12.3 nM e inmediatamente se empezaron a capturar las imágenes. En el segundo experimento se evaluó el efecto del torin1 sobre la producción de H₂O₂. En semillas *HyPer* germinadas y crecidas desde un inicio en medio suplementado con insulina 1.23 y 12.3 nM, se determinaron sus valores de fluorescencia por efecto de dicha hormona. Para evaluar si tal efecto involucraba a TOR, se adicionó en un orificio previamente preparado, 70µl de torin1 250 nM a las plántulas crecidas en las condiciones antes mencionadas e inmediatamente se realizó la captura de las imágenes. Para el análisis de la imagen del ápice de la punta de la raíz, se usó el programa MetaFluor; mediante un análisis de relación automático, dividiendo el valor de la ventana 1 (excitación a 495 nm) entre el de la ventana 2 (excitación a 420 nm) (Hernández-Barrera *et al.*, 2013)

5.9. Microscopía de epifluorescencia

Mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon^R OPTIPHOT-2 modelo HD 10101AP, lámpara de mercurio y filtros de luz UV para detección a longitudes de onda entre 490 y 580 nm acoplado a una cámara fotográfica Nikon Coolpix S 10, se capturaron las imágenes de los pelos radiculares de las plántulas crecidas en los distintos tratamientos y teñidas con H₂DFDA. Mientras que para la línea *HyPer* las observaciones se realizaron a través de las cajas de Petri modificadas, las condiciones de excitación de la sonda fueron 420 y 500 nm en la longitud de onda y por 400 milisegundos de exposición a la luz, la frecuencia de captura de las imágenes fue de cada 6 seg. Usando una cámara CCD (Sensys, Roper Scientific) acoplada a un microscopio invertido Nikon TE300 (Hernández-Barrera *et al.*, 2013).

VI. RESULTADOS

6.1. Efecto de la insulina sobre la longitud de los pelos radiculares

Considerando que se había determinado previamente que 1.23 y 12.3 nM de insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas de 5 y 8 días de manera dosis dependiente (Pascual-Morales *et al.*, 2012). Se decidió evaluar el efecto de esta hormona a concentraciones más altas, 30.7 y 61.5 nM. Los resultados mostraron que la insulina estimuló el crecimiento de los pelos radiculares de manera dosis dependiente hasta 12.3 nM, como ya había sido observado y que concentraciones mayores progresivamente lo disminuían, siendo este efecto más evidente en plántulas de 8 días de edad (Fig. 6).

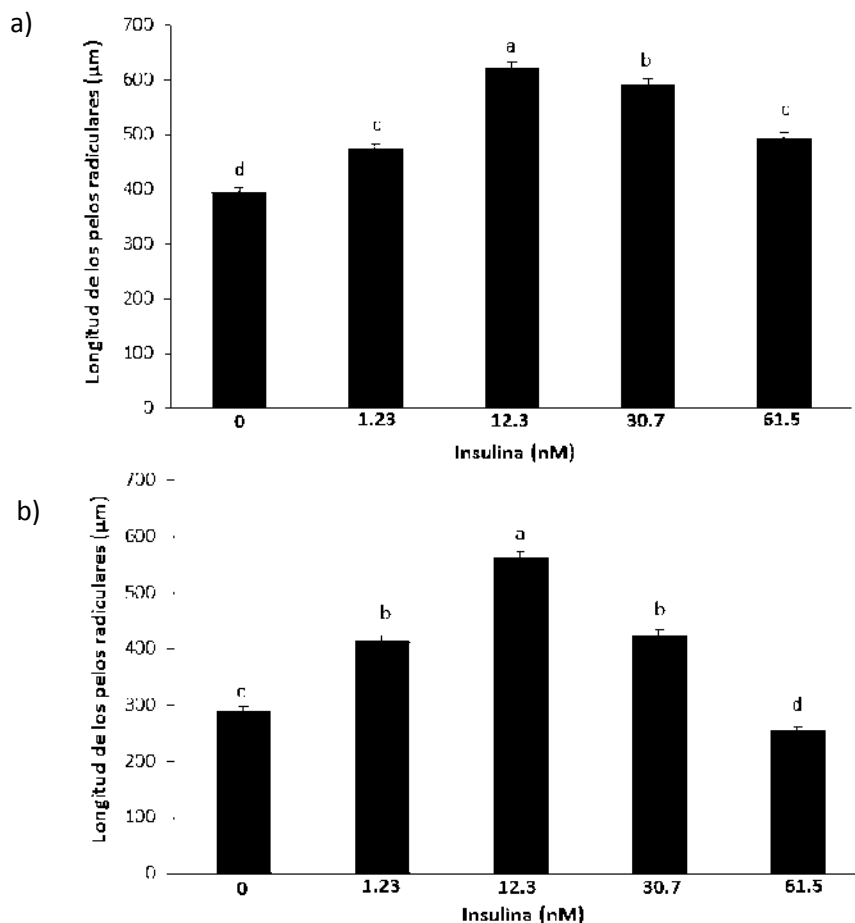


Figura 6. Crecimiento de los pelos radiculares en respuesta a diferentes concentraciones de insulina. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X, 2 % sacarosa y suplementado con insulina a 1.23, 12.3, 30.7, y 61.5 nM. A los 5 (a) y 8 días (b), se tomaron fotografías de la zona de elongación de los pelos radiculares y se evaluó su longitud. Las gráficas se realizaron mediante mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas con el programa IMAGEJ. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8 mediante una prueba de ANOVA. La prueba de Tukey determinó la significancia de cada tratamiento lo cual se muestra mediante letras sobre las barras.

6.2. Participación de TOR en el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina

6.2.1. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis*

Con el fin de determinar el mecanismo por el cual la insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares, evaluamos la posibilidad de que la cinasa TOR, que es activada por insulina en animales (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008) pudiera también modular el desarrollo vegetal (Xiong y Sheen, 2012) y específicamente el crecimiento de los pelos radiculares. Se puede observar en la figura 7 que la insulina fue incapaz de estimular el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis* en presencia del inhibidor de TOR.

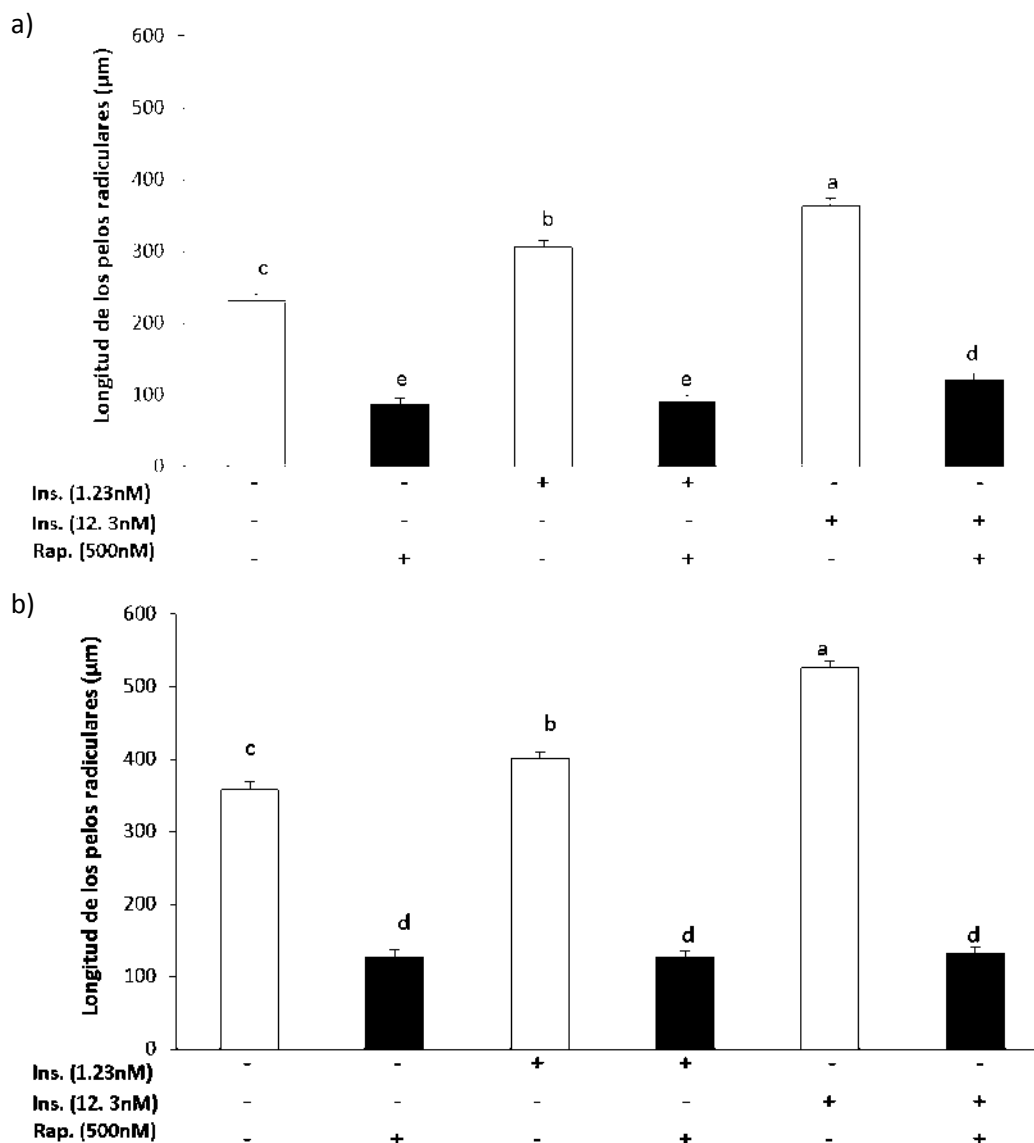


Figura 7. Efecto de la insulina y la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X, 2 % sacarosa y suplementado con insulina 1.23 y 12.3 nM por 4 y 7 d, posteriormente se trasplantaron a los mismos medios adicionados con rapamicina 500 nM y se incubaron otras 24 h. A los 5 (a) y 8 días (b), se tomaron fotografías de la zona de elongación de los pelos radiculares y se evaluó su longitud. Las gráficas se realizaron mediante mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas con el programa IMAGEJ. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8 mediante una prueba de ANOVA y de Fisher para determinar la significancia de cada tratamiento. Las letras representan la diferencia significativa entre los tratamientos.

6.2.2. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea 25c

Los resultados anteriores mostraron que en la línea silvestre, la rapamicina fue capaz de inhibir el efecto promotor de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis*. Estos resultados son contrarios a la mayoría de los reportes, donde observaron que *Arabidopsis* fue insensible a la rapamicina (Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010;

Ren *et al.*, 2012). En nuestro grupo de trabajo, en experimentos con esta última línea se observaron alteraciones en la arquitectura radicular de plántulas crecidas en presencia de insulina 200 nM, en tanto que en la línea silvestre se requirió insulina 500 nM para mostrar tal efecto (García-Flores, 2011). En la figura 8a, se puede observar que la rapamicina, no solo no inhibió el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas 25c de 5 días de edad, sino que lo estimuló y además que el efecto promotor de la insulina en presencia del inhibidor no fue alterado. Sin embargo, en plántulas 25c de 8 días de edad, la rapamicina mostró el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los pelos radiculares como sucede en la línea silvestre (Fig. 8 b).

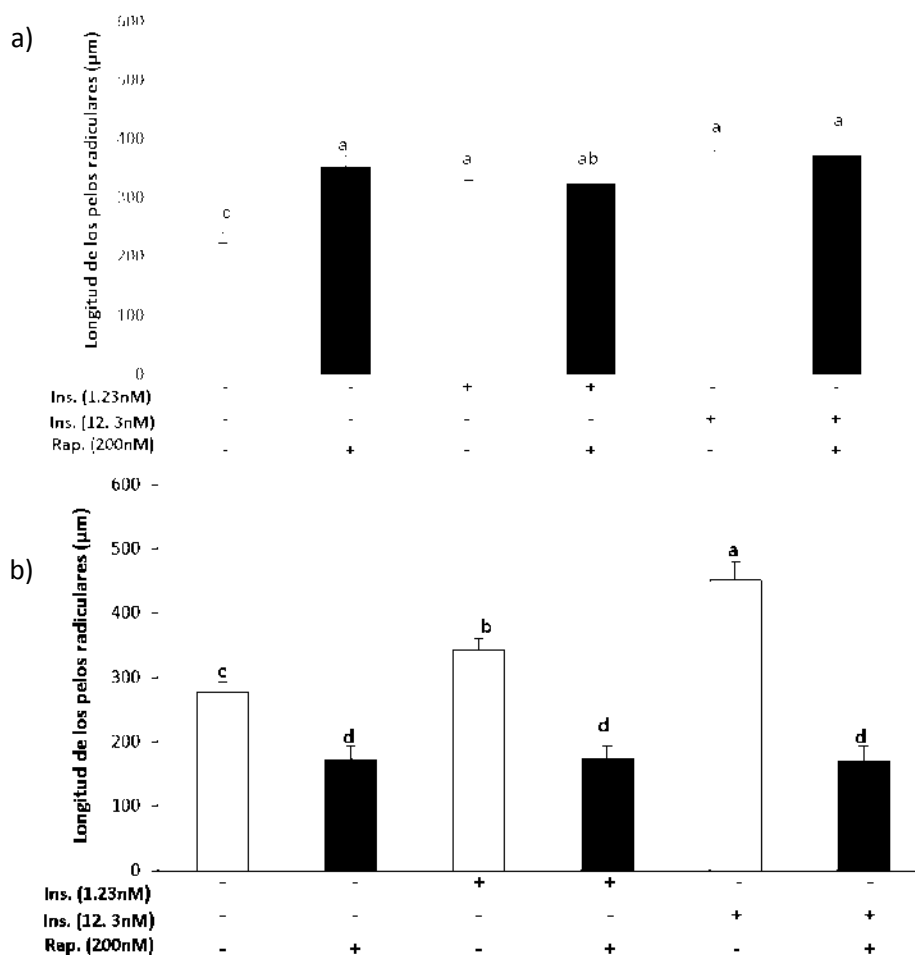


Figura 8. Efecto de la insulina y la rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea 25c de *Arabidopsis*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X, 2 % sacarosa y suplementados con 1.23 y 12.3 nM de insulina por 4 y 7 d, posteriormente se trasplantaron a los mismos medios adicionados con rapamicina 200 nM y se incubaron otras 24 h. A los 5 (a) y 8 días (b), se tomaron fotografías de la zona de elongación de los pelos radiculares y se evaluó su longitud. Las gráficas se realizaron mediante mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas con el programa IMAGEJ. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8 mediante una prueba de ANOVA y de Fisher para determinar la significancia de cada tratamiento. Las letras representan la diferencia significativa entre los tratamientos.

6.2.3. Efecto de los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares

Para corroborar la participación de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina, se utilizaron torin1, -fármaco de nueva generación, capaz de inhibir a TOR por competencia directa con el ATP en el sitio activo de TOR impidiendo su actividad de cinasa- (Thoreen *et al.*, 2009). Se analizó el crecimiento de los pelos radiculares de plantas crecidas en medio líquido. En este sistema se observó un aumento significativo de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas de 5 días de edad -71 y 121%- respecto al control en los tratamientos con 1.23 y 12.3 nM de insulina respectivamente (Fig. 9a). Mientras que para plántulas de 8 días el aumento fue de 43% y 86% para 1.23 nM y 12.3 nM respectivamente (Fig. 9b), también el efecto de ambos inhibidores de TOR -rapamicina y torin1- fue evidente. Presentando torin1 un mayor grado de inhibición respecto a la rapamicina. Estos datos son similares a los de las plantas crecidas en medio sólido (Fig. 7), lo que apoya la idea de la participación de TOR en el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina.

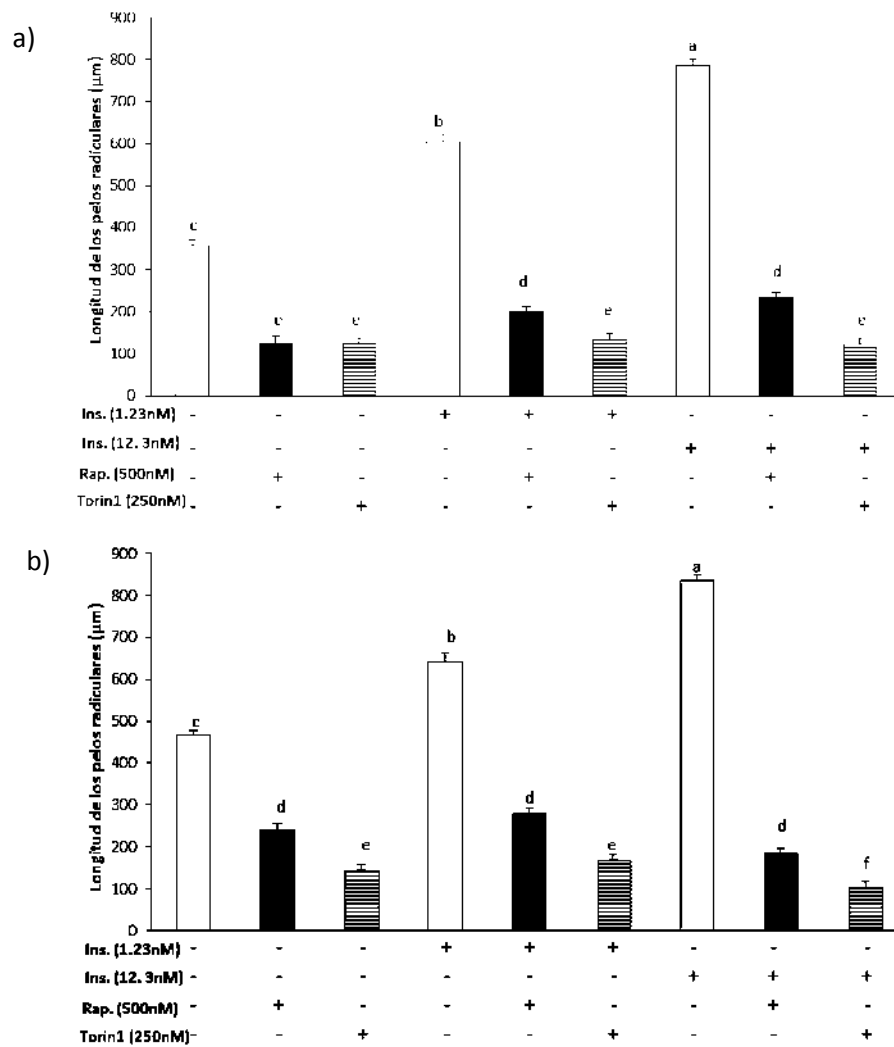


Figura 9. Efecto de la insulina y los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares en *Arabidopsis*. Las semillas fueron germinadas y crecidas por 4 y 7 días en cajas de microtítulo de seis pozos con 1ml de medio de cultivo líquido (MS 0.2X, 2% sacarosa), suplementado con insulina 1.23 o 12.3 nM. Después, el medio fue remplazado por medio fresco suplementado adicionalmente con rapamicina 500nM o torin1 250 nM y las plántulas fueron incubadas otras 24 h. A los 5 (a) y 8 (b) días, la zona de elongación de los pelos radiculares fue fotografiada y sus longitudes fueron evaluadas. Las gráficas fueron construidas usando las mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas que fueron analizadas con ImageJ. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8 mediante una prueba de ANOVA y de Tukey. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

6.2.4. Efecto de los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas 25c crecidas en medio líquido

Debido a que la rapamicina, inesperadamente no reprimió el crecimiento de los pelos radiculares de plántulas 25c de 5 días de edad (Fig. 8a), evaluamos el efecto de la rapamicina y torin1, sobre el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas 25c, crecidas en medio líquido y suplementado con insulina. Como se puede observar en la figura 10, en la línea 25c la insulina estimuló el crecimiento de los pelos radiculares de manera dosis dependiente. En plántulas de 5 días dicha estimulación fue de 52% y 69% y en las de 8 días alrededor del 65% y 134% en los tratamientos con 1.23 y 12.3nM de insulina respectivamente. La rapamicina al igual que sucedió en medio sólido (Fig. 8a), no solo no inhibió el crecimiento de los pelos radiculares de plántulas 25c de 5 días sino que lo aumentó (Fig. 10a), contrario al efecto inhibitorio mostrado en plántulas de 8 días de edad (Fig. 10b). Sorprendentemente, torin1 presentó un efecto contrario al de la rapamicina, es decir, inhibió el crecimiento de los pelos en plántulas 25c de 5 días de edad, mientras que en las de 8 días no ocasionó ningún efecto (Fig. 10b). Así que los inhibidores de TOR, -rapamicina y torin1- presentan efectos diferentes dependiendo de la edad de las plántulas 25c, no así en la línea silvestre, donde ambos fármacos independientemente de la edad reprimen la estimulación del crecimiento de los pelos radiculares por la insulina (Fig. 9).

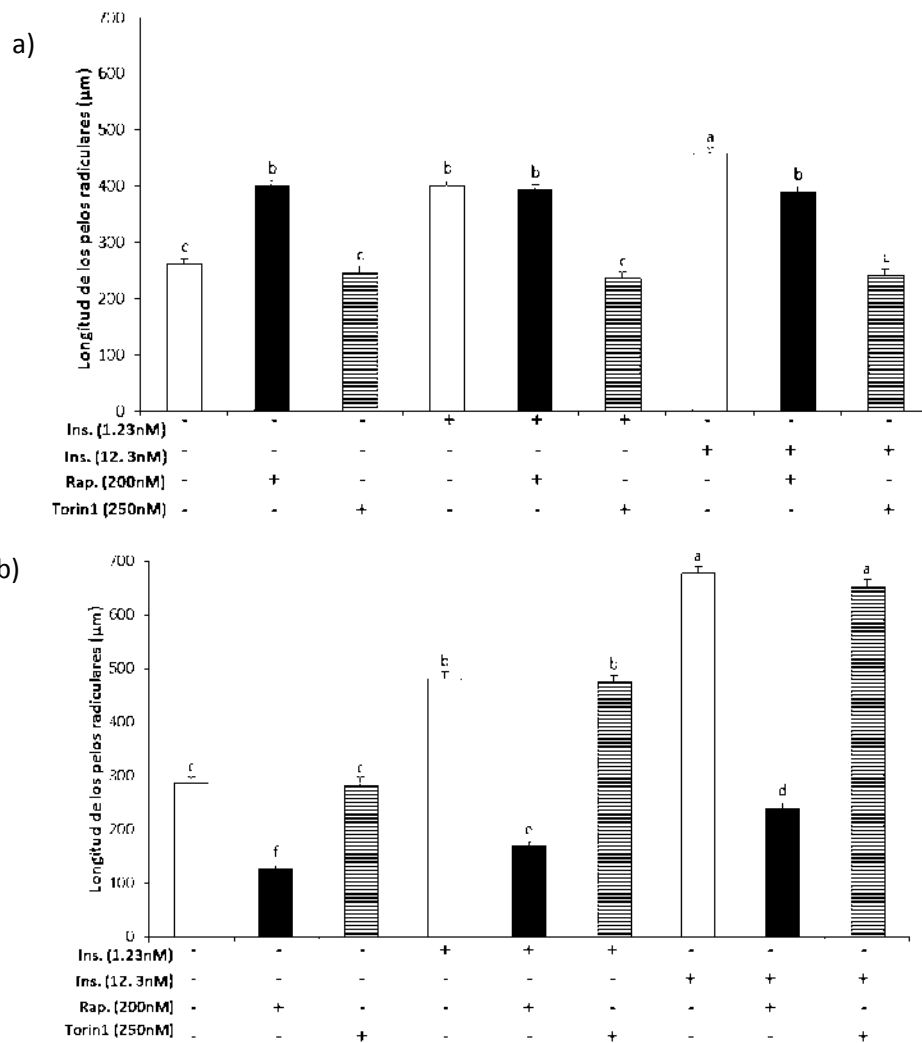


Figura 10. Efecto de la insulina y los inhibidores de TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea 25c de *Arabidopsis*. Las plantas fueron germinadas y crecidas por 4 y 7 días en cajas de microtítulo de seis pozos con 1ml de medio de cultivo (MS 0.2X, 2% sacarosa), suplementado con 1.23 o 12.3 nM de insulina. Después el medio fue remplazado por medio fresco adicionalmente suplementado con rapamicina 200 nM o torin1 250 nM y las plántulas fueron incubadas otras 24 h. A los 5 (**a**) y 8 (**b**) días, la zona de elongación de los pelos radiculares fue fotografiada y sus longitudes fueron evaluadas. Las gráficas fueron construidas usando las mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas que fueron analizadas con ImageJ. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos, lo cual fue determinado por ANOVA y prueba de Tukey.

6.2.5. Efecto de los solventes utilizados en la preparación de rapamicina sobre el crecimiento de los pelos radiculares

Para tratar de explicar por qué en las condiciones del presente estudio la rapamicina inhibió el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis*, a concentraciones 100 veces menores que las utilizadas por otros grupos de investigación, se realizó una revisión bibliográfica, encontrándose que en la mayoría de los reportes donde *Arabidopsis* presenta insensibilidad a este fármaco el solvente utilizado en su preparación era el DMSO (Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012; Xiong y Sheen., 2012). Esto permitió plantear como hipótesis que la rapamicina disuelta en etanol era más activa y para probarla, se decidió evaluar el efecto de la rapamicina disuelta en DMSO sobre el crecimiento de los pelos radiculares a las concentraciones reportadas por otros autores y las utilizadas en el presente estudio. Como ha sido reportado reiteradamente, la rapamicina disuelta en DMSO no presentó inhibición sobre el crecimiento de los pelos en plántulas de *Arabidopsis* de 5 días a ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 11a). Sin embargo, en plántulas de 8 días, 10000 nM de rapamicina presentó un ligero efecto inhibitorio (Fig. 11b). En la línea 25c la inhibición sobre el crecimiento de los pelos radiculares por rapamicina se observó desde 200 nM en plántulas de 5 días, mientras en las de 8 días la inhibición se presentó solamente a 10000 nM, en ambos casos la inhibición fue más marcada en esta línea (Fig. 11).

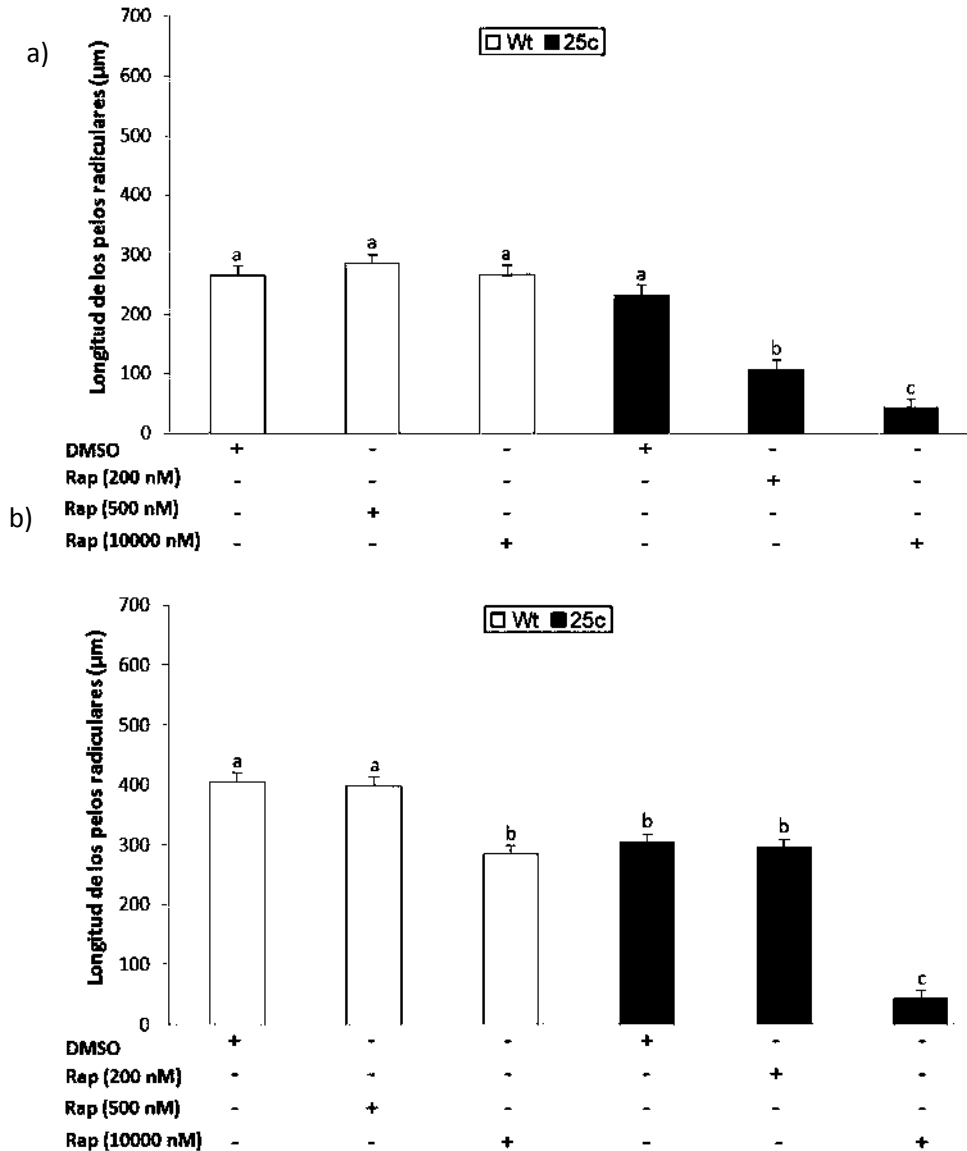


Figura 11. Efecto de la rapamicina disuelta en DMSO sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea silvestre y 25c de *Arabidopsis*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en placas de seis pozos con un ml de medio líquido (MS 0.2X, 2 % sacarosa) por 4 y 7 d, posteriormente se cambió el medio, por el medio fresco antes mencionado pero adicionado con rapamicina 200, 500 y 10000 nM disuelta en DMSO donde se incubaron otras 24 h. A los 5 (a) y 8 días (b), se tomaron fotografías de la zona de elongación de los pelos radiculares y se evaluó su longitud. Las gráficas se realizaron mediante mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas con el programa IMAGEJ. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8 mediante una prueba de ANOVA y Tukey para determinar la significancia de cada tratamiento. Las letras representan la diferencia significativa entre los tratamientos.

6.2.6. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en la línea de baja expresión inducible por estradiol *tor-es1*

Debido a que algunos autores han señalado que *Arabidopsis* es insensible a la rapamicina (Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012) y a que esta sensibilidad se restaura con sobre expresión de la proteína *ScFKBP12*, este problema fue superado mediante la generación de mutantes de TOR condicionadas (Deprost *et al.*, 2007; Xiong y Sheen, 2012). La línea de baja expresión de TOR inducible por estradiol *tor-es1*, permitió evaluar la función de TOR en un estadio fisiológico y en un órgano determinado. En el presente estudio, se ensayó esta línea de *Arabidopsis* (Xiong y Sheen, 2012) para evaluar el efecto promotor de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares con una estrategia genética que permitiría determinar la participación de TOR. Se puede observar en la figura 12, que la insulina estimuló el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas *tor-es1* de *Arabidopsis* de 5 días en un 53 y 123% en los tratamientos con insulina 1.23 y 12.3 nM, en tanto en plántulas de 8 días de edad se obtuvo un 60 y 130 % respectivamente. Por otra parte, en presencia de estradiol se disminuyeron los niveles de expresión de TOR, el efecto promotor de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de las plántulas *tor-es1*, a diferencia de la línea silvestre fue reprimido en los dos tiempos ensayados (Fig. 12). Estos resultados, junto con los de la estrategia farmacológica (Fig. 9), sugieren fuertemente que la insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares a través de la activación de TOR.

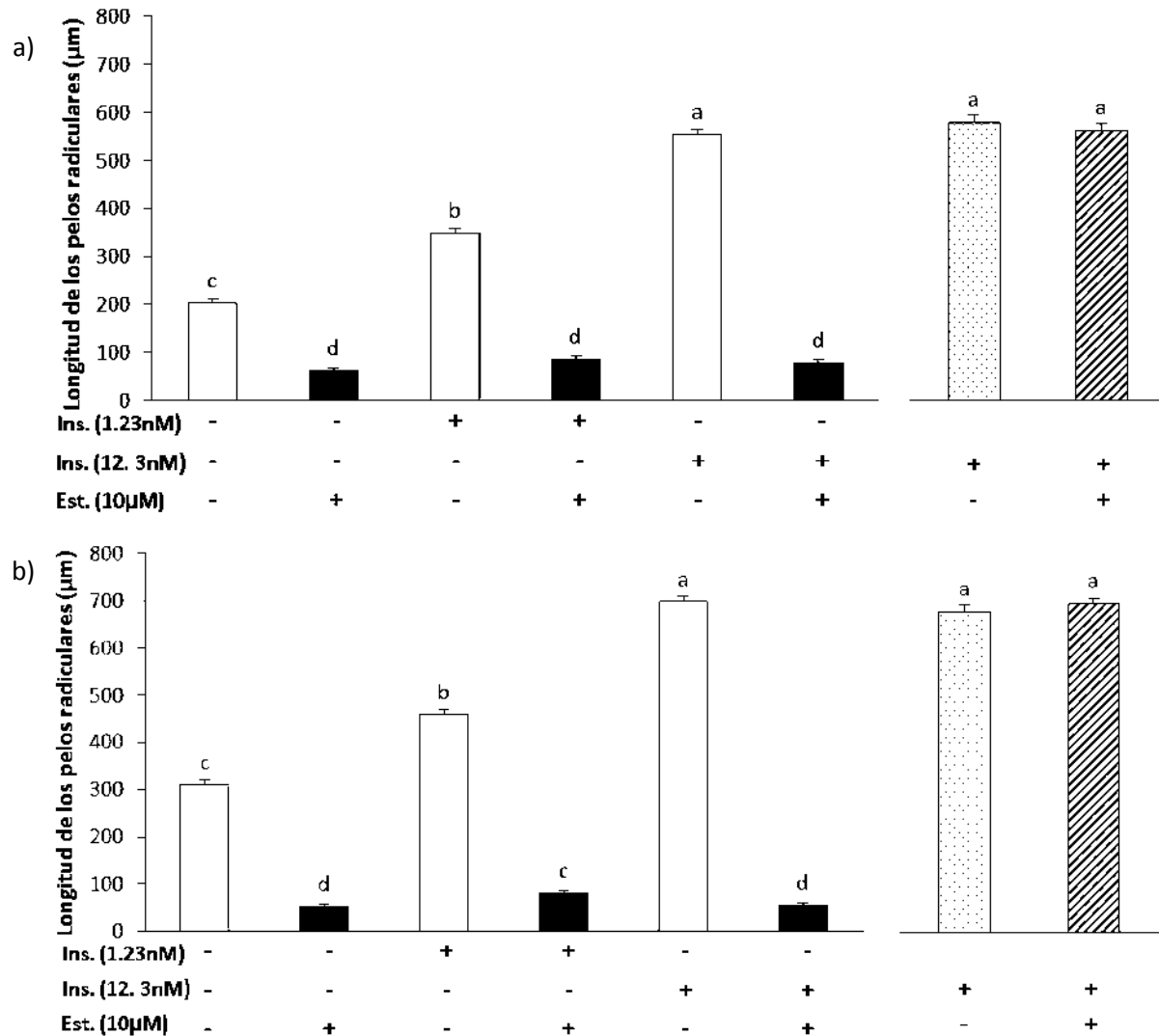


Figura 12. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en la mutante *tor-es1* inducible por estradiol. Las semillas fueron germinadas y crecidas por 4 y 7 d. en placas de seis pozos con un ml de medio líquido (MS 0.2X, 2 % sacarosa), suplementado con insulina 1.23 y 12.3 nM Posteriormente el medio se cambió por medio fresco pero adicionado de DMSO o estradiol 10 µM donde se incubaron otras 24 h. A los 5 (a) y 8 días (b), se tomaron fotografías de la zona de elongación de los pelos radiculares y se evaluó su longitud. Las gráficas se realizaron mediante mediciones de 300 pelos radiculares de las imágenes representativas con el programa IMAGEJ. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8 mediante una prueba de ANOVA y Tukey para determinar la significancia de cada tratamiento. Las letras representan la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Las gráficas con rayas transversales del extremo derecho muestran los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo como se indicó antes con la línea mutante, pero en este caso con la silvestre.

6.3. Participación de las ROS sobre el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina

6.3.1. Efecto de la insulina e inhibidores de TOR sobre la producción de ROS

Uno de los componentes implicados en la regulación del crecimiento de los pelos radiculares son las especies reactivas de oxígeno (Monshausen *et al.*, 2007). Xiong y Sheen (2012) reportaron que la inhibición de TOR disminuye el crecimiento de los pelos radiculares y, Ren y colaboradores (2012) relacionaron este efecto con una disminución en los niveles de ROS. Por lo tanto, se decidió evaluar si el efecto promotor de la insulina sobre el crecimiento de los pelos podría estar correlacionado con la producción de ROS. Se determinaron los niveles de H₂O₂ con el colorante H₂DFDA. Con esta metodología se encontraron diferencias en la intensidad de fluorescencia en los tratamientos con insulina y los inhibidores de TOR respecto al control (Fig. 13). En los tratamientos con rapamicina se puede observar una disminución en el crecimiento, acompañada por una deslocalización de las ROS en el ápice y deformación en los pelos radiculares. El inhibidor Torin1 al igual que rapamicina mostró una disminución en la longitud, deslocalización de ROS en el ápice y deformación de los pelos radiculares. Estos datos revelan que la pérdida de la actividad de la cinasa TOR, promueve la deslocalización de ROS, sin embargo a pesar de que ambos fármacos inhiben la actividad de la cinasa TOR se observaron diferencias morfológicas entre los pelos tratados con cada uno de los fármacos.

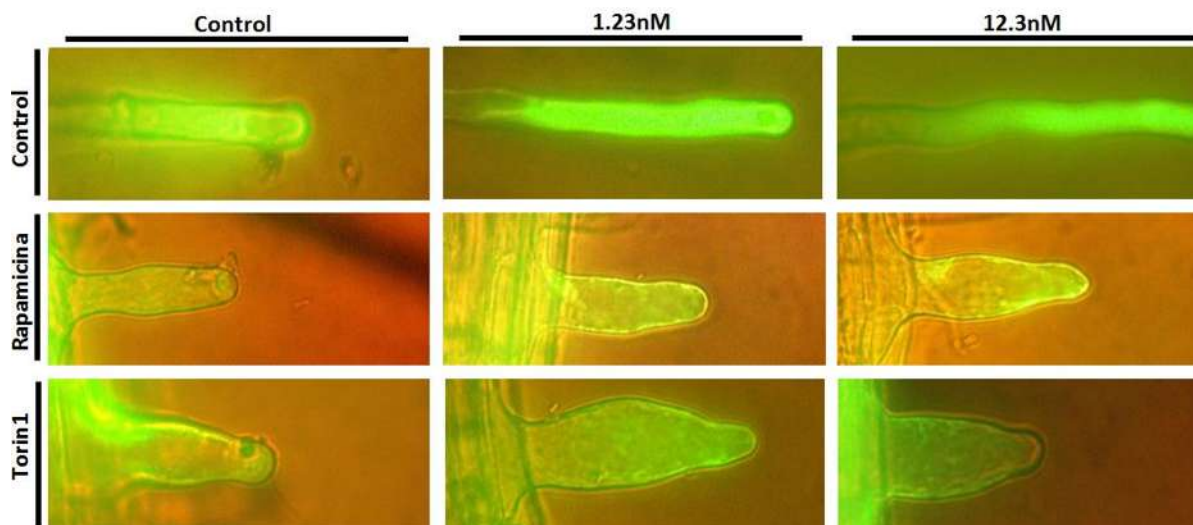


Figura 13. Efecto de la insulina e inhibidores de TOR sobre la producción de ROS en los pelos radiculares de plántulas de *Arabidopsis*. Las plántulas crecidas por cinco días en presencia de insulina y tratadas con los inhibidores de TOR la últimas 24 h, fueron expuestas a H₂DCFDA 20 μM por 45 min a 4 °C, lavadas dos veces y las imágenes fueron capturadas con el microscopio Nikon de epifluorescencia. Las fotografías son representativas de 30 pelos radiculares.

6.3.2. Efecto de la insulina sobre la producción de H₂O₂

En los experimentos con H₂DFDA, se lograron observar algunos cambios en los niveles de ROS (Fig. 13), sin embargo, nuevas herramientas genéticas como la sonda molecular HyPer, han sido desarrolladas para el estudio de moléculas de vida corta como el H₂O₂, que permite evaluar en tiempo real y en el órgano de interés el efecto de dicha molécula. Hyper es una línea transgénica de *Arabidopsis*, formada por la proteína YFP circularmente permutada (cpYFP) insertada en el dominio del factor de transcripción OxyR que interacciona con H₂O₂ (Hernández-Barrera *et al.*, 2013). Así que en el presente estudio se utilizó esta sonda, para evaluar de manera semi cuantitativa, los niveles internos de H₂O₂ en los pelos radiculares de plántulas tratadas con insulina. En el ápice de crecimiento de los pelos radiculares, la producción de ROS fue oscilatoria (Fig. 14a). Los valores de fluorescencia promedio mostraron diferencias entre los distintos tratamientos de insulina, aumentando sus niveles conforme la concentración de insulina donde fueron crecidas las plántulas se incrementaba (Fig. 14).

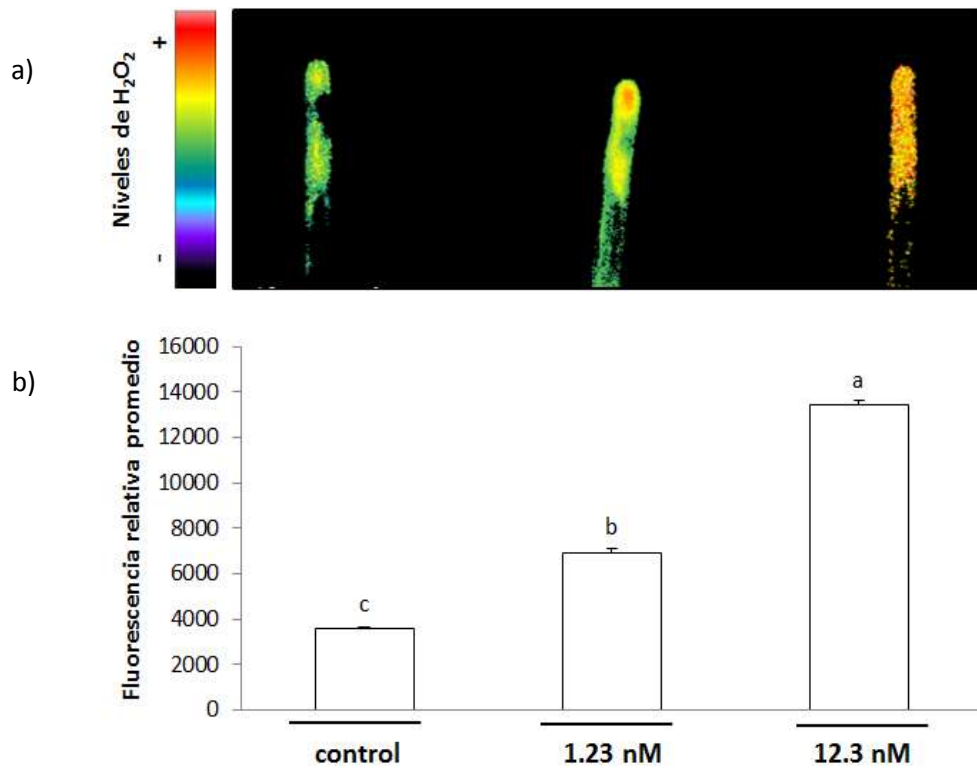


Figura 14. Efecto de la insulina sobre los niveles de H₂O₂ en la línea *HyPer* de *Arabidopsis*. El gradiente de colores relaciona los niveles de H₂O₂ en los pelos radiculares de plántulas creciendo en medios suplementados con 1.23 y 12.3 nM de insulina. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en los pelos radiculares de los diferentes tratamientos. Se compararon 100 imágenes de una secuencia de pelos radiculares en crecimiento. Las letras muestran la diferencia significativa entre tratamiento determinada mediante la prueba estadística ANOVA Tukey.

6.3.3. Cambio de los patrones del H₂O₂ en respuesta a la insulina

Al observar que la insulina aumento la producción de H₂O₂ en los pelos radiculares de semillas germinadas y crecidas en medios suplementados con la hormona (Fig. 14), se decidió evaluar si esta hormona podría inducir cambios inmediatos en los patrones oscilatorios de H₂O₂ en el ápice del pelo radicular. En plántulas crecidas en medio sin insulina, se añadió la hormona e inmediatamente se realizaron las observaciones. En la figura 15 se muestran los aumentos en los picos máximos de oscilación después de la adición de 1.23 y 12.3 de insulina respecto al control. Es claro que el incremento más dramático se presenta con la concentración de 12.3 nM de insulina (Fig. 15c).

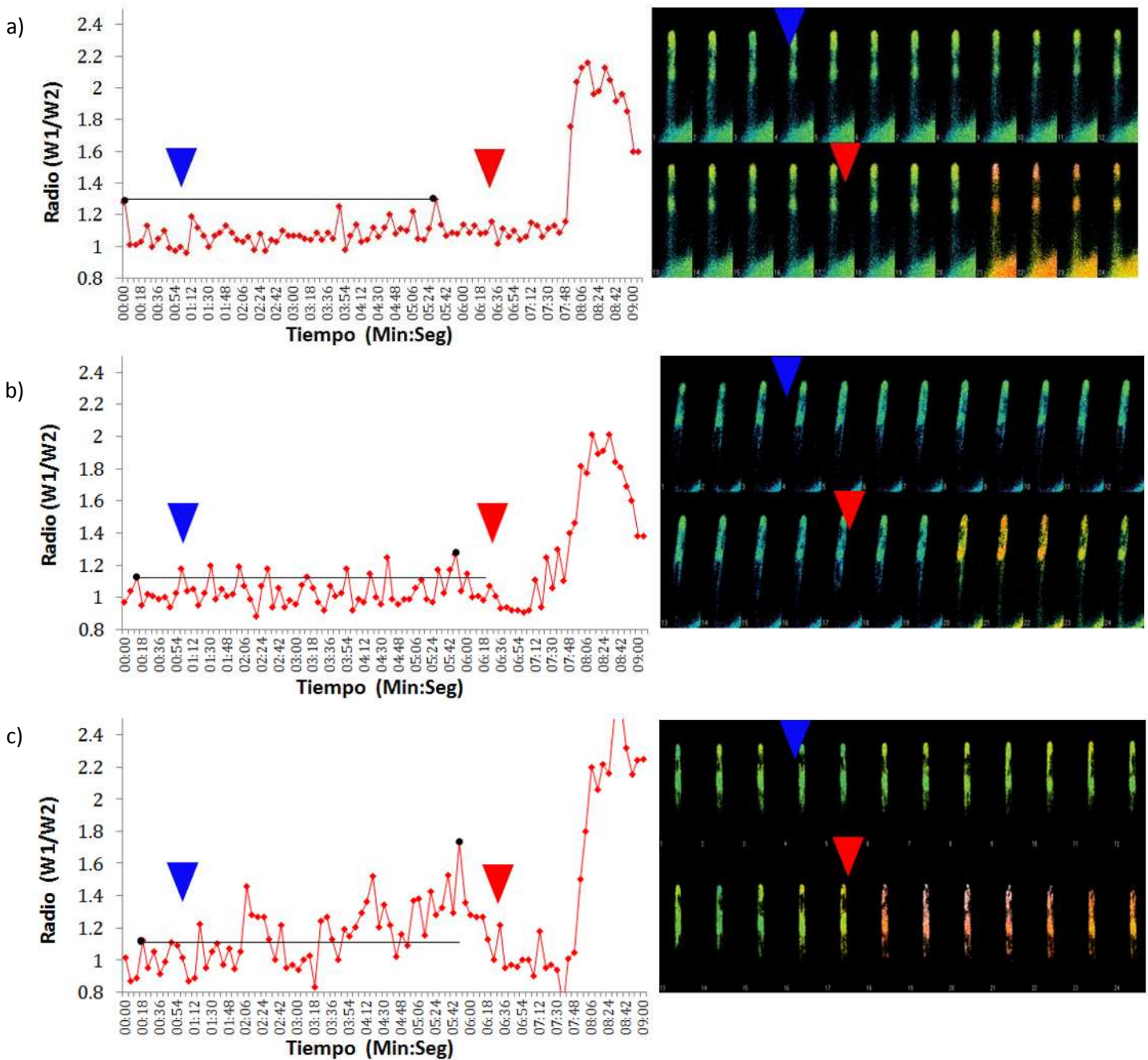


Figura 15. Cambios en los patrones oscilatorios de H_2O_2 en la línea *HyPer* en respuesta a la insulina. La longitud de onda 1 (W1) de la sonda *HyPer* muestra los niveles de proteína OxyR expresados en la plántula, mientras que la 2 (W2), la cantidad de proteína OxyR unida al H_2O_2 . La relación entre ambas (W1/W2) permite evaluar cambios en la producción del H_2O_2 en una secuencia de imágenes registradas cada 6 seg. Las plántulas fueron crecidas en medio sin insulina e inmediatamente después de la adición de agua (a) o diferentes concentraciones de insulina (b y c) (flechas azules) se registraron las imágenes cada 6 seg durante seis min. Las flechas rojas indican la adición de H_2O_2 usado como control del funcionamiento del sistema.

6.3.4. Alteraciones en los niveles oscilatorios de H₂O₂ en respuesta a los inhibidores de TOR

Hasta este momento los resultados del presente estudio muestran una correlación positiva entre el efecto estimulante de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis* (Fig. 6, 7 y 9), el aumento en la producción de H₂O₂ y sus patrones oscilatorios (Fig. 14 y 15). Además de la posible participación de TOR en la señalización activada por la insulina (Fig. 7, 9 y 12). Debido a que existen reportes de que la inhibición en la actividad de TOR disminuye el crecimiento y los niveles de ROS en los pelos radiculares (Ren *et al.*, 2012; Xiong y Sheen, 2012), se evaluó si el inhibidor directo de TOR -torin1-, podría inducir cambios en los patrones oscilatorios de ROS. Los resultados mostrados en la figura 16, indican que al inhibir TOR, por adición del fármaco (flechas rojas) se presenta una alteración en los patrones oscilatorios de H₂O₂, lo que correlaciona con pelos radiculares menos activos y de menor crecimiento. Dicho fenómeno se presentó tanto en el control (Fig. 16a), como en los tratamientos con 1.23 nM (Fig. 16b) y 12.3 nM de insulina (Fig. 16c).

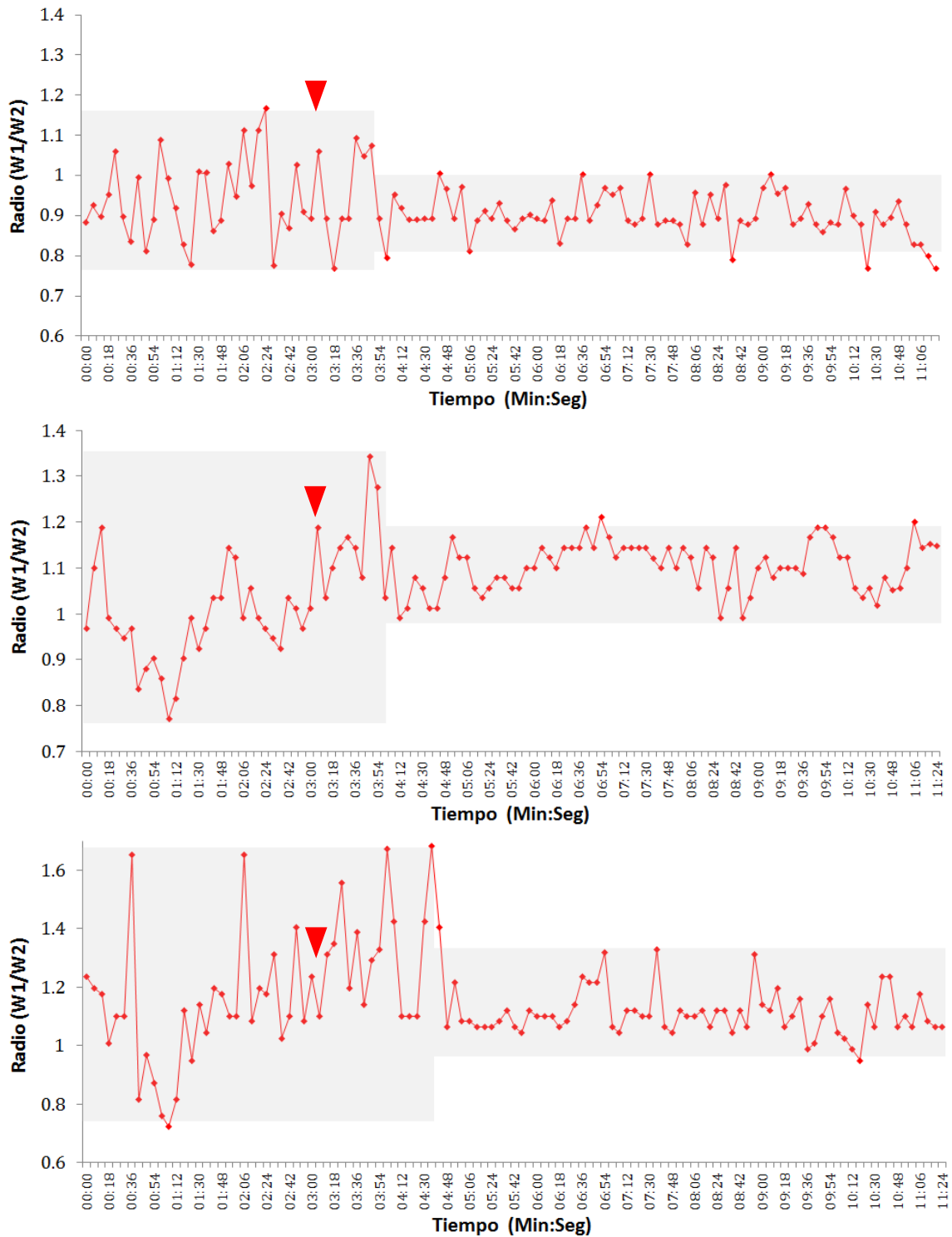


Figura 16. Efecto de la inhibición de TOR en las oscilaciones de H_2O_2 en plántulas *HyPer* tratadas con insulina. Se muestran los cambios en los patrones oscilatorios de H_2O_2 por efecto de torin1. Se crecieron plántulas en medios sin insulina (a), suplementados con 1.23nM (b) y 12.3nM de insulina (c). Las flechas rojas indican la adición de 250 nM de torin1 (2.42 Min/Seg.). Se grafican los cambios en la relación (W_1/W_2), previamente estandarizada a un valor de 1 y en base a este valor se determinan los cambios entre los patrones oscilatorios del H_2O_2 .

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra la participación de la proteína TOR sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis thaliana* al ser estimulada por insulina y, el efecto de esta hormona sobre la producción de ROS. Asimismo, se demuestra que el efecto inhibitorio de la rapamicina a bajas concentraciones sobre el crecimiento celular, depende del tipo de disolvente empleado. A la fecha había sido reportado reiteradamente que *Arabidopsis* era insensible a la rapamicina (Turck *et al.*, 2004; Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012) de tal manera, se dio por hecho que las plantas en general no respondían al macrólido aún a concentraciones de alrededor de 5000-10000 nM. Por esta razón varios grupos de investigación construyeron líneas transgénicas de *Arabidopsis* a las cuales adicionaron *ScFKBP12* para restaurar la sensibilidad a la rapamicina (Sormani *et al.*, 2007; Leiber *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012). Sólo recientemente Xiong y Sheen (2012) reportaron que 10000 nM de rapamicina inhibía la señalización TOR-S6K1 de *Arabidopsis* y retardaba el crecimiento mediado por glucosa. Tomando en cuenta que existen reportes como en el caso del maíz, donde 100 nM de rapamicina inhibe la fosforilación de la proteína ribosomal S6 estimulada por la insulina (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999) y que en *Chlamydomonas* la concentración inhibitoria de su crecimiento osciló entre 100-500 nM (Crespo *et al.*, 2005), en el presente estudio se analizó el efecto de rapamicina 200 y 500 nM sobre el crecimiento de los pelos radiculares en las líneas 25c y silvestre de *Arabidopsis* respectivamente. Cabe mencionar que las concentraciones de rapamicina antes mencionadas fueron ensayadas a la par de la optimización del efecto del fármaco sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis* (García-Flores, 2011). Los resultados del efecto de la rapamicina fueron sorprendentes, al mostrar que el crecimiento de los pelos radiculares estimulado por insulina en las plántulas Wt de *Arabidopsis* fue reprimido a una concentración 500 nM (Fig. 7 y 9), cuando repetidamente había sido reportada su insensibilidad aún a 10000 nM. En cambio la línea 25c mostró mayor sensibilidad al inhibirse el crecimiento con rapamicina 200 nM (Fig. 8 y 10), esto también fue inesperado debido a que esta línea fue analizada por Sormani *et al.*, (2007) quienes observaron sensibilidad a una concentración de 10000 nM de rapamicina.

Con el objetivo de explicar a qué se debían diferencias tan significativas en las concentraciones del inhibidor, revisamos nuevamente la literatura y encontramos que en la

mayoría de los reportes la rapamicina la disolvían en DMSO (Sormani *et al.* 2007; Leiber *et al.*, 2010; Ren *et al.* 2012.; Xiong y Sheen, 2012) y solamente en aquellos trabajos donde el macrólido fue disuelto en etanol, se requirieron concentraciones bajas para observar el efecto inhibitorio sobre TOR (Sánchez de Jiménez *et al.* 1999; Crespo *et al.*, 2005; Sotelo *et al.* 2010). Para comprobar la hipótesis anterior, analizamos el efecto de diferentes concentraciones de rapamicina disuelta en DMSO sobre el crecimiento de los pelos radiculares. La figura 11a; muestra que rapamicina 200 y 10000 nM inhiben el crecimiento de los pelos radiculares en plántulas de 5 días solamente en la línea 25c, en tanto que las plántulas silvestres fueron insensibles al inhibidor aún a concentraciones de 10000 nM como efectivamente había sido reportado (Turck *et al.* 2004; Sormani *et al.* 2007; Leiber *et al.* 2010; Ren *et al.*, 2012). Sin embargo, las plántulas silvestres de 8 días presentaron una ligera inhibición en el crecimiento de los pelos radiculares a una concentración de rapamicina de 10000 nM, lo que está de acuerdo con las observaciones de Xiong y Sheen, (2012) (Fig. 11b). Así, nuestros resultados confirman nuestra hipótesis que la rapamicina presenta una mayor actividad o disponibilidad cuando se disuelve en etanol, confiriendo este solvente una fluidez a la membrana y en consecuencia mayor disponibilidad del inhibidor a diferencia del DMSO, el cual como ha sido reportado incrementa la rigidez de la membrana (Orvar *et al.*, 2000; Veerman *et al.*, 2007).

Los pelos radiculares son estructuras tubulares que surgen a partir de células especializadas de la epidermis de la raíz y juegan un papel muy importante en la adquisición de nutrientes y en el anclaje de la planta al suelo. En general, se ha reportado que el desarrollo de los pelos radiculares es controlado por fitoreguladores como las auxinas y otras señales (Ishida *et al.*, 2008) y el efecto de la insulina sobre el desarrollo estas estructuras sólo ha sido abordado en nuestro grupo de trabajo. Interesantemente, observamos que la insulina estimuló fuertemente el crecimiento de los pelos radiculares de una manera dosis-dependiente hasta una concentración 12.5 nM. Concentraciones más altas de 30.7 y 61.5 nM reprimieron tal efecto (Fig. 6), posiblemente debido a que la vía de señalización activada por la insulina se autorregula como sucede en metazoarios. Esta interpretación se basa en que la vía PI3K/TOR/S6K ha sido conservada evolutivamente en los organismos eucariontes, incluyendo las plantas como lo sugiere la presencia de varios

componentes homólogos de dicha vía descritos en *Arabidopsis* (Tabla 2). En maíz, se ha descrito una vía de señalización PI3K/TOR activada por insulina que estimula el crecimiento de ejes embrionarios, el hipocótilo y la radícula (Garrocho-Villegas y Sánchez de Jiménez, 2012; Garrocho-Villegas *et al.*, 2013). A partir de ejes embrionarios de maíz, también se aisló un péptido estructuralmente similar a la insulina al cual denominaron ZmIGF y recientemente se demostró la existencia de un receptor putativo para ZmIGF, que mostró ser competitivo por la insulina (Rodríguez-López *et al.*, 2011; Garrocho-Villegas *et al.*, 2013). La cinasa TOR es clave para el crecimiento vegetal (Deprost *et al.*, 2007; Sormani *et al.*, 2007), incluido el crecimiento de los tricoblastos y pelos radiculares (Leiber *et al.*, 2010; Xiong y Sheen, 2012; Ren *et al.*, 2013). Recientemente se ha destacado la importancia de TOR, más allá de su papel sobre la regulación traduccional, implicándola en la reprogramación del transcriptoma (Xiong *et al.*, 2013; Xiong y Sheen, 2014).

En el presente estudio se determinó que la insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares en forma dosis dependiente tanto en la línea silvestre (Wt), como en la 25c y, que dicha estimulación fue inhibida por la rapamicina (Fig. 7 y 8). No obstante, el comportamiento del macrólido fue muy diferente en la línea transgénica 25c, donde en plántulas control de 5 días de edad, la rapamicina no sólo no inhibió la elongación de los pelos radiculares sino que la incrementó (Figs. 8a), mientras que en las plántulas tratadas con insulina el inhibidor no tuvo ningún efecto. En cambio, el efecto inhibitor del macrólido se observó nuevamente en las plántulas de 8 días de edad (Fig. 8b). En los experimentos en medio líquido (Fig. 9), el efecto promotor de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares de la línea silvestre fue considerablemente mayor respecto al crecimiento de tales estructuras en medio sólido y también se observó que dicha estimulación por la insulina fue inhibida por la rapamicina, pero más significativamente por torin1 (inhibidor directo de TOR). Esta última observación fue muy interesante, debido a que torin1 pertenece a una generación de inhibidores que directamente interactúan con el sitio ATP de la mTOR y han mostrado ser más efectivos para suprimir el crecimiento y la proliferación de células animales, debido a que a diferencia de la rapamicina, torin1 inhibe un amplio espectro de las funciones de mTOR (Thoreen *et al.*, 2009). Respecto al comportamiento de la línea 25c con torin1, las plántulas de diferentes edades presentaron sensibilidad a este inhibidor a los 5 días pero no a los 8 días de edad; mientras que la

sensibilidad a la rapamicina fue lo contrario, es decir, las plántulas fueron insensibles a los 5 días pero sensibles a los 8 días (Fig. 10). Esta diferencia en sensibilidad de la línea 25c a ambos inhibidores respecto a la línea silvestre (Wt) -donde a cualquier edad las plántulas fueron sensibles a ambos compuestos-, sugiere que en tal respuesta podría participar la FKBP12 sobre expresada en la línea 25c. ¿Cómo podría dicha proteína estar involucrada y presentar efectos contrastantes con ambos inhibidores cuando sólo uno de ellos la requiere para su actividad? Creemos que como la FKBP12 pertenece a una familia de proteínas que presentan un motivo Tetratric Peptide Repeat (TPR), el cual se ha mostrado esencial para las respuestas de fitoreguladores como etileno, citocininas, giberelinas y auxinas; su sobreexpresión también alteraría la respuesta a la insulina y a los inhibidores de TOR (Schapire *et al.*, 2006; Geisler y Bailly, 2007).

Por otra parte, con la estrategia genética observamos que en la mutante condicionada *tor-es1* (muestra una depleción en la expresión de TOR en presencia de estradiol), la estimulación del crecimiento de los pelos radiculares por la insulina, también fue dosis dependiente y tal efecto fue reprimido en presencia de estradiol (Fig. 12). Estos últimos resultados están de acuerdo con lo reportado por Xiong y Seen (2012), ellos observaron la abolición del crecimiento de los pelos radiculares en la mutante *tor-es1* inducible por estradiol. Tomando juntos los resultados de las estrategias químicas y genéticas, estos sugieren fuertemente que la regulación del crecimiento de los pelos radiculares de *A. thaliana* por insulina involucra la activación de TOR. Pensamos que el mecanismo donde participa TOR, posiblemente requiera la producción de ROS, esta propuesta se apoya en los resultados obtenidos por Ren *et al.*, (2012), quienes observaron una reducción significativa de ROS en plantas transgénicas sensibles a la rapamicina y en nuestros resultados donde la presencia de insulina incrementa la producción de ROS en los pelos radiculares de *Arabidopsis* (Fig. 13 y 14). Se ha reportado que las ROS están muy relacionadas con el crecimiento de los pelos radiculares (Monshausen *et al.*, 2009), y que la inhibición de TOR por rapamicina disminuye tanto el crecimiento de los pelos radiculares como los niveles de ROS en este órgano (Ren *et al.*, 2012). La regulación del crecimiento de los pelos, podría involucrar al producto de la NADPH, el O^{2-} , regulando las propiedades de la pared celular (Knight, 2007). Otra fuente importante de ROS, proviene de la actividad mitocondrial (Minibayeva *et al.*, 2012). Se ha observado que en la raíz existe

una distribución diferencial de ROS de $O^{2\cdot-}$ y H_2O_2 , los cuales pueden tener diferentes funciones en el control del crecimiento radicular. Mientras que los iones $O^{2\cdot-}$ se localizan principalmente en la zona de transición entre el meristemo y las zonas de rápida elongación, el H_2O_2 se encuentra en células completamente elongadas en la región de diferenciación de los pelos radiculares (Dunand y Penel, 2007). Las ROS y los antioxidantes como el glutatión están en constante interacción durante la regulación del crecimiento (Koprivova *et al.*, 2010). También se ha observado que en el ápice de la raíz el glutatión y el ascorbato se encuentran principalmente en forma oxidada, mientras que en el centro quiescente donde en las células que se dividen lentamente, dichas moléculas se encuentran en su forma reducida (Jiang *et al.*, 2003). En este trabajo, se demostró que la insulina estimula la producción de H_2O_2 (Fig. 14). Un fenómeno similar fue reportado por Othman *et al.*, (2013) donde la hormona promovió la producción de ROS, implicadas en el daño al DNA en un cultivo de células de riñón de rata. Sin embargo, en el caso de los pelos radiculares la producción de ROS es indispensable para su crecimiento, lo que en parte podría explicar su efecto positivos sobre este fenómeno. La actividad de TOR se ha relacionado con el crecimiento de estos órganos y su inhibición se ve acompañada de una baja regulación de genes asociados al desarrollo de pelos radiculares como *MRH6* y *LRX1* (Ren *et al.*, 2010). Sin embargo, a la fecha no se ha descrito una relación directa entre TOR y la actividad de la NADPH oxidasa productor importante de ROS en pelos radiculares. Proteínas como la extensina *LRX1* regulan la rigidez de la pared celular y esta a su vez está regulada por *ROL5*, que es blanco de TOR y se ha propuesto que regula componentes de la pared celular como arabinoglucanos y peptidoglucanos. Además, *ROL5* está presente en las mitocondrias por lo que podría relacionarse con la producción de ROS en los pelos radiculares. La deslocalización de ROS en la punta, podría además interferir con la señalización de calcio, debido a que las ROS modulan el gradiente de Ca^{2+} enfocado en la punta de crecimiento, que es un elemento importante para el crecimiento de los pelos radiculares (Monshausen *et al.*, 2007). Sin embargo el papel inicial de ROS en el crecimiento de estos parece estar implicado en los estadios de elongación de los pelos radiculares, ya que la iniciación no se ve comprometida, regulando la dureza de la pared de los pelos radiculares (Fig. 4). El resultado de la deformación a los costados de los pelos radiculares causada por los inhibidores de TOR (Fig. 13) sugiere que TOR podría regular la

posición los factores que producen ROS y que la inactivación de esta cinasa deslocalizaría a las proteínas productoras de ROS perdiendo la punta de crecimiento y causando un crecimiento aberrante. Aquí se observó que la insulina activa procesos fisiológicos específicos como el aumento de los patrones oscilatorios de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fig.15), distinto al estrés oxidativo, donde la producción de ROS es súbita y posterior a ella, los sistemas antioxidantes de la planta tratan de contrarrestar este efecto (Cárdenas *et al.*, 2008), lo que se muestra después de la adición de peróxido de hidrogeno (Fig. 15). Mientras que la insulina responde de manera específica aumentando los patrones oscilatorios un proceso relacionado con el crecimiento de estos órganos, la insulina muestra una respuesta distinta a lo que se ha observado en pelos radiculares de especies que nodulan como el frijol, donde la adición de factores de nodulación, aumentan los niveles de ROS de manera gradual, después de lo cual se recuperan, en comparación con un agente oxidante como el quitosan, donde el aumento en la producción de ROS se da de manera súbita y no se recupera a los tiempos evaluados (Cárdenas *et al.*, 2008). Por lo que la insulina es capaz de estimular tanto la producción de ROS (Fig. 14) como promover y aumentar las oscilaciones de ROS en el ápice de los pelos (Fig.15). La inhibición de TOR sobre los patrones de producción-descenso de H_2O_2 , resultó en una disminución en la amplitud y frecuencia de las oscilaciones (Fig.16).

VIII. CONCLUSIONES

La insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares de manera dosis dependiente a través de la activación de TOR. El mecanismo por el cual la insulina estimula el crecimiento de los pelos radiculares involucra un incremento en el patrón oscilatorio y producción de H_2O_2 . Estos cambios solo se presentan si la cinasa TOR está activa.

IX. PERSPECTIVAS

Determinar la actividad de la cinasa TOR mediante la evaluación de la fosforilación de S6K, por análisis de Western-blot en presencia de insulina y de los inhibidores de TOR.

Determinar el origen de las ROS que se producen bajo efecto de insulina mediante inhibidores de la cadena transportadora de electrones para un posible origen mitocondrial o bien utilizando inhibidores de NADPH oxidasas como DPI.

Probar el efecto de la insulina sobre el crecimiento de pelos radiculares de plantas tratadas con agentes pro-oxidantes y antioxidantes.

Evaluar la tasa de crecimiento de los pelos radiculares en presencia de 0, 1.23 y 12.3nM insulina y su correlación con los niveles oscilatorios de H₂O₂ en la línea HyPer.

X. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Agredano-Moreno L.T., Reyes de la Cruz H., Martínez- Castilla L.P. and Sánchez de Jiménez E. 2007. Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol. Biosyst.* 3: 794-802

Amano Y., Tsubouchi H., Shinohara H., Ogawa M. and Matsubayashi Y. 2007. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 104: 18333–18338

Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell Biochem.* 182: 31-48

Bao Y., Kost B. and Chua N.H. 2001. Reduced expression of alpha-tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J.* 28: 145–157

Baumberger N., Ringli C. and Keller B. 2001. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 15: 1128-39

Baumberger N., Steiner M., Ryser U., Keller B. and Ringli C. 2003. Synergistic interaction of the two paralogous *Arabidopsis* genes *LRX1* and *LRX2* in cell wall formation during root hair development. *Plant J.* 35: 71-81

Benjamins R. and Scheres B. 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443-465

Berkowitz O., Jost R., Pollmann S. and Masle J. 2008. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 3430-3447

Best C.H.S. and Scott M.A. 1923. Possible sources of insulin. *J. Meth. Res* 3: 177-179

Betsuyaku S., Sawa S. and Yamada M. 2011. The function of the CLE peptides in plant development and plant–microbe interactions. *Arabidopsis Book* 9: e0149

Bibikova T.N., Blancaflor E.B. and Gilroy S. 1999. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17: 657–665

Bibikova T.N., Jacob T., Dahse I. and Gilroy S. 1998. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 2925–2934

Bishopp A., Mähönen A.P. and Helariutta Y. 2006. Signals of change hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133:1857-1869

Björk G.R., Huang B., Persson O.P. and Bystrom A.S. 2007. A conserved modified wobble nucleoside (mcm(5)s(2)U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA* 13: 1245-1255

Bork P. and Koonin E.V. 1994. A P-Loop-like motif in a widespread ATP pyrophosphatase domain—implications for the evolution of sequence motifs and enzyme activity. *Proteins* 20: 347-355

Brown E.J., Albers M.W., Shin T.B., Ichikawa K., Keith C.T. and Lane W.S.A. 1994. Mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756-758

Butenko M.A., Vie A.K., Brembu T., Aalen R.B. and Bones A.M. 2009. Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Plant Sci.* 14: 255–263

Campanoni P. and Blatt M.R. 2007. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *J. Exp. Bot.* 58: 65–74

Cárdenas L., Martínez A., Sánchez F. and Quinto C. 2008. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J.* 56: 802–813

Carol R. J. and Dolan L. 2002. Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 357: 815–821

Carol R.J., Takeda S., Linstead P., Durrant M.C., Kakesova H., Derbyshire P., Drea S., Zarsky V. and Dolan L. 2005. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438: 1013–1016

Carrera A. C. 2004. TOR signaling in mammals. *J. Cell Sci.* 117: 4615-4616

Casamitjana-Martinez E., Hofhuis H.F., Xu J., Liu C.M., Heidstra R. and Scheres B. 2003. Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Curr. Biol.* 13: 1435–1441

Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S. and Swaroop R. 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852

Cosgrove D. J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 391–417

Craddock C., Lavagi I. and Yang Z. 2012. New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. *Trends Cell Biol.* 22: 492–501

Cramer G.R. and Jones R.L. 1996. Osmotic stress and abscisic acid reduce cytosolic calcium activities in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 19: 1291–1298

Crespo J.L., Diaz-Troya S. and Florencio F.J. 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 139: 1736-1749

Cunningham J.T., Rodgers J.T., Arlow D.H., Vazquez F., Mootha V.K. and Puigserver P. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*: 450: 736-740

Czyzewicz N., Yue K., Beeckman T. and Smet I.D. 2013. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development. *J. Exp. Bot.* 64: 5281–5296

Chan T.F., Carvalho J., Riles L. and Zheng X.F.S. 2000. A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 13227-13232

Cheung A.Y. and Wu H.M. 2008. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 547–572

Chiu M.I., Katz H. and Berlin V. 1994. RAPT1, a mammalian homolog of yeast TOR, interacts with the FKBP12 rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12574-12578

Dames S.A., Mulet J.M., Rathgeb-Szabo K., Hall M.N. and Grzesiek S. 2005. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J. Biol. Chem.* 280: 20558-20564

Deprost D., Truong H.N., Robaglia C. and Meyer C. 2005. An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 844-850

Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicolaï M., Bedu M., Robaglia C. and Meyer C. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8: 864–870

Dewitte W., Scofield S., Alcasabas A.A., Maughan S.C., Menges M., Braun N., Collins C., Nieuwland J., Prinsen E., Sundaresan V. and Murray J.A. 2007. *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 140: 14537-14542

Dietz K.J., Jacquot J.P. and Harris G. 2010. Hubs and bottlenecks in plant molecular signalling networks. *New Phytol.* 188: 919–938

Dinkova T.D., Reyes de la Cruz H., García-Flores C., Aguilar R., Jiménez-García L.F. and Sánchez de Jiménez E.S. 2007. Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiol. Plant.* 130:1-10

Duan Q., Kita D., Chao L., Cheung A.Y. and Wu H.M. 2010. FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41:17821–17826

Dunand C. and Penel C. 2007. Localization of superoxide in the root apex of *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 2: 131–132

Ellis M.M. and Eyster W.H. 1923. Some effects of insulin and glucokinase on maize seedlings. *Science* 1513: 541-542

Engelman J.A., Luo J. and Cantley L.C. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7: 606-619

Fernández A., Drozdzecki A., Hoogewijs K., Nguyen A., Beeckman T., Madder A. and Hilson P. 2013a. Transcriptional and functional classification of the GOLVEN/ROOT GROWTH FACTOR/CLE-like signaling peptides reveals their role in lateral root and hair formation. *Plant Physiol.* 161: 954–970

Fernández A., Hilson P. and Beeckman T. 2013b. GOLVEN peptides as important regulatory signaling molecules of plant development. *J. Exp. Bot.* 64: 5263–5268

Fingar D.C., Richardson C.J., Tee A.R., Cheatham L., Tsou C. and Blenis J. 2004. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-P1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol. Cell Biol.* 24: 2000-2016

Finkelstein J.J., Gampala S.S.L. and Rock C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* S15-S45

Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Miedema H., Torresk M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jonesk Jonathan D. G., Davies J. M. and Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442–446.

Foyer C.H. and Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875

Gabardi S. and Baroletti S.A. 2010. Everolimus: A proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation. *Pharmacotherapy* 30: 1044-56

García Flores M. 2010. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Licenciatura de Biología. Facultad de Biología, UMSNH.

Garrocho-Villegas V. and Sánchez de Jiménez E. 2012. TOR pathway activation in *Zea mays L.* tissues. *Plant Sig. Behav.* 7: 657-677

- Garrocho Villegas V., Aguilar C. R., and Sánchez de Jiménez E. 2013. Insights into the TOR-S6K Signaling Pathway in Maiz (*Zea mays L.*). Pathway Activation by-Effector-Receptor Interaction. *Biochemistry* 9129-9140.
- Geisler M. and Bailly A. 2007. Tete-a- tete: the function of FKBP12 in plant development. *Trends Plant Sci.* 12: 465-473
- Grebe M. 2012. The patterning of epidermal hairs in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 31–37
- Goehring A.S., Rivers D.M. and Sprague G.F. 2003. Urmylation: A ubiquitin-like pathway that functions during invasive growth and budding in yeast. *Mol. Biol. Cell* 14: 4329-4341
- Goodman D.B and Davis W.L. 1993. Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19: 440-446
- Grunewald W. and Friml J. 2010. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J.* 29: 2700–2714
- Halliwell B. and Gutteridge, J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine (4th edn), Clarendon (Halliwell and Gutteridge 2007)
- He X., Liu Y.M., Wang W. and Li Y. 2006. Distribution of G-actin is related to root hair growth of wheat. *Ann. Bot.* 98: 49–55
- Hepler P.K., Kunkel J.G., Rounds C.M. and Winship L.J. 2012. Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci.* 17: 32–38
- Hernández-Barrera A., Quinto C., Johnson E.A., Wu H.-M., Cheung A.Y. and Cárdenas L. 2013. Using *Hyper* as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: A method with virtually unlimited potential in plant biology. *Meth. Enzymol.* 527: 275-290

- Herrmann A. and Felle H. H.** 1995. Tip growth in root hair cells of *Sinapis alba* L.: significance of internal and external Ca²⁺ and pH. *New Phytol.* 129: 523–533
- Huang D., Jaradat M.R., Wu W., Ambrose S.J., Roos A.R., Abrams S.R. and Cutler A.J.** 2007. Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50: 414-428
- Huang S., Bjornsti M.A. and Houghton P.J.** 2003. Rapamycins— mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol. Ther.* 2: 222-232
- Ishida T., Kurata T., Okada K. and Wada T.** 2008. A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 365–386
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis B.E., Murata Y. and Kwak J.M.** 2009. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 20520-20525
- Jiang K., Meng Y.L., and Feldman L.J.** 2003 Quiescent center formation in maize roots associated with an auxin-regulated oxidizing environment, *Development* 130: 1429–1438
- Jiménez-López S., Mancera-Martínez E., Donayre- Torres A., Rangel C., Uribe L. and March S. Jimenez-Sanchez G. and Sanchez de Jimenez E.** 2011. Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant Cell Physiol.* 52:1719-1733
- Jones M. A., Raymond M.J., Yang Z. and Smirnov N.** 2007 NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J. Exp. Bot.* 58 (6):1261-70.

- Jones D.L., Shaff J. E. and Kochian L.V.** 1995. Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoniferum* L. Inhibition of ti growth by aluminum. *Planta* 197:672-680
- Jones V.A.S. and Dolan L.** 2012. The evolution of root hairs and rhizoids. *Ann. Bot.* 110: 205-212
- Kandasamy M.K., McKinney E. C. and Meagher R.B.** 2009. A singlr vegetative actin isovariant overexpressed under the control of multiple regulatory sequences is sufficient for normal *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 21: 701-718
- Kende H. and Zeevaart J.A.D.** 1997. The five classically plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210
- Ketelaar T., Allwood E.G. and Hussey P.J.** 2007. Actin organization and root hair development are disrupted by ethanol-induced overexpression of *Arabidopsis* actin interacting protein 1 (AIP1). *New Phytol.* 174: 57–62
- Khanna P.N., Jain, S.C. and Mohan S.V.** 1974. Extraction of insulin from a plant source. *3rd Int. Con. Plant Tiss. Cell Cult. (Leicester, UK.)*.
- Kieber J.J.** 2002. Cytokinins. *The Arabidopsis book* doi: 10.1199/tab.0063
- Kim J., Kundu M., Viollet B. and Guan K.L.** 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13: 132-141
- Knight M. R.** 2007. New ideas on root hair growth appear from the flanks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (52): 20649–20650
- Knutson B.A.** 2010. Insights into the domain and repeat architecture of target of rapamycin. *J. Struct. Biol.* 170: 354-363

Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N. and Yoshioka H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19: 1065–1080

Komori R., Amano Y., Ogawa-Ohnishi M. and Matsubayashi Y. 2009. Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106: 15067–15072

Konrad K.R., Wudick M.M and Feijo J.A. 2011. Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:721–730

Koprivova A., Mugford S.T. and Kopriva S. 2010. *Arabidopsis* root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Rep.* 2: 1157–1167

Kutschmar A., Rzewuski G., Stuhrwohldt N., Beemster G.T.S., Inzé D. and Sauter M. 2009. PSK- α promotes root growth in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 181: 820–831

Lease K.A. and Walker J.C. 2006. The *Arabidopsis* unannotated secreted peptide database, a resource for plant peptidomics. *Plant Physiol.* 142: 831–838

Leiber R.M., John F., Verherbruggen Y., Diet A., Knox J.P. and Ringli C. 2010. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 1898-1908

Leidel S., Pedrioli P.G., Bucher T., Brost R., Costanzo M., Schmidt A., Aebersold R., Boone C., Hofmann K. and Peter M. 2009. Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* 458: 228-232

Libault M., Brechenmacher L., Cheng J.L., Xu J. and Stacey G. 2010. Root hair systems biology. *Trends Plant Sci.* 15: 641–650

Ljung K., Bhalerao R. P. and Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465-474.

Mahfouz M.M., Kim S., Delauney A.J. and Verma D.P. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18: 477-490

Márton M.L., Fastner A., Uebler S. and Dresselhaus T. 2012. Overcoming hybridization barriers by the secretion of the maize pollen tube attractant ZmEA1 from *Arabidopsis* ovules. *Curr. Biol.* 22: 1194–1198

Matsubayashi Y. 2011. Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant Cell Physiol.* 52: 5–13

Matsubayashi Y., Ogawa M., Kihara H., Niwa M. and Sakagami Y. 2006. Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phyto-sulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiol.* 142: 45–53

Matsubayashi Y. and Sakagami Y. 1996. Phyto-sulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 7623–7627

Matsuzaki Y., Ogawa-Ohnishi M., Mori A. and Matsubayashi Y. 2010. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science* 329: 1065–1067

McInnis S.M., Desikan R., Hancock J.T. and Hiscock S.J. 2006. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling cross-talk. *New Phytol.* 172: 221–228

McMahon G., Weir M.R., Li X.C. and Mandelbrot D.A. 2011. The evolving role of mTOR inhibition in transplantation tolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22: 408-415

Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. and Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 6422-6427

Michard E., Alves F. and Feijo J.A. 2009. The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *Int. J. Dev. Biol.* 53:1609–1622

Miller E.W., Dickinson B.C. and Chang C.J. 2010. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 15681–15686

Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M. A., Shulaev V., and Mittler R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2(84), ra45.

Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A. and Ryabovol V. 2012. Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 59:11-19

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery. M. and Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9(10): 490-498.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405–410

Monshausen G. B., Bibikova T. N., Messerli M. A., Shi C., and Gilroy S. 2007. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(52): 20996-21001.

Monshausen G.B., Bibikova T. N., Weisenseel M. H., and Gilroy S. 2009. Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. *The Plant Cell Online* 21(8): 2341-2356.

Moon H., Lee B., Choi G., Shin D., Prasad D. T., Lee O., Kwak S.S., Kim D.H., Nam J., Bahk J., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J., Lim C.O. and Yun D.J. 2003. NDP kinase 2

interacts with two oxidative stress activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 358–363

Müller B. and Sheen J. 2007. Advances in cytokinin signaling. *Science* 318:68-69

Murphy E., Smith S. and De Smet I. 2012. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. *Plant Cell* 24: 3198–3217

Myers M.G. and White M.F. E., Gruenberg G., Zick Y. and Taylor F. 2002. The molecular basis of insulin action. In: *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models.* New York, pp 55-87

Nishimura M.T. and Dangl J.L. 2010. *Arabidopsis* and the plant immune system. *Plant J.* 61: 1053–1066

Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., and Kuchitsu K. 2008. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 283(14): 8885-8892.

Ohyama K., Ogawa M., and Matsubayashi Y. 2008. Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.* 55: 152–160

Ojangu E.L., Järve K., Paves H. and Truve E. 2007. *Arabidopsis thaliana* myosin XIK is involved in root hair as well as trichome morphogenesis on stems and leaves. *Protoplasma* 230: 193–202

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

Olszewski N., Sun T. and Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell* S61-S80

Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RJ (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794

Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A. and Goormachtig S. 2012. WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol.* 158: 1329–1341

Othman E.M., Kreissl M.C., Kaiser F.R., Arias-Loza P.A. and Stopper H. 2013. Insulin-mediated oxidative stress and DNA damage in LLC-PK1 pig kidney cell line, female rat primary kidney cells, and male ZDF rat kidneys *in vivo*. *Endoc.*:154: 1434–1443

Pascual-Morales E. J., Arteaga-Tinoco I., García-Pineda E., Mellado-Rojas M. E. y Beltrán-Peña E. 2012. La insulina promueve el crecimiento de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. *Biologicas.* 14: 1 – 6

Pedreira J., Sanz N., Pena M.J., Sanchez M., Queijeiro E., Revilla G. and Zarra I 2004. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pipe hypocotyls *Plant Cell Physiol* 45:530 – 534.

Peremyslov V.V., Prokhnevsky A.I., Avisar D. and Dolja V.V. 2008. Two class XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146: 1109–1116

Prokhnevsky A. I., Peremyslov V.V. and Dolja V.V. 2008. Overlapping functions of the four class XI myosins in *Arabidopsis* growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 19744–19749

Rashotte M., Brandy S.R., Reed R.C., Ante S.J. and Muday G.M. 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 481-490

Reid D.E., Li D., Ferguson B.J. and Gresshoff P.M. 2013. Structure– function analysis of the GmRIC1 signal peptide and CLE domain required for nodulation control in soybean. *J. Exp. Bot.* 64: 1575–1585

Ren M., Qiu S., Venglat P., Xiang D., Feng L., Selvaraj G. and Datla R. 2011. Target of Rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155: 1367-82

Reyes de la Cruz H., Aguilar R. and Sanchez de Jimenez E. 2004. Functional characterization of maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plants ortholog of methazoan p70 (S6K). *Biochem.* 43: 533-539

Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquard A., and Murray J. A. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544

Robaglia C., Menand B., Lei Y., Sormani R., Nicolai M., Gery C. Teoule E., Deprost D. and Meyer C. 2004. Plant growth: the translational connection. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 581-584

Rodríguez Andrade E. 2012. Estudio del desarrollo vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis thaliana* por efecto de la insulina. Licenciatura de QFB. Escuela de Químico Farmacobiología, UMSNH.

Rodríguez-López C.D., Rodríguez-Romero A., Aguilar C.R. and Sánchez de Jiménez E. 2011. Biochemical characterization of a maize novel peptide hormone. *Protein Pept. Lett;* 18: 84-91

Rouhier N. 2011. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol.* 186: 365–372

Ruvinsky I., Sharon N., Lerer T., Cohen H., Stolovich- Rain M., Nir T., Dor Y., Zisman P. and Meyuhas O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 19: 52199-52211

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

Saradha J.S.K., Sridhar G.R., Subba B.R. and Apparao A. 2010. Plant insulin: An *in silico* approach. *Int. J. Diab. Dev. Count.* 30: 191-193

Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E. and Ortíz-López A. 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 105:148-154

Schapiro A.L., Valpuesta V. and Botella M.A. 2006. TPR proteins in plant hormone signaling. *Plant Sig. Behav.* 1: 229-230

Scheres B. 2007. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 345–354

Schiefelbein J.W., Kwak S.H., Wieckowski Y., Barron C. and Bruex A. 2009. The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 60: 1515–1521

Schiefelbein J.W. and Somerville. C. 1990. Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, 2(3): 235-243

Schieke S.M. and Finkel T. 2006. Mitochondrial signaling, TOR and life span. *Biol. Chem.* 387: 1357-1361

Schmelzle T. and Hall M. N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-262

Schopfer P. 1996. Hydrogen peroxide mediated cell wall stiffening in vitro maize coleoptiles. *Planta* 199: 43-49

Shahbazian D., Roux P.P., Mieulet V., Cohen M.S., Raught B. and Taunton J. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* 25: 2781-2791

Shiu S.H. and Bleecker A.B. 2001. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci.Sig. STKE* re22.

Sormani R., Yao L., Menand B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C. and Robaglia C. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7: 26-33

Sotelo R., Garrocho-Villegas V., Aguilar C.R., Calderon M.E., Sanchez de Jimenez E. 2010. Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays* L.) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 46: 578- 586

Soulard A.C.A. and Hall M.N. 2009. TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 825–836

Strabala T.J., O'Donnell P.J., Smit A.M., Ampomah-Dwamena C., Martin E.J., Netzler N., Nieuwenhuizen N.J., Quinn B.D., Foote H.C.C. and Hudson K.R. 2006. Gain-of-function

phenotypes of many CLAVATA3/ esr genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. *Plant Physiol.* 140: 1331–1344

Suzaki T., Yoshida A. and Hirano H-Y. 2008. Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *Plant Cell* 20: 2049–2058

Teale W.D., Paponov I.A. and Palme K. 2006. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859

Thoreen C. C , Kang S A , Chang J. W., Liu Q., Zhang J., Gao Y., Reichling L.J., Sim T., Sabatini D. M. and Gray N.S. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycinresistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284: 8023-8032

Turck F., Zilbermann F., Kozma S.C., Thomas G. and Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134:1527-1535

Vanhaesebroeck B. and Alessi D.R. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346: 561-576

Veerman E.C.I., Valentijn-Benz M., Nazmi K., Ruissen A.L.A., Walgreen-Weterings E. van Marle J., Doust A.B., van't Hof W., Bolscher J.G.M. and Amerongen A.V.N. 2007. Energy depletion protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides by rigidifying its cell membrane. *J. Biol. Chem.* 282: 18831-18841

Virkamaki A., Ueki K. and Kahn C.R. 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 103: 931- 943

Wang Y., Zhu Y., Ling Y., Zhang H., Liu P., Baluska F., Samaj J., Lin J. and Wang Q. 2010. Disruption of actin filaments induces mitochondrial Ca^{2+} release to the cytoplasm and $[\text{Ca}^{2+}]_c$ changes in *Arabidopsis* root hairs. *BMC Plant Biol.* 10: 53

Watanabe Y. 1994. A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein. Isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur. J. Biochem.* 224:167-172

Whitford R., Fernandez A., Tejos R., Cuellar-Perez A., Kleine-Vehn J., Vanneste S., Drozdzecki A., Leitner J., Abas L. Aerts M., Hoogewijs K., Baster P., De Groot R., Lin Y.C., Storme V., Van de Peer Y., Beeckman T., Madder A., Devreese B., Luschnig C., Friml J. and Hilson P. 2012. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Dev. Cell* 22: 678–685

Wullschleger S., Loewith R. and Hall M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484

Wu J., Kurten E.L., Monshausen G., Hummel G.M., Gilroy S. and Baldwin I.T. 2007. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. *Plant J.* 52: 877–890

Wymer C. L. Bibikova T. N. and Gilroy S. 1997. Cytoplasmic calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana* *Plant J* 12:427–439.

Xiong Y. and Sheen J. 2012. Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J. Biol. Chem.* 287: 2836-2842

Xiong Yan., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C., and Sheen J. 2013. Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*: 496: 181-187

Xiong Y. and Sheen J. 2014. The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism 164: 499–512.

Xu Q., Liang S., Kudla J. and Luan S. 1998. Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin. *Plant J.* 15: 511-519

Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 59: 225-251

Yang H.P., Matsubayashi Y., Nakamura K. and Sakagami Y. 2001. Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol.* 127: 842–851

Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L. and Gruissem W. 2004. Genevestigator. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136: 2621-32