

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**Interacción entre la percepción de la luz y la gravedad sobre
el crecimiento y la proliferación celular en *Arabidopsis
thaliana*: simulación en tierra y definición del experimento
espacial *Seedling growth***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Ángel Valbuena Crespo

Directores

Raúl Herranz Barranco
María Eugenia Carnero Díaz

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Interacción entre la percepción de la luz y la gravedad sobre el crecimiento y la proliferación celular en *Arabidopsis thaliana*:

**simulación en Tierra y definición del experimento
espacial “Seedling Growth”**

Trabajo de investigación que presenta

Miguel Ángel Valbuena Crespo

para la obtención de Grado de Doctor

Madrid, 2016

Departamento de Biología Medioambiental
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Interacción entre la percepción de la luz y la gravedad sobre el crecimiento y la proliferación celular en *Arabidopsis thaliana*:

simulación en Tierra y definición del experimento espacial “Seedling Growth”

Miguel Ángel Valbuena Crespo

Licenciado en Biotecnología

Madrid, 2016

Bajo la dirección de los doctores:

Raúl Herranz Barranco

María Eugenia Carnero Díaz

Tutor de la Facultad de Ciencias

Biológicas (UCM):

Tomás Naranjo Pompa

VºBº Directores de tesis doctoral

VºBº Tutor de doctorado

Dr. Raúl Herranz Barranco

Tomás Naranjo Pompa

Dra. María Eugenia Carnero Díaz

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible este trabajo, que han sido muchas, y espero acordarme de todas.

En primer lugar al Dr. Raúl Herranz, director de la tesis, compañero de laboratorio y amigo y al Dr. F. Javier Medina, por su apoyo, confianza y tutela, por su ayuda en todo momento, porque me he sentido en su laboratorio como en mi casa y con una libertad para trabajar que dudo vuelva a gozar en adelante. Muchas gracias.

A la Dra. Ana Manzano, por todos los consejos durante mi tesis y al Dr. Khaled, mi compañero de laboratorio durante la tesis, por todas las interesantes conversaciones tenidas. Y a Arancha, la heredera de esta línea de trabajo con la que he compartido buenos momentos de laboratorio desde el primer día. Y por supuesto a Mercedes, ¡Qué hubiese hecho todos estos años sin la alegría que despierta mi Mercedes por el laboratorio! Esta etapa de mi vida estará siempre ligada a vuestro recuerdo.

A los diferentes grupos con los que hemos colaborado:

- A la Dra. Eugenie Carnero por su co-dirección y la Dra. Isabel Le Disquet, de la Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, por acogerme calurosamente durante la estancia breve en París y la dirección de los trabajos en sus instalaciones de microgravedad.
- Al Dr. John Kiss, Co-Investigador Principal de Seedling Growth junto con el Dr. Medina, actualmente en la Universidad de Mississippi, y a la Dra. Katherine Millar, por toda la ayuda prestada durante estos años.
- A la Dra. Marianne Steele, al Dr. John Freeman y al Dr. Gwo-Shing, del Centro de Investigaciones Nasa-Ames, por toda la asistencia científico-técnica y por el apoyo durante mis estancias en California.
- Al Dr. Julio Sáez-Vasquez, del CNRS-Université de Perpignan, por la colaboración prestada con los mutantes de nucleolina.

- A la Dra. Verónica Pereda y a Brigitte, de la Université Paul Savatier de Toulouse, por el uso de la RPM y por hacerme sentir como en casa nada más entrar por la puerta del laboratorio.
- Al Dr. Jack van Loon, del centro ESTEC (ESA) en los Países Bajos, por el uso de la RPM, la LCD y toda la ayuda técnica prestada y por su apoyo durante mis estancias en el centro.
- A los servicios de microscopía confocal, de electrónica y de proteómica y genómica del Centro de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC), por la cantidad de horas pasadas juntos.

A los compañeros de laboratorios vecinos: Livia, Laura, Irene, Virginia, Fran, Meme, Gosia, Emmanuel. Mención especial al 208 - Héctor, Mayte, Edu, Yoli, Vanesa - por las interminables horas de buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. A todos gracias por ser los primeros en escucharme al mínimo problema / percance / contratiempo / complicación / noticia buena o mala. A los que ya no están por el CIB, especialmente a Alberto, Lourdes, Irene, Nacho, Paula, Fátima por el poco o mucho tiempo que pasamos y recordaré siempre.

A mis amigos María, Andoni, Ana, Estefanía, Javi, Alicia, Ángel y Alexis, por ser eso, mis amigos.

Y por último pero no menos importante, a mí familia, a mi abuela por hacerme compañía todas las mañanas mientras escribía la tesis y a mis padres y hermana por confiar en mí incluso aunque yo no lo hiciera.

Sin duda, lo mejor de la tesis no ha sido lo que haya podido aprender, que seguramente ha sido mucho, ni tan siquiera los sitios que he conocido gracias a ella, que de seguro han sido muchos, sino que ha sido toda la gente que he conocido durante estos cinco años y que siempre recordaré. Y eso no se puede medir por muchos o pocos.

Este trabajo ha sido financiado por la beca FPI (BES-2010-035741) y por los proyectos de investigación otorgados (AYA-20009-07952 y AYA-2012-33982) por el Ministerio de Economía y Competitividad, por los proyectos GBF dirigidos por el Dr. Raúl Herránz (ESA#4000105761 y ESA#4200022650) de la Agencia Espacial Europea y por los proyectos Seedling Growth (ILSRA-2009-0932, ILSRA-2009-1177) de la NASA

Resumen

Las plantas serán parte imprescindible de los sistemas de soporte vital, como fuente de oxígeno y alimento para la tripulación, en la exploración espacial de la Luna y Marte. Por ello, entender la biología fundamental de las plantas en microgravedad es acuciante. La gravedad se ha mantenido constante a lo largo de la evolución de las plantas en la Tierra, y distinguir cómo el fototropismo y el gravitropismo configuran la estructura de la planta no es trivial en nuestro planeta. Por ello, la Estación Espacial Internacional (ISS), es el laboratorio científico perfecto dónde poder estudiar dichos tropismos aislados o en diferentes combinaciones. Ambos estímulos, gravedad y luz, son percibidos por la raíz y la parte aérea respectivamente; dichas señales se traducen y transmiten a lo largo de la planta para modular el crecimiento y la proliferación celular a cada órgano.

El objetivo principal de los trabajos de investigación contenidos en esta tesis es hacer realidad y maximizar el retorno científico del proyecto espacial “Seedling Growth”, que persigue profundizar en la descripción de los efectos de la microgravedad en el crecimiento y la proliferación celular, y específicamente el efecto modulador de la luz y las auxinas en el mantenimiento de la competencia meristemática.

El proyecto espacial “Seedling Growth” (SG) se está ejecutando con éxito en la ISS. Es un proyecto conjunto entre la NASA y la ESA que pretende estudiar cómo afecta la luz al desarrollo de la planta en ausencia de otros factores ambientales como es la gravedad, además de cómo se ven afectadas rutas de señalización basadas en auxina en el crecimiento y diferenciación celular. SG consta de tres partes, la primera (SG1) se realizó en marzo-mayo de 2013 y la segunda (SG2) en noviembre-diciembre de 2014. La tercera se realizará a lo largo de 2016 gracias a que las pruebas realizadas en Tierra para su viabilidad en la ISS han tenido éxito. Para la realización de SG, se empleó la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y concretamente algunos mutantes para el estudio de tropismos. En SG1 se utilizaron mutantes de fitocromos (*phyA* y *phyB*), proteínas encargadas de la captación de la luz, bajo diferentes condiciones lumínicas. Durante SG2 se añadieron mutantes en el transporte y sensibilidad a auxina (*aux1.7*, *eir1.1* y

tir1), fitohormona desencadenante de proliferación celular, y mutantes de nucleolina (*nuc-L1* y *nuc-L2*), una proteína nucleolar responsable de la síntesis y maduración de rRNA. En SG3, se utilizarán también mutantes relacionados con auxina y de nucleolina, pero en esta ocasión, parte de las muestras serán fijadas para estudios estructurales.

Para anticipar la respuesta en microgravedad que se observará en el experimento espacial, utilizamos simuladores de microgravedad en Tierra (GBF - *Ground Based Facilities*) como la RPM (*Random Positioning Machine*) o el clinostato 2D.

Se estudió el meristemo radicular por ser una región de proliferación celular constitutiva y que proporciona las células que configurarán la arquitectura de la raíz. Con los resultados de las muestras analizadas hemos confirmado los resultados de varios estudios previos en microgravedad real y en oscuridad cómo es una mayor longitud de la raíz. Esto se confirmó en mutantes de fitocromos y relacionados con auxina, mientras que era más corta en los mutantes de nucleolina. En cuanto a la proliferación celular en el meristemo, medido mediante cortes de la zona meristemática, la tasa de división es más alta en las muestras crecidas en microgravedad que en condiciones control. Esto mismo les ocurre a los mutantes de fitocromos y a los relacionados con auxina. Sin embargo, la proliferación celular es menor en los mutantes de nucleolina crecidos en microgravedad. Respecto al crecimiento celular, medido de manera indirecta a través del tamaño de nucleolo, se observó una disminución en el crecimiento en prácticamente todas las líneas estudiadas crecidas en microgravedad con respecto a las crecidas en gravedad control, pese a que la expresión de los genes de nucleolina es contradictoria en la mayoría de los casos. Esto se puede explicar si la nucleolina L2 rescata la función de la nucleolina L1 que pierde efectividad bajo situaciones de estrés, pero dicho rescate no es completo, provocando desajustes en el crecimiento celular.

Las conclusiones obtenidas tras la realización de este trabajo, son las siguientes:

1. El experimento espacial “Seedling Growth” (SG) se está ejecutando con éxito en la Estación Espacial Internacional (ISS):
 - a. Las condiciones de crecimiento, preservación y procesado de las muestras definidas en el experimento TROPI han funcionado en las misiones SG1 y SG2.
 - b. La fijación con el hardware FixBox y el uso de ferrofluido con aldehído, preservará la ultraestructura de las muestras en la misión SG3.
2. Hemos confirmado que el desacople entre el crecimiento y la proliferación celular observado en el meristemo de raíz de *Arabidopsis* observado en microgravedad real y oscuridad (experimento ROOT).
3. Cuando las plantas germinan y crecen en presencia de luz (ciclo luz blanca/oscuridad) se ha observado que la microgravedad simulada también provoca un aumento de la proliferación y una disminución en el crecimiento celular, si bien este efecto es menos evidente que en oscuridad.
4. La microgravedad simulada no siempre consigue reproducir en toda su intensidad los efectos que se observan en muestras expuestas a condiciones ambientales similares en microgravedad real (por ejemplo, ISS).
5. Ninguno de los mutantes relacionados con auxina estudiados (*aux1.7*, *eir1.1* y *tir1*) presentaron tasas de proliferación, o patrones de expresión génica diferentes al genotipo silvestre. El efecto de la microgravedad sobre la proliferación celular parece estar regulado río abajo en la transducción de la señal gravitatoria.
6. La disminución en el crecimiento celular en microgravedad se manifiesta en la actividad nucleolar, y particularmente con el aumento en la expresión del gen de respuesta a estrés de la nucleolina (NUC-L2).
 - a. La expresión forzada de NUC-L2 en el mutante NUC-L1 hace que esas plantas tengan una respuesta favorable en microgravedad potencialmente interesante para la agricultura espacial.
 - b. A pesar de no haber podido desarrollar mecanismos específicos para responder al estrés gravitropico, la planta utiliza mecanismos generales de respuesta a otros estreses abióticos.

Summary

Plants are going to be an essential part of life support systems, as a source of oxygen and food for the crew, in space exploration of the Moon and Mars. Consequently, understanding the fundamental biology of plants in microgravity is pressing. The gravity has remained constant throughout the evolution of plants on our planet surface, and differentiating how phototropism or gravitropism shape the structure of the whole plant is not trivial on Earth. Therefore, the International Space Station (ISS) is the perfect scientific laboratory to study these tropisms isolated or in different combinations. Both stimuli, gravity and light, are perceived by the root and aerial part respectively; and those signals are translated and transmitted along the plant to modulate cell growth and proliferation to each organ.

The main objective of the research contained in this thesis is to realize and maximize the scientific return of the space project called "Seedling Growth", which aims to deepen the description of the effects of microgravity on the cell growth and proliferation, and specifically the modulating effect of light and auxins in maintaining the meristematic competence.

The "Seedling Growth" (SG) space project is running successfully on the ISS. SG is a joint project between NASA and ESA that aims to study how light affects the development of the plant in the absence of other environmental factors such as gravity, and how signaling pathways based on auxin affects cell growth and proliferation. SG consists of three parts, the first (SG1) was carried out in March-May 2013 and the second one (SG2) in November-December 2014. The third (SG3) will be carry out throughout 2016 thanks to the successful results of a number of viability tests performed in Earth before ISS execution. Different mutant strains of *Arabidopsis thaliana* were used as plant model to perform SG experiment in order to study tropisms. During SG1 grew phytochrome mutants (*phyA* and *phyB*), proteins responsible for capturing light under different lighting conditions. During SG2, these mutants grew and additionally some mutants related to transport and sensitivity to auxin (*aux1.7*, *eir1.1* and *tir1*), phytohormone which triggers cell proliferation, and as well as mutants

related to nucleolin (*nuc-L1* and *nuc-L2*), a nucleolar protein responsible for the synthesis and maturation of rRNA. All samples were frozen for transcriptomic and proteomic studies. Auxin-related mutants and nucleolin mutant were used during SG3, but on this occasion, part of the samples will be fixed for structural studies.

To anticipate the response that seedlings could give in real microgravity onboard the ISS, we took advance of microgravity simulator on Earth called Ground Based Facilities (GBF) as the Random Positioning Machine (RPM) or the 2D clinostat.

Root meristem was studied for being the area where main cell proliferation processes take place and because it supplies the cells needed to shape the architecture of the root. With the results of the analyzed samples, we have confirmed previous studies in real microgravity on samples grown in darkness like a longer root length. This was confirmed in phytochrome and related auxin mutants, whereas it was shorter in the nucleolin mutants. Local cell proliferation rate (LCPR) in the meristem was measured by counting the cells in the meristematic layers of the root under a microscope. LCPR is higher in samples grown in microgravity conditions than those in control gravity. The same happens to the phytochrome and related auxin mutants. However, cell proliferation is lower in nucleolin mutants grown in microgravity. Cell growth in meristematic cell was measured indirectly through the nucleolus size. Cell growth decreased in almost all strains grown in microgravity studied with respect to those grown in gravity control. Nevertheless, the expression of nucleolin genes is contradictory in most cases. This can be explained because the L2 nucleolin rescues the function of nucleolin L1 which loses effectiveness under a stress situation, but such rescue is not complete, causing disturbances in cell growth.

The conclusions obtained after the completion of this doctoral thesis are:

1. Seedling Growth (SG), the space experiment is been executed successfully on the International Space Station (ISS).
 - a. Growth conditions, preservation and processing of samples defined during TROPI space experiment, have worked during SG1 and SG2.
 - b. Fixation inside hardware FixBox using fixative with ferrofluid ensures the ultra-estructural preservation of samples during SG3.
2. We have confirmed that the decoupling between cell growth and cell proliferation observed in the Arabidopsis root meristem in real microgravity and darkness (ROOT experiment).
3. Simulated microgravity causes an increase in cell proliferation and a decrease in cell growth when plants germinate and grow in the presence of light (white light /darkness), but this effect is less evident than in complete darkness.
4. Simulated microgravity is not always able to reproduce at full intensity the effects observed in samples exposed to similar environmental conditions in real microgravity (as in the ISS).
5. None of the studied mutant related with auxin (*aux1.7*, *eir1.1* and *tir1*) have showed proliferation rates or gene expression patterns different to the wild genotype. The effect of microgravity on cell proliferation appears to be regulated downstream in the gravitational signal transduction.
6. The decrease in cell growth under microgravity conditions is exhibited in the nuclear activity and particularly with the increased of stress-responsive gene of nucleolin (NUC-L2).
 - a. The forced appearance of NUC-L2 in *nuc-L1* mutant makes that these plants have a favorable response in microgravity potentially interesting for space agriculture.
 - b. Plant uses general mechanisms to response to abiotic stresses because there is not another specific mechanism to respond to a gravitational stress.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	III
SUMMARY	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	2
ABREVIATURAS	8
<i>Nota sobre nomenclatura</i>	10
INTRODUCCIÓN	12
1 DESARROLLO Y MORFOLOGÍA DE LA RAÍZ	12
2 EFECTOS DE LA LUZ Y LA GRAVEDAD EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA.....	16
3 CONCEPTO DE COMPETENCIA MERISTEMÁTICA	17
3.1 <i>Percepción de la señal: captación de los estímulos proliferativos</i>	20
3.1.1 Captación del estímulo lumínico	21
3.1.2 Captación del estímulo gravitatorio	23
3.2 <i>Transducción de la señal: regulación hormonal</i>	23
3.2.1 Regulación de la proliferación celular.....	28
3.3 <i>Respuesta celular: Crecimiento y proliferación celular</i>	31
4 BIOLOGÍA EN MICROGRAVEDAD: INVESTIGACIÓN EN EL ESPACIO Y SIMULADORES EN TIERRA	35
4.1 <i>La Estación Espacial Internacional</i>	35
4.2 <i>Instalaciones de simulación en Tierra (GBF)</i>	37
4.3 <i>Experimentos espaciales previos</i>	39
4.3.1 El experimento ROOT	39
4.3.2 El experimento TROPI.....	41
4.3.3 El experimento GENARA	43
5 NECESIDAD DEL PROYECTO ESPACIAL SEEDLING GROWTH	44
OBJETIVOS	48

MATERIALES Y MÉTODOS	52
1 MATERIAL BIOLÓGICO	52
1.1 Lotes y mantenimiento de las semillas	54
1.2 Esterilización de las semillas	55
1.3 Criterios de selección de semillas.....	55
1.4 Condiciones de cultivo.....	58
1.4.1 Soporte de papel de cromatografía	58
1.4.2 Soporte en agar	58
2 PREPARACIÓN EN TIERRA DEL EXPERIMENTO ESPACIAL SG	59
2.1 Montaje de las muestras en los Cassettes	63
2.1.1 Montado de las semillas	64
2.1.2 Cubiertas del cassette.....	64
2.1.3 Ensamblaje de los cassettes	65
2.2 Detalles técnicos de los vuelos espaciales en la ISS	66
2.2.1 Línea temporal del Experimento espacial “Seedling Growth”	66
2.2.2 Seedling Growth I (SG1).....	67
2.2.3 Seedling Growth II (SG2).....	69
2.2.4 Seedling Growth III (SG3).....	70
2.2.4.1 FixBox.....	71
3 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS SIMULACIONES EN TIERRA	73
3.1 Condiciones en la Random Positioning Machine (RPM)	73
3.2 Condiciones en el clinostato 2D	75
3.3 Condiciones en la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC)	76
3.4 Tratamientos recibidos en los experimentos en Tierra	76
3.5 Tratamiento recibido en experimentos de efectos sinérgicos de estrés ambiental	81
4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EXPUESTAS A MICROGRAVEDAD.....	82
4.1 Técnicas de microscopía	82
4.1.1 Actividad β -glucuronidasa en líneas transformadas	82
4.1.2 Actividad fluorescente en líneas transformadas GFP	83
4.1.3 Microscopía confocal.....	83
4.1.3.1 Preparación de la muestra para inmunofluorescencia	83
4.1.3.2 Revelado de las muestras pre-procesadas para inmunofluorescencia	84
4.1.3.3 Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia	85
4.1.4 Microscopía electrónica de transmisión (MET)	85
4.1.4.1 Preparación de la muestra.....	85
4.1.4.2 Microscopía óptica sobre cortes.....	86
4.1.4.3 Ultramicrotomía y tinción para microscopía electrónica de transmisión	86
4.1.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	87

4.2 Técnicas de transcriptómica	89
4.2.1 Preparación de las muestras.....	89
4.2.2 Extracción de RNA	89
4.2.3 Primers o cebadores	89
4.2.4 Análisis de expresión génica por transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCRq)	90
4.3 Técnica de citometría de flujo.....	92
4.3.1 Comprobación del número de meristemas	92
4.3.2 Fijación de núcleos para citometría de flujo.....	93
4.4 Técnicas de proteómica	94
4.4.1 Extracción de proteína.....	94
4.4.2 Cuantificación de proteína.....	94
4.4.3 Electroforesis SDS-PAGE	94
4.4.4 Tinción con azul de coomassie.....	95
4.4.5 Western Blot.....	95
4.4.5.1 Anticuerpos para proteómica	95
4.4.5.2 Transferencia a membrana	95
4.4.5.3 Incubación.....	96
4.4.5.4 Revelado ECL para peroxidasa	96
5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	97
RESULTADOS.....	100
1 FASE DE DEFINICIÓN DEL EXPERIMENTO ESPACIAL “SEEDLING GROWTH”	100
1.1 Definición de las condiciones ambientales en SG	100
1.1.1 La hidratación	101
1.1.2 Tiempo de cultivo	102
1.1.3 Observación de las plántulas	103
1.1.4 Iluminación de las plántulas	104
1.1.5 Niveles de gravedad	104
1.1.6 Resumen de otros requisitos exigidos para el experimento espacial “Seedling Growth”	105
1.2 Definición de las líneas transgénicas/mutantes a utilizar en SG	106
1.2.1 Mejora de los lotes y de las semillas.....	110
1.3 Definición de las condiciones de preservación de las muestras espaciales.....	111
1.3.1 Congelación de las muestras en condiciones de ingravidez	111
1.3.2 Fijación de las muestras en condiciones de ingravidez.....	112
1.3.2.1 Sustitución de los fijadores basados en aldehídos por NotoxHisto	113
1.3.2.2 Fijación de las plántulas en el hardware Tropi: Ferrofuido.....	115
1.4 Fase de ejecución del experimento espacial “Seedling Growth”	119

2 EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD EN LA COLECCIÓN DE MUTANTES DE FITOCROMOS	123
2.1 Efecto de la luz roja en clinostato	123
2.2 Longitud de los mutantes de fitocromos en la RPM	126
2.3 Proliferación celular en mutantes de fitocromos en la RPM.....	129
2.4 Crecimiento celular en mutantes de fitocromos en RPM.....	131
2.5 Expresión de genes en mutantes de fitocromos en la RPM	133
2.6 Longitud de los mutantes de fitocromos en la ISS	135
2.7 Expresión de genes en mutantes de fitocromos en la ISS	137
2.8 Resumen capítulo 2.....	139
3 EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD EN LAS COLECCIONES DE MUTANTES DEL TRANSPORTE DE AUXINAS Y LOS DE NUCLEOLINA	140
3.1 Crecimiento de los mutantes del transporte auxinas y los de nucleolina en la RPM	140
3.2 Proliferación celular en mutantes del transporte de auxina y de nucleolina en la RPM.....	143
3.3 Crecimiento celular en mutantes de auxina y nucleolina en RPM	146
3.4 Expresión de genes en mutantes de auxina y de nucleolina en la RPM.....	151
3.5 Expresión de proteínas de crecimiento celular	153
3.6 Estudios con citometría de flujo en clinostato de mutantes de auxina.....	154
3.7 Crecimiento de los mutantes de auxina y de nucleolina en la ISS.....	161
3.8 Resumen capítulo 3.....	164
4 EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD SIMULADA EN COMBINACIÓN CON OTROS ESTRESSES AMBIENTALES.....	165
4.1 Microgravedad simulada y choque térmico.....	165
4.1.1 Resumen de choque térmico.....	169
4.2 Desarrollo de raíces secundarias en clinostato.....	169
4.3 Efecto sobre el desarrollo de la raíz en diferentes gradientes de auxina.....	173
4.4 Muestras con gen reportero GFP.....	177

DISCUSIÓN	180
1 HACIENDO REALIDAD EL EXPERIMENTO ESPACIAL "SEEDLING GROWTH"	180
<i>¿Cuáles serán las condiciones experimentales en el experimento espacial Seedling Growth?</i>	181
<i>¿Cómo se fijarán las muestras en el experimento espacial Seedling Growth?</i>	185
2 CONFIRMANDO LA GENERALIDAD DEL DESAJUSTE ENTRE EL CRECIMIENTO Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CONDICIONES DE GRAVEDAD ALTERADA	188
3 DESVELANDO LOS MECANISMOS QUE CONECTAN EL FOTOTROPISMO Y EL GRAVITROPISMO SOBRE LA COMPETENCIA MERISTEMÁTICA EN MICROGRAVEDAD	190
4 BUSCANDO LOS EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE CONTROLAN LA PROLIFERACIÓN CELULAR	195
<i>¿Cómo influye la auxina en el medio al desarrollo de la plántula?</i>	197
<i>¿Cómo se comportan las raíces secundarias en microgravedad?</i>	198
5 BUSCANDO EL MECANISMO QUE DESREGULA EL CRECIMIENTO CELULAR EN MICROGRAVEDAD	199
<i>¿Se responde al estrés gravitatorio de forma similar a otros estreses abióticos?</i>	201
6 VALIDANDO LAS HERRAMIENTAS DE MICROGRAVEDAD SIMULADA CON DATOS DE MICROGRAVEDAD REAL (SG)	206
<i>¿Qué ocurre a las plántulas que crecen en otros niveles de gravedad?</i>	209
7 FUTUROS EXPERIMENTOS A REALIZAR EN MICROGRAVEDAD REAL Y SIMULADA	211
CONCLUSIONES	214
BIBLIOGRAFÍA CITADA	218

ABREVIATURAS

Abreviaturas

Abreviaturas de Biología Espacial:

ARC: *Ames Research Center*. Centro de Investigaciones de Ames, California
CC/EC: cámara de cultivo (cassette espacial)
CIB: Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid
EC: *Experimental Container*. Contenedor experimental
EMCS: *European Modular Cultivation System*. Sistema de Cultivo Modular Europeo
ESA: *European Space Agency*. Agencia Espacial Europea
GBF: *Ground Based Facilities*. Simuladores en Tierra de microgravedad
GENARA: *Gravity related genes in Arabidopsis*
ISS: *International Space Station*. Estación Espacial Internacional
KSC: *Kennedy Space Center*, Cabo Cañaveral, Florida
LDC: *Long Diameter Centrifuge*. Centrífuga de gran diámetro
MELiSSA: *micro-ecological life support system alternative*
NASA: *National Aeronautics and Space Administration*. Agencia Espacial Estadounidense
N-USOC: *Norwegian User Support and Operations Centre*. Centro de Operaciones y Soporte a usuarios de Noruega
OVT: *Operations verification test*. Ensayo de verificación de operaciones
ROOT: proyecto espacial para el estudio de raíces de *Arabidopsis*
RPM: *Random Positioning Machine*
SG: experimento espacial *Seedling Growth* (compuesto de tres partes: SG-1, -2 y -3).
ST: *Schedule test*. Ensayo de programación

Abreviaturas generales:

Ab: anticuerpo
ABA: ácido abscísico
ARF: Auxin response factor. Factor de respuesta a auxina
ATP: Adenosina trifosfato
AUX: *auxin transporter protein*. Proteína de transporte de auxina
AuxRE: *auxin responsive element*. Elemento de regulación dependiente de auxina
CDC: ciclo de división celular
CDK: *cyclin dependant kinase*. Quinasa dependiente de ciclina
CK2: casein quinasa 2
CF: centro fibrilar
CFD: componente fibrilar denso
CG: componente granular
Cry: criptocromo
Cycb: ciclina B
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: *deoxyribonucleic acid*. Ácidos desoxirribonucleicos
DR5: *direct repeat 5*
ET: etileno
ETS: *external transcribed spacer*. Espaciador transcribible externo
Fe: Ferrofluido
g: gramos
g: gravedad
GA: glutaraldehído

GAF: dominio específico GMP, adenilil ciclasa y FhlA. Región de unión a cromóforo
 GAR: Región rica en glicina y arginina
 GFP: *Green fluorescent protein*. Proteína verde fluorescente
 GTP: guanósín trifosfato
 GUS: gen β -glucuronidasa
 IAA-: forma desprotonada de la auxina (activa)
 IAAH: forma protonada de la auxina (inactiva)
 LCPR: *local cell proliferation rate*. Tasa de proliferación celular
 NH: NotoxHisto
 NOR: *Nucleolar organizer region*. Región organizadora nucleolar
 O/N: *over night*. Toda la noche
 PAS: dominio Per-Arnt-Sim. Sensor de la señal lumínica
 PBS: *phosphate based solution*. Tampón fosfato
 Pfr: configuración del fitocromo bajo luz roja lejana (inactiva)
 PFA: paraformaldehído
 PGP: *phosphoglycolate phosphatase*
 Phot: fototropina
 Phy: fitocromo
 PI: yoduro de propidio
 PIN: *Auxin efflux carrier component*. Familia proteica PIN-formed
 Pr: configuración del fitocromo bajo luz roja (activo)
 R: luz roja
 RBD: *RNA binding domain*. Región de unión al RNA
 RL = FR: *Far red*. Luz del rojo lejano
 RNA: *Ribonucleic acid*. Ácidos ribonucleicos
 RNAr: RNA ribosómico
 rpm: revoluciones por minuto
 RT: *room temperatura*. Temperatura ambiente
 SCF: complejo proteico SKP, Cullin, F-Box
 SDS: dodecyl sulfato sódico
 TIR: *transport inhibitor response*
 Ub: ubiquitina
 YP: yoduro potásico

Nota sobre nomenclatura

Para la denominación de genes, proteínas, líneas transformadas y mutantes se han seguido las directrices propuestas por (Meinke & Koornneef 1997) para *Arabidopsis thaliana*. Hay información actualizada sobre la normativa en internet:

<http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/guidelines.jsp>

Las reglas más importantes que se han seguido son las siguientes:

- Genes: se designan de manera general con tres letras mayúsculas en cursiva. Para genes homólogos en diferentes especies se antepone un prefijo específico que no va en cursiva. Las variantes del gen se indican con números o con letras y números. Ejemplos: *NUC*, *AtNUC*, *AtNUC-L1*.
- Proteínas: se indican mediante la misma abreviatura del gen que codifica en mayúscula y normal. Si se pone el nombre completo con tipografía normal. Ejemplos: *NUC*, *AtNUC*, *AtNUC-L1*, nucleolina.
- Mutantes: el nombre del gen mutado se pone en minúscula y cursiva. Ejemplos: *nuc*, *Atnuc*, *Atnuc-l1*.
- Construcciones génicas: en caso de ser una inserción, es decir, un gen y a continuación otro, se separarán por dos puntos dobles. Si conllevan la fusión de dos genes, como la fusión entre promotor de un gen y región codificante de otro, se nombran con los genes separados por dos puntos. Ejemplos: DR5::GUS. CYCB1;1:*uidA*

INTRODUCCIÓN

1 DESARROLLO Y MORFOLOGÍA DE LA RAÍZ

2 EFECTOS DE LA LUZ Y LA GRAVEDAD EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA

3 CONCEPTO DE COMPETENCIA MERISTEMÁTICA

**4 BIOLOGÍA EN MICROGRAVEDAD: INVESTIGACIÓN EN EL ESPACIO Y
SIMULADORES EN TIERRA**

5 NECESIDAD DEL PROYECTO ESPACIAL SEEDLING GROWTH

Introducción

1 Desarrollo y morfología de la raíz

Se estima que hace más de 568 millones de años, la vida emergió de los océanos cuando la adaptación de las algas verdes para vivir fuera del agua produjo la aparición de las primeras embriófitas (Clarke et al 2011). El cambio medioambiental desde un medio líquido al suelo firme supuso una mayor exposición a la radiación, las carencias hídricas o la necesidad de buscar nuevas fuentes de nutrientes (Volkman & Baluska 2006). Los helechos y musgos se adaptaron a ese estrés ambiental a través de modificaciones en sus tallos para suplir las necesidades de fijación al sustrato y la absorción de nutrientes (Jones & Dolan 2012). Harían falta más de 200 millones de años (hace 350 millones de años) para que el grupo de las *Euphyllophyta* desarrollara un sistema radicular con una especificidad mayor que el de los rizoides (Raven & Edwards 2001). Este nuevo órgano, la raíz, mejoraba la penetrabilidad en el sustrato, optimizando la absorción de agua y de nutrientes, gracias a utilización del vector gravedad como referencia espacial básica y constante en nuestro planeta.

La raíz es un órgano sin clorofila que generalmente crece hacia abajo con un gravitropismo positivo y un fototropismo negativo (**Figura 1A**). Se compone de:

- Una zona meristemática constituida de células que se dividen con frecuencia para dar todas las células de la raíz.
- Una zona de elongación celular, dónde las células paran de dividirse y empiezan a crecer por elongación, y
- Una zona de diferenciación celular, dónde se forman todos los tejidos definitivos y las raíces laterales.

Este nuevo órgano que surge desde la parte basal del tallo, está estructurado en anillos concéntricos (**Figura 1B**), desde la periferia hacia el centro, se observa la rizodermis (donde se originan los pelos radiculares), el córtex (células diferenciadas con pared ensanchada y almidón de reserva), la endodermis (células con suberina, una barrera selectiva que controla el paso de las sustancias absorbidas desde el suelo hacia el cilindro central) (Eshel & Beeckman 2013), y el periciclo que rodea el cilindro vascular, compuesto de xilema (transporte de savia bruta) y floema (transporte de savia elaborada) (Laurenzio et al 1996). El periciclo es también el tejido donde se inician las raíces laterales (McCully 1995).

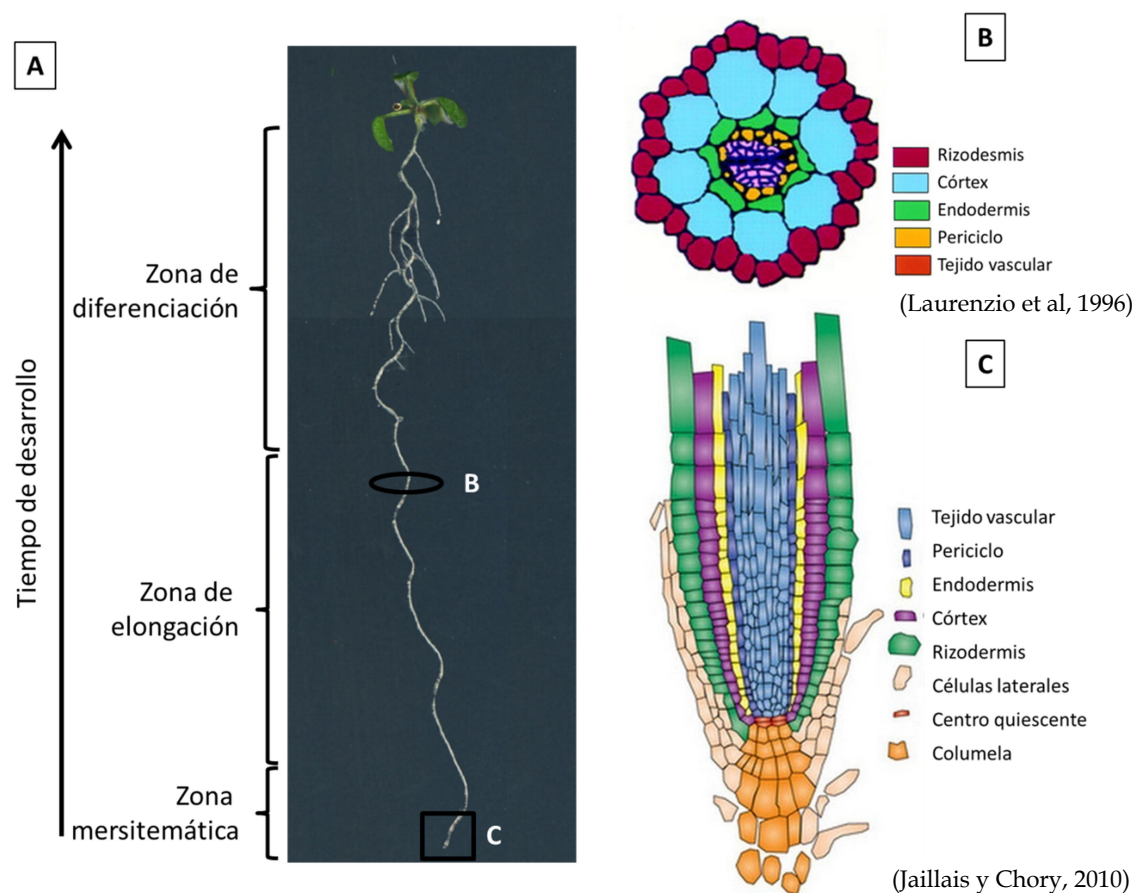
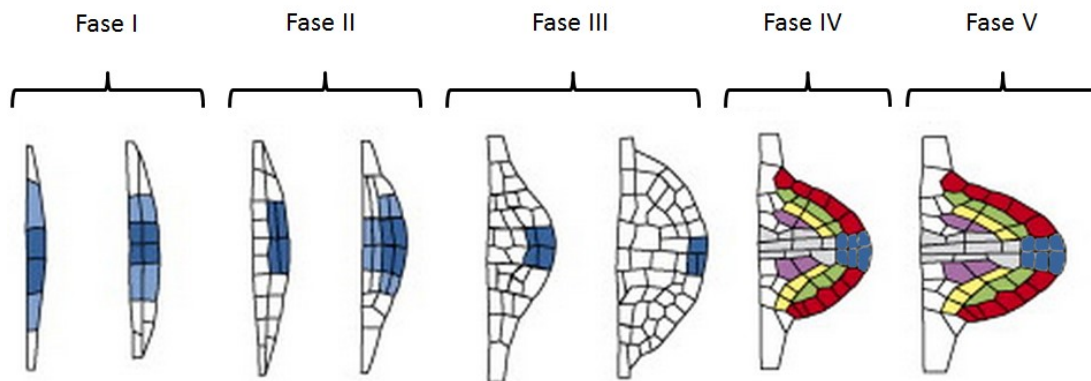


Figura 1: Organización de la raíz en *Arabidopsis thaliana*. A) Fotografía en la que se señalan las diferentes zonas de la raíz primaria, de distal a proximal: meristemática, de elongación y de diferenciación, con abundantes pelos radiculares o con raíces laterales emergidas. B) Corte transversal de la raíz primaria en la que se muestran las 3 capas diferenciadas, alrededor de periciclo y tejidos vasculares. C) Esquema de un corte longitudinal de la zona meristemática. El meristemo está compuesto por centro quiescente (células troncales inactivas) rodeado de las células "madre" (*stem cells*). Desde el centro quiescente se distribuyen los tejidos meristemáticos con alta tasa de proliferación: futuro epidermis la más exterior, futuro córtex a continuación y futura endodermis protegiendo el periciclo y los tejidos vasculares de transporte. El meristemo está protegido por la caliptra, la cual se compone de la columela (órgano sensorial gravitrópico) en la parte central y de las partes laterales.

En un corte longitudinal de la punta de la raíz (**Figura 1C**) se puede ver con más detalle, que la zona meristemática está rematada por la zona de diferenciación y protegida por la caliptra (Jaillais & Chory 2010). La zona meristemática se origina desde el centro quiescente. Este centro está constituido de 3-4 células troncales que regeneran células precursoras meristemáticas con mayor actividad proliferante que originarán capas meristemáticas: epidermis, córtex y endodermis. La función principal de las primeras células que forman la zona meristemática es mantener una población de células no diferenciadas con una tasa de proliferación celular suficiente para cubrir las necesidades del crecimiento de la nueva raíz. Finalmente, en la parte más distal del meristemo apical está la caliptra, integrada por las células laterales de la cubierta y la columela, con la doble función de proteger el meristemo de las agresiones mecánicas asociadas al crecimiento de la raíz y detectar la señal gravitropica (Valla 2007). Concretamente, los estatocitos, que son las células que se encuentran por debajo del centro quiescente, se caracterizan por contener estatolitos, unos orgánulos especializados llamados amiloplastos en angiospermas; son ricos en granos de almidón que se desplazan en función del vector gravedad (Driss-Ecole et al 2003). El límite entre la zona meristemática y la zona de elongación celular se llama zona de elongación distal. Se reconoce por el cambio de tamaño de las células y es la zona que permite la curvatura de la raíz en respuesta a estímulos ambientales (gravitropismo, fototropismo...).

En las células del periciclo se encuentra el origen de las raíces secundarias (Marhavy et al 2013) y las raíces laterales o secundarias se originan en la zona de diferenciación a partir de una célula del periciclo. Son células diferenciadas bloqueadas en G1 (Beeckman et al 2001), por eso no se les considerará como una capa meristemática (Benfey & Scheres 2000). Pero, ciertas células del periciclo adquieren la competencia de formar raíces secundarias acumulando la señal de auxina en su citoplasma (De Smet et al 2007). Mientras las células precursoras de la raíz secundaria están cerca de la zona meristemática, la elevada concentración de auxina extracelular inhibe su desarrollo. Estos niveles están mantenidos en las células contiguas de la endodermis mediante AUX1 y PIN3 (Marhavy et al 2013). Pero cuando la concentración extracelular de auxina se reduce (la célula del periciclo ya ha alcanzado la zona de elongación/diferenciación), la raíz lateral se puede desarrollar (Malamy & Benfey 1997a). La emergencia de la raíz lateral se produce en al menos cinco fases diferentes,

desde las primeras divisiones asimétricas (Casimiro et al 2003) y en una capa celular hasta que la raíz secundaria adquiere por sí misma una capacidad meristemática completa (**Figura 2**) (Malamy & Benfey 1997b). Durante la primera fase ocurren las primeras divisiones a partir de las células precursoras. En la segunda fase se produce una proliferación celular en las diferentes capas y la auxina comienza a acumularse en la capa externa. En la tercera, la auxina se concentra en las células que serán la columela y el futuro centro quiescente, polarizando el desarrollo de la raíz lateral. En la cuarta fase, ocurren las diferenciaciones celulares y la raíz secundaria emerge fuera de la primaria. En la última fase, la raíz ya presenta un meristemo funcional emergido con posibilidad de elongación celular (Peret et al 2009).



Adaptado de Peret, 2009

Figura 2: Diferentes fases de desarrollo de una raíz secundaria. El color azul indica la concentración de auxina, encontrándose el máximo en las células más oscuras. El marrón indica la futura rizodermis, el verde el futuro córtex, el amarillo la futura endodermis y el malva el periciclo.

2 Efectos de la luz y la gravedad en el desarrollo de la planta

Las plantas son organismos sésiles, por lo que cuando interactúan con el medio ambiente circundante tienen que adaptarse a las condiciones cambiantes al no poder escapar de las condiciones ambientales indeseadas (**Figura 3**).

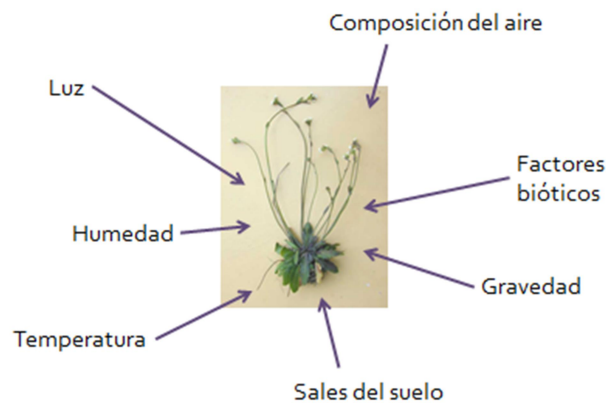


Figura 3: Factores ambientales que influyen directamente sobre el desarrollo de una planta. Además de los factores bióticos, entre los múltiples factores abióticos que van a definir la morfología de la planta están la composición del aire y del suelo, la humedad, la temperatura, la luz y la gravedad.

Dado que las plantas transforman la energía solar en energía química por la fotosíntesis, la luz es uno de los condicionantes ambientales abióticos más destacados que utilizan como fuente de información para controlar diferentes procesos fisiológicos (Page et al 2012). La fotomorfogénesis es un desarrollo no direccional provocado por la luz y que puede conducir a cambios importantes de forma, como por ejemplo la formación de flores o el fototropismo. Mientras que el fototropismo es un mayor proceso de crecimiento direccional de la parte aérea de la planta, la morfología de la raíz se ve afectada en menor grado. El desarrollo de la planta se denomina escotomorfogénesis o etiolación cuando se produce en oscuridad y fotomorfogénesis o de-etiolación en presencia de luz. Las plantas etioladas se caracterizan por un hipocotilo más largo, unos cotiledones más pequeños y carecer de cloroplastos. El fototropismo positivo es la respuesta de crecimiento/movimiento del tallo de la planta hacia la luz. Sin embargo, las raíces se caracterizan por un moderado fototropismo negativo (Darwin & Darwin 1880).

La gravedad es otro factor abiótico al que toda planta vascular debe de hacer frente. El gravimorfismo está relacionado con todo tipo de cambio no direccional producido en la raíz como consecuencia de la gravedad mientras que el gravitropismo es el tipo de crecimiento en la dirección del vector gravedad, siendo positivo para las raíces (ayudando a la planta a localizar el alimento y fijación al sustrato) y negativo en los tallos (maximizando la obtención de luz solar). Aunque existen otros tropismos, como el hidrotropismo (orientación hacia la fuente de agua), el quimiotropismo (respuesta positiva o negativa a sustancias y elementos presentes en el medio) o el tigmotropismo (reacción al tocar un obstáculo sólido durante su desarrollo), salvo excepciones, no son capaces de competir con el estímulo gravitatorio o luminoso (Kiss 2007). Todos los estímulos fluctúan y varían constantemente y las plantas se adaptan a ellos tras percibirlos y desencadenar la respuesta adecuada y proporcionada (Gilroy 2008). En el caso de la gravedad, aunque se puede variar la dirección en la que la planta sufre este efecto, su intensidad sufre variaciones mínimas en todos los puntos del planeta y a lo largo del tiempo (Hangarter 1997).

3 Concepto de competencia meristemática

Un meristemo es un tejido vegetal con células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse por mitosis un número indefinido de veces. Esta competencia meristemática se caracteriza por un ciclo celular activo.

El ciclo celular es el conjunto de etapas que se repiten en el tiempo para controlar cuánto crecen las células y cuándo se dividen (**Figura 4A**). Consta de cuatro etapas: G1, S, G2 y M. En las dos fases G (gap) se produce crecimiento celular y hay incremento en la síntesis de RNA y proteína. Durante la fase S (síntesis) se replica el DNA, por lo que es fácil diferenciar entre las fases G1 y G2 ya que esta última tiene doble dotación genética y que se producen los cambios necesarios en el citoesqueleto para preparar la división en dos células hijas. En la fase M se produce finalmente la mitosis (Cooper 2000). El ciclo celular requiere de complejos mecanismos de transducción de señales como ciclinas, quinasas dependientes de ciclina, factores de transcripción, hormonas como auxinas, citoquininas, etc... para su control (Morgan 1997). El organismo modelo eucariótico de estudio del ciclo celular es *Saccharomyces pombe*.

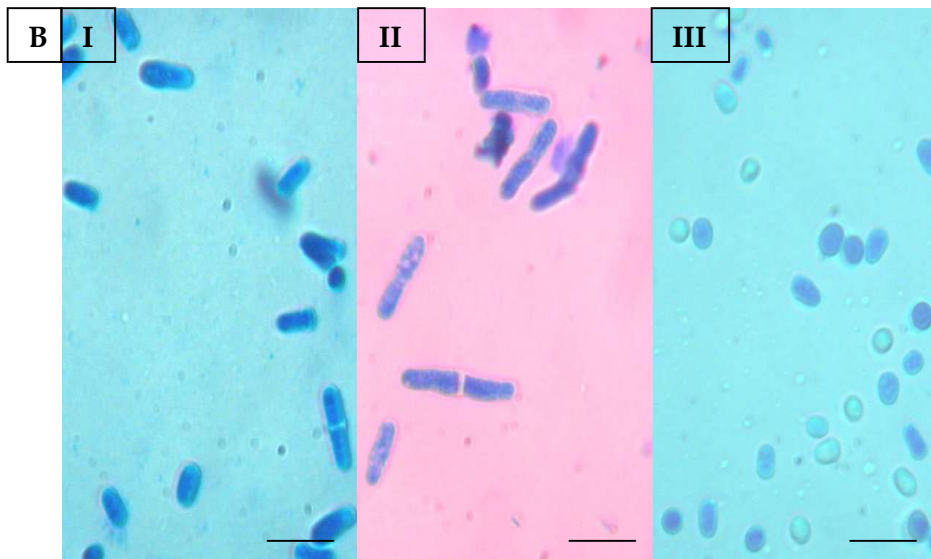
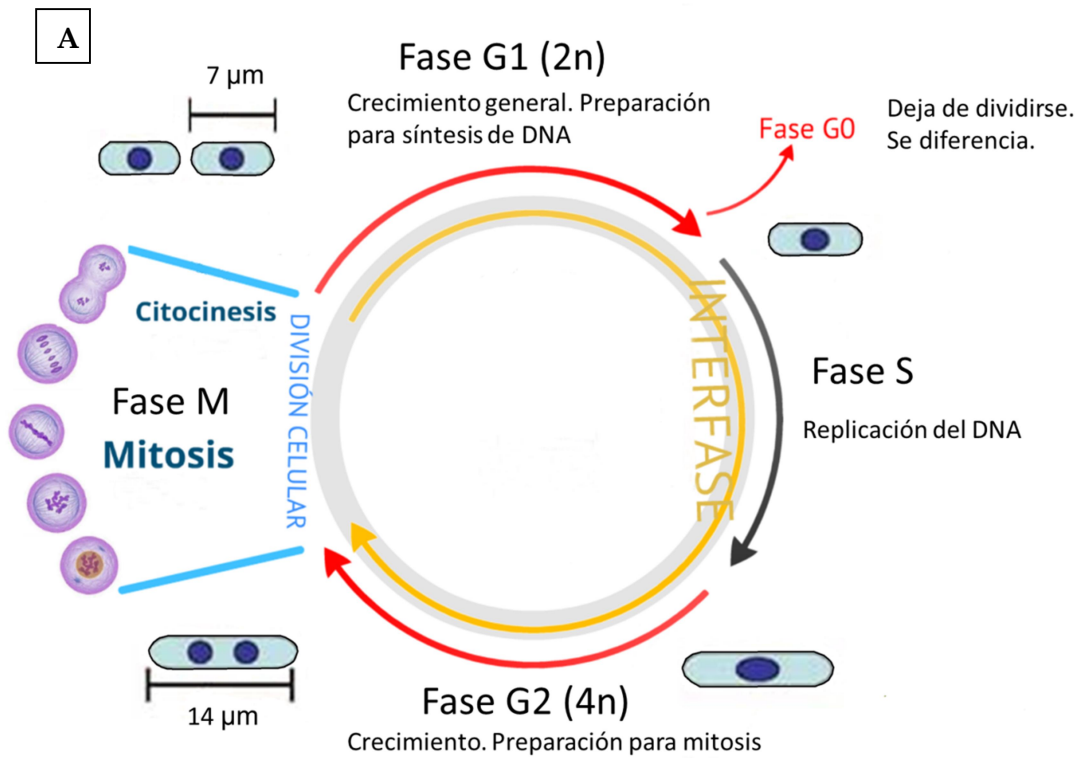


Figura 4: Fases del ciclo celular. Arriba) Esquema de las diferentes fases del ciclo celular mostrando el tamaño celular y la carga genética durante la interfase con dos periodos de crecimiento, G1 y G2, y un periodo en el que el DNA se replica, S. En la mitosis se originan dos células iguales tras la citocinesis y de nuevo comienza el ciclo celular. La célula puede salir del ciclo, G0, y diferenciarse. Abajo) Diferentes fenotipos celulares de *S. pombe* (coloración con el azul de metileno, x 600) (I) *Wild-type*, (II) mutante *cdc2-33* cultivados a 37°C, (III) mutante *cdc2-3wee*. La barra indica 10µm.

Las mutaciones que retrasan o impiden la división, alargan el ciclo celular y eso se traduce en un tamaño de las células más grande que el WT (**Figura 4BI**). Es lo que pasa con las mutaciones que afectan el gene *cdc2* (*cell division cycle*) tal como *cdc2-33* (**Figura 4BII**), el cuál bloquea la señal de la transición G2-M, es decir, la entrada en mitosis. Esta mutación se expresa a una temperatura mayor de 35°C, creciendo hasta un tamaño superior de 14 µm sin dividirse. A la inversa, las mutaciones que aceleran el ciclo y que conducen a una división precoz, resultan en un tamaño celular reducido. Otra mutación del gene *cdc2*, llamada *cdc2-3wee* (**Figura 4BIII**), provoca una división celular precoz y un tamaño más pequeño que el WT (fenotipo *wee* : pequeño en escocés) (Kellogg 2003).

Definimos la competencia meristemática de la célula como su capacidad de proliferar en respuesta a una señal de crecimiento sin sufrir diferenciación (Heidstra & Sabatini 2014). Debe considerarse que el concepto de crecimiento celular se refiere exclusivamente al que se asocia con el incremento en la proteína celular (concepto que debe ser diferenciado del de elongación celular, que normalmente se debe a la aparición de vacuolas y se asocia a la diferenciación celular), mientras que la proliferación celular es más evidente y se refiere a la división celular. Según (Mizukami 2001), la competencia meristemática impone que la división celular esté íntimamente coordinada con el crecimiento celular, y por tanto, con la síntesis de proteínas y con la biogénesis de ribosomas. Esta competencia meristemática es esencial para un correcto desarrollo de la planta dirigido por los promotores de crecimiento que marcan las condiciones ambientales (Laurenzio et al 1996). Si los promotores de crecimiento se activan, provocan el crecimiento y la división celular, mientras que se mantenga la competencia meristemática. Los mismos estímulos en la zona de elongación pueden reprimir esos promotores por lo que crecimiento y división se inhiben y la célula se diferenciará. Aunque es variable en el tiempo, la zona meristemática se limita a la distancia entre 300 y 700 µm a partir de la punta de la raíz (Beemster & Baskin 1998). El crecimiento de la raíz se debe más al incremento en el número de células que a la elongación de las mismas (Scheres et al 2002).

3.1 Percepción de la señal: captación de los estímulos proliferativos

Los principales estímulos que configuran el crecimiento y la proliferación celular en el meristemo son la gravedad y la luz (Figura 5).

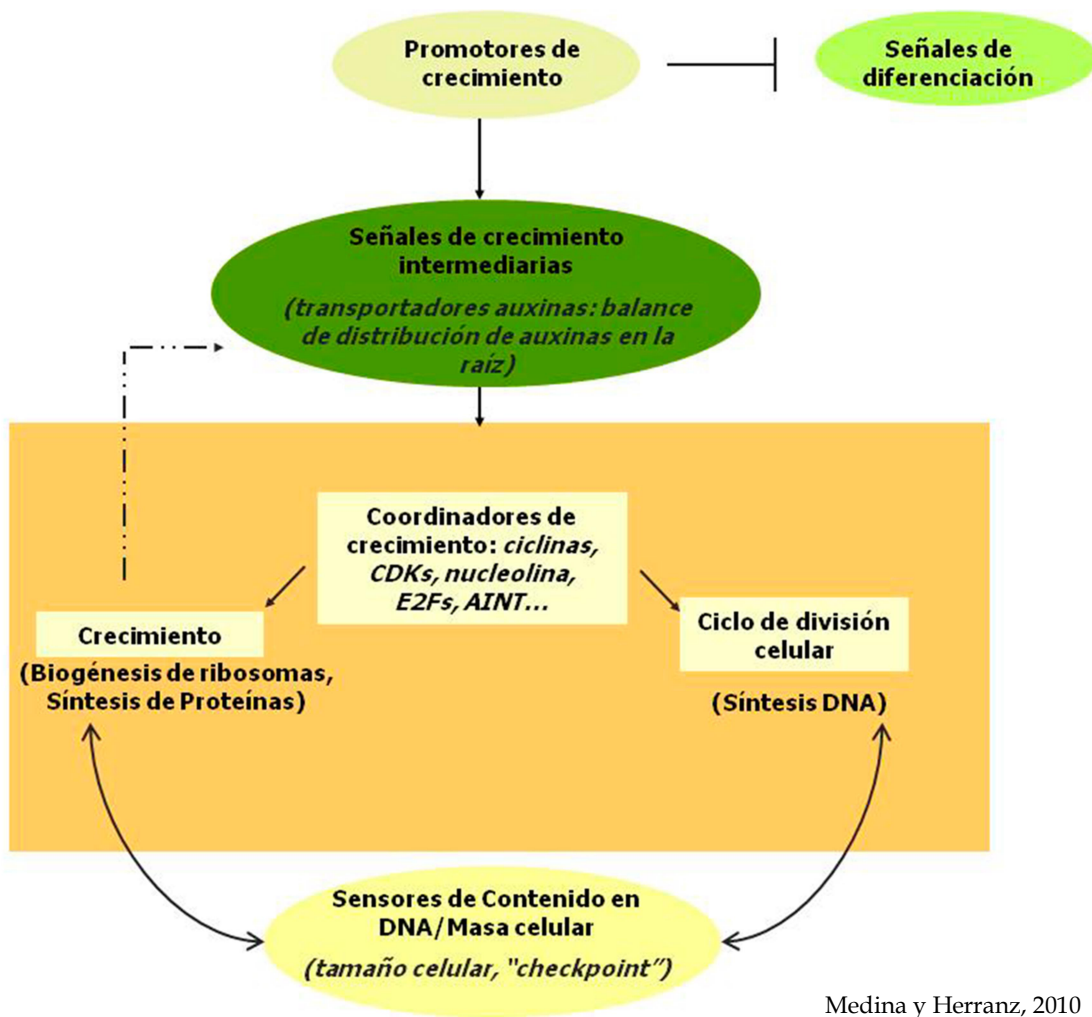


Figura 5: Esquema de relación entre crecimiento celular (síntesis de proteínas, biogénesis de ribosomas) y proliferación celular (ciclo celular, replicación del DNA, división celular) en condiciones fisiológicas de competencia meristemática. Ambos procesos están regulados por las mismas señales o estímulos a nivel de órgano.

3.1.1 Captación del estímulo lumínico

Las plantas utilizan varios tipos de fotorreceptores para medir la cantidad y la duración de la luz, así como su calidad y su dirección (Franklin et al 2005). En *Arabidopsis* hay cinco fitocromos (phyA-phyE) para captar luz roja (R, 600-700nm)/rojo lejano (RL, 700-800nm); tres criptocromos (cry1-cry3) y dos fototropinas (phot1-phot2) para la luz UV/azul (UV-A, 315-400nm) (**Figura 6A**) (Nagatani 2010). Aunque la luz R activa los fitocromos y la RL los inactiva, la luz UV-A también puede activar a los fitocromos PHYA y PHYB (Kami et al 2010). Los fitocromos tienen dos conformaciones (**Figura 6B**), una forma inactiva (Pr) que absorbe luz R, y otra activa (Pfr) que absorbe luz RL. La luz permite la conversión reversible de una forma a la otra. También se puede revertir de la forma activa a la forma inactiva en la oscuridad (Ballaré et al 1990). Las formas activas de los fitocromos A, B y D son homodímeros, mientras que el resto forman heterodímeros (Hofmann 2009) y tienen dos dominios (**Figura 6C**):

- N-terminal: tiene cuatro subdominios entre los que está el fitocromo (PHY); el de unión al cromóforo (molécula que absorbe luz) o GAF y otro regulador de la actividad espectroscópica PAS, junto la última parte del dominio NT (Rockwell & Lagarias 2006).
- C-terminal: tiene tres subdominios con capacidad reguladora para dimerización y translocación al núcleo (Rockwell et al 2006).

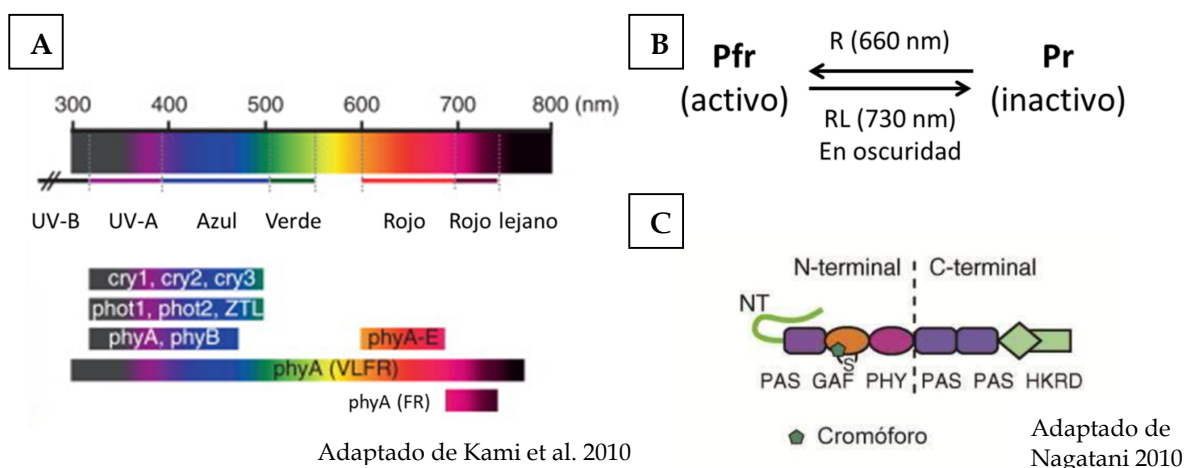


Figura 6: Funcionalidad de los fotorreceptores en plantas. A) Espectro efectivo de fotorreceptores para su activación o inactivación. Criptocromos (cry) y fototropinas (phot) se activan con rangos de luz azul. PhyA absorbe todo el espectro pero especialmente el rojo lejano, mientras que el resto de fitocromos están especializados en captar luz roja cercana. B) Esquema de los cambios conformacionales de los fitocromos entre su forma activa (Pfr) e inactiva (Pr) dependiendo del espectro lumínico que estén absorbiendo (rojo (R) o rojo lejano (RL)). C) Estructura típica de un fitocromo de planta con su dominio de captación del estímulo en la zona N-terminal y su dominio de regulación y translocación en la zona C-terminal. NT: dominio N-terminal; PAS: dominio de Per-Arnt-Sim; GAF: dominio Fhl-adenilil-ciclasa-GMP-fosfodiesterasa; PHY: fitocromo; HKRD: dominio rico en histidina.

La señal que reciben los fitocromos se integra para responder a estímulos ambientales (Austin & Ballaré 2014). Por ejemplo, la relación R/RL normalmente es próxima a 1 en un entorno bien iluminado, pero se reduce si hay otras plantas alrededor porque los tejidos verdes absorben R, a la vez que emiten RL (de Wit et al 2013). Con esa información, la planta detecta la presencia de competidoras y responde en consecuencia, por ejemplo dando prioridad a la elongación de los tallos para que sus hojas sobrepasen a las de sus vecinas. Este proceso se llama "evitación constitutiva de la sombra" y está relacionado con una reducción del tamaño de las hojas, la cantidad de clorofila y el adelanto de la floración (Bongers et al 2014). El principal fotorreceptor en este proceso es el fitocromo PHYB, que capta la luz roja (Trupkin et al 2014). La función de PHYA es inhibir la elongación del hipocotilo en tiempos prolongados de rojo lejano. En cuanto a la germinación, PHYA induce la germinación como respuesta a bajos flujos de luz (Shinomura et al 1994) y PHYB y PHYE con RL (Hennig et al 2002). PHYA es el principal fotorreceptor para la desetiación bajo RL prolongado (Franklin et al 2007), lo que permite a las plantas desetiarse cuando están bajo otra planta a la que no pueden sobrepasar (por ejemplo lo que les sucede a las plantas herbáceas en un bosque). En cambio, PHYB desencadena la desetiación de la planta como respuesta a luz roja. PHYC, PHYD y PHYE interaccionan con PHYB en dicha respuesta (Franklin & Quail 2010). Los fitocromos inactivos (Pr) en ausencia de luz, se translocan al núcleo de forma luz-dependiente (Pfr) para actuar como factores de transcripción indirectos (Nagy et al 2001).

En el fototropismo también actúan criptocromos (Chentao 2002a) y fototropinas. Los criptocromos son fotorreceptores de luz azul (Hoang et al 2008) sin actividad quinasa que regulan actividades fotomorfológicas como por ejemplo la germinación, la desetiación, los ritmos circadianos o la conversión de oxígeno en peroxidasa con un papel fisiológico (Consentino et al 2015). Las fototropinas también se activan con fotones azules para inducir fototropismos como el movimiento de los cloroplastos o la apertura de estomas (Chentao 2002b). Las fototropinas son las primeras en captar la dirección de la luz ya continuación, son fitocromos y criptocromos quienes modulan el crecimiento asimétrico del hipocotilo (Goyal et al 2013).

3.1.2 Captación del estímulo gravitatorio

Está establecido que la gravedad se detecta por los estatocitos, las células “profesionales” que regulan el gravitropismo. Existen dos hipótesis que explican los mecanismos por los que estas células son capaces de detectar la señal de la gravedad, la hipótesis de almidón-estatolito que deriva de estudios con mutantes de almidón con una reducida respuesta gravitrópica (Weise & Kiss 1999) y la hipótesis de presión-protoplasto (Baldwin et al 2013). Según la primera, los cambios de orientación de la planta provocarían la acumulación de energía potencial en los amiloplastos, y esa energía se transmitiría a la membrana plasmática debido al cambio de posición de los estatolitos (Wolverton et al 2011). El estímulo se transmite al resto de la planta por la vía de señalización de auxinas (Firn et al 2000, Simmons et al 1995). La otra hipótesis, la de presión-protoplasto, tiene en cuenta no sólo las variaciones en la distribución de los amiloplastos, sino toda la tensión acumulada sobre la membrana plasmática (Wayne et al 1990). Un argumento importante en favor de esta segunda hipótesis es la existencia de respuestas gravitrópicas en cultivos celulares cuyos amiloplastos carecen de almidón, pudiendo considerar esta respuesta como un mecanismo de detección de la gravedad "no profesional".

3.2 Transducción de la señal: regulación hormonal

Las hormonas vegetales o fitohormonas, son sustancias que modifican el crecimiento y desarrollo de la planta. Se caracterizan por ser sintetizadas en dosis muy bajas y en células (a diferencia de otros filos que lo hacen en glándulas u órganos especializados). Pueden actuar en los mismos tejidos donde son sintetizados o requerir de transporte por tejidos vasculares para que hagan su efecto. Hay seis grupos principales (auxinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico (ABA), giberelinas y ácido jasmónico) aunque existen otros reguladores como los salicilatos u oxilipinas y pueden actuar de forma sinérgica o tener efectos antagónicos. Una vez que llegan al órgano/célula efectora, el modo de acción es de recepción del estímulo, amplificación de la señal, traducción de la señal y generación de la respuesta (Vanstraelen & Benkova 2012).

La auxina es el nombre genérico de un grupo de fitohormonas que tienen la propiedad de inducir respuestas de crecimiento en la planta. La forma predominante en plantas es el ácido 3-indolacético (IAA) implicada en desarrollo embrionario, postembrionario, tropismos relacionados con la luz y la gravedad, división celular, elongación y diferenciación celular, aunque existen otras auxinas sintéticas como 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) o el 1-ácido naftalenoacético (1-NAA). La síntesis de auxina tiene lugar en los meristemas, especialmente en el apical de la parte aérea y como la síntesis de la hormona en el radicular es insuficiente, tiene que producirse un transporte por el tallo (Ljung et al 2005). Ese transporte de auxina desde su principal punto de síntesis hasta la raíz es basipétalo por todo el tallo, acropétalo por todo el cilindro central de la raíz, y una vez alcanza la columela, dónde se observa una acumulación, vuelve a ser basipétalo a través de las capas meristemáticas, hasta que la señal se va diluyendo por la zona de elongación o se reabsorbe por el córtex (Band et al 2014, Lewis et al 2007, Moore 2002) (**Figura 7A**).

La estimulación de fitocromos activa factores de transcripción que movilizan auxina para coordinar cambios en el crecimiento celular en la zona meristemática de la raíz (Shin et al 2010). Por otra parte, la detección de la gravedad llevada a cabo por los órganos sensoriales en la raíz, alteran la auxina para conseguir cambios en el crecimiento y también en la proliferación celular (Leyser 1999). Es decir, tras percibir el estímulo, el mensaje se comunica a las células de la zona de elongación y provocan una diferencia de crecimiento para que ocurra la curvatura de la raíz (**Figura 7B**). Sin éste órgano, como ocurre en cultivos celulares vegetales, actúan otros mecanismos de células "no profesionales" de la que hasta el momento se desconocen los mediadores (Moustafa 2014).

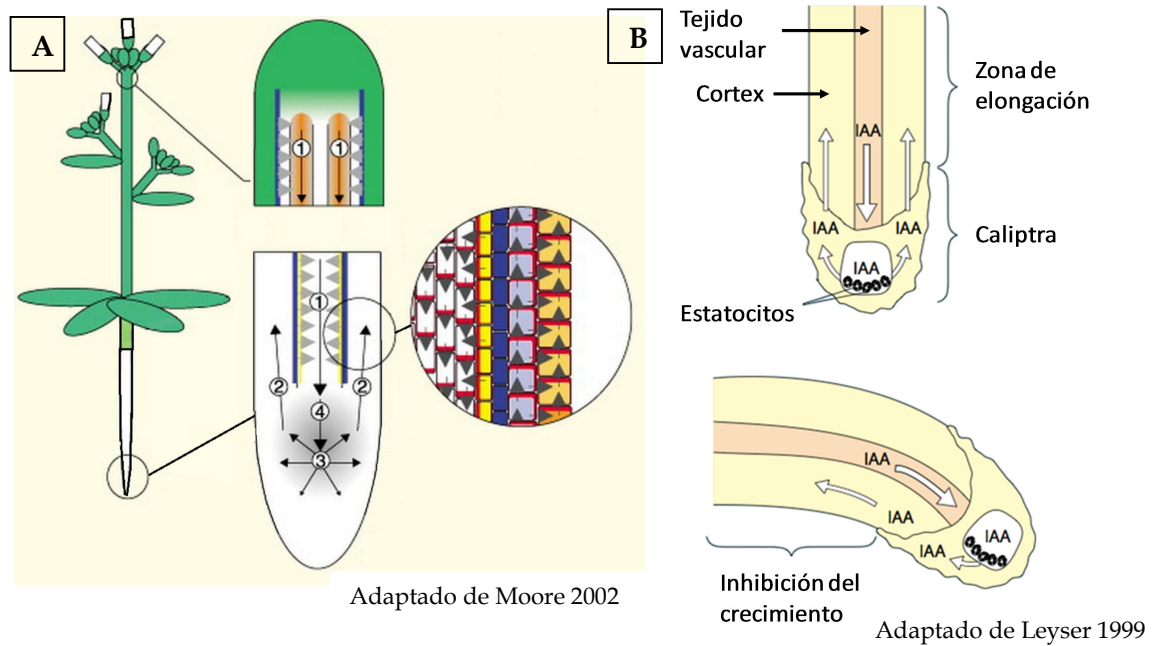


Figura 7: Transporte de la auxina. A) A la izquierda esquema de *Arabidopsis thaliana*. En el centro, esquema transporte de auxina desde que se sintetiza en los meristemas apicales y hojas incipientes (arriba) hasta la punta de la raíz (abajo), pasando por un transporte vascular por tallo y raíz. Los números indican el tipo de proteína PIN responsable del transporte en las diferentes zonas de la planta. En el meristemo el transporte acropétalo, vuelve a ser basipétalo por PIN2. Las flechas negras indican el flujo de auxina. A la derecha se muestra una ampliación del transporte de auxina en la zona del meristemo, en la que es acropétalo en la futura zona vascular (blanco) y basipétalo en las capas corticales (rizodermis en naranja, córtex en morado, endodermis en azul y periciclo en amarillo). Las flechas grises indican el eflujo de auxina en cada célula.

B) Esquema del transporte de auxina una vez llega la auxina a la punta de la raíz. En condiciones normales (arriba), el transporte basipétalo en la raíz es homogéneo, pero en caso de alterar su orientación (gravedad) o ser iluminada (luz), la distribución de auxina se modifica y en la zona con altas concentraciones se inhibe el crecimiento celular mientras que no lo hace por el otro lado.

Entre las funciones de la auxina está la de favorecer la división celular o el desarrollo en longitud, pero por encima de cierta concentración ejerce el efecto contrario porque estimula la síntesis de etileno (que inhibe el crecimiento y hasta causa la caída de las hojas). Aunque la raíz responde con una concentración menor de auxina que las yemas o tallos, la diferencia es que la acumulación de auxina inhibe elongación celular mientras que en los tallos es al revés. Esto también se aprecia en plantas etioladas, que tiene concentraciones de auxina en el meristemo apical mayores que las de las de-etioladas (Tepperman et al 2004). El efecto de la auxina es fácil de observar tras reorientar la posición de la raíz, en el que la planta reconoce su posición y el crecimiento de la raíz a partir de ese momento será acorde a su nueva posición.

El transporte de la auxina se realiza principalmente vía floema (vía rápida) hasta llegar a la zona del meristemo radicular donde los tejidos vasculares desaparecen. A partir de ese punto, el transporte acropétalo es célula a célula hasta el centro quiescente y también lo es el transporte basipétalo, desde el centro quiescente por las capas celulares más externas, hasta un punto en el que retorna al floema. El transporte célula-célula de la raíz puede ser por difusión si la auxina está protonada (IAAH) o con transportadores y de forma activa si está desprotonada (IAA⁻). Esta forma activa es más rápida (hasta un centímetro por hora) que la difusión y se la denomina transporte polar de auxina porque depende de la posición y localización de los transportadores de influjo y eflujo celular situados en la membrana plasmática (Swarup et al 2001) que será clave en gravitropismo. AUX es una proteína de transmembrana de influjo celular que cotransporta IAA⁻ junto dos protones. AUX1 se localiza en las células por todo el trayecto, tanto para el transporte basipétalo como acropétalo y se encuentra en las mismas células que PIN2 y PIN3 (Friml 2003). El pH citosólico se mantiene neutro por las diversas bombas que exportan los protones a la pared celular y por eso dentro de la célula, la forma aniónica es la más habitual. El eflujo celular de auxina se realiza con proteínas de transmembrana de la familia PIN. Existen 8 PIN y muestran una distribución asimétrica en la planta y en la membrana plasmática. PIN2 (también llamado EIR1 - *ethylene insensitive root 1*) se ocupa del transporte basipétalo en la raíz (Luschnig et al 1998) porque se encuentra en las tres capas con competencia meristemática (Müller et al 1998). Las proteínas PIN son muy poco eficientes y requieren la ayuda sinérgica de ABCB (ATP *binding cassette* con glicoproteína P de clase B) como PGP- *phosphoglycolate phosphatase* (Mravec et al 2008). La regulación del transporte polar puede ser mediante estos, otros inhibidores o mediante PINOID (con actividad quinasa) que controla la polaridad del PIN y su actividad por vesículas endosómicas, secuestrando PIN de la membrana plasmática (Haga et al 2014).

Un punto en común entre la respuesta a fototropismo y a gravitropismo es que, aunque los componentes no se conocen con exactitud el calcio debe de estar implicado. Bajo luz azul, PHOT1 provoca un rápido incremento de calcio citosólico (Baum et al 1999), aunque este no sea estrictamente necesario para el fototropismo (Folta et al 2003). En las células de la columela de la raíz, el núcleo se encuentra en la parte apical y los estatolitos en la basal a 1g. Si el vector cambia, los estatolitos se desplazan moviendo con ellos los filamentos de actina y estos a su vez activan los canales de

calcio dependientes de calmodulina (Leitz et al 2009, Toyota & Gilroy 2013). Los cationes, que ahora están libres, cambian el pH del citoplasma, lo que altera la distribución y el gradiente de auxina en la raíz (Monshausen et al 2011).

Una diferencia entre los gradientes de auxina producidos por la luz o por la gravedad se observó en los coleoptilos de maíz (Iino 1995). La redistribución de la auxina debido a gravedad ocurre a lo largo de todo el coleoptilo, mientras que si es por la luz ocurre solo en la punta del mismo. Se desconocen los intermediarios que hacen posible esa diferencia. Se ha visto que la luz azul lateral provoca la acumulación en la zona de sombra de auxina (Pickard & Thimann 1964). PIN3 interviene en el fototropismo aunque su relación con la luz azul es incierta (Blakeslee et al 2004). Lo que si es más seguro, es que la luz puede relocalizar PIN1. Al haber menos PIN1 en la parte basal de las células del hipocotilo, se reduciría el transporte polar y se aumentaría el fototropismo al aumentar la cantidad de auxina disponible en el transporte lateral (Noh et al 2003).

A nivel molecular, la auxina desencadena una cascada de expresión regulada por ARF (*Auxin Response Factor*), factores transcripcionales positivos, y por AUX/IAA, negativos (Wang et al 2013). El receptor proteico de auxina más estudiado es un complejo de ubiquitinación SCF que contiene una caja TIR1 - *transport inhibitor response* (dominio intermediario en las interacciones proteína-proteína). Este complejo degrada la proteína AUX/IAA, proteína que estaba inhibiendo a ARF (Calderón Villalobos et al 2012). Es decir, en ausencia de auxina, ARF está secuestrado por AUX/IAA, pero en su presencia SCF degrada AUX/IAA vía proteasoma, dejando libre ARF permitiendo la expresión de genes que contengan promotores con AuxRE (*Auxin Responsive Element*) (Liscum & Reed 2002). Existen varios ARF y AUX/IAA que dependen del tipo de respuesta del desarrollo de la planta. Entre los genes inducidos por auxinas, están otros factores de transcripción que a su vez regulan la propia síntesis de auxina y a sus propios reguladores (Shimizu-Mitao & Kakimoto 2014) (**Figura 8**).

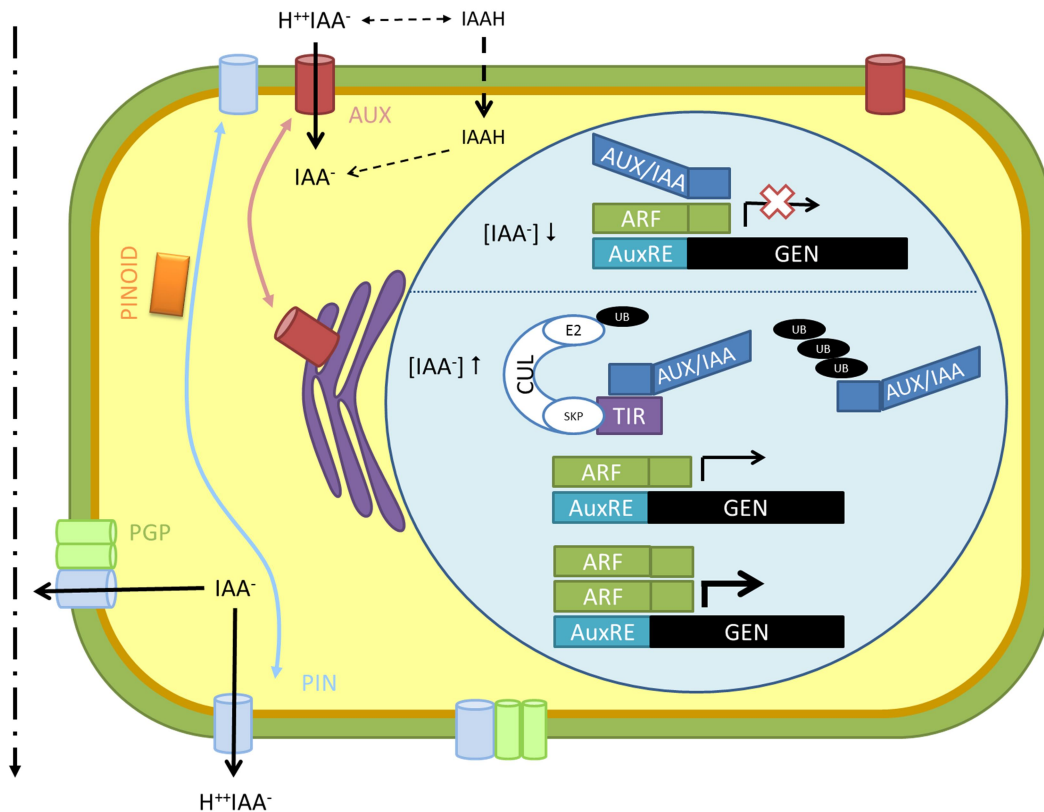


Figura 8: Transporte celular de auxina. Esquema de una célula donde entra auxina cargada negativamente mediante transportadores de transmembrana llamados AUX (rojo), mientras que la auxina no cargada lo puede hacer directamente por difusión. El pH citoplásmico hace que la mayor parte de la auxina se desprotona. La salida de auxina se hace mediante otras proteínas de transmembrana llamados PIN (azul) con la colaboración o no de PGP – fosfoglicolato fosfatasa (verde). Para la regulación de auxina, son las proteínas de transporte las que alteran su distribución. AUX se recoge en el retículo endoplasmático, mientras que la polarización de PIN es controlada por PINOID (naranja), además de poder quedarse en vesículas citosólicas. La flecha de la izquierda indica la dirección global del transporte de auxina polarizada. En las células del meristemo donde la auxina hace su efecto, su concentración determina la expresión de genes con promotor dependiente de auxina (AuxRE). Estos genes están reprimidos por la proteína AUX/IAA, pero cuando aumenta la concentración de la auxina, esta se une a TIR (morado) en el núcleo, que ubiquitina a AUX/IAA para su degradación por la ruta del proteosoma, de manera que los complejos de transcripción, ARF, se pueden unir al promotor del gen. Si además ARF dimeriza, la expresión de dicho gen es mayor.

3.2.1 Regulación de la proliferación celular

El ciclo celular se regula en tres puntos de control (del inglés *check points*) localizados en las transiciones G1/S, G2/M y en la propia mitosis (**Figura 9A**). Estos puntos se caracterizan por la asociación de complejos proteicos ciclinas/CDK específicos que controlan la transducción de señales que hace progresar las distintas fases del ciclo. Existe medio centenar de ciclinas en *Arabidopsis*, agrupados en 8 clases (A, B, C, D, H, L, P y T) y se caracterizan por un tamaño próximo alrededor de 100 aminoácidos y una caja de destrucción susceptible de ubiquinación que controla su expresión durante el

ciclo celular. Las ciclinas A aparecen al comenzar la fase S, las B en el *check point* G2/M y las ciclinas D, que dependen de señales extracelulares, son importantes en ambos *check points* (Komaki & Sugimoto 2012).

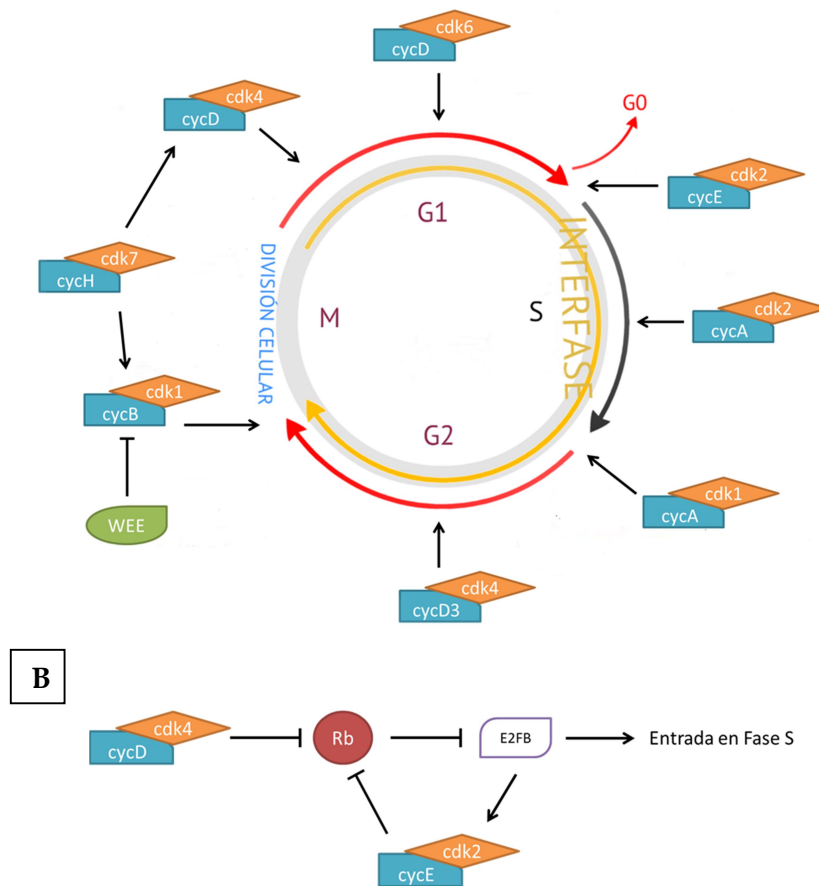


Figura 9: Regulación del ciclo celular. A) esquema con las diferentes quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las ciclinas (CYC) de las que dependen en los diferentes puntos del ciclo celular. B) Acción llevada a cabo por las diferentes CDK y CYC durante el *check point* de G1/S para que continúe el ciclo celular a la fase de duplicación del material genético (S). Rb: Retinoblastoma.

Las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) tienen una región catalítica con un sitio de unión a ciclina y otro sitio de unión para el ATP y el sustrato a fosforilar (Joubès et al 2000). Se agrupan en seis clases siendo CDKA y CDKB, dos de las quinasas con actividad más destacada en la regulación de las transiciones. Entre las actividades de las CDKs se encuentran la fosforilación de histonas 1 de cromosomas mitóticos, la de componentes del citoesqueleto y del retinoblastoma o la destrucción de componentes de etapas previas marcándolos para la vía de la ubiquitinación, todas ellas funciones imprescindibles para la progresión del ciclo celular (Breuer et al 2010).

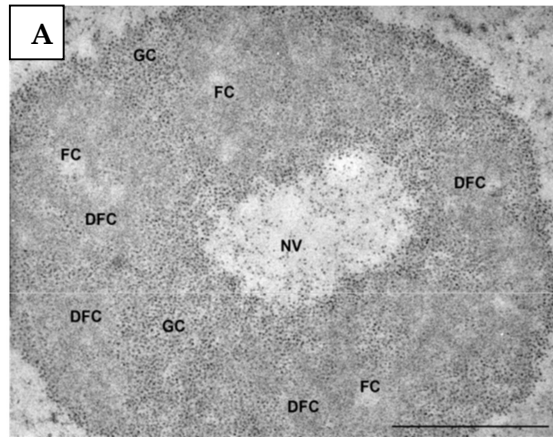
Si las condiciones de crecimiento son óptimas, auxinas, azúcares y citoquininas inducen la síntesis de ciclinas tipo D que se unirá a la CDK correspondiente para estimular la división celular (Boruc et al 2010). Esta regulación del *check point* G1/S cursa con la destrucción de proteínas inhibitoras de retinoblastoma (**Figura 9B**), iniciándose la expresión de los factores de transcripción necesarios en la fase S como E2FB (Hirschi et al 2010). En condiciones desfavorables, se inactiva el complejo CDK-ciclina y no progresa el ciclo celular. En la transición G2/M, los complejos CDK-ciclina permanecen inhibidos si se activan factores de respuesta a daños de DNA o ante situaciones de estrés, y el progreso del ciclo celular progresa cuando todas esas señales desaparecen (Komaki & Sugimoto 2012).

La caseína quinasa 2 (CK2) es uno de los candidatos a conectar los diferentes procesos de detección y transducción de las señales proliferantes con algún proceso fisiológico y celular, como el transporte polar de auxina, la biogénesis de ribosomas y el ciclo celular (Litchfield 2003). CK2 es un heterotetrámero con dos subunidades alfa (con cuatro variantes CKA1-4) que tienen función catalítica quinasa y dos beta con funciones reguladoras (Raaf et al 2008). Tiene actividad serin/treonina quinasa independiente porque su actividad no depende de otras moléculas, como suele ocurrir con otras proteínas con actividad quinasa como podrían ser ciclinas, lípidos o calcio (Tuazon & Traugh 1991). Por lo general, los niveles de CK2 corresponden con el ratio de proliferación, es decir, células con alta tasa de proliferación presentan unos niveles altos de CK2 (Munstermann et al 1990). Se ha detectado CK2 en citoplasma y principalmente en el núcleo (Krek et al 1992), tanto en plasma como asociado con estructuras (tubulina) como a orgánulos (Faust et al 1999, Sarrouilhe et al 1998). CK2 es la única quinasa que además de ATP también puede aceptar GTP como donador del grupo fosfato (Niefind K et al 1999). CK2 es esencial para que el ciclo celular pueda progresar, pasar los *check-points* y entrar en mitosis, de hecho, la proteína homóloga en mamíferos se produce en grandes cantidades en tumores de riñón, mama, cabeza, pulmón o próstata (Daya-Makin et al 1994, Landesman-Bollag et al 2001). La nucleolina, es sustrato de CK2 (Schneider et al 1986) y además, la actividad de CK2 aumenta con el crecimiento celular, al igual que el grado de fosforilación de la nucleolina, que es máximo con los niveles máximos de CK2 y viceversa (Schneider & Issinger 1989)

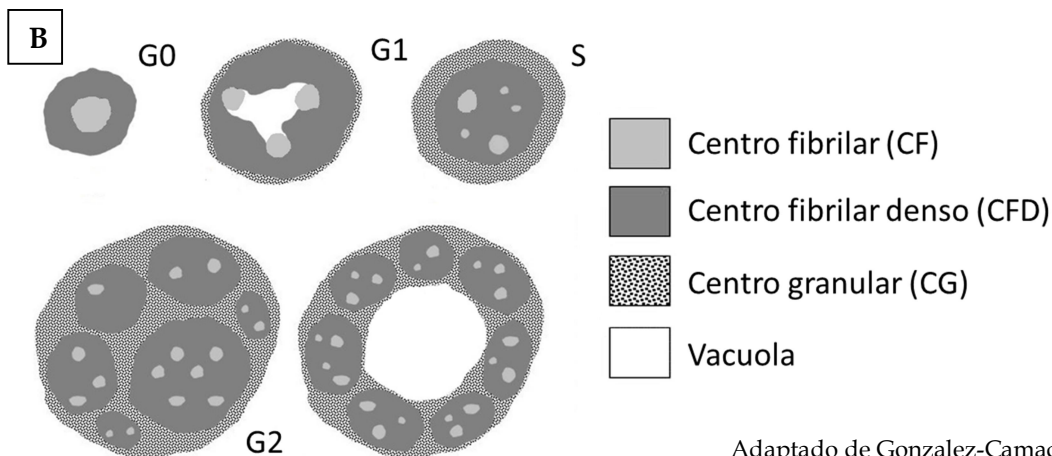
3.3 Respuesta celular: Crecimiento y proliferación celular

El crecimiento y la proliferación celular requieren gran cantidad de proteínas para las distintas funciones celulares. Los ribosomas son las estructuras donde se sintetizan las proteínas, por lo que la tasa de producción de ribosomas está directamente relacionada con la regulación de la proliferación y el crecimiento celular (George 2000). En el nucleolo se producen todas las fases de la biogénesis de ribosomas, excepto la síntesis de RNAr 5S y del ensamblaje final de las subunidades (Lempiainen & Shore 2009). El nucleolo es una estructura supra-molecular sin membrana delimitante, única o múltiple, situado en el interior del núcleo y formada, a diferencia de la cromatina, por ácidos ribonucleicos y proteínas. El preRNAr, o RNA ribosómico precursor, se encuentra repetido cientos de veces en tándem y agrupados en el genoma en posiciones fijas de cromosomas bajo un organizador nucleolar (NOR) que es fácil de visualizar en preparaciones microscópicas electrónicas (Raska et al 2006). El nucleolo se organiza de dentro afuera según las sucesivas etapas de síntesis de ribosomas (**Figura 10A**). En el centro se encuentran los centros fibrilares (CF) que acumulan RNAr y ensamblaje de complejos de transcripción. Entre los CF y el componente fibrilar denso (CFD) se transcribe el preRNAr (Medina et al 2010). Llegando a la periferia del nucleolo se encuentra el componente granular (CG) donde termina de madurar el preRNAr y se ensambla las subunidades del ribosoma antes de ser exportadas al citoplasma para formar los ribosomas maduros. Esta organización de CF rodeados de CFD se puede encontrar más de una vez en el mismo nucleolo si las necesidades de síntesis proteicas son mayores. La etapa del ciclo celular en la que se encuentra la célula condiciona la estructura, la morfología y la actividad del nucleolo (Gonzalez-Camacho & Medina 2006) (**Figura 10B**).

- G1: nucleolo pequeño, escasos CF, abundante CFD, actividad moderada.
- G2: gran nucleolo, múltiples y pequeños CF, abundante CG, actividad alta.
- G2/M: desaparece el nucleolo, inactivación de complejos macromoleculares.



De Pontvianne et al., 2007



Adaptado de Gonzalez-Camacho, 2006

Figura 10: Organización nucleolar. A) Foto de un nucleolo de una célula meristemática de raíz de *Arabidopsis* observada al microscopio electrónico. Se observan los subcomponentes nucleolares: centros fibrilares (FC), rodeado de componentes fibrilares densos (CDF), contenido a su vez en componente granular (GC) y vacuola nucleolar (NV). La barra representa 1 μ m. B) Diferentes distribuciones de los componentes del nucleolo en las diferentes fases del ciclo celular.

Muchas proteínas regulan la biogénesis de ribosomas y después no forman parte del ribosoma maduro, son las proteínas nucleolares (Olson et al 2002), como la nucleolina y la fibrilarina. El patrón de desarrollo de la planta, el estado proliferativo de la célula (Gonzalez-Camacho & Medina 2004) y el ciclo celular condicionan la expresión génica de estas proteínas que se pueden utilizar como marcadores nucleolares asociados al crecimiento celular (Petricka & Nelson 2007).

La nucleolina es la proteína nucleolar más abundante en células proliferantes, altamente conservada en animales, levaduras y plantas y está implicada en el procesamiento del RNAr (Medina et al 2010). Pese a que lo habitual es encontrar sólo un gen de nucleolina, las plantas poseen al menos dos (*NUC-L1* y *NUC-L2*) con variación en su secuencia de aminoácidos (Saez-Vasquez et al 2004). *NUC-L2* está

silenciado en la mayoría de los tejidos en condiciones normales aunque tenga una expresión basal, y sólo se activa cuando NUC-L1 está dañado (línea mutante) o la planta se encuentra en una situación de estrés (Pontvianne et al 2007). La nucleolina posee tres dominios funcionales (Ginisty et al 1999):

- N-terminal: secuencia de aminoácidos ácidos separadas por básicos en número variable según especie. Contiene varios lugares de fosforilación por la CDKA y CK2 (Caizergues-Ferrer et al 1987). Esta región interacciona con factores de control de la transcripción de DNAr (Roger et al 2003).
- Región central: es un motivo de reconocimiento de RNA (RBD). Unión específica a RNA tanto por reconocimiento de RNA como en la afinidad por las secuencias de pre-RNAr (Serin et al 1996). Este dominio RBD está duplicado en plantas (en animales hay cuatro copias en tándem).
- C-terminal: dominio GAR (región rica en glicina y arginina). Está muy conservado entre especies, pero NUC-L2 presenta menor grado de homología con la propia NUC-L1 o cualquier otra nucleolina existente en otra especie (Pontvianne et al 2007). Interacciona con múltiples proteínas ribosómicas o a RNA de forma inespecífica y con baja afinidad (Bouvet et al 1998, Ghisolfi et al 1992).

Los niveles de nucleolina en G1 son mínimos, aumentan durante S y son máximos en G2, justo antes de la mitosis, a la par que la mayor tasa de producción de ribosomas (Medina et al 2010). La expresión de nucleolina es máxima en células meristemáticas de la raíz y más reducida en células diferenciadas. Su actividad se regula con modificaciones postraduccionales como fosforilaciones (Gonzalez-Camacho & Medina 2004, Morimoto et al 2002), dimetilaciones (Lapeyre et al 1986), glicosilaciones (Carpentier et al 2005b) o ADP-ribosilaciones (Leitinger & Wesierska-Gadek 1993). La nucleolina además, puede sufrir una degradación proteolítica (Gonzalez-Camacho & Medina 2006). Dentro del nucléolo, la nucleolina es especialmente abundante en el componente fibrilar denso, alrededor de los centros fibrilares (González-Camacho & Medina 2005, Pontvianne et al 2010, Pontvianne et al 2007).

Otra proteína nucleolar es la fibrilarina. Tiene 34-28KDa y al igual que la nucleolina, su estructura y función está muy conservada en eucariotas (Reichow et al 2007). Pose dos dominios:

- Motivo de reconocimiento de RNA (RBD): consta de dos secuencias conservadas, RNP1 y RNP2 (Aris & Blobel 1991), implicadas en procesamiento del pre-RNAr con metilación y ensamblaje ribosómico (Tollervey et al 1993).
- Dominio GAR: responsable de la exportación de la proteína al nucleolo (Pih et al 2000) y de otras interacción con proteínas, nucleocápsidas de virus incluidas (Taliensky et al 2010)

La fibrilarina se localiza en el componente fibrilar denso (Ochs et al 1985), pero también en los cuerpos de Cajal, suborgánulos nucleares dónde se puede producir la transcripción del RNA, el splicing del mRNA o la biogénesis de las pequeñas proteínas ribonucleares (snoRNP) (Snaar et al 2000). La fibrilarina forma parte del núcleo de la denominada caja C/D de las snoRNP (forma activa de la fibrilarina) (Lechertier et al 2009), responsables de la metilación del RNA y de la escisión del espaciador transcrito externo en 5' (5'ETS) (Reichow et al 2007). También debe de participar en etapas más tardías del procesamiento del RNA, porque se ha localizado tanto en zonas tanto distales como proximales del CFD respecto de los CF (Stanek 2000). Como la nucleolina, la expresión génica de fibrilarina es dependiente de la actividad transcripcional del nucleolo y de la progresión del ciclo celular. Los niveles de fibrilarina son mayores en células con alta actividad proliferativa (Cerdido & Medina 1995, Medina et al 2000, Saez-Vasquez et al 2004).

4 Biología en microgravedad: investigación en el espacio y simuladores en tierra

Aunque la fascinación por el cielo es tan antigua como el *Homo sapiens* mismo, como recogen decenas de hallazgos en Sumeria hace 6000 años y en puntos dispares del planeta desde la antigua civilización China hasta la Azteca, la astronomía moderna comienza con el invento del telescopio de Galileo en el 1609. En la actualidad, la exploración espacial es una de las principales fuentes de innovación científica y tecnológica y los avances espaciales repercuten en la calidad de vida del ser humano en la Tierra (Buckley et al 2012). Una vez establecida la Estación Espacial Internacional, el siguiente paso es desarrollar la tecnología necesaria para que los humanos puedan colonizar otros mundos, en la Luna, Marte o habitar en naves espaciales, y para alcanzar eso se necesita algún sistema de soporte vital autónomo, que provea de oxígeno y alimentos con mínimos requerimientos desde la Tierra. Existen procesos químicos basados en el reciclaje que permiten obtener agua y oxígeno de la orina, incluso hay grandes proyectos como MELiSSA (*micro-ecological life support system alternative*), que proponen varios compartimentos biológicos (uno de ellos ocupado por plantas y otro por los humanos) que reciclan los desechos de otros compartimentos en un ecosistema cerrado y autónomo (Wolff et al 2014). El compartimento que nos interesa utiliza plantas, que además de proveer alimento directamente y oxígeno tal y como lo hacen en la Tierra, podría suponer una ayuda psicológica a los humanos que vivan alejados de nuestro planeta. Entre otras ventajas a corto plazo estaría la de proveer de oxígeno a la estación espacial y reducir la factura espacial en millones de euros, y a largo plazo conseguir un soporte vital viable en la colonización de otros planetas.

4.1 La Estación Espacial Internacional

En el momento histórico en el que nos encontramos, podemos estudiar los efectos de la gravedad aislándola de otros factores. La Estación Espacial Internacional (*International Space Station* - ISS) es la única oportunidad de proporcionar un ambiente de microgravedad de forma duradera y estable. Esta obra conjunta entre la NASA estadounidense, el Roscosmos ruso, la Agencia Espacial Canadiense, la ESA europea y la JAXA japonesa, ha servido de base para experimentos de muy diversa índole desde 1998 y varios módulos científicos continúan siendo el mejor laboratorio sin gravedad

disponible en la actualidad. La Estación consta de diez módulos habitables y concretamente en el módulo europeo Columbus se encuentra el Sistema Modular de Cultivo Europeo (*European Modular Cultivation System - EMCS*) (Brinckmann 1999). El EMCS está dedicado a la investigación de la biología de plantas (aunque también se han utilizado para experimentos con pequeños insectos y cultivos celulares) en ambientes de gravedad reducida (Brinckmann & Brillouet 2000) y consiste en un incubador con dos rotores con capacidad de observación (teleciencia) y soporte vital para los experimentos biológicos proporcionando luz, composición del aire, temperatura, agua... (Brinckmann 2005, Fossum et al 2005). La ficha técnica del EMCS se puede consultar en el documento ESA-HSO-COU-013. Cada rotor aloja hasta cuatro Contenedores Experimentales (*Experiment Container - EC*) (Brinckmann 1999).

Pese a que la ISS es sin duda el mejor laboratorio para realizar experimentos sin gravedad (Raftery & Hoffman 2013), presenta importantes limitaciones. Una de ellas es su difícil accesibilidad, lo que conlleva un elevado coste: realizar cualquier tipo de experimento en la ISS requiere la inversión de millones de euros. Por ello, hay poca disponibilidad de vuelos espaciales, y los vehículos utilizados tienen una limitada capacidad de carga, ya que gran parte es combustible, oxígeno y material para el mantenimiento y soporte vital de los astronautas en la ISS, por lo que el espacio para experimentos se reduce. En consecuencia, la reproducibilidad de los experimentos espaciales está limitada al máximo, puesto que conseguir repetirlo es extremadamente infrecuente (solo por fallo técnico) y el número de muestras a enviar no admite redundancias. Otra limitación es la automatización y la seguridad en la ISS. El tiempo de manipulación del astronauta se cuenta por segundos y debe de ser mínimo. También es muy importante tener en cuenta que a la hora de realizar el experimento, toda sustancia catalogada como peligrosa (especialmente los fijadores químicos) requiere siempre un triple aislamiento de seguridad. Por motivos similares, las muestras congeladas se pueden conservar por tiempo y espacio limitado en la ISS y para volver a la Tierra necesitan esperar a que haya espacio en alguna cápsula con capacidad de retorno (mucho material es eliminado para su destrucción en la reentrada a la atmósfera en cápsulas cuyos restos caen al océano). La realización de un experimento espacial conlleva por tanto la realización de experimentos previos (para optimizar el experimento espacial) y post-vuelo (de validación de los resultados) en sistemas de simulación más asequibles y accesibles en la Tierra.

4.2 Instalaciones de simulación en Tierra (GBF)

Existen diversas formas de conseguir microgravedad de calidad (se considera una buena microgravedad por debajo de $10^{-4}g$) sin necesidad de lanzamientos espaciales, como torres de caída libre (entre 1 y 4 segundos de microgravedad), vuelos parabólicos en aviones (que alternan periodos de unos 30 segundos de hipogravedad con otros equivalentes de hipergravedad), o cohetes (*Sounding rockets*, duración inferior a una hora de microgravedad). La duración de la microgravedad que ofrecen es insuficiente para estudiar parámetros como la proliferación o crecimiento celular que son procesos que pueden incluso abarcar 24 horas. Además, algunas de esas instalaciones tienen limitaciones de espacio y automatización de los protocolos similares a los de la ISS.

Las instalaciones de simulación en tierra o GBF (*Ground Based Facilities*) son un conjunto de aparatos que simulan en las condiciones de microgravedad presentes en la ISS. Ejemplos de GBF que consiguen una simulación de microgravedad continua son el clinostato, la *Random Positioning Machine* (RPM) y el levitador magnético. Los primeros dispositivos se basan en la redistribución espacial de las muestras por rotación para obtener una fuerza promedio próxima a cero. El clinostato fue utilizado por primera vez en 1879 por Julius von Sachs que utilizaba la fuerza del agua para dar vueltas a una noria a la que pegaba sus objetos de estudio como judías o incluso conejos (von Sachs 1879). Esta noria, al igual que los clinostatos modernos, compensa el vector gravedad con una velocidad angular (Hoson et al 1997) que va desde una clinorotación lenta (1rpm) hasta una rápida (30rpm). Cuando tienen más de un eje de rotación hablamos de clinostato 3D, y de *Random Positioning Machine* si se añade aleatoriedad en los movimientos tridimensionales, asegurando la neutralidad del vector gravedad (van Loon 2007).

Los levitadores magnéticos están basados en otro principio físico, el de la levitación diamagnética, que aprovecha las propiedades intrínsecas del agua y otras sustancias orgánicas. Aplicando sobre los sistemas biológicos un campo magnético de alta energía que genera una fuerza magnética que se opone a la de la gravedad, resultando en la levitación del objeto de estudio dependiendo de la fuerza aplicada con el imán (Christianen 2010, Hill 2010, Qian et al 2009). La levitación magnética permite estudiar diferentes condiciones de gravedad simulada al mismo tiempo y en el mismo entorno ambiental, entre ellas las de la Luna (0,17g) o Marte (0,37g). Aunque esta tecnología

produce una simulación muy estable a nivel molecular, su principal debilidad es que el propio campo magnético (de varios Teslas de intensidad) altera *per se* la actividad biológica de la muestra control (Herranz et al 2012, Manzano 2011).

Por otro lado, existen sistemas para someter a organismos a hipergravedad como las centrífugas de gran diámetro, que pueden alcanzar las 100g y albergar plantas, animales e incluso seres humanos (Brown 1992).

En cualquier caso, la utilización de unos sistemas de simulación u otros depende del sistema biológico en estudio y de la velocidad de respuesta al cambio gravitacional de nuestros marcadores biológicos, siendo deseable contrastar el método de simulación con alguna muestra expuesta a microgravedad real antes de generalizar los resultados obtenidos en Tierra. Por lo tanto, en los GBF hablamos de microgravedad simulada (μg *sim*), mientras que la existente en la ISS será denominada microgravedad real (μg). El término 0g no debe aplicarse para ningún caso, ya que aunque imperceptible por el movimiento orbital, dentro de la Estación sigue presente el campo gravitatorio terrestre 95% del superficial (que se anula con su propia fuerza centrífuga y por eso continúa orbitando alrededor de la Tierra). La microgravedad real se considera más pura porque el ambiente alrededor del experimento sigue siendo de microgravedad, algo que no ocurre con las GBF (en los que la calidad de la μg disminuye con la distancia al centro de la simulación). De ahí la necesidad de realizar los experimentos en la ISS y reservar las GBF para las actividades previas a un vuelo espacial o experimentos que no puedan llevarse a cabo en la ISS por su complejidad (Herranz et al 2013a).

4.3 Experimentos espaciales previos

En la última década se han realizado varios experimentos que han contribuido decisivamente a comprender como el desarrollo de las plantas está alterado en condiciones espaciales. A continuación resumiré tres de los experimentos espaciales llevados a cabo en la ISS, que constituyen el germen del experimento espacial que se describe en esta memoria y que se está realizando actualmente en la ISS.

4.3.1 El experimento ROOT

El experimento espacial ROOT ("Misión Cervantes"), dirigido por el Dr. Medina (CIB-CSIC, Madrid, España), se realizó en la ISS durante la misión Soyuz TMA2 del 18 al 28 de septiembre de 2003 durante la estancia del astronauta español Pedro Duque (Figura 11). Las plántulas de *Arabidopsis* de genotipo silvestre crecieron durante 4 días en *bioracks* (módulo de cultivo automatizado con control de la temperatura y de la hidratación de las semillas) en oscuridad y posteriormente fueron fijadas automáticamente, liberando



Figura 11: parche de la Misión Cervantes. El experimento ROOT formó parte de la "Misión Cervantes".

paraformaldehído en los propios contenedores. En Tierra, se reprodujo totalmente el experimento espacial en condiciones de gravedad control y en la RPM, y se introdujo un estudio paralelo con una línea transformada de *CYCB1;1:uidA*, medida mediante GUS. Para su publicación (Matía et al 2010), se completó con muestras crecidas en las mismas condiciones pero durante 2 y 8 días durante el vuelo espacial STS-84 en la MIR en 1997 y que se fijaron en glutaraldehído. Los resultados científicos de esta misión fueron abundantes y demostraron el desacople entre crecimiento y proliferación celular en microgravedad (Matía et al 2007). Las líneas silvestres crecidas en microgravedad incrementaron su longitud mientras que el ratio de proliferación se igualaba según avanzaban los días. El tamaño nucleolar y los marcadores de actividad nucleolar eran inferiores en el espacio (Manzano et al 2008). La actividad de biogénesis

de ribosomas también se resentía en microgravedad, tanto en el vuelo espacial como en su réplica en la RPM (Matía et al 2010). Los resultados en el simulador en Tierra, aunque no idénticos, eran comparables a los del vuelo, abriendo la posibilidad de acercar resultados con estos aparatos previamente a un experimento espacial (Medina & Herranz 2010). La línea transgénica sirvió para evaluar la expresión de ciclina-B1 como marcador específico de ciclo celular en la fase G2/M de células en división (Matía et al 2005). La gran disminución en su expresión se interpretó como un acortamiento en la fase G2 del ciclo celular en ausencia de gravedad (Matía et al 2007). Posteriores análisis de nuestro grupo utilizando cultivos celulares en microgravedad simulada en RPM han confirmado que, ciertamente, la fase G2 es la más afectada y que la microgravedad promueve un aumento en la tasa de proliferación. La casi completa desactivación del punto de control en la transición G2/M, provocaría que se omitiera el tamaño celular insuficiente como causa para detener el ciclo celular (Moustafa 2014).

Por otro lado, se han realizado estudios con líneas transgénicas que informan de la distribución de auxinas en la raíz (*DR5::GUS*) en diferentes condiciones de microgravedad simulada, sugiriendo que la microgravedad altera la distribución de auxinas incluso en presencia de señales gravitrópicas positivas (experimento de levitación magnética en el que los estatolitos no levitan pero la planta como un todo está en un entorno próximo a la microgravedad) (Herranz et al 2013b). Esto también sugiere que la respuesta no profesional de las células a la microgravedad puede ser muy relevante (Manzano et al 2013).

4.3.2 El experimento TROPI

El estudio de la gravedad sin luz es fácil en la Tierra simplemente cubriendo las muestras biológicas, pero para estudiar los estímulos lumínicos sin la interacción de la omnipresente gravedad

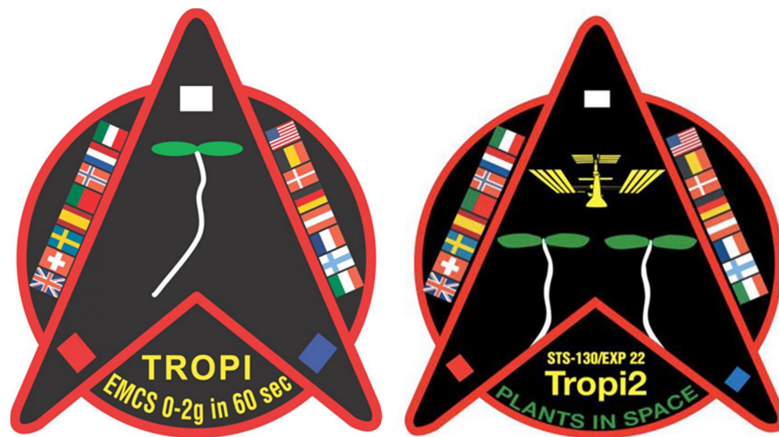


Figura 12: parches de las misiones espaciales TROPI-1 y TROPI-2.

necesitamos la ISS, que nos permite estudiar directamente el crecimiento de la planta en respuesta a la luz únicamente (Correll & Kiss 2002, Vitha et al 2000). Esto permitiría conocer la relación entre el fototropismo negativo de la raíz y su gravitropismo positivo (Sakai et al 2000).

El experimento TROPI (Kiss et al 2006), lleva por nombre completo "*Analysis of a novel sensory mechanism in root phototropism*" (Figura 12). Está dirigido por el Dr. Kiss (Universidad de Mississippi), fue lanzado en dos transbordadores (uno en julio de 2006, STS-121, y otro en septiembre, STS-115), constaba de tres fases (separadas en TROPI-1 y TROPI-2) que tuvieron lugar entre octubre y diciembre de 2006 y regresó a la tierra en tres vuelos (en diciembre, STS116, en junio de 2007, STS117 y en noviembre, STS120). TROPI pretendió analizar mecanismos sensoriales en el fototropismo de plantas. TROPI se realizó en el EMCS, que permitía crecer las plántulas a 1g y μ g, pero también a gravedades parciales de 0,2g y 0,5g. Las plántulas se trataron con luces azules y rojas para probar la interacción de luz y gravedad en el hipocotilo y en la curvatura de la raíz.

La ejecución de TROPI-1 tuvo varios percances (Kiss et al 2009). La germinación fue pobre, en torno a un 58%. Las fotografías para medir la curvatura y evolución del crecimiento de las plántulas uso video analógico y no permitió ver en tiempo real un fallo en la hidratación de los cassettes, que una vez retornados junto con las muestras tuvieron que ser procesadas con un arduo trabajo de unir dos fotos por fotograma (cada foto sólo captaba la mitad del cassette) y en la mayoría de los casos no aportaban información porque el cassette no estaba bien hidratado (sólo fue válido el 1% del

video). Además, las muestras se degradaron o perdieron la cadena de congelación en algún punto (De Parolis et al 2006) porque la calidad y cantidad de RNA obtenidos en las extracciones no fueron las óptimas.

Estos problemas se solucionaron en TROPI-2 (Kiss et al 2011). En cuánto el problema de germinación se cambiaron dos cosas: el tiempo de almacenado de las semillas desde su montado hasta su ejecución no excedió de los 6 meses, tiempo máximo para el que se habían hecho los test de almacenado (Driss-Ecole et al 2008); y se incluyó una membrana de carbón activo (part no. FM5K/250; Calgon Carbon Corp., Pittsburgh, PA, USA) sobre la membrana semipermeable de gases de la cubierta, para filtrar los posibles gases acumulados en la estación, como el etileno, que inhibe el crecimiento y que se han originado tras los múltiples experimentos realizados en la ISS con plantas. En cuanto a las imágenes se cambió el sistema de toma de imágenes por imágenes en tiempo real, para solucionar cualquier imprevisto que se diera en un momento dado. Y finalmente, las muestras bajaron bien congeladas a -80°C en el MELFI para su análisis genético específico de raíces (Molas et al 2006) por microarrays (Stimpson et al 2009) porque se pidió la colaboración de un segundo astronauta para que congelaran las muestras en menos de tres minutos desde que se termina el experimento y porque se utilizó el congelador GLACIER entre el congelador de la ISS y el MELFI de los STS-117 y STS-120.

Pese a los problemas durante su ejecución, TROPI obtuvo diversos resultados satisfactorios y confirmó el fototropismo positivo de hipocotilos y raíces a la luz roja, que sería la evocación de una respuesta primigenia a este tipo de radiación de los rizoides de helechos y musgos (Millar et al 2009). Estos fototropismos desaparecían cuando aumentaba el gravitropismo, incluso a niveles de 0,1g (Kiss et al 2011). TROPI estudió la luz azul con pretratamientos de luz roja y en esas condiciones los hipocotilos presentaban una respuesta reducida al fototropismo y muy marcada en las raíces. Esto apoya la hipótesis de que en hipocotilos, ese fototropismo está atenuado por la gravedad, mientras que en raíces ese aumento es más directo (Kiss et al 2012).

4.3.3 El experimento GENARA

La existencia de genes reguladores de gravedad implicaría que su expresión depende al menos de mecanismos de gravisensibilidad y de la redistribución de hormonas (Manzano et al 2008). El experimento GENARA-A (del inglés "Gravity Related Genes in *Arabidopsis*") estuvo dirigido por la Dr Carnero-Díaz de la Universidad Pierre et Marie Curie de París y su objetivo era estudiar la actividad molecular que ayudaría a compensar el impacto negativo del crecimiento de la planta

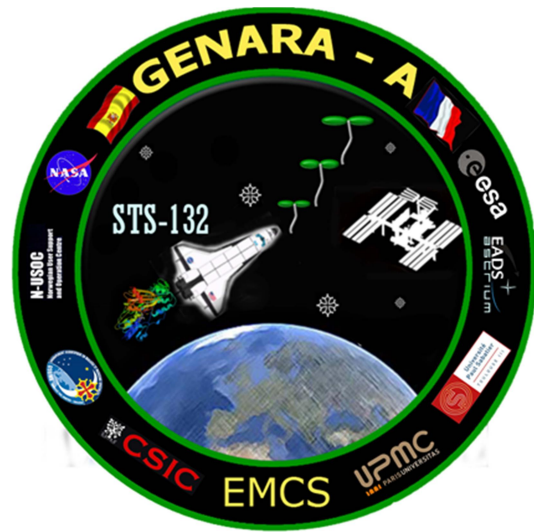


Figura 13: parche de la misión GENARA-A.

en el espacio (**Figura 13**). GENARA se lanzó en el STS-132 el 14 de Mayo de 2010, se realizó en la ISS entre junio y julio de ese mismo año. Las muestras retornaron el 9 de marzo de 2011 en el STS-133.

En GENARA se hicieron crecer las plántulas en el EMCS a 1g y μ g durante 12 días en ciclos de luz blanca de 16 horas y 8 en oscuridad. Las muestras congeladas en el MELFI sirvieron para estudios de proteómica. En concreto se separaron, identificaron y cuantificaron hasta 1484 proteínas diferentes de membrana, de las que 80 eran más abundantes en los extractos de plántulas crecidas en microgravedad real y 69 menos abundantes (Mazars et al 2014a). Las proteínas relacionadas con metabolismo y movimiento de hormonas de crecimiento descendían sus niveles en microgravedad real mientras que las de estrés, defensa y algunas de metabolismo eran más abundantes. Todo esto apoya la idea de que las plantas perciben la μ g como un estrés ambiental (Mazars et al 2014b).

5 Necesidad del proyecto espacial Seedling Growth

En base a los resultados previos, los investigadores principales Dr. Francisco Javier Medina (<http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=32>) por la ESA y Dr. John Z. Kiss (<http://www.olemiss.edu/info/bios/kiss.html>) por la NASA han propuesto el experimento espacial de plantas más ambicioso de la historia. Los trabajos descritos en esta tesis han sido fundamentales para la definición de Seedling Growth (SG) (**Figura 14**) y describen la ejecución y explotación de resultados de la primera fase del experimento (SG1).

El objetivo de este experimento conjunto entre la ESA y la NASA es estudiar los efectos de la gravedad sobre los mecanismos de señalización de la planta y describir cómo responde a la luz y cómo esas condiciones afectan al crecimiento y desarrollo de la planta. Profundiza en las interacciones fundamentales entre las rutas de señalización de luz roja y azul y cómo se ven afectadas por la gravedad. Estas rutas de señalización son vitales para la regulación del crecimiento y la proliferación celular. Su objetivo se centra en la fase de transducción de señal, es decir, en cómo la planta reacciona frente a la luz, además de la interacción entre las rutas de señalización de luz roja y azul usando mutantes en el transporte y señalización de auxina. También se usaron gravedades fraccionarias para comparar su influencia sobre los receptores de luz de la planta.

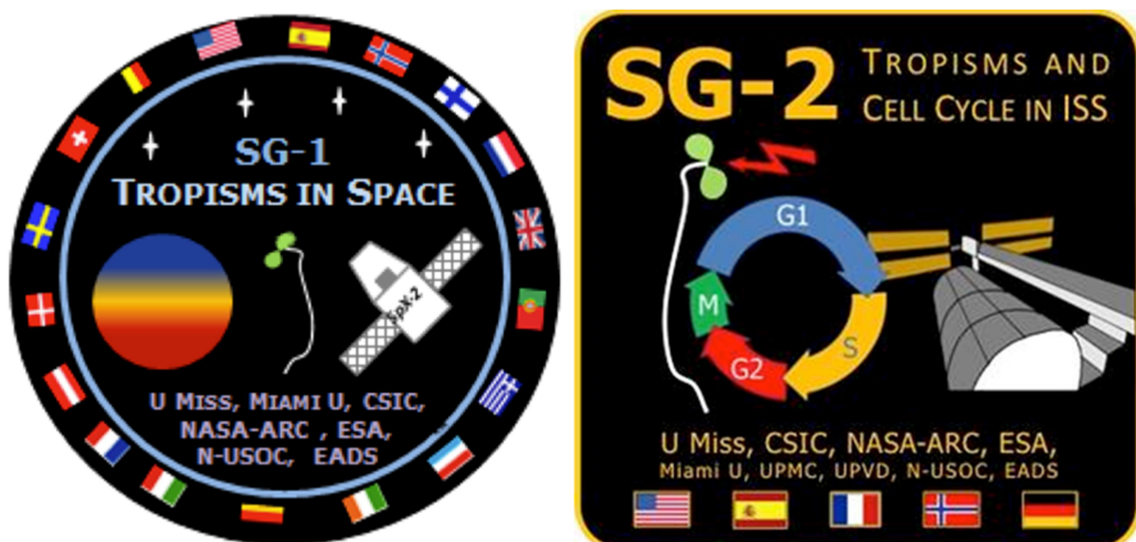


Figura 14: parches de las misiones espaciales "Seedling Growth-1" y "Seedling Growth-2".

Aunque SG emplea el hardware de los experimentos TROPI, la definición de los materiales a utilizar y como fijarlos ha sido un desafío importante que se describe en esta tesis, junto con experimentos complementarios realizados en GBF y algunos resultados preliminares de las primeras muestras que han regresado de la ISS demostrando que el experimento SG se está realizando con éxito

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo principal de los trabajos de investigación contenidos en esta tesis es hacer realidad y maximizar el retorno científico del proyecto espacial “Seedling Growth”, que persigue profundizar en la descripción de los efectos de la microgravedad en el crecimiento y la proliferación celular, y específicamente el efecto modulador de la luz y las auxinas en el mantenimiento de la competencia meristemática en el ambiente espacial.

Los subobjetivos específicos de esta tesis son:

1. Seleccionar y definir las condiciones de cultivo óptimas para cada una de las líneas mutantes de *Arabidopsis* (fitocromos, transporte de auxinas y nucleolinas) en el hardware TROPI del EMCS en condiciones de microgravedad real (ISS) y gravedad control (centrifuga en ISS).
2. Compatibilizar los protocolos de almacenamiento, fijación, congelación y transporte de las muestras con las limitaciones de la investigación en la ISS.
 - a. Comprobar los requerimientos mínimos de volumen, caducidad y tipo de fijador para su implementación en el diseño de la unidad de fijación Fixbox.
 - b. Corroborar la biocompatibilidad y eficiencia de los fijadores en presencia de ferrofluido.
3. Caracterizar los efectos sobre la competencia meristemática en cada una de las líneas mutantes en condiciones de microgravedad simulada (RPM) frente a la gravedad control (1g) en tierra.
 - a. A nivel ultraestructural (microscopía) se determinará la tasa de proliferación celular, el tamaño nucleolar y su ultraestructura (como marcador del crecimiento celular) así como la morfología y longitud de la raíz.

- b. A nivel molecular (western blotting y qPCR) se determinará la expresión génica de los marcadores clave para la regulación del crecimiento y la proliferación celular.
4. Caracterizar los efectos sobre la competencia meristemática en las líneas mutantes presentes en Seedling Growth 1 en condiciones de microgravedad real (ISS) y gravedad control (centrífuga a 1g en la ISS).
 - a. A nivel estructural se analizará la morfología y la longitud de la raíz.
 - b. A nivel molecular (qPCR) se determinará la expresión génica de los marcadores clave para la regulación del crecimiento y la proliferación celular.
5. Caracterizar el efecto de la microgravedad en combinación con otros estreses ambientales, (choque térmico, auxina exógena, ausencia de luz...) sobre la competencia meristemática.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIAL BIOLÓGICO

2 PREPARACIÓN EN TIERRA DEL EXPERIMENTO ESPACIAL SG

3 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS SIMULACIONES EN TIERRA

4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EXPUESTAS A
MICROGRAVEDAD

5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Materiales y Métodos

1 Material biológico

Todos los experimentos incluidos en este trabajo utilizaron la especie vegetal modelo *Arabidopsis thaliana*. Hemos aprovechado la disponibilidad en nuestro laboratorio de una amplia batería de líneas mutantes y diversas construcciones genéticas reporteras que detallaremos a continuación. Para facilitar su identificación las hemos clasificado en tres bloques atendiendo a la relación existente entre sus mutaciones seguido de un cuarto bloque con los genes reporteros usados:

- Colección de líneas de fototropismo:
 - Landsberg erecta (denominada Ler *wild-type*): base genética sobre la que se han construido los mutantes de fitocromos.
 - *phyA-201* (denominado *phyA*): mutante deficiente en la proteína de *Phytochrome A*. At1G09570. Mutación obtenida con metanosulfonato de etilo, por la que se pierde la función proteica al intercalarse en su secuencia un codón de stop. Anteriormente se le denominaba *fre1-1* (*far red elongated mutant*) (Nagatani et al 1993, Reed et al 1994).
 - *phyB-1* (denominado *phyB*): mutante deficiente en la proteína *Phytochrome B*. At2G18790. Mutación obtenida por acción del metanosulfonato de etilo. Anteriormente se le denominaba *hy3-1* o *phyB-Bo64* (Reed et al 1993).
- Colección de líneas relacionadas con el tráfico de auxinas:
 - Columbia-0 (denominada Col-0 *wild type*): base genética sobre la que se han construido los diferentes mutantes del bloque de auxinas.
 - *aux1.7* (*auxin resistant*): mutante deficiente en la proteína *auxin influx transporter*. At2G38120. La mutación ha sido obtenida por acción del metanosulfonato de etilo, al cambiar una base en el exón 9. La planta es resistente al etileno y a la auxina. El fenotipo es similar al *wild type*, pero la plántula está alterada en la respuesta gravitrópica (Pickett et al 1990).

- *eir1.1 (ethylene insensitive)*: mutante deficiente en la proteína *auxin efflux carrier* PIN2. At5G57090. La mutación ha sido obtenida por acción del diepoxibutano. Las raíces son insensibles al etileno y agravitrópicas. Los tallos son sensibles al etileno y son gravitrópicos (Roman et al 1995).
 - *tir1 (auxin transport inhibitor resistant): transport inhibitor response*. At3G62980. La mutación de la proteína TIR ha sido obtenida por acción del metanosulfonato de etilo (Ruegger et al 1998).
- Colección de líneas de nucleolina:
- Columbia-0 (denominada Col-0 *wild type*): base genética sobre la que se han construido los mutantes incluidos en el bloque de nucleolina
 - *nuc-11.1: nucleolin like 1*. At1G48920. Mutante con el gen *NUC1* alterado. En bibliografía puede venir referido como *AtNucL1.1*, $\Delta 90$ (SALK_053590), *parl1-1* o *nuc1.1*. Mutación conseguida por inserción de dos secuencias de 7 y 11 nucleótidos en el exón 12. Se puede encontrar el transcrito truncado con la consiguiente proteína con cuatro aminoácidos extra (Clay & Nelson 2005).
 - *nuc-11.2: nucleolin like 1*. Mutante con el gen de *NUC1* alterado. Otros nombres con la que se le puede encontrar es el de *AtNucL1.2*, $\Delta 27$ (SALK_002764) o *parl1-2* o *nuc1.2*. Mutante obtenido por inserción de T-DNA de 114 nucleótidos en el exón 9 (Petricka & Nelson 2007).
 - *nuc-12.1: nucleolin like 2*. At3G18610. Mutante con el gen *NUC2* alterado. También llamado *AtNucL2.1* (SALK_042511) o *nuc2.1*. Mutación obtenida por la inserción mediante T-DNA de 451 nucleótidos en un intrón de *NucL2* (Alonso et al 2003).
 - *nuc-12.2: nucleolin like 2*. Mutante con el gen *NUC2* alterado. Se puede encontrar como *AtNucL2.2* (GABI178D01) o *nuc2.2*. Mutación obtenida por la inserción de 423 nucleótidos mediante T-DNA en un exón del gen (Rosso et al 2003).
 - *nuc-12.2::2.2*: mutante de complementación del anterior, en el que el gen mutado ha sido reintroducido. Se puede encontrar en bibliografía como *nuc2-2 gNUC2* (Durut et al 2014).

- Otras líneas (todas ellas en fondo *wild-type* Col-0) transformadas con genes reporteros:
 - o *CYCB1::GFP*: línea en la que el promotor de ciclina *CYCB1* dirige la expresión de la señal fluorescente verde (gen *GFP*). Generada en nuestro laboratorio (Manzano 2011).
 - o *NUCL1::GFP*: línea en la que el promotor de Nucleolina 1 dirige la expresión fluorescente (gen *GFP*). Generada en nuestro laboratorio (Manzano 2011).
 - o *PIN2::PIN2-GFP*: línea en la que el promotor de *PIN2* dirige la expresión de la proteína de fusión *PIN2-GFP* (Blilou et al 2005)
 - o *DR5rev::GFP*: promotor artificial de respuesta a auxinas *DR5* unido al gen *GFP* (Swarup et al 2004).
 - o *DR5::GUS*: consiste en un gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de respuesta a auxina (Jefferson et al 1987, Ulmasov et al 1997).

1.1 Lotes y mantenimiento de las semillas

La propagación de las semillas se hace de forma rutinaria 2-3 veces al año. Se siembran semillas de *Arabidopsis* sobre tierra suplementada con vermiculita, para facilitar el crecimiento y la aireación. Las semillas plantadas proceden de lotes originales, de forma que todas las generaciones son H1. Las plantas crecen durante un periodo de unos 3-4 meses en incubadores a 22°C con 80% HR con ciclos de luz oscuridad (16/8h). Cuando se forman las silículas (fruto en forma de vaina con semillas en su interior), las plantas se regaron pero cubriendo la parte aérea (excepto las hojas) con una bolsa hecha con papel de filtro para que las semillas que cayeran quedasen recogidas. Tras secarse las hojas, se cortaron los tallos y se mantuvieron en la misma bolsa de papel en el laboratorio a temperatura ambiente para asegurarnos así que las semillas estaban completamente secas. Después de un mes, las plantas se sacaron de las bolsas y se filtraron con embudos metálicos para separar las semillas que se almacenan en tubos de ensayo a 25°C.

La comprobación de los lotes se hace rutinariamente tras cada recogida. De cada línea de *Arabidopsis* se sembraron unas 25 semillas seleccionadas por su apariencia bajo la lupa (ver apartado 1.3), comparándolas en la misma placa Petri con otras 3 líneas correspondientes al mismo ecotipo pero de lotes anteriores. Se pretende así detectar cualquier anomalía en su crecimiento, así como lotes que por algún motivo fueran defectuosos. Solamente los mejores lotes de semillas atendiendo a su tasa de germinación y a su vitalidad en el crecimiento se utilizaron en los experimentos de gravedad alterada.

1.2 Esterilización de las semillas

Para la esterilización de las semillas se mezcló un litro de alcohol (Merck EMSure® 100983) al 70% (v/v) en agua con 100µl Tritón X-100 (Sigma T9284). Se diluyó en tubos de ensayo y se etiquetaron con los ecotipos que se usarían en cada experimento. Se echaron las semillas a esterilizar en el tubo de ensayo correspondiente y durante 5 minutos se agitó, bien ligeramente con la mano, bien absorbiendo y expulsando la mezcla con ayuda de una pipeta Pasteur. Posteriormente se realizaron tres lavados con etanol 95% durante menos de 1 minuto cada uno, para retirar todas las trazas que pudieran quedar del detergente, también con agitación. En el último lavado, en vez de retirar el alcohol con la pipeta Pasteur, lo que se recogió fueron las semillas que se depositaron sobre un papel de filtro estéril. Cuando se secaron completamente (mínimo 30 minutos), se podían usar o pasar a un tubo de ensayo estéril. La caducidad de uso de dichas semillas estériles se estableció en un mes.

1.3 Criterios de selección de semillas

La selección de semillas nos permite asegurar una alta germinación y buena vigorosidad de las plántulas. La selección se realizó siempre para la siembra de semillas en cualquiera de los experimentos descritos en esta tesis.

La selección requiere trabajar en campana de flujo laminar con una lupa (Leica EZ4). Se necesitan las semillas esterilizadas (ver apartado 1.2), goma guar, varios portaobjetos y varias placas de cristal estéril. La goma guar 1% (p/v) (Sigma G4129), se preparó con 100 mililitros de agua destilada en un vaso de precipitados dónde se agitó y calentó lentamente; una vez llegó al punto de ebullición se retiró del calentador y se hicieron

alícuotas en recipientes de cristal con tapa y se autoclavaron a 120°C; estos viales se pudieron usar durante los siguientes 90 días.

Se colocó una tapa de placa Petri en la lupa, sobre ella, dos portaobjetos, sobre uno de ellos (que tenía un papel negro para aumentar el contraste), se esparcieron unas gotas de goma guar y se pusieron las semillas estériles a continuación; en el otro portaobjetos se puso el soporte de papel de nitrocelulosa dónde van las semillas (en caso de no requerir este soporte, sólo será necesario el otro portaobjetos) ya recortado (ver apartado 2.1.1) y se añadieron unas gotas de agua de manera que el papel quedase pegado al porta y al cargar las semillas no se moviera (**Figura 15**).

Se seleccionaron las semillas teniendo en cuenta diversos aspectos: opacidad, tamaño, color y aspecto en general de la semilla (**Figura 16**). Las semillas seleccionadas bajo la lupa con luz incidente se observaron desde varios ángulos para cerciorarnos de que el endospermo se encuentra en buen estado dentro de la semilla. Se seleccionaron semillas homogéneas y preferentemente de tamaño grande que tienden a ser más sanas y contienen más endospermo. Las semillas deben de tener color homogéneo dando preferencia a un color amarillo-marrón y descartando las marrones oscuras y las verdosas. Cada una de las semillas se debe colocar verticalmente y orientada con el micrópilo hacia arriba para garantizar que el punto de germinación es el mismo en todos los casos y a una distancia variable (dependiendo de genotipo y posición que ocupe de la parte superior de la membrana en cada cassette).



Figura 15: Colocación del material para la selección de semillas bajo la lupa. Un portaobjetos con un papel de nitrocelulosa (izquierda) y otro con un papel negro por debajo para aumentar el contraste (derecha). Sobre el primero se colocarán unas gotas de agua estéril para evitar que se mueva el papel mientras se colocan una a una las semillas seleccionadas y sobre el otro se pondrá goma guar y las semillas estériles que serán seleccionadas.

Semillas	A deshechar		A utilizar	
Color				
Forma				
Aspecto general				

Figura 16: Criterios de selección de las semillas. Se muestran las semillas que deben ser rechazadas a la izquierda y seleccionadas a la derecha. En las filas se muestran los criterios de el color (podemos distinguir semillas más claro-verdosas o muy oscuras, seleccionando sólo las marrones), la forma y el buen aspecto en general (hay que seleccionar las que puedan tener el endospermo dañado (semilla transparente) o que tras un rato en goma guar no se hidratan adecuadamente).

1.4 Condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado estaba basado en *Murashige and Skoog* a media fuerza ($\frac{1}{2}$ MS) (así evitamos que las semillas tengan un refuerzo nutritivo excesivo que enmascare los efectos producidos por la modificación del campo gravitatorio durante los primeros estadios de crecimiento). El medio se componía de 50 ml de macronutrientes (Sigma M0654), 50 ml de micronutrientes (Sigma M0529), $0,1661 \pm 0,005$ g de MES hidratado (Sigma M2933) y $0,0381 \pm 0,005$ g de MESK⁺ (Sigma M0895) en 890 ml de H₂O_{dd}. La mezcla se agitó durante 5 minutos y se ajustó el pH a $5,5 \pm 0,05$ con KOH 0,1M siendo el volumen final 1 litro. En algunos casos, éste se complementó con sacarosa al 1% (Merck 107.651).

1.4.1 Soporte de papel de cromatografía

La mezcla del medio de cultivo se vertía en una placa Petri limpia, dónde se embebían los soportes de papel de cromatografía Whatman#17 (*Fisher Scientific* #3017-915) previamente cortados acorde al recipiente donde crecerían con posterioridad las plántulas. Se secaron directamente sobre la campana de flujo laminar durante unas dos horas y media y se renovaba el medio cada cuatro papeles. Los papeles de pruebas realizadas en cassettes, se colocaron en las bases y se esterilizaron todo junto. Los papeles para placas Petri se esterilizaron previamente a ponerles en las placas.

1.4.2 Soporte en agar

En caso de ir el medio de cultivo con agar, tras preparar la mezcla y ajustar el pH, añadíamos agar al 0,8% (*Duchefa Biochemie* P1001.1000), se esterilizaba y finalmente se vertían en las placas Petri. Una discusión más extensa sobre los protocolos de trabajo con *Arabidopsis* en microgravedad se puede consultar en (Herranz et al 2015).

2 Preparación en Tierra del experimento espacial SG

Los experimentos incluidos en ésta memoria se llevaron a cabo en el módulo americano *Destiny* de la ISS y concretamente en el EMCS. Los experimentos realizados en la ISS se prepararon en cassettes (CC) introducidos en varios contenedores experimentales (EC) de tipo TROPI instalados en el EMCS (**Figura 17**). El EMCS regula la temperatura, las condiciones atmosféricas, el aporte de agua requerido por el experimento biológico (microgravedad cuando está parado). El EMCS dispone de dos centrífugas dónde se insertan hasta un máximo de 4 EC por rotor (**Figura 19A**). Si estos rotores están parados existe microgravedad real y si están en movimiento se simulará la gravedad control 1g o las gravedades parciales (**Figura 19B**). Los EC están equipados con LED blancos (en la parte superior de cada cassette) y LED rojos y azules (en la parte lateral de cada cassette) para proporcionar al experimento el patrón de iluminación deseado (**Figura 18**). El EC TROPI puede albergar hasta 5 cámaras de cultivo (CC) o cassettes. El correcto ensamblaje de los denominados “cassettes espaciales” es clave en el éxito exigido en cuanto a germinación y crecimiento (Kittang et al 2014).

Durante el lanzamiento el experimento modelo viajó en la nave Space-X. Las semillas viajaron montadas en sus CC y correspondientes EC en condiciones controladas de temperatura. Una vez se descargaron en el módulo *Destiny*, se instalaron en el EMCS, se activó la germinación por hidratación y se le proporcionaron todos los parámetros del soporte vital que requieren las plantas, concretamente la temperatura, la humedad, el agua y las concentraciones de oxígeno y CO₂. Aunque el EMCS dispone de un sistema de iluminación, en nuestros experimentos se utilizó el sistema incluido en el EC TROPI, ya que proporcionan luz con LED blancos, azules o rojos de la intensidad y orientación adecuada para nuestras condiciones experimentales. El control técnico del EMCS se realiza manualmente por la tripulación del ISS y también remotamente desde el centro noruego N-USOC (*Norwegian User Support Operation Centre*). Sobre los EC hay una cámara de video fija (Sony FCB-IX470) y es un juego de espejos el que se mueve para enfocar cada uno de los cuatro EC y tomar fotografías de los 5 cassettes uno por uno (baja resolución) o incluso con ampliaciones en alta resolución (dos tomas por cassette).

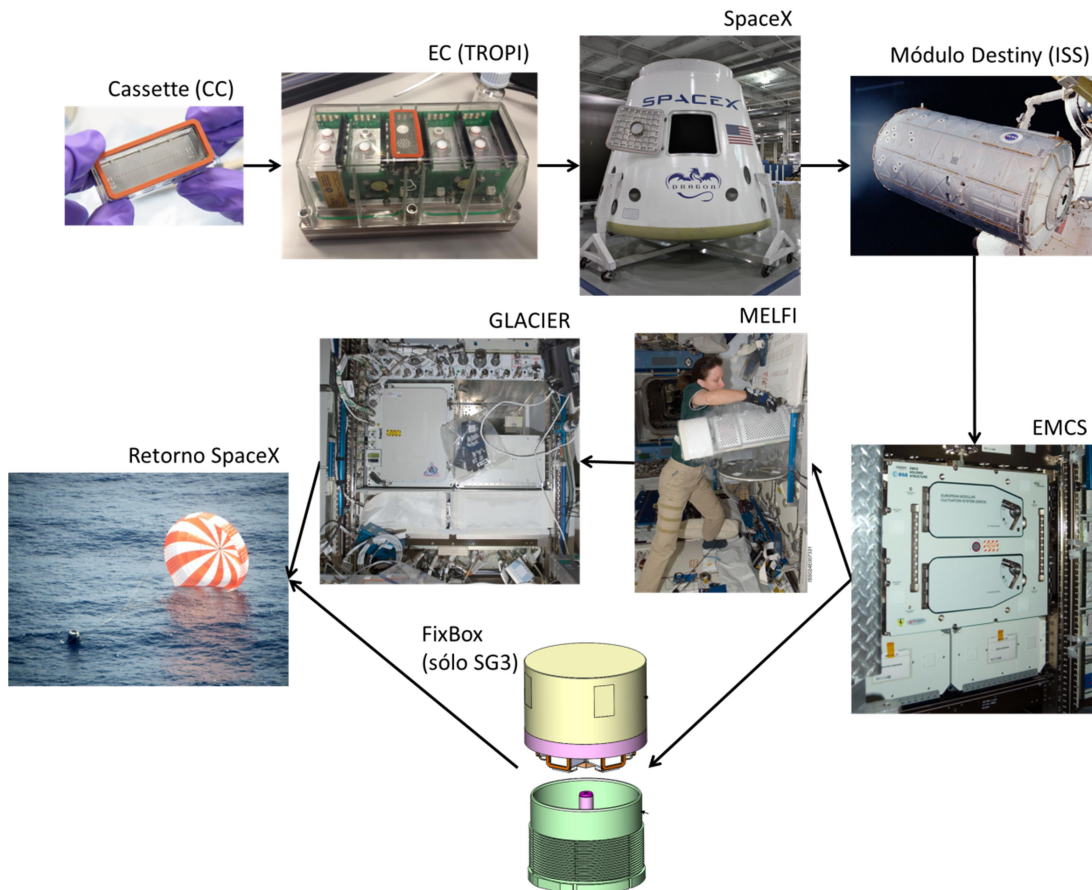


Figura 17: Esquema de los pasos seguidos para la elaboración del experimento Seeling Growth. En Tierra se preparan todos los cassettes (CC) y se montan los EC previamente a ser montados en la sonda "Dragon" de "SpaceX", la sonda no tripulada que enviará cargamento hasta la ISS. El experimento se descarga en la ISS y se lleva hasta el módulo de la NASA Destiny. Allí se encuentra el EMCS (*European Modular Cultivation System*), dónde crecen las muestras. Una vez termine el experimento, las muestras serán congeladas a -80°C en el MELFI (*Minus Eighty-Degree Laboratory Freezer for ISS*) o el FixBox. Cuando sea posible, las muestras retornarán a Tierra de nuevo a bordo del SpaceX (las muestras congeladas irán en el congelador GLACIER (*General Laboratory Active Cryogenic ISS Experiment Refrigerator*) para que no pierdan la temperatura en ningún momento del proceso).

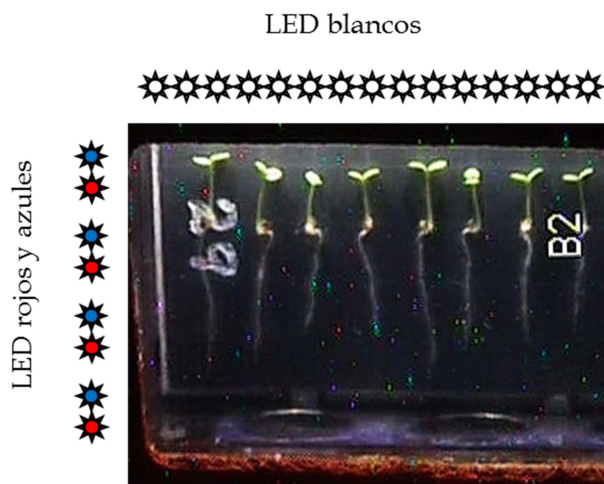


Figura 18: Esquema de la posición de los LED entorno a los cassettes espaciales en los EC en alta resolución. La posición de los LED blancos es longitudinal, mientras que los azules y rojos están en el lateral izquierdo de todos los cassettes.

Finalmente las muestras se extrajeron del EMCS y una parte se instaló en congeladores (MELFI - congelador que opera en la ISS entre los +10 y -99°C - y se descargaron en el GLACIER - congelador disponible en el vehículo de descenso). Parte de las muestras de SG3 además se procesarán con el FIXBOX a bordo (ver apartado 2.2.4.1) y se descargarán a 4°C en la “Coldbag” con bloques de hielo (#SEG33118113-327) (Campana & Melendez 2011). Las muestras de SG1 y SG2 se recuperaron tras el amenizaje, se transportaron a la base de la NASA en ARC (California) y finalmente se entregaron al equipo investigador en Madrid. Para SG3 se esperan los mismos pasos logísticos.

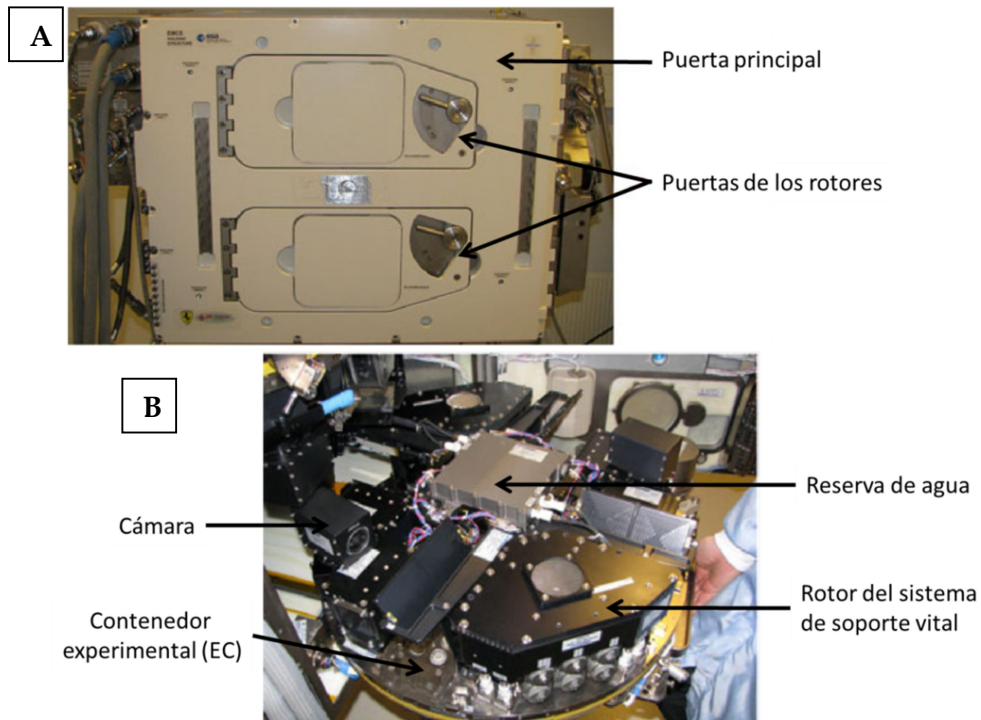


Figura 19: Esquema de las tecnologías espaciales en la ISS utilizadas en el Experimento SG. A) Fotografía del exterior del EMCS. B) Detalle del interior del EMCS. Este aparato de cultivo posee dos rotores. Cada rotor puede girar con distintas velocidades y de manera independiente el uno del otro. El soporte vital de cada rotor permite controlar la temperatura, la luz, el fotoperiodo, la humedad... Las cámaras permiten tomar fotos o videos de las plántulas dentro de las cajas.

A continuación (**Tabla 1**) se muestran las temperaturas y los tiempos máximos, mínimos y preferidos en los diferentes asos del experimento, desde la siembra hasta que se reciben las muestras, pasando por su fase de crecimiento en la ISS y todos los traslados requeridos.

Descripción	Duración		Temperatura (°C)		
	Pref	Máx	Mín	Pref	Máx
Realización de la siembra (semillas en goma guar)	<10 min	30 min	18	22	28
Almacenamiento del material biológico previamente al lanzamiento	<2 semanas	3 meses	18	22	28
Almacenamiento del material biológico en la ISS hasta el inicio de la fase de crecimiento	<2 semanas	3 meses	18	22	28
Montado de los EC en el EMCS e hidratación de los cassettes		3 horas	18	22	28
Fase de crecimiento	143 horas	145,5 horas	21,5	22	26
Transferencias de las muestras crecidas a bolsas de congelación		45 min	18	22	28
Almacenamiento de las muestras en la ISS	Tiempo determinado.	no		-80	-68
Transporte de las muestras a Tierra	Entre todas,	no		-80	-68
Devolución de las muestras al laboratorio	debería exceder de 6 meses			-80	-68

Tabla 1: Descripción de los requerimientos del experimento SG. Tiempos preferidos y máximos y de las temperaturas preferidas (pref), mínimas (Mín) y máximas (Máx) a lo largo de los pasos realizados.

2.1 Montaje de las muestras en los Cassettes

El nombre completo del CC utilizado es *experiment Unique Equipment / Plant Seedling Seed Cassettes*. Todos los protocolos relacionados con los CC siguieron las normativas de la NASA, reflejados en los documentos NASA. Cada CC tiene un volumen de 46x16x17 mmy está compuesta de dos partes, la base y la cubierta (**Figura 15**). La base consta a su vez de un soporte metálico con dos orificios para que el puerto sensor de temperatura y el puerto que permite la hidratación del experimento accedan a la CC. Encima se coloca un papel de cromatografía (Whatman 17 CHR) donde se embebe el medio de cultivo (ver punto 1.4) y una membrana cuadrículada de nitrocelulosa negra (VWR#28149-472) donde se colocan las semillas tras una cuidadosa selección (ver punto 1.3). La cubierta tiene dos paredes transparentes (permite que entre la luz blanca superior y las luces estimuladoras laterales) y otra pared con cuatro orificios cubierta con una membrana semipermeable para el intercambio de gases. Finalmente, posee un sistema de calentadores eléctricos transparentes en la parte superior de la cubierta para evitar la condensación de vapor de agua que dificultaría la captura de imágenes desde la cámara del EMCS a las plántulas *in vivo*.

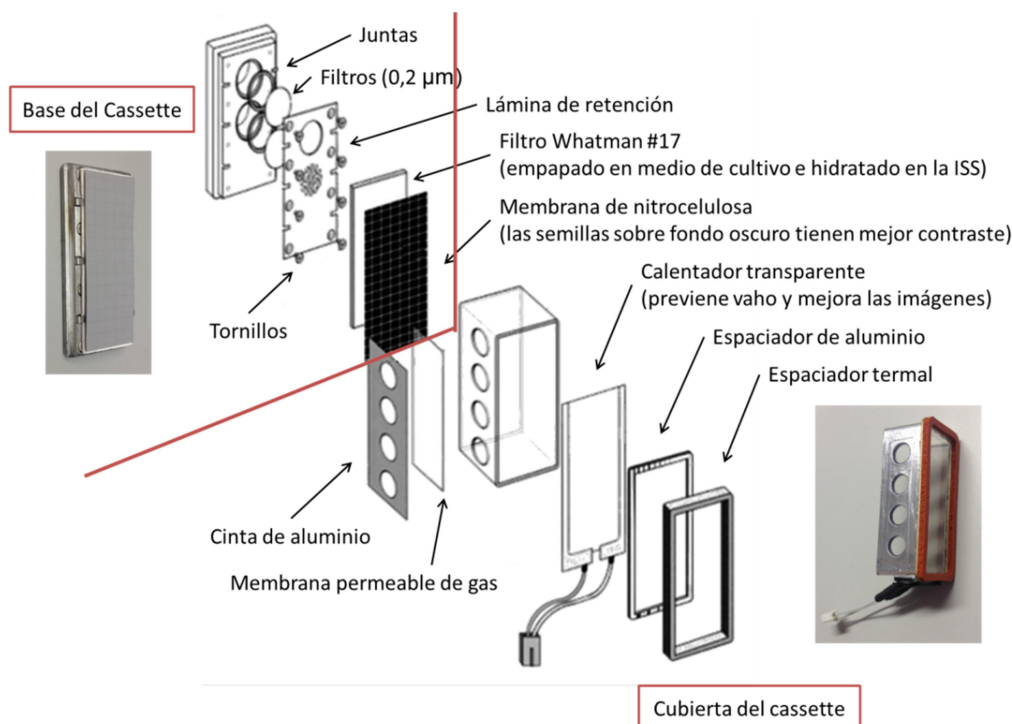


Figura 20: Ensamblaje de todos los componentes individuales del cassette espacial. Se distinguen en el esquema todos los componentes de la base (parte superior izquierda) y la cubierta (parte inferior derecha) y se adjunta una fotografía de cada una de las partes ensambladas antes de cerrar el CC.

2.1.1 Montado de las semillas

Se cortó la membrana cuadriculada de nitrocelulosa que irá sobre los papeles Whatman 17 CHR con las medidas de 1,63 x 4,6 cm ($\pm 0,03$). Sobre dichas membranas se hizo una inscripción con tinta blanca testada para su inocuidad biológica (Koh-I-Noor #9065-D) que sirvió para registrar el tipo de semillas que se ponen. A continuación se esterilizaron todas juntas en una placa Petri de cristal. Las semillas estériles se seleccionaron (ver apartado 1.3) bajo la lupa poniendo especial atención a: que la numeración del papel corresponde con la del ecotipo puesto; la altura a la que se ponen en el papel; a que el micrópilo quedase hacia arriba una vez cerrado el cassette; y a que la cantidad de goma guar que envuelve la semilla fuera suficiente como para adherirla al papel, pero no más, para que no pueda provocar toxicidad. Tras colocar las semillas, los papeles se dejaron secando de la goma guar en la campana durante mínimo 30 minutos. A continuación se podían almacenar incluso unos sobre otros en placa Petri estéril precintada con parafilm o pegarse directamente a las bases.

2.1.2 Cubiertas del cassette

Se esterilizaron 3 vasos de precipitados de cristal. Se diluyó etanol (Sigma #270741) al 70% con H_2O_{dd} y 40 μ l Tritón-X100 (Sigma #T9284) por litro, y se vertió a uno de los recipientes esterilizados marcado como "Sterilization". En los otros dos recipientes se vertió etanol al 100% y se marcaron como "Rinse 1" y "Rinse 2". Se introdujeron las cubiertas de los cassettes de cuatro en cuatro en el vaso de esterilización asegurándose de que se cubrían completamente, conectores eléctricos incluidos. El vaso se colocó en un sonicador durante 15 segundos para disgregar cualquier posible burbuja. Las cubiertas permanecieron en el recipiente durante 15 minutos y se agitó el medio cada minuto. Se cogieron las cubiertas de una en una con pinzas estériles y se pasaron al siguiente recipiente, "Rinse 1", evitando pasar exceso de líquido. Se agitó durante 30 segundos y se pasó al siguiente recipiente, "Rinse 2". Tras otros 30 segundos removiendo el medio con las pinzas, se pusieron sobre un papel estéril y se continuó con la siguiente cubierta. El tiempo de secado fue superior a 1 hora. Una vez secas se pueden almacenar largo tiempo en recipientes estériles. Se registró la hora de comienzo y de fin de todas las tandas de esterilización de cubiertas. Todo el proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar.

2.1.3 Ensamblaje de los cassettes

Cada base metálica tiene dos orificios donde se insertan el control de temperatura y el inyector de agua (por donde se hidratará el cassette en el EMCS). En cada una de estas oquedades se situó una junta (Fisher Scientific #SX0001301) y un filtro millipore (Fisher Scientific #GSWP01300) de $0,22\mu\text{m}$ de grosor para reforzar la esterilización dentro del cassette. A continuación se colocó la placa de sujeción con sus ocho tornillos de sujeción correspondientes y una gota de goma guar sobre cada tornillo a modo de sellado.

Los papeles de filtro de 163×475 mm embebidos en el medio de cultivo (ver apartado 1.4) y ya secos, se prensaron (largo superior e inferior) para facilitar que entre por las pestañas que tienen las bases metálicas. Este proceso se repitió con cada una de las bases que compongan el experimento. Toda esta estructura se autoclavó en recipientes en los que podrían quedar almacenadas durante un máximo de 90 días.

Se cogieron las bases y sobre el papel de cromatografía se puso el papel de nitrocelulosa con las semillas, asegurándose que el medidor para la temperatura de la base metálica queda a la izquierda y las semillas con el micrópilo hacia la parte superior. Ambos papeles necesitan adherirse uno al otro por 6 gotas de goma guar (4 en cada esquina y dos en posiciones centrales), sin ser gotas muy abundantes que pudieran llegar a afectar el desarrollo de las semillas, ni demasiado poco como para que sea absorbido rápidamente por el papel blanco antes de llegar a poner el de nitrocelulosa. El tiempo de secado típico fue de unos 30 minutos.

La cubierta se colocó con los cables de la resistencia térmica a la derecha, con la toma de temperatura de la base a la izquierda y las semillas en la parte superior (**Figura 21**).

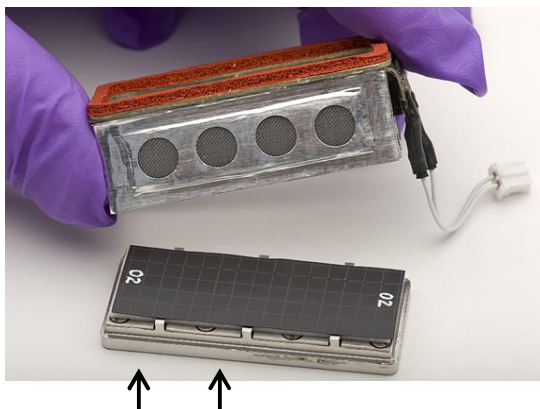


Figura 21: Montado del cassette espacial. Los sensores de temperatura y la entrada de agua deben de situarse a la izquierda (sólo visible desde abajo, donde indican las flechas) y la cubierta se debe de colocar con las conexiones eléctricas hacia la derecha.

2.2 Detalles técnicos de los vuelos espaciales en la ISS

2.2.1 Línea temporal del Experimento espacial “Seedling Growth”

El experimento *Seedling Growth* es el experimento de biología de plantas más ambicioso realizado hasta ahora en la ISS, no solo por sus objetivos científicos sino también por su volumen, que obliga a repartir los experimentos en al menos 3 misiones espaciales (SG1, SG2 y SG3) que incluyen un total de 12 “runs” o unidades experimentales en el EMCS. Como muestra la **Figura 22**, SG empezó en 2012 y se terminará en 2017. El trabajo inherente a esta tesis está representado en negro. Se trata:

- de la recepción y del procesamiento de parte de las muestras de SG1,
- de los test de preparación, del ST, del OVT y de la preparación de las muestras de SG2, y
- de los test de preparación de SG3.

También durante la tesis se participó en otras etapas de los experimentos SG marcadas en gris en la **Figura 22**. Actualmente, las dos primeras misiones ya se han ejecutado por completo en el espacio.

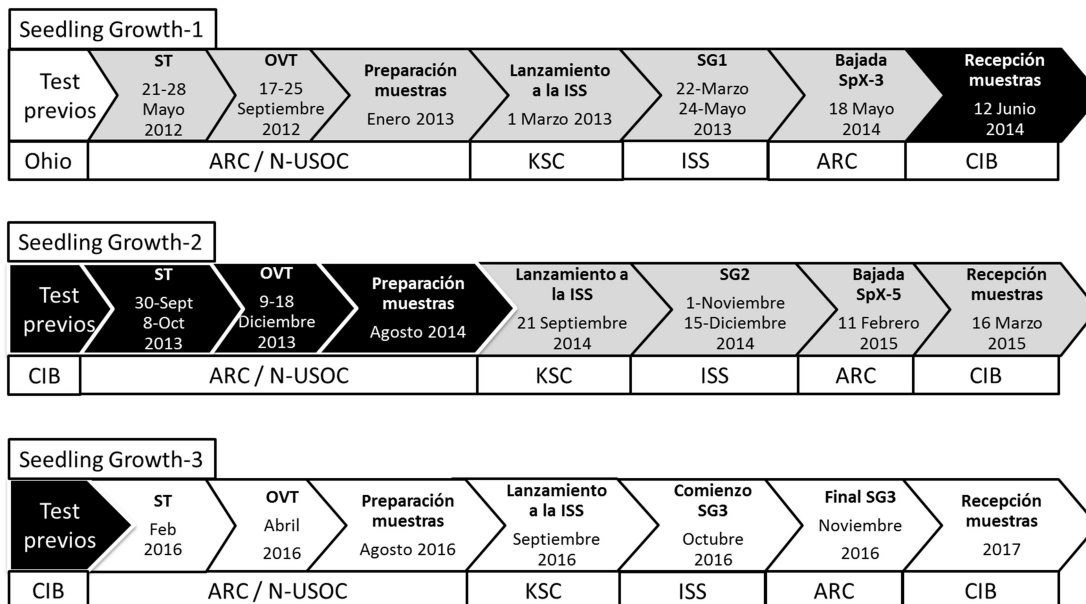


Figura 22: Línea temporal de las actividades de las tres partes de las que consta el proyecto espacial Seedling Growth. Las fechas de SG3 son las esperadas en el momento de la redacción de esta tesis y está sujeto a modificaciones, principalmente debidas a retrasos de los lanzamientos espaciales. Las casillas en negro corresponden con las actividades realizadas por completo y personalmente (viajes o estancias breves) durante el periodo de doctorado. Las grises muestran las etapas que se hicieron con la colaboración de los grupos americanos.

2.2.2 Seedling Growth I (SG1)

Antes de que comenzara la primera misión, el SG1, hubo que realizar dos ensayos del experimento espacial, el ST y el OVT que se prepararon en Mayo y Septiembre de 2012 respectivamente, mientras que las muestras de vuelo se prepararon en enero de 2013 y se lanzaron en el SpaceX-2 NET a la ISS en marzo, realizándose el experimento en órbita en ese mismo mes. Todas las muestras se congelaron en el MELFI (congelador que opera en la ISS) hasta que regresaron a la Tierra en el SpaceX-3 NET en diciembre 2013. Fueron entregadas al laboratorio en junio de 2014.

Seedling Growth I (SG1) fue una misión liderada por el equipo norteamericano (Dr. Kiss/NASA) que pretendía estudiar el fototropismo sin el efecto perturbador de la gravedad, y por ello se utilizó la colección de mutantes fototrópicos (*Ler*, *phyA* y *phyB*). La misión se compuso de 4 runs que se realizaron de forma sucesiva para que los patrones lumínicos de un rotor no interfirieran con el del otro rotor. En esta primera misión, las condiciones de cultivo de los runs eran similares, solo se diferenciaron en el nivel de gravedad durante los dos últimos días de crecimiento (microgravedad, 1g y gravedades parciales de 0,1g y 0,3g). Todos los runs se iniciaron con un crecimiento inicial a 1g en oscuridad (desde T 0h hasta T+12horas), seguido de una estimulación con luz roja entre T+12 horas y T+16 horas para incidir en la germinación. A continuación, las plántulas crecieron en luz blanca continua hasta T+96 horas (**Figura 23**). Al final de este periodo, las plántulas tienen 4 días y pueden ser utilizadas para la fotoestimulación en gravedad alterada (μg / 0,1g / 0,3g / 1g). Tras seis horas en oscuridad, la mitad de los EC se mantuvieron con luz roja continua y la otra mitad principalmente con luz azul (con o sin un pulso de luz roja).

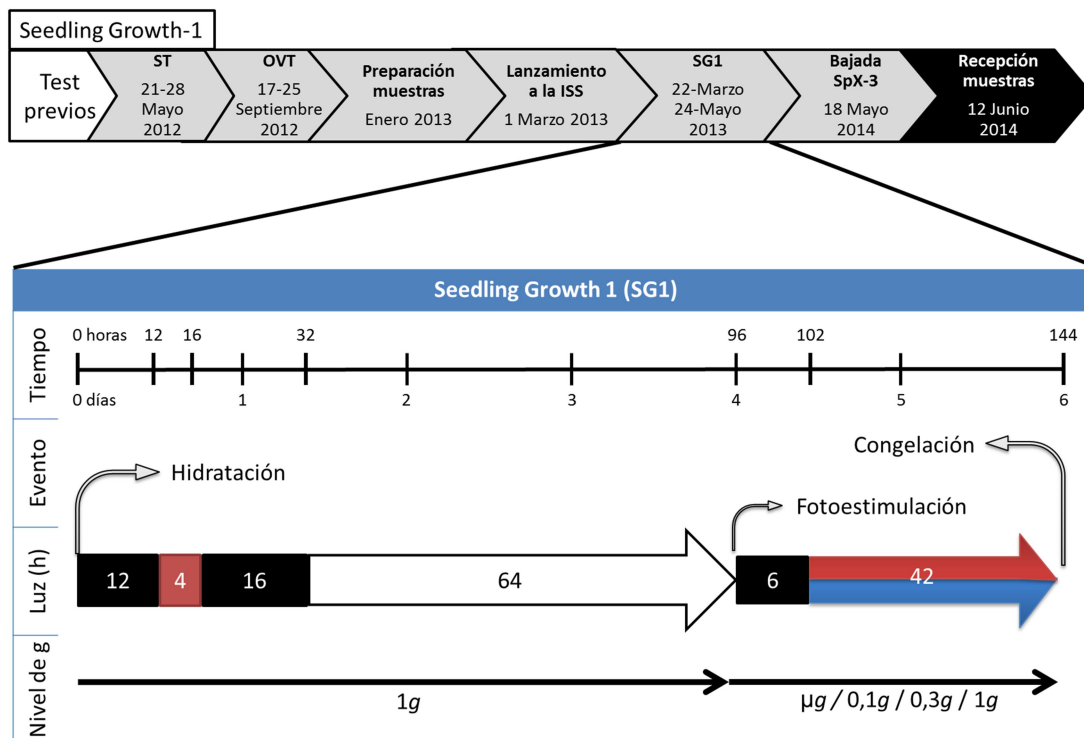


Figura 23: SG1. Diseño experimental de los 4 runs (sucesivos) que componen Seedling Growth 1. Se muestra las condiciones de luz y gravedad así como las operaciones realizadas durante los 6 días de crecimiento. El mismo juego de luces en las últimas horas se realiza en cada uno de los 4 ECs que componen un run.

Transcurrida la fase de crecimiento, las muestras se congelaron y se mantuvieron en el MELFI. El astronauta abrió los EC y colocó los cassettes en unas cartucheras criogénicas (transcurrió un promedio máximo de 45 minutos desde la parada del rotor hasta la congelación) que fueron depositadas en el congelador MELFI a -95°C . Esto permitió almacenarlas en la ISS en estado óptimo de conservación durante el tiempo que una nave pudo regresarlas a la tierra (1 año). Dicho regreso se hizo en el congelador GLACIER de la cápsula "Dragon". Asegurada la conservación de las muestras congeladas durante todo el proceso, las muestras se recuperaron tras su amerizaje en el Océano Pacífico y se trasladaron en instalaciones de la NASA, en las que se abrió cada cassette para recuperar una por una las plántulas crecidas en la ISS. Se pusieron en tubos de ensayo con RNALater (Ambion #AM7020) para su transporte hasta nuestro laboratorio en Madrid para preservar las macromoléculas de la mejor manera posible.

Nos referiremos a todos los experimentos que se realicen en tierra con un diseño similar a SG1 como experimentos en **condiciones SG1/2**.

2.2.3 Seedling Growth II (SG2)

Seedling Growth 2 (SG2) se montó en agosto de 2014, partió de Cabo Cañaveral el 21 de septiembre a bordo de SpaceX-Dragon SpX-4 y fue ejecutado durante el mes de noviembre. Las muestras retornaron a la Tierra en febrero de 2015 y el 16 de marzo llegaron a nuestro laboratorio de Madrid. SG2 tenía liderazgo conjunto entre el Dr Kiss (NASA) y el Dr. Medina (ESA). Tuvo dos fases de ensayos previos en octubre (ST) y en diciembre (OVT) de 2013.

Seedling Growth II (SG2) constó de 4 runs. Los dos primeros runs tuvieron una disposición y configuración igual al SG1 porque se utilizó un solo rotor. Las muestras tuvieron la misma distribución en los cassettes. Además, el tratamiento de fotoestimulación, así como el análisis de imágenes y el posterior análisis de las muestras congeladas fueron iguales a SG1. La diferencia fue que las gravedades fraccionarias fueron de 0,5g y 0,8g. De esta forma, completando con la primera parte de SG, se cubrió un espectro de gravedades desde μg a 1g.

El run 3 fue totalmente diferente (**Figura 24**). En este run se utilizaron los dos rotores del EMCS. Las muestras estaban relacionadas con auxina y nucleolina, es decir, mutantes del transporte como *aux1.7* y *eir1.1*, mutantes en la recepción de la auxina, *tir1*, y mutantes de la nucleolina como *nuc-L1.2* y *nuc-L2.2*. Se colocaron 22 ó 28 semillas por cassette: 28 plántulas son para optimizar biomasa, mientras que los de 22 (8 en la mitad izquierda y 14 en la mitad derecha), además de obtener biomasa también servirán para que se pueda estudiar la dirección del crecimiento al activar la luz roja los dos últimos días (con las ocho plántulas que crecen sin tigmotropismo en la mitad izquierda). Otra diferencia en este run fue la luz, durante los primeros días de crecimiento hubo ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y los dos últimos días una fotoestimulación continua de luz roja en la mitad de los EC y ningún LED activo en la otra mitad (oscuridad).

Fue necesario un cuarto run debido a problemas técnicos en la hidratación de varios cassettes en el EMCS durante el run 3, correspondientes a los cassettes 271 (Col-0), 272 (Nuc-L1), 273 (Col-0), 274 (Nuc-L2) y 275 (Col-0).

SG2 se congeló de la misma manera que SG1 para su posterior análisis. Debido al retraso en su recepción, el análisis de las muestras no ha podido ser incluido en este trabajo.

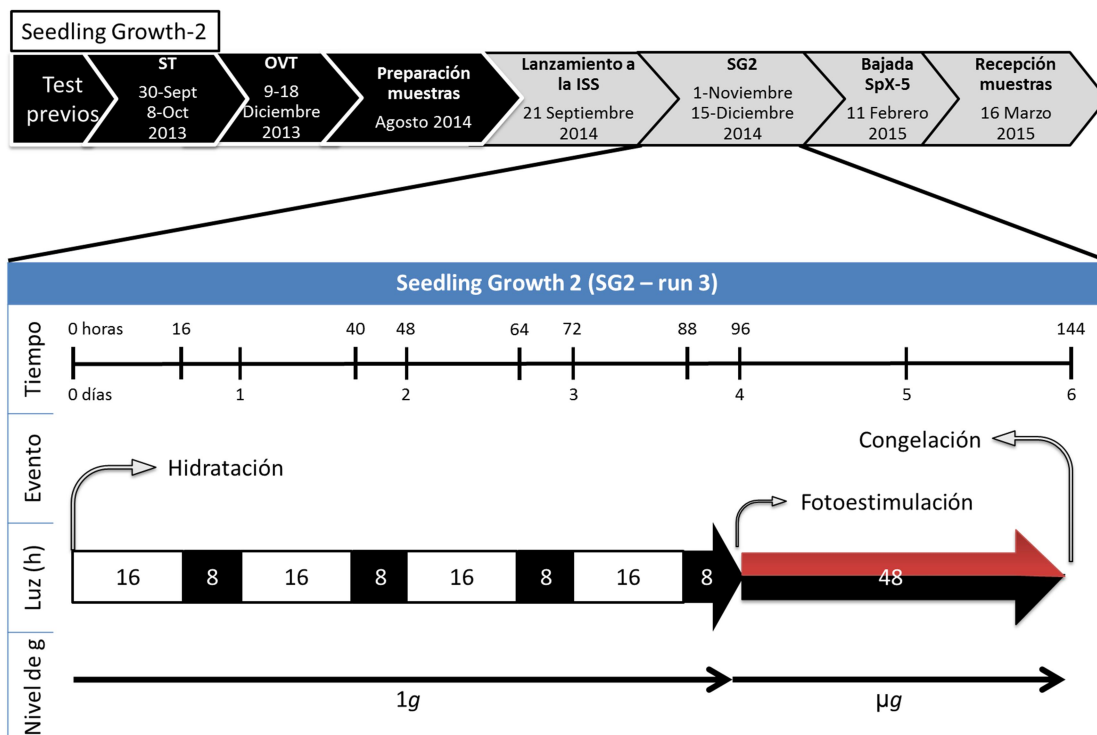


Figura 24: SG2-3. Esquema del crecimiento de las líneas de auxina y nucleolina durante los run 3 y 4 de SG2. Las muestras crecieron en microgravedad real o a 1g durante 4 días con ciclos de luz y oscuridad y dos días más en luz roja continua u oscuridad. Al final del periodo de crecimiento las muestras fueron congeladas.

2.2.4 Seedling Growth III (SG3)

El lanzamiento de *Seedling Growth 3* (SG3) ha sufrido varios retrasos y no se espera antes del verano de 2016 (SpaceX-9), pero las actividades previas comenzaron ya en 2012. Este experimento tiene la novedad de que la mayor parte de las muestras no serán congeladas sino que serán fijadas. Al ser esta misión responsabilidad principal del equipo europeo del Dr. Medina (ESA), se utilizará únicamente las líneas del transporte y sensibilidad a auxina (*eir1.1*, *aux1.7* y *tir1*) y la colección de mutantes de nucleolina (*nuc-L1.2* y *nuc-L2.2*) junto con el *wild-type* y otras líneas reporteras de expresión de genes como *DR5rev::GFP*.

SG3 se compone de 3 runs cada uno de ellos con una gravedad constante durante todo el proceso de crecimiento y de fotoestimulación: microgravedad real (run1), 1g (run2) y gravedad parcial de 0,3g (run3). El programa de luz de SG3 será el mismo que el run 3 de SG2. Para cada run, la mitad de las muestras serán congeladas, y la otra mitad serán fijadas en el espacio, con ayuda del FIXBOX. Se harán dos tipos de fijaciones químicas: uno con una mezcla de glutaraldehído al 4,5% y paraformaldehído al 1,5% en PBS y otro con paraformaldehído al 5%. Las dos mezclas de fijadores llevan 50% de ferrofluido.

Los experimentos realizados en la Tierra con diseño similar a los runs de SG3 y los run 3 y 4 de SG2, lo denominaremos **condiciones SG2/3**.

2.2.4.1 FixBox

El FixBox es un hardware especializado en fijación de cassettes diseñado por la empresa NTE-Sener. Cuando el crecimiento de las plantas de SG3 finalice, el astronauta cogerá cada uno de los cassettes del TROPI, perforará un pequeño agujero en la parte superior de la cubierta del cassette (suficiente para permitir la salida de aire cuando se introduzca el fijador en el cassette herméticamente cerrado) y lo colocará lo antes posible en el rotor del FixBox. Cuando estén los 5 cassettes enganchados al rotor central, se irá cerrando el Fixbox progresivamente de forma que, sin romper los niveles de triple aislamiento requeridos en la ISS, una aguja perforará la bolsa que contiene el fijador en la base del FixBox y causará la entrada del fijador hasta que se llene al menos un 80% del volumen total del cassette (**Figura 25**). Tras 2 horas a temperatura ambiente el astronauta pondrá el FixBox a 4°C hasta su descenso en Tierra con la siguiente sonda.

La fijación química en microgravedad es un proceso muy difícil de realizar. El primer grupo de problemas viene de las condiciones de seguridad que hacen que no se puede llenar todo el cassette con la mezcla química. El segundo grupo de problemas es que en microgravedad los líquidos no se mantienen al fondo de la caja y si las muestras no están bien sujetas, tampoco se mantienen al fondo de la caja. Eso hace que si no se toma un mínimo de precauciones, hay pocas posibilidades para que el fijador entre en contacto con las muestras. Por esta razón, se añade el ferrofluido en el fijador y se coloca un imán en la parte central del FixBox en contacto con la base de los cassettes. De esa manera, el hierro contenido en el fijador debería ser atraído por el imán y de esa

manera se podría retener el líquido en el fondo de la caja. Esperamos que el fijador se comporte en microgravedad al igual que lo haría en Tierra, es decir, que se mantenga en la parte basal junto con las semillas. Como también esperamos que las plantas se mantengan ahí y no se den golpes, creemos que las muestras estarán así sumergidas durante todo el proceso. Estas primeras horas son determinantes para una correcta fijación. Una vez transcurrido ese tiempo, valdría con que sigan hidratadas en todo momento para que no se dañe la estructura.

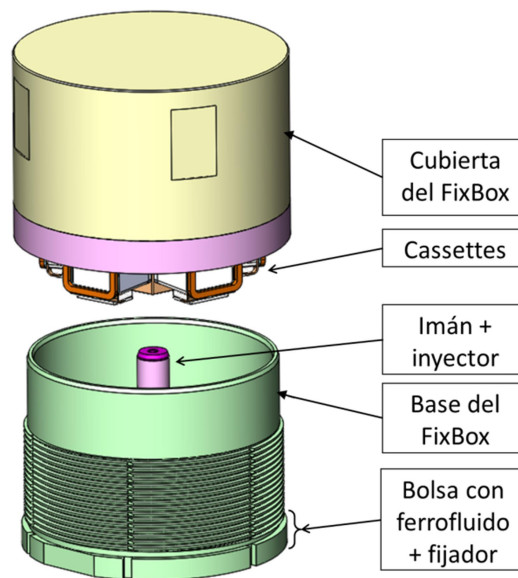


Figura 25: Esquema del FixBox. Cinco cassettes se enganchan en la cubierta del FixBox. El astronauta enroscará dicha cubierta a la base y se producirá la fijación. Un imán en la zona central mantendrá el volumen de ferrofluido con el fijador en la parte más próxima al papel de nitrocelulosa dónde crecieron las plantas.

3 Condiciones experimentales de las simulaciones en Tierra

Una parte sustancial de esta tesis se basa en experimentos de simulación en tierra, que pretenden recrear las condiciones de los experimentos que tendrán lugar en la ISS y en el EMCS, tanto por la preparación del vuelo espacial como de su validación posterior. Su validación podría permitir incrementar el número muestras si por cuestiones técnicas se requieren más muestras de las que podrían crecer en un experimento espacial en la ISS. Se trabajó con tres simuladores de microgravedad que se basan en el mismo fundamento, movimientos mecánicos que aleatorizan el vector gravedad hasta hacerlo omnidireccional para que el organismo biológico sea incapaz de localizarlo y responder a sus estímulo. Concretamente los equipos utilizados fueron dos clinostatos 2D y una versión más elaborada (3D) denominada *Random Positioning Machine* (RPM).

3.1 Condiciones en la Random Positioning Machine (RPM)

La RPM más usada para nuestros experimentos está localizada en el laboratorio de la *Faculté de Médecine Rangueil* de la Université III - Paul Savatier en Toulouse (Francia) al cargo de la Dra. Pereda, y se trata de una RPM portátil (Huijser 2000) (**Figura 26A**). También se utilizó puntualmente un equipo similar disponible en ESTEC, en el principal centro de investigación de la ESA (Nordwijk - Países Bajos), al cargo del Dr. van Loon (Hoson et al 1992).

Este simulador de ingravidez se basa en la rotación aleatoria de la muestra en torno a dos ejes con objeto de cambiar al azar la dirección del vector de la gravedad de forma tan frecuente que sobrepase la capacidad de detección de los sensores biológicos de la gravedad (Borst & van Loon 2009). En la práctica, el organismo se comporta como si no hubiera ningún vector gravedad. Los dos ejes de rotación funcionan con dos motores independientes controlados mediante un ordenador. La velocidad angular se establece en función del sistema biológico en estudio, es decir, los sistemas que respondan rápidamente a los cambios en el vector gravedad requerirán más velocidad, aunque a coste de añadir más fuerzas secundarias. Se ha calculado que en el punto central de la rotación ± 5 cm y con una velocidad angular máxima de $60^\circ/\text{s}^{-1}$, la gravedad residual existente es de $10^{-4}g$ (van Loon 2007). Esta RPM se localiza dentro de un incubador en el que se controlan las condiciones ambientales de temperatura y humedad.

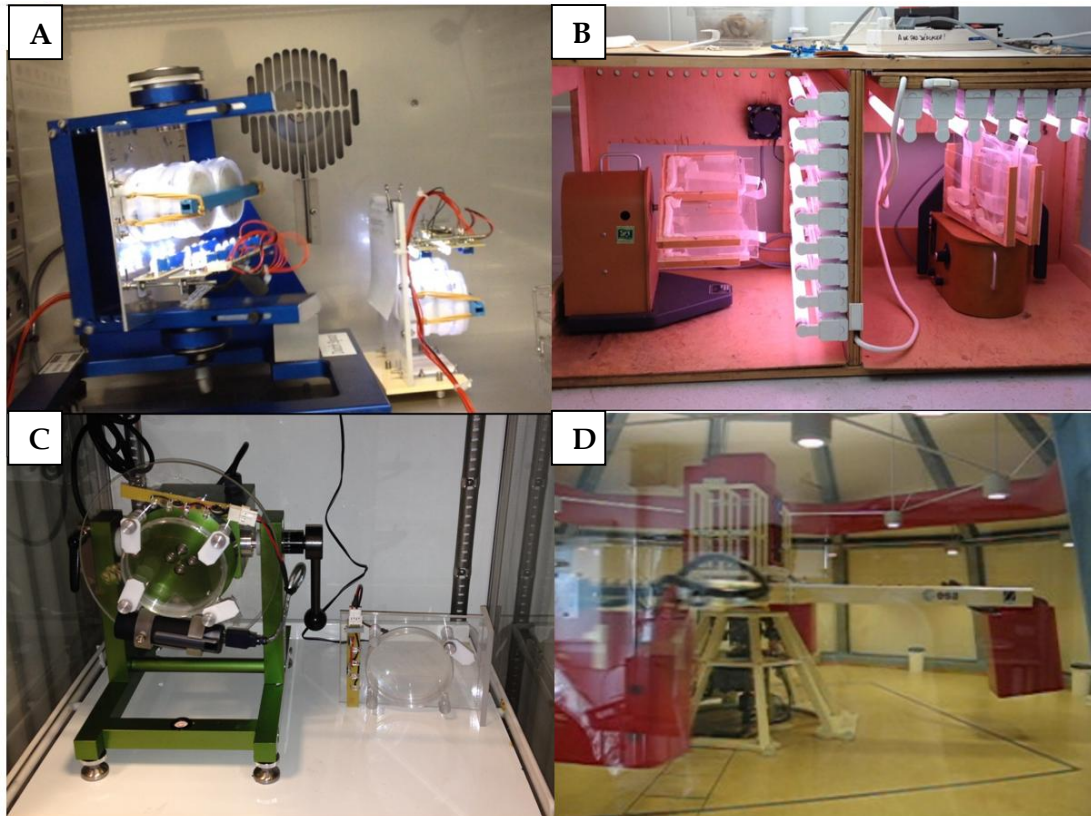


Figura 26: Simuladores de gravedad alterada en Tierra (GBF). A) Imagen de un experimento en la *Random Positioning Machine* (RPM) de Toulouse. A la izquierda, de color, la RPM sobre la que se coloca las placas Petri del experimento. Se compone de dos brazos articulados que rotan de forma aleatoria con un programa informático. Unos LED suministran la luz que las plantas requieran. A la derecha, dentro del mismo incubador se coloca el control con las mismas condiciones lumínicas. Estos aparatos están instalados en una cámara con control de humedad y temperatura.

B) Clinostato 2D de París. Dos equipos idénticos con diferente orientación permiten colocar hasta 8 placas Petri grandes (12x12 cm). El clinostato de la izquierda (microgravedad) tiene el eje horizontal, de manera que las muestras que se colocan en él, cambian su vector gravedad constantemente. A la derecha, el otro clinostato tiene el eje de rotación en vertical (control 1g), de manera que las muestras están expuestas a las mismas vibraciones que en el otro clinostato, pero el vector de la gravedad no cambia.

C) Clinostato 2D/ONU de Madrid. Consta de un motor que puede mover hasta 3 placas de 6cm de diámetro (límite puesto para que todas las placas reciban una irradiación lumínica similar). El control se sitúa estático en la misma cámara de cultivo.

D) Fotografía de la *Large Diameter Centrifuge* (LDC) de ESTEC en funcionamiento. Consta de un eje central al que está anclado y de 4 brazos con una góndola en cada extremo que sirve de incubador para el experimento a realizar. La iluminación consiste en unos tubos fluorescentes colocados en la parte superior de la góndola.

3.2 Condiciones en el clinostato 2D

Se usaron dos clinostatos: uno localizado en el grupo dirigido por la Dra. Carnero en la Université VI - Pierre et Marie Curie en París (Francia) y otro obtenido recientemente en un proyecto de la ONU coordinado por el Dr. Herranz en nuestro laboratorio principal en el Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid (España).

El equipo dispone de dos clinostatos que rotan a 1 rpm: uno con el eje en posición horizontal, de manera que las muestras están girando alrededor y cambiando el vector de la gravedad constantemente, mientras que el control 1g se consigue tumbando el otro clinostato de manera que el eje de rotación se queda en vertical y las muestras están expuestas a las mismas vibraciones que el experimento pero manteniendo inalterada la dirección del vector de la gravedad. Este último se considera el clinostato control. En el clinostato con eje horizontal los tubos de luz están en un lateral, mientras que en el control de eje vertical las luces están en el techo (**Figura 26B**) con un tabique por el medio para que no interfieran. Las luces disponibles en el dispositivo son tubos fluorescentes T5 de 1650 lm (20W). En el clinostato horizontal, la aceleración centrífuga producida por una rotación de 1 rpm, es de $1,10 \cdot 10^{-3} \text{ ms}^{-2}$, lo cual corresponde a una gravedad de $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ g}$.

En nuestro laboratorio tenemos disponible un clinostato más pequeño que el parisino, pero que consigue microgravedad simulada de la misma manera (**Figura 26C**). El control se sitúa en el mismo incubador, suficientemente separado del clinostato. Los dispositivos de iluminación para este hardware son unos tubos fluorescentes T5 (25W) que se encuentran en las paredes del incubador dónde se encuentra dicho clinostato y el control. La iluminación roja se consigue desde el propio aparato, con LED rojos colocados en los laterales, y que rotan con la placa Petri, de manera que la iluminación con este fotón es continúa desde el mismo foco. El control dispone de unos LED rojos idénticos al del clinostato.

3.3 Condiciones en la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC)

Una instalación adicional que hemos utilizado en ESTEC es la *Large Diameter Centrifuge* (LDC). Además de conseguir hipergravidades desde 2g a 20g, esta centrífuga con 4-6 góndolas con capacidad de carga de 80kg cada una, es perfecta para situar en el interior de una de ellas equipos adicionales, en nuestro caso una RPM portátil, y así conseguir microgravedad en un ambiente de hipergravedad. Lo más importante es que, debido a su gran diámetro (8 metros) las fuerzas laterales que se generan durante la rotación se minimizan (van Loon et al 2008). Los controles de este aparato deben de ser internos, es decir, así como el control de la RPM va en el mismo incubador pero no toca el aparato, en este caso, debe de haber un control sobre la máquina que reciba las vibraciones que recibe la muestra pero sobre el propio eje para que la velocidad que alcance sea despreciable. Las góndolas tienen sensores de aceleración y temperatura y permiten acoplar equipos de video cuya señal se graba en el exterior (**Figura 26D**). La sala necesita estar continuamente climatizada para reducir la elevada temperatura que provoca la fricción de los brazos con el aire.

3.4 Tratamientos recibidos en los experimentos en Tierra

Todos los dispositivos de simulación de microgravedad estaban situados en incubadores, lo que permitió programar la temperatura a 23°C y la humedad relativa al 80%, patrones estándar en todos los experimentos.

En cuanto a la luz, el experimento en RPM con muestras de mutantes de fitocromos se hizo con las condiciones lumínicas SG2/3 pero con la gravedad constante durante todo el experimento (o 1g o μg), mientras que el resto se mantuvieron ciclos de luz / oscuridad (16/8 h) durante todos los días de crecimiento, es decir, condiciones SG2/3 sin fotoestimulación (pag. 70). Se garantizó que las luces LED utilizadas proporcionaran la misma intensidad lumínica en el rango de 40-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que en el hardware TROPI de la ISS, facilitando que la intensidad que llega a las plántulas fuera similar.

Para la esterilización de las semillas y el preparado del medio de cultivo se siguió el protocolo estándar. En cuanto al soporte, se tuvo que modificar porque los simuladores no están preparados para acoger cassettes TROPI. Para simular lo mejor posible las condiciones de crecimiento de las plantas en los cassettes y optimizar el área útil del

hardware, en la RPM se emplearon placas Petri de 6 cm de diámetro con medio de cultivo suplementado con agar y un papel de nitrocelulosa (VWR #28149-472) dónde se colocaban las semillas seleccionadas (como se indica en el apartado 1.4, página 58). En el clinostato de París se ponían placas cuadradas de 12 cm de lado con medio de cultivo suplementado con 1% sacarosa y agar (ver página 58).

En Toulouse se realizaron 5 runs que permitieron crecer todos los mutantes disponibles (**Figura 27**). El medio de cultivo utilizado fue estándar (ver apartado 1.4) con agar en placas Petri y con papeles de nitrocelulosa. La esterilización de las semillas fue estándar (ver apartado 1.2), se sembraron 60 semillas por placa divididas en dos filas que crecieron durante 6 días. Las condiciones lumínicas en los runs 1 y 2 fueron de ciclos de luz/oscuridad durante los 4 primeros días y los dos últimos, luz continua roja u oscuridad (condiciones RPM-1) (**Figura 28**). En los runs 3, 4 y 5 no hubo periodo final de fotoestimulación y se continuaron los ciclos de luz/oscuridad (condiciones RPM-2). Con las condiciones de RPM-1 se crecieron líneas mutantes de fitocromos y con las condiciones RPM-2, las líneas mutantes de auxina y nucleolina. El material congelado tras el run 1 y 3 sirvió para extraer RNA y hacer qPCR; el material congelado del run 4 se utilizó para extraer las proteínas y hacer *western blot* con anticuerpos antinucleolina; las semillas fijadas fueron observadas en microscopía confocal y en luz transmitida. De estas observaciones se pudo calcular la cantidad de células por unidad de longitud y medir el área nucleolar para inferir competencias meristemáticas de crecimiento y proliferación. El control 1g se colocó en la misma cámara en la que estaba la RPM y de espaldas para que los LED, que eran iguales en control y experimento, no interfirieran entre sí.

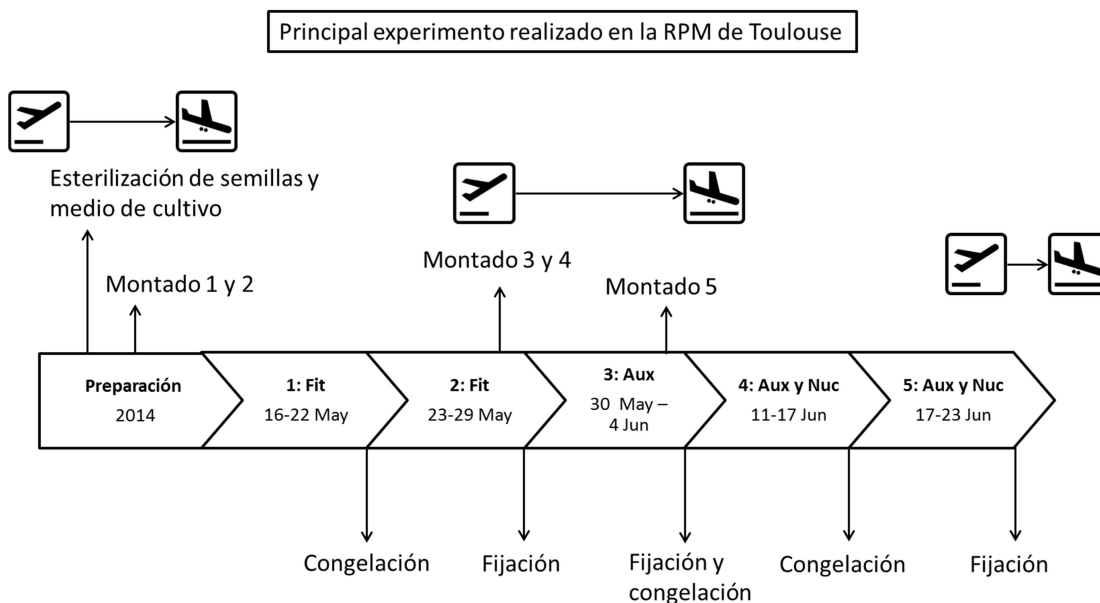


Figura 27: Principales experimentos realizados en la RPM de Toulouse. En los runs 1 y 2 crecieron mutantes de la colección de fitocromos. Las muestras del run 1 se congelaron y las del run 2 se fijaron químicamente. En el run 3 crecieron mutantes de la colección de auxina y parte se fijaron y parte se congelaron. El run 4 sirvió para congelar muestras de mutantes de la colección de auxina y de nucleolina y en el run 5 esas mismas muestras se fijaron de manera química. Fit: uso de mutantes de la colección de fitocromos; Aux: mutantes relacionados con auxina; y Nuc: empleo de mutantes relacionados con nucleolina. El símbolo (✈) indica un viaje a Toulouse realizado para preparar material o recoger muestras de runs acabados y el símbolo (✈) indica retorno a Madrid.

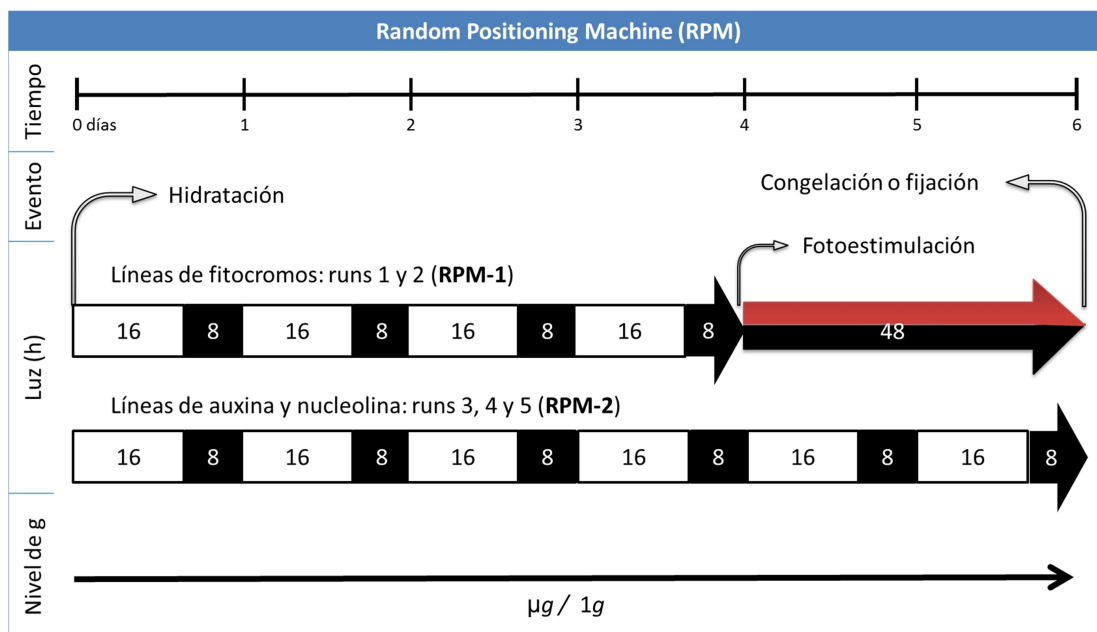


Figura 28: Condiciones de los experimentos realizados en la RPM de Toulouse. Arriba) Abajo) Programa de luces empleados en los experimentos realizados con RPM. Fit: líneas de fitocromos; Aux: líneas de auxinas; Nuc: líneas de nucleolinas.

Los experimentos realizados en el clinostato de París fueron los correspondientes al estudio del desarrollo de raíces secundarias en microgravedad; al efecto de auxina exógena en microgravedad; los estudios de ciclo celular determinado por citometría de flujo; y en el clinostato de nuestro laboratorio se realizó el experimento de crecimiento de muestras en **condiciones SG2/3** pero con gravedad constante (**Figura 29**). La formación de las raíces secundarias se observó en plántulas de 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días, el estudio con auxina exógena se hizo con plántulas de 4 días, la citometría de flujo con plántulas de 4 y 6 días y la fotoestimulación con plántulas de 6 días. Excepto el periodo de fotoestimulación, las plántulas recibieron una iluminación de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura estándar de 22°C . El dispositivo parisino permite utilizar ocho placas Petri cuadradas (Deltalab #200204) para maximizar la superficie útil de microgravedad.

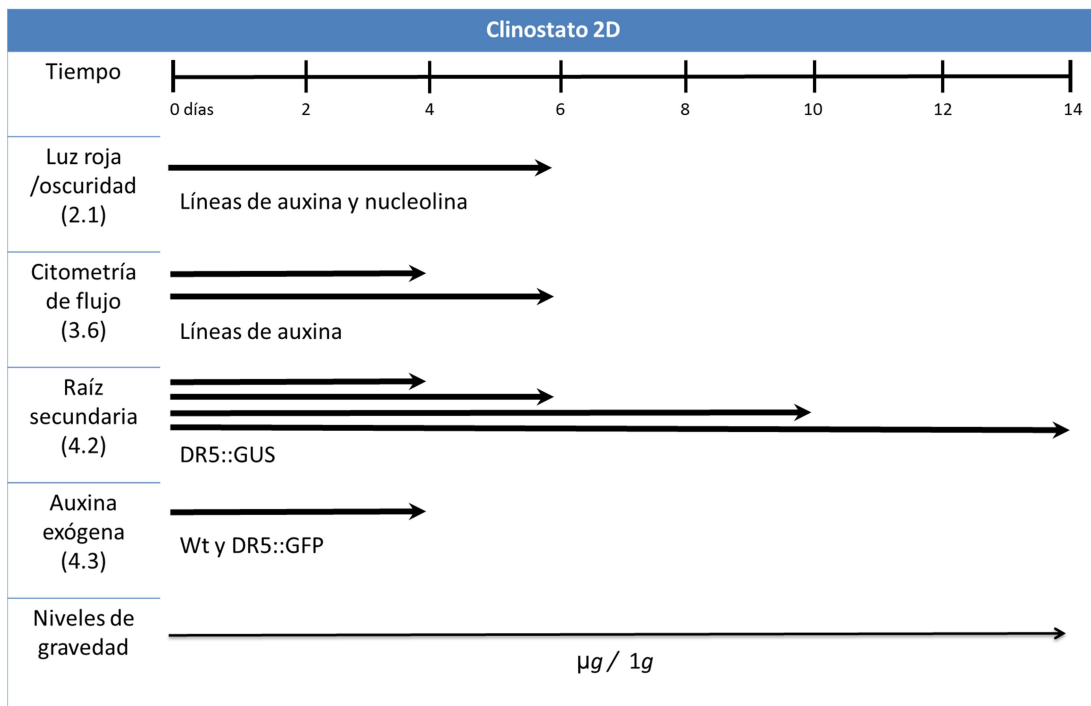


Figura 29: Esquema de los experimentos realizados clinostatos 2D. Se muestra la duración de los experimentos, las líneas de *A. thaliana* crecidas y el nivel de gravedad empleado. Entre paréntesis se muestra el apartado de resultados al que hace referencia.

El clinostato de la ONU sólo es apto para placas Petri de 9 cm de diámetro y no más de dos/tres placas a la vez (para asegurarse que la luz llegue correctamente a todas ellas). La luz roja se conseguía apagando las luces del incubador y conectando unos LED unidos al rotor del clinostato de manera que la dirección del haz de luz procedía siempre de la misma dirección. Para las muestras en oscuridad se envolvieron las placas en papel de aluminio. La velocidad de rotación fue de 1 rpm, tanto en París como en Madrid, y el control se colocaba en el mismo incubador y con su propia fuente de Luz LED, separado del clinostato para que no recibiera el haz de luz del hardware.

En ESTEC se utilizó la LDC. Se crecieron plántulas con construcciones transgénicas fluorescentes durante 4 días a 22°C en medio de cultivo con agar. Lo hicieron simultáneamente en una RPM homóloga a la tolosana, en una RPM dentro de la centrífuga (LCD) y directamente en la LDC.

Tras el experimento en el simulador de ingravidez y de manera general, se tomaron fotografías para evaluar su ratio de germinación y el crecimiento de la raíz. Después las muestras se podían fijar o congelar de forma similar a lo que ocurre en el experimento espacial. En caso de fijarse se sumergieron durante un mínimo de dos horas en el fijador glutaraldehído (3%) con paraformaldehído (1%) para estudios estructurales o sólo en paraformaldehído (4%) para inmunofluorescencias. Tras este tiempo se renovó la solución y se transportó hasta Madrid con un acumulador de hielo (para mantenerle en una temperatura próxima a 4°C). Las muestras fijadas de esta manera sirvieron para realizar técnicas de microscopía.

En caso de congelarse, las placas fotografiadas se cerraron y sumergieron en nitrógeno líquido o bien las muestras se cortaron primero con tijeras oftalmológicas, separando parte aérea y parte radicular para analizar cada fracción en tubos de ensayo diferentes antes de sumergirlos en nitrógeno líquido. En ambos casos se transportó en nieve carbónica hasta Madrid para su análisis. Las muestras congeladas sirvieron para realizar técnicas de transcriptómica y proteómica.

3.5 Tratamiento recibido en experimentos de efectos sinérgicos de estrés ambiental

Como complemento a los experimentos de estrés gravitatorio se realizaron dos experimentos puntuales de choque térmico y de respuesta a auxina exógena.

Las líneas utilizadas en el experimento de choque térmico fueron *wild-type* Col-0 y varias líneas con alteración de la nucleolina (**Figura 30**). Mutantes *nuc-1.1*, *nuc-1.2*, *nuc-2.1*, *nuc-2.2*, y otra línea mutante *nuc-2.2* al que se le ha reinsertado la NUC-L2 (*nuc-2.2::NUCL2*). Crecieron a dos tiempos, siendo el corto de 13 días y el largo de 17, con una temperatura estándar de 22°C. En el experimento corto, las últimas 24 horas las plantas estuvieron a 37°C y a continuación se fijaron. El tratamiento largo incluía un choque térmico de 48 horas a los 12 días de crecimiento, más 3 días de recuperación a 22°C con una fijación igual a la del experimento corto. La fijación en paraformaldehído permitió realizar inmunofluorescencias con dos anticuerpos de forma simultánea para estudiar su colocalización: nucleolina (Alexa-488) y fibrilarina (Alexa-647).

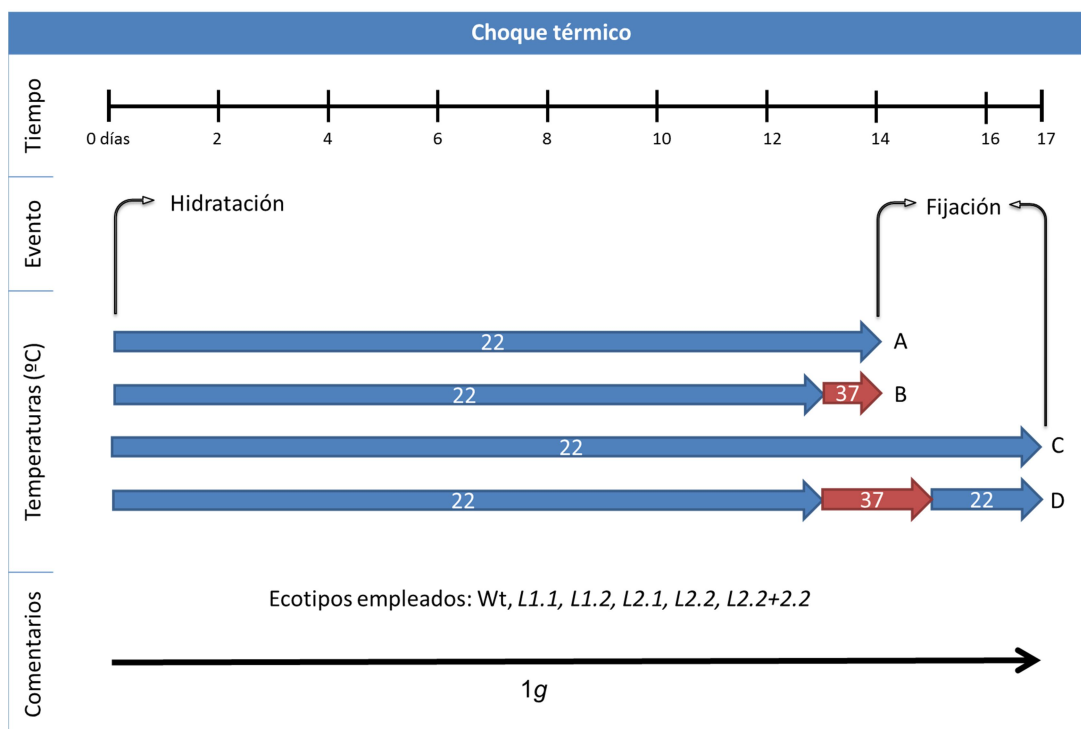


Figura 30: Esquema de las condiciones empleadas en el experimento de choque térmico. Se puede dividir en experimento corto (A y B) y largo (C y D). Las plántulas crecieron durante 14 días en situación control (A) o durante 13 días y luego se pasó a 37°C durante un día, en el experimento corto. En el largo que duró 17 días, los mismos ecotipos crecieron en situación control (C) o durante 13 a 23°C, 48 horas a 37°C y otras 48 horas de recuperación a 23°C (D). Todas las muestras fueron fijadas a continuación. Para este experimento la gravedad permaneció constante.

Las líneas utilizadas en el experimento de auxina exógena fueron *wild-type* Col-0 y DR5::GFP y se pusieron a crecer durante 4 días en el clinostato 2D. Se hicieron diluciones seriadas en el que se incorporó al medio con sacarosa y agar la auxina, siendo la primera de 10^{-5} M hasta 10^{-10} M. Tras el periodo de crecimiento, las muestras se sumergieron en azul de toluidina para la medición de las raíces o se fijaron para su observación con un microscopio ApoTome (Zeiss Axio Imager Z1 + Colibri (LED de 365, 470 y 590 nm), Iluminador HXP120 de UV y cámara AxioCam MRm 1.4Mp Blanco/Negro). Las imágenes se procesaron con el programa AxioVision4.8.

4 Procesamiento y análisis de las muestras expuestas a microgravedad

Al finalizar todos los experimentos se realizó una fotografía (Pentax K10D) de la placa de cultivo, con la que poder realizar las mediciones de la longitud de la raíz con ImageJ, además de como primer indicador de algún problema en el experimento

4.1 Técnicas de microscopía

Las muestras fijadas con diferentes compuestos químicos como glutaraldehído, paraformaldehído o NotoxHisto, sirvieron para su caracterización estructural mediante microscopía, bien por observación con líneas transformadas GUS, GFP o mediante inmunofluorescencia en microscopía confocal o bien por su inclusión en resinas para microscopía de contraste de fases o electrónica.

4.1.1 Actividad β -glucuronidasa en líneas transformadas

Se usó una línea de *Arabidopsis* con el gen reportero GUS (también llamado *uidA* que codifica para β -glucuronidasa) asociado a un promotor de respuesta a auxina llamado DR5 en el experimento de raíces secundarias. La coloración azul al añadir el sustrato X-Glc-A, permite la visualización *in situ* al microscopio de la actividad del promotor génico.

En primer lugar las plántulas se fijaron con acetona al 90% a -20°C O/N (mínimo dos horas). Tras dos lavados de 10 min con buffer fosfato 100mM, se incubó con solución de revelado durante toda la noche a 37°C en oscuridad. La solución de revelado contiene ferrocianuro potásico trihidratado 5mM, ferrocianuro potásico 5mM, buffer

fosfato 100mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-ácido glucurónico (X-GlcA) 40mM (Duchefa biochemies X1405.0100). Después se lavó con buffer fosfato 50mM y se montó en portas con glicerol como medio de montaje. Las raíces se visualizaron y fotografiaron con un microscopio Apotome Zeiss (Zeiss Axio Imager Z1).

4.1.2 Actividad fluorescente en líneas transformadas GFP

Las muestras transformadas con construcciones fluorescentes se fijaron con 4% PFA durante 2 horas a temperatura ambiente (se renovó el fijador tras ese tiempo en caso de necesitar ser transportadas al laboratorio de Madrid con un acumulador de frío a 4°C). Las plántulas se lavaron con PBS 1x a pH=7,2 3 veces durante 10 minutos cada una, estuvieron en acetona 90% media hora para blanquear los tejidos y poder observar la fluorescencia más nítida. Las plántulas se montaron con glicerol y se observaron en el servicio de microscopía confocal del CIB.

4.1.3 Microscopía confocal

Las muestras fijadas sólo con PFA (Sigma #P6148) fueron útiles para la detección *in toto* de ciertas proteínas que sirvieron de marcadores indirectos para el estudio de parámetros como el crecimiento celular. Las muestras fijadas con GA fueron utilizadas para estudiar la ultraestructura de las células en microscopía electrónica. No pueden ser usadas para la inmunodetección de proteínas porque aunque conserve mejor la estructura, enmascara el antígeno proteico, lo que inutiliza la marcación con anticuerpos.

4.1.3.1 Preparación de la muestra para inmunofluorescencia

La muestra se fijó con PFA al 4% en PBS (1x con pH 7.2) con un 10% de DMSO (dimetil sulfóxido) (Sigma #D8418) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS durante 10 minutos cada uno y se añadió la mezcla de digestión, compuesta por 2% de celulasa (Serva #16419), 1% de pectinasa (Sigma #P4716-25KU), 0,05% de macerozima (Serva #28302), 0,4% de manitol (Merck #105983), 10% de glicerol y 0,2% de tritón X-100 durante 10 minutos a 37°C. Después se lavaba con una solución de PBS con 10% glicerol y 0,2% Tritón X-100. A continuación, se colocaron las plántulas en un porta y bajo una lupa se cortaron los meristemas y de uno en uno se colocaron sobre un pocillo de un porta (Electron Microscopy Sciences #63422-06) embebido previamente en poli-L-lisina (Sigma #P8920). Sobre cada uno de los pocillos del porta se puso una gota de metanol y estuvo durante mínimo 30 minutos a -20°C pudiendo

las muestras conservarse en este paso durante varios meses. Este paso es el idóneo para viajar con las muestras congeladas en caso de realizar el experimento en otras instalaciones diferentes a dónde se va a realizar la inmunofluorescencia.

4.1.3.2 Revelado de las muestras pre-procesadas para inmunofluorescencia

Las muestras procesadas para microscopía confocal y congeladas en metanol, se colocaron dentro de una cámara oscura y húmeda (placa Petri forrada de papel de aluminio con un papel de filtro mojado en la base sobre la que se colocó el porta) para evitar que las muestras se secasen a partir de este paso. Se rehidrató con PBS 1x dos veces durante 5 minutos y se añadió la solución de bloqueo durante media hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo está compuesta por 0.05% Tween y 2% BSA en PBS 1x pH 7.2. A continuación se incubó el anticuerpo primario en solución de bloqueo a 37°C toda la noche. A la mañana siguiente se lavó 3 veces con PBS (ídem) durante 5 minutos y se incubó con el segundo anticuerpo también en solución de bloqueo durante 3 horas a 37°C. A partir de este paso es importante que la cámara oscura no reciba ninguna luz y los tiempos en los que permanece abierta para los cambios de medio sean cortos para evitar gastar la fluorescencia del anticuerpo. Se lavó 3 veces con PBS (ídem) durante 5 minutos y se incubó con una gota de DAPI al 5x (Thermo #62248) durante no más de 5 minutos. Se lavó 3 veces con PBS (ídem) durante 5 minutos y se lavó otras 3 veces con H₂O_{dd} durante 5 minutos. Para terminar, se añadió una gota de solución DABCO a cada uno de los pocillos dónde había muestra, se puso un cubre y se lacaba los extremos del cubre al porta para poder conservarlo durante un par de semanas a 4°C en caso de no poder visualizarlas en ese momento al microscopio confocal. La solución DABCO es una mezcla de 800 µl de agua con 200 µl de Tris-HCl 1M pH=8 y 200 µl de Dabco (Sigma #290734) que se calentó a 70°C mientras se removía en el agitador magnético, se le añadió 9 ml de glicerol tras llegar a la ebullición, se alicuotó en tubos de ensayo y se almacenó en el congelador durante un máximo de un año.

El microscopio confocal Leica DMI 6000 CS usado para la visualización de estas muestras es del modelo Leica TCS SP5 perteneciente al servicio interno del CIB-CSIC.

4.1.3.3 Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

Los anticuerpos primarios empleados para la detección *in toto* de los marcadores fueron:

- Anti-AtNUC-L1 policlonal: generado en conejo contra la región de reconocimiento de RNA (RRM) de la proteína nucleolin-like AtNUC-L1 (cedido por el Dr. J. Saéz-Vázquez (Pontvianne et al 2007, Saez-Vasquez et al 2004). La concentración utilizada fue de 1:1000.
- Antifibrilarina monoclonal 38F3: generada en ratón contra hélices α de la fibrilarina (Abcam #ab4566). La concentración que se utilizó fue de 1:1000.

Los anticuerpos secundarios para el revelado de los primarios, fueron:

- Anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de conejo unido a partícula fluorescente verde (Alexa 488nm) o rojo lejano (Alexa 647nm) en una dilución de 1:100.
- Anticuerpo IgG de conejo anti-IgG de ratón unido a partícula de emisión en rojo lejano (Alexa 647nm). La concentración empleada fue de 1:100.

4.1.4 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

4.1.4.1 Preparación de la muestra

Las muestras se fijaron con GA (Sigma #G5882) al 4,5% y PFA al 1,5% en PBS con pH 7,2 durante 2 horas a temperatura ambiente (fijación de la fracción proteica). En este paso se puede renovar el medio de fijación y mantenerlo a 4°C O/N o dejarlo almacenado durante un máximo de 90 días. . Tras retirar el fijador aldehído, se lavó 3 veces con PBS durante 10 minutos y se puso en OsO₄ (Ted Pella #18459) al 1% diluido en agua durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hizo tres lavados en agua de 10 minutos cada uno antes de empezar las deshidrataciones seriadas de etanoles al 30%, 50% y 70%, todas a temperatura ambiente durante 30 minutos excepto la última deshidratación que es a 4°C O/N. A la mañana siguiente se continuó la deshidratación con etanol 80%, 95% y 100%, también a temperatura ambiente media hora, excepto el 100% que fueron dos veces de 15 minutos cada una. La impregnación en resina se hizo con Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences; Embed 812 resina 14900, Araldite GY-502 10900, anhídrido dodecenil succinil destilado - DDSA 13710, DMP30 13600) mezclado previamente durante 2 horas en agitación. Se hicieron diluciones seriadas de

etanol 100% (Merck #100983) con esta resina. En primer lugar se sumergieron las muestras en una mezcla de etanol/resina en proporción 2:1, después la mezcla es la mitad etanol y la mitad resina, luego la proporción es 1:2 y finalmente 100% resina. Todos estos pasos a temperatura ambiente durante 1 hora. Para finalizar se cortó la parte terminal de la raíz, y está se incluyó en cápsulas de gelatina (TAAB #C091/1) orientadas de forma transversal en el fondo de la cápsula. Esta resina polimeriza correctamente tras 48 horas a 65°C.

En algunos casos el protocolo de fijación puede variar. Los meristemas de las muestras crecidas en clinostato se cortaron posteriormente a la fijación. Otra variante fue la fijación en metil-acetilación. Esta variante está especialmente indicada para aumentar el contraste de las sub-estructuras nucleolares (Testillano et al 1995, Testillano et al 1991). En vez de usar etanol como agente deshidratante, se usó metanol. Tras la deshidratación, se hicieron tres cambios de metanol al 100% de 30 minutos cada uno y se dejaron toda la noche en una mezcla de metanol-anhídrido acético 5:1 a 25°C y se comenzó al día siguiente con tres lavados en metanol 100% de 10 minutos cada uno tras el cual, ya se pudo comenzar con la infiltración de resina.

4.1.4.2 Microscopía óptica sobre cortes

Para el estudio estructural de las células meristemales se realizaron cortes semifinos de 2µm de grosor (LKB Pyramitome-11800) de los bloques dónde previamente habíamos incluido la muestra. Estos cortes se recogieron sobre un porta que tenía una gota de agua y se calentó hasta que se evaporó toda el agua. Una vez seco, se echó una gota de medio de montaje Permount (Electron Microscopy Sciences #17986-01). La visualización de estos cortes se realizó con el microscopio Leica DM2500 acoplado a una cámara digital CCD Leica DFC320 y se procesaron con ImageJ 2.0 (Imagejdev.org). Las imágenes sirvieron para comprobar el estado de preservación estructural y medir el número de células por unidad de distancia para calcular el ratio de proliferación.

4.1.4.3 Ultramicrotomía y tinción para microscopía electrónica de transmisión

En las muestras que requerían la observación en microscopio electrónico de transmisión (MET), se talló una pirámide en la cápsula entorno a la muestra con la que poder afinar los cortes ultrafinos en un ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut E). Esos cortes se montaron en rejillas de níquel recubiertas con una película de formvar 0,5% (TAAB 15820).

Todas las muestras de MET se tiñeron con acetato de uranilo 5% durante 30 minutos, se lavaron con agua destilada y se completó la tinción con citrato de plomo 0,3% durante 90 segundos (disponible en el servicio de microscopía del CIB-CSIC). La observación de las muestras se hizo con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 a 100kV de tensión acelerada. El procesado de las imágenes generadas se hizo con ImageJ 2.0. Sirvió para comprobar en detalle la ultraestructura del nucleolo, su área y las porciones entre sus subcomponentes.

4.1.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se cortaron las raíces y se fijaron, post-fijaron y deshidrataron de la misma forma que se hizo para la microscopía electrónica de transmisión. A continuación las muestras se pusieron en el secador de punto crítico con CO₂ líquido, que reemplazó al etanol. Se calentó la cámara hasta los 31°C con una presión de 72 bar y el CO₂ líquido se evapora, quedándose la muestra totalmente seca. Para su montaje, se puso un parche de doble faz de las mismas medidas que el *stub* (porta muestras específico para MEB) y se pegaron sobre el parche aprovechando toda la superficie al máximo. Se llenaron dos *stubs* con las muestras de 4 días y se pusieron en el *sputter* (emisor de micropartículas metálicas) para rociarles con oro durante 2 minutos en vacío para que la dispersión del metal fuera uniforme (las muestras una vez metalizadas y en atmósfera seca se pueden guardar de forma ilimitada).

Se resume en la **Figura 31** las diferencias y semejanzas entre los protocolos de fijación e inclusión utilizados.



Figura 31: Esquema de los protocolos utilizados en las diferentes técnicas de microscopía. En la recopilación se muestra además de los pasos, las temperaturas necesarias y los tiempos clave. ET: electrónica de transmisión; EB: electrónica de barrido.

4.2 Técnicas de transcriptómica

4.2.1 Preparación de las muestras

Se separaron las dos fracciones en origen y/o en el laboratorio de Madrid, y para ello, se dispuso una placa Petri grande de cristal con nieve carbónica para crear un ambiente frío y evitar así la degradación de los ácidos nucleicos. Dentro se colocó otra placa Petri más pequeña dónde se vertía el contenido del tubo de ensayo con RNALater y bajo la lupa y con ayuda de unas tijeras oftalmológicas se cortó la raíz del resto de la planta, que se puso en dos tubos de ensayo diferentes. Las semillas quedaron fuera de las dos particiones por tener compuestos que pueden alterar los resultados de expresión génica.

4.2.2 Extracción de RNA

De las muestras de raíces se extrajo el RNA mediante un sistema de columnas inmediatamente tras la disección de las muestras. El homogeneizado de la biomasa se hizo en el propio tubo de ensayo con ayuda de microhomogeneizadores (Sigma #Z317314). Para la extracción se usó un kit comercial de purificación de RNA por columnas (Norgen Biotek #48400). Se cuantificó la cantidad de RNA existente con Nanodrop 2000 (Thermo).

El RNA purificado se limpió de posibles restos de DNA con 1µl de DNasa-turbo (Ambion Life #1907) por cada 2µg de RNA a 37°C durante 1 hora. El protocolo requiere añadir 5µl de resina durante 5 minutos a temperatura ambiente (incluido en el kit comercial), se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante dónde estaba disuelto el RNA. En nuestro caso, se repitió la centrifugación para asegurarnos de no recoger nada de resina.

4.2.3 Primers o cebadores

El diseño de los primers para las qPCR se realizó con diversas aplicaciones online. En primer lugar se buscó en la base de datos TAIR la secuencia del gen concreto y se localizaron las regiones codificantes (exones). Con el programa Primer3 se introdujo el cDNA (exones consecutivos) de dos en dos de manera que el fragmento amplificado fuera aproximadamente de 200 pb. De entre todas las parejas obtenidas nos quedamos con la que mejor proporción GC tuviera, y se volvió a comprobar donde se encontraban en el gen. En caso de que esos cebadores se encontrasen entre uno y otro

exón, por ejemplo, se rechazó para evitar problemas de alineamiento. Finalmente se hacía un BLAST del genoma entero y se comprobó que los cebadores fuesen lo más específico posibles (Tabla 2).

Gen	Forward	Reverse
<i>PIN2</i> (At5g57090)	5'GCAATGTTTAAACGCAAGCAA3'	5'GCCTCCTCTTCCIGCTTTCT3'
<i>TIR1</i> (At3g62980)	5'ATTTTGGGATGCTGTTCTG3'	5'GAAGCAAGCACCTCAAGACC3'
<i>CK2A-2</i> (At3g5000)	5'ACCAGGATCAGCTCGTCAAA3'	5'CTTTCTGCTGCCCTGACTTG3'
<i>CYCB1.2</i> (At5g06150)	5'GTGCCTTGCTTATTGCTTCC3'	5'ATTGCCTTCTCCATCACCAG3'
<i>NUC-L1</i> (At1g48920)	5'TCTGTTCCAATTGACCGTGA3'	5'ACTACCGAAACGACCATTGC3'
<i>NUC-L2</i> (At3g18610)	5'CTCAGGGAGGATCAAAGACG3'	5'TCGCGGCCTAGTAACAATTT3'
<i>FIB</i> (At5g52470)	5'CGTCTTTCGTTCTTCACTTT AGACAAG3'	5'GCCCACTACGGCCTCTGTCA3'
<i>ACT</i> (At3g18780)	5'GCACCCTGTTCTTCTTACCG3'	5'ATCCAGCACAATACCGGTTGT 3'

Tabla 2: Cebadores forward y reverse utilizados para los estudios de transcriptómica (Integrated DNA Technologies) con los genes estudiados.

4.2.4 Análisis de expresión génica por transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCRq)

La RT-PCRq en un solo paso permite combinar la transcriptasa reversa, que pasa RNA a DNA, y la reacción en cadena de la polimerasa. Este método permite comparar entre muestras las diferencias de expresión de una secuencia determinada. Emplea *SYBR green* (Agilent Technologies #600886), un agente intercalante de DNA fluorescente con la que se puede seguir la amplificación en tiempo real durante la reacción. Los cebadores utilizados deben poseer una alta eficiencia a una concentración determinada a RNA. Para comprobar la eficiencia, se comprobó la eficiencia con curvas estándar, haciendo diluciones seriadas de RNA (0,2; 0,8; 2; 4; 10; 20 y 50 ng/ μ l). La eficiencia para cada pareja de primers determinará la concentración de RNA óptima. Fijadas la concentración óptima de primer en 5ng/ μ l, se realizaron las RT-PCR con el RNA de las

muestras. La **Tabla 3** muestra las cantidades empleadas de los diferentes componentes en cada pocillo.

La RT-PCRq se hizo en un aparato IQ5 Real Time Detection System disponible en el servicio de proteómica del CIB-CSIC al que hay que programarle un protocolo térmico. El programa utilizado en el termociclador (Bio-rad) se muestra en la **Tabla 4**.

Los resultados fueron analizados y procesados utilizando el programa IQ5 Optical System Software y procesados en Excel (Microsoft Office 2007) con una hoja diseñada para poder hacer comparaciones entre las diferentes placas (opción no disponible en IQ5).

Producto	Cantidad
2X Billiant III SYBR Green	7,5 μ l
Retrotranscriptasa	0,75 μ l
DTT (100mM)	0,15 μ l
H ₂ O	1,8 μ l
Primer Forward (5ng/ μ l)	0,9 μ l
Primer Reverse (5ng/ μ l)	0,9 μ l
Muestra (4ng/ μ l)	3 μ l

Tabla 3: Componentes y cantidades utilizadas en la PCR a tiempo real.

Reacción transcriptasa reversa	Activación polimerasa	Ciclos de PCR (x35)			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
48°C 30'	95°C 10'	95° C 10"	60°C 20"	72°C 30"	72°C 5'

Tabla 4: Ciclo térmico utilizado en las PCR a tiempo real. Temperatura en grados centígrados (°C) y el tiempo en minutos (') o segundos (").

Del programa se obtuvieron las Ct o valor umbral del ciclo, es decir, el ciclo en el que la fluorescencia producida supera el umbral establecido. En la misma placa se hicieron dos réplicas de cada muestra (Huggett et al 2005). Para cada pareja de cebadores se contó en cada placa con un calibrador, una muestra mezcla de todas las demás muestras a modo de control positivo (Edwards et al 2004). Además, por cada muestra usada en una placa, se usó en esa misma placa la misma muestra pero con cebadores de actina como gen de referencia (Dheda et al 2005). Como la muestra se puso por duplicado, se hizo la media de las Ct obtenidas.

Se calculó el ΔCt restando a este valor la media de las Ct de la muestra con los cebadores de actina ($\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{muestra}} \text{ cebador} - Ct_{\text{muestra}} \text{ actina}$), para referenciarlo sobre un gen que no modifica su expresión. De la misma forma se calculó el ΔCt del calibrador ($\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{\text{calibrador}} \text{ cebador} - Ct_{\text{calibrador}} \text{ actina}$). Después se calculó el $\Delta \Delta Ct$ de la muestra con el calibrador de esa misma placa ($\Delta \Delta Ct_{\text{muestra}} = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$), de esta manera, se puede relativizar entre placas de diferentes días.

Este valor sería el exponente negativo de una potencia de base 2. Los valores por encima de uno suponen un aumento de la expresión, sin embargo, una caída en la expresión aparecería como un valor entre 0 y 1. Para hacerlo más visual, si el ratio ($2^{-\Delta \Delta Ct}$) es mayor de uno, se dejaría tal cuál. Si por el contrario, el ratio es menor de 1, el ratio se cambiaría a $(-1 / 2^{-\Delta \Delta Ct})$.

Por último se calculo el ratio de ese valor de la muestra crecida en microgravedad entre el valor dado por la muestra crecida en gravedad control ($2^{-\Delta \Delta Ct_{\mu g}} / 2^{-\Delta \Delta Ct_{1g}}$). De la misma forma, si el valor obtenido está entre 0 y 1, calcularíamos un nuevo ratio de -1 entre ese valor para esos casos. Los valores representados en las gráficas, muestran la media de los valores de este ratio y su desviación estándar.

4.3 Técnica de citometría de flujo

El aparato utilizado para realizar citometrías de flujo se encuentra en el servicio del "Institut des Sciences du Vegetal" del CNRS del campus de Gif-sur-Yvett, París.

4.3.1 Comprobación del número de meristemos

Se crecieron plántulas a 1g y se llevaron hasta el citómetro de flujo. Se cortaron 20, 20, 15 y 9 meristemos con tijeras oftálmicas y se pusieron en una placa sobre una dilución

de: 800µl de Galbraith (MOPS 20mM, MgCl₂ 45 mM, Na₃C₆H₅O₇ 30mM y Tritón x100 0,1%) y 40 µg/ml RNAasa (Galbraith et al 1983). Para extraer los núcleos, se utilizaron dos maneras de moler las células de las raíces. Tres de las cuatro muestras (de 20, 15 y 9 meristemos) se trocearon con una cuchilla, mientras que la otra muestra (de 20 meristemos) se machacó con una barra de cristal. Todas ellas se filtraron con una red de 33 µm de paso y se colorearon con 50µg/ml de yoduro de propidio (PI) antes de pasarlas por el citómetro de flujo.

4.3.2 Fijación de núcleos para citometría de flujo

Las plántulas crecieron en los clinostatos durante 6 días. Al terminar se realizaron dos protocolos diferentes de fijación: Ulrich que permite de fijar los núcleos extraídos y fijación química que fijan los tejidos biológicos antes de hacer la extracción de los núcleos.

El método de Ulrich (Ulrich & Ulrich 1991) emplea ácido cítrico como conservante. Bajo la lupa con luz lateral para que se distinguiera el ápice de la zona diferenciada se cortaron unos 20 meristemos de cada condición con tijeras oftálmicas y se dejaron en una gota de ácido cítrico 0,1M y Tween20 0,1M. Se trocearon con cuchilla los tejidos para extraer los núcleos y se suspendió el picado en 500 µl de la misma solución de ácido cítrico y Tween20. A continuación se pasó la suspensión por un filtro de 33 µm y se dejó durante 30 minutos a 4°C. Durante ese tiempo las muestras se trasladaron al citado citómetro de flujo. Una vez allí, se añadió 2,5 ml de Na₂HPO₄, 0,4 M, 50 µg/ml de RNAasaA y 50 µg/ml de PI. A continuación se pasaron las muestras por el citómetro de flujo.

La fijación química utiliza PFA al 4% con PBS 1x pH7. Una vez crecidas en el clinostato, 20 plántulas se introdujeron en el fijador y se transportaron hasta el citómetro de flujo. Una vez allí, se lavó el material biológico con PBS y se cortaron los meristemos con una cuchilla. Se pusieron en una placa con la disolución Galbraith (ver apartado 4.3.1), se trocearon los meristemos para extraer los núcleos, se filtró (33 µm) la solución con el picado y se colorearon con el PI.

4.4 Técnicas de proteómica

4.4.1 Extracción de proteína

Para la extracción proteica (Barjaktarovic et al 2007) se añadió 1 ml de buffer de lisis a las muestras ultracongeladas mientras se homogenizan con émbolo en tubos de ensayo de 1.5ml. El buffer de lisis está formado por Tris-HCl 40mM (pH 8), antiproteasas (1 µg de aprotinina, de pepstatina y de leupeptina), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 0,1 mM. Se mantuvo en hielo durante 30 minutos, dándole un pulso cada 10 minutos con vórtex. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se guardó la fase acuosa a -20°C para la precipitación de las proteínas.

4.4.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación de la proteína extraída se realizó con la recta patrón Bradford (Biorad #500-0205) (Bradford 1976). Se diluyó albúmina de suero bovino (BSA, SIGMA #9048-46-8) de manera seriada: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 y 1 mg/ml. Se diluyó el Bradford con agua destilada 1:5 y se usó 1 ml por muestra de la dilución, al igual que para cada una de nuestras muestras. Se generó la recta patrón con un espectrofotómetro (Agilent Cary-4000) midiendo densidad óptica a 595nm. Con la ecuación de la recta pendiente ($y=mx+b$), se calculó la concentración de proteína extraída.

4.4.3 Electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas se separaron en la 1^o dimensión utilizando el sistema "Protean IEF System" (Biorad). El gel separador al 8% (se hacían 2 geles cada vez) llevaba 2 ml de acrilamida 40% (Merck 1.10784.0100) - Bis (Biorad #110-26-9); 3,75ml de Tris 1M pH 8.8 (Merck #8382D); 4,1ml de Agua; 0,05 ml de SDS 20% (Biorad #161-0301); 0,05ml APS 10% recién preparado (Biorad #161-0700); y 0,016ml de TEMED (Sigma #8133). Se echaron muy despacio unas gotas de butanol con la finalidad de alisar la superficie, y se retiró con papeles absorbentes una vez gelificó. Mientras, se prepararon 5ml de gel concentrador con 0,625 ml de acryl 40% Bis; 0,75ml de Tris 1M pH 6,8; 3,1ml de agua; 0,25ml de SDS 20%; 0,25ml de APS al 10% y 0,05ml de Temed. Los cristales se llevaron a las cubetas de electroforesis que tiene un litro de tampón de electroforesis 1x (un litro de tampón 10x consta de 30,3g Tris, 144g de glicina y 10 g de SDS). En cada pocillo se cargaron sobre 4µl de muestra con 6 µl tampón de carga (10 ml de tampón de carga llevan 5ml de glicerol, 1g de SDS 20%, 2,5ml de β-mercaptoetanol, 2,1ml de Tris-HCl

0,5M pH 6.8 y traza de Biorad-phenol-Blue). Las muestras cargadas son las mismas en los dos geles. Como marcadores de masa molecular se empleó "BenchMarck Prestained Protein Ladder" (Invitrogen #10748-010). Se dejó conectado a la fuente durante hora y media a 80V (o hasta que el marcador de 25kDa llegaba al borde inferior. Una vez terminada la electroforesis, sacamos los geles. Con uno de ellos se hizo *Western Blot* y el otro se tiñó en azul de Coomassie.

4.4.4 Tinción con azul de coomassie

Uno de los geles de la electroforesis se fijó con una solución de etanol:ácido acético:agua (20:10:70) y se agitó durante 10 minutos. Después se sumergió en azul de Coomassie (Thermo #20278): metanol:agua (50:10:40) durante 1 hora. Finalmente se decoloró el gel con una mezcla de metanol:ácido acético: agua (50:10:40) durante toda la noche y varios lavados más al siguiente día.

4.4.5 Western Blot

4.4.5.1 Anticuerpos para proteómica

El anticuerpo primario empleado en el experimento de *Western-blot* fue:

- Anti-AtNUC-L1 policlonal, generado en conejo contra un péptido de la región C-terminal (GAR) de la proteína At-NUC-L1 (cedidos por el Dr. J. Saéz-Vázquez (Pontvianne et al 2007, Saez-Vasquez et al 2004) en una concentración 1:1000.

El anticuerpo secundario para el revelado del primario fue:

- Anticuerpo IgG de burro Anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano picante para ECL (GE Healthcare #NA934V). Se diluyó hasta conseguir una concentración de 1:5000.

4.4.5.2 Transferencia a membrana

Con el otro gel se realizó un inmunoblot (o *Western Blot*) con un tampón de transferencia al 20% que contenía 3,02 g de Tris 25 mM, 14,26 g de glicina 190 mM y 200 ml de metanol para un litro en agua. La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa PVDF 0.45 μ m (PALL #66543) se montó de la siguiente manera en una estructura de "Mini Protean" (Biorad #170-3930). Se cogió el *holder* dejando la parte negra hacia abajo, a continuación se pusieron una esponja y dos papeles de cromatografía (Whatman #3030917), después se dispuso el gel de proteína y

la membrana PVDF, a continuación dos papeles de cromatografía y finalmente otra esponja para cerrar con la parte blanca del holder. La membrana PVDF especialmente y en menor medida las esponjas y el papel de cromatografía deben de ajustarse al tamaño del gel. La membrana se activó pasándola por un baño en metanol, mientras que el papel y las esponjas deben de estar bañadas en el propio tampón de transferencia. Cada vez que se adicionaba una nueva capa se pasó una pipeta pasteur a modo de rodillo para evitar que quedasen burbujas de aire que impidieran el paso de la corriente y por ende de las proteínas. Se cerró el *holder* y se conectó a la fuente para la transferencia durante 1 hora a 100V. Se sacó la membrana marcando el lado dónde se deberían de encontrar las proteínas. Se lavó con PBS Tween20 0,05% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó en PBS-Tween20 con 5% leche en polvo toda la noche a 4°C.

4.4.5.3 Incubación

Tras el bloqueo de la membrana se hicieron tres lavados rápidos con PBS-Tween20 0,05%, un lavado de 10 minutos en agitación y otro lavado rápido. El primer anticuerpo de anti-nucleolina Ab100 1:1000 se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-Tween20 + Leche o toda la noche a 4°C. Se preparó en una bolsa de plástico sellada con unos 3 ml de esta solución. Tras la incubación del anticuerpo primario se hicieron varios lavados en PBS Tween20, tres rápidos y dos de 10 minutos. Se añadió el anticuerpo secundario con peroxidasa a 1:5000 en PBS Tween20 leche 5% a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1x pH7.2.

4.4.5.4 Revelado ECL para peroxidasa

El revelado de la membrana con las proteínas se hizo con el kit ECL (GE HealthCare RPN2232) que consta de dos productos comerciales, A y B, que hay que mezclar justo en el momento que se va a usar. Todo el revelado se realizó en una sala de fotografía a oscuras. Se retiró la membrana del último lavado y se puso a incubar con la mezcla de revelado durante 1-2 minutos (la mezcla es reutilizable mientras no reciba la luz durante un par de días). Después se puso la membrana dentro de un cassette de rayos

X (Fujifilm EC-DW 18x24cm) y se coloca encima una película fotográfica (AGFA curix RP2Plus) y se cerró el cassette. El tiempo de la exposición de la membrana varió desde 5 segundos hasta la media hora en algunos casos hasta ajustar el tiempo de exposición adecuado, dependiendo de la eficiencia de los anticuerpos. Finalmente se abrió el cassette de rayos X y se reveló la película en una máquina de revelado (AGFA Curix-60).

5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics v22.0). Se comprobó que las muestras obtenidas de la población eran normales con la prueba no paramétrica de Kolmogórov-Smirnov en caso de que hubiera 30 muestras y con Shapiro-Wilk en caso de que no llegasen a 30 el número de muestras, en ambos caso con un nivel de confianza del 95%. Tras justificar que las poblaciones son normales, se comprobó que las muestras eran homocedásticas, es decir, que no existían diferencias entre las desviaciones típicas calculadas con la prueba de Levene. Para comparar dos muestras entre sí se calculó una t-student bilateral de muestras independientes con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS

1 FASE DE DEFINICIÓN DEL EXPERIMENTO ESPACIAL “SEEDLING GROWTH”

2 EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD EN LA COLECCIÓN DE MUTANTES DE
FITOCROMOS

3 EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD EN LAS COLECCIONES DE MUTANTES DEL
TRANSPORTE DE AUXINAS Y LOS DE NUCLEOLINA

4 EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD SIMULADA EN COMBINACIÓN CON
OTROS ESTRESSES AMBIENTALES

Resultados

1 Fase de definición del experimento espacial “Seedling Growth”

Con el objetivo de profundizar en la descripción del mecanismo por el que se desacopla el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de microgravedad real (Matía et al 2010) o simulada (Manzano et al 2013), se propuso la realización del experimento espacial “Seedling Growth” (SG) a las agencias NASA y ESA. Una vez aprobado, hubo que definir cuales eran las condiciones óptimas para realizar este experimento con garantías de obtener un máximo rendimiento. Concretamente hubo que concretar, i) las condiciones ambientales o de soporte vital de las plantas, ii) las nuevas líneas mutantes o reporteras a utilizar para ampliar los estudios que se tenían hasta el momento y iii) las condiciones de preservación o fijación de las muestras para su retorno a la tierra.

Las oportunidades de vuelos espaciales son muy raras y los experimentos son costosos. El experimento debe de funcionar a la primera porque la posibilidad de repetición en microgravedad real es muy complicada. Además, los resultados deben de ser fiables, publicables y responder a una cuestión científica. Todas estas consideraciones implican que debemos hacer muchas pruebas preliminares para validar todas las condiciones experimentales y las técnicas utilizadas.

1.1 Definición de las condiciones ambientales en SG

Basándonos en experimentos espaciales previos, SG utilizará el EMCS que ya utilizó *Arabidopsis* durante el experimento TROPI y GENARA, con el único requerimiento adicional de fijar las muestras al final del experimento (en vez de sólo congelarlas). En cuanto a las condiciones ambientales, cabe determinar la duración del experimento, la iluminación o los niveles de g a usar entre otros requerimientos. La temperatura se mantuvo fija en 22°C durante todo el proceso, traslados incluidos, y la humedad relativa en el interior de la cámara de cultivo fue del 90% \pm 10%, para dejar la luz y los cambios de g como únicas variables ambientales del experimento.

1.1.1 La hidratación

El material biológico de cada experimento está constituido de semillas. Esta condición está justificada por el hecho de que las semillas son la forma de resistencia y de almacenamiento de la planta. En efecto, gracias a su estado deshidratado son poco sensibles al medioambiente y guardan una importante capacidad de germinación durante mucho tiempo. Estas características son imprescindibles para la realización de los experimentos espaciales, ya que las semillas no perciben la hipergravedad durante el despegue del cohete, al contrario de los animales. La otra ventaja de utilizar las semillas es que el inicio del experimento está estrictamente controlado por una simple hidratación de las semillas. Es de una importancia primordial, en un primer tiempo, guardar un medioambiente seco antes del experimento y, en un segundo tiempo, tener una buena hidratación durante el experimento.

La hidratación de las muestras es crucial para la germinación de las muestras. Los experimentos de definición se realizaron en los mismos cassettes espaciales porque la condensación, evaporación y distribución del agua no son equivalentes en un experimento en placas Petri. Se hidrataron las muestras en función de la cantidad que el papel Whatman puede absorber, con diferentes cantidades de agua: 750 μl , 800 μl , 850 μl y 900 μl (**Figura 32A**). Cantidades inferiores no hidratan completamente el papel y superiores no son capaces de ser absorbidos. En los cassettes llenados con 750 μl y 900 μl no hubo un crecimiento correcto. Con los días, el cassette hidratado con 750 μl se llegó a sacar, y el de 950 μl , tenía un exceso de vapor en las paredes y en las ventanas de transpiración que ralentizó el crecimiento de igual modo. Las muestras con 800 y 850 μl no presentaban diferencias entre ellas, con vapor en las paredes, pero ambas con buena tasa de germinación y un crecimiento óptimo, siendo más homogéneo en el segundo caso.

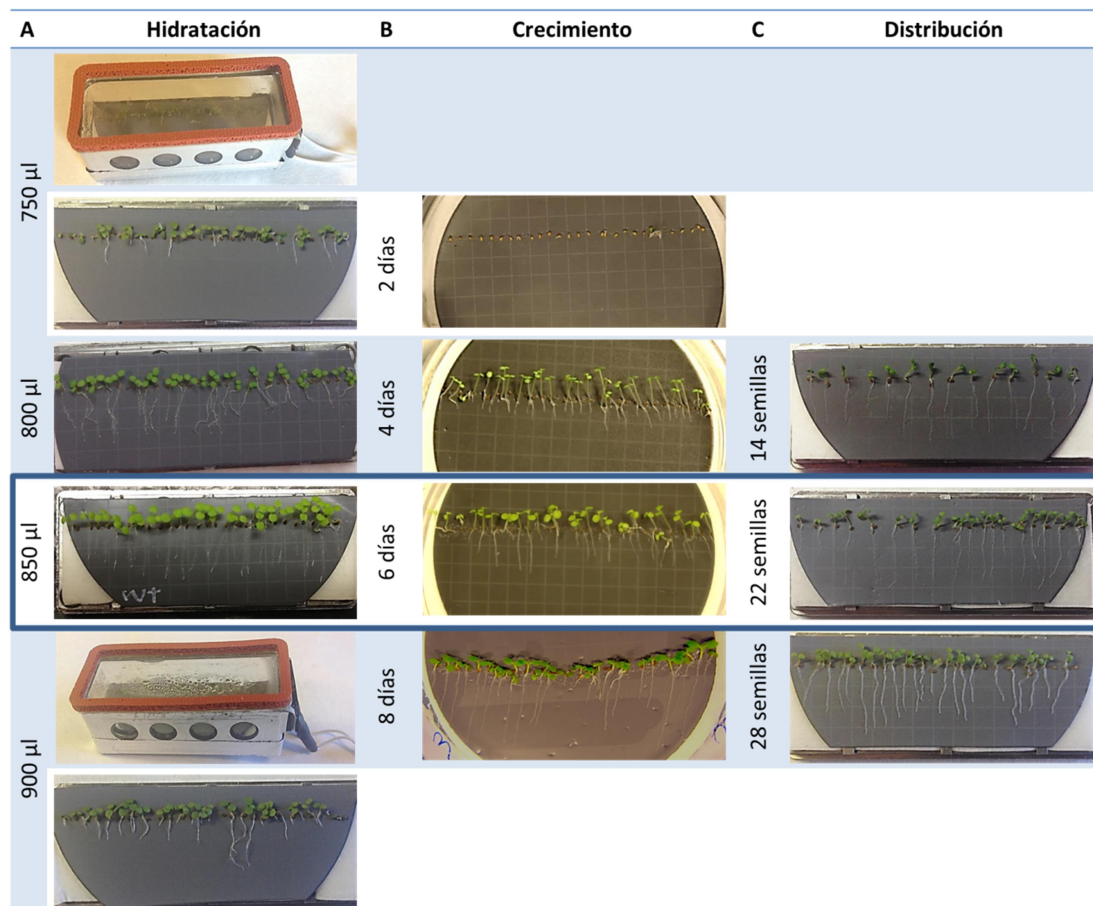


Figura 32: Condiciones ambientales para el crecimiento óptimo en los cassettes TROPI. A) Hidratación de los cassettes con diferentes cantidades de agua tras 7 días de crecimiento. Muestras de WT Col-0. B) Crecimiento de las muestras a 2, 4, 6 y 8 días. Muestras de WT Col-0. C) Distribución de diferente número de semillas en el cassette espacial. Muestras de WT Ler. En un recuadro azul se muestran las condiciones óptimas en cada una de las condiciones.

1.1.2 Tiempo de cultivo

Hay que definir con exactitud el tiempo de crecimiento de las plantas. Este tiempo constituye un compromiso entre la fase de desarrollo de la planta y el tamaño del cassette. Para determinar el tiempo del experimento, se pusieron plántulas a 2, 4, 6 y 8 días (**Figura 32B**). A 2 días, la germinación prácticamente no se había producido, mientras que a 8 y 10 días, las plántulas habían crecido más de lo que lo podrían hacer en el cassette espacial (la cámara TROPI mide 46x16x17 – largo x ancho x alto). A 4 y 6 días, las plántulas entran de manera longitudinal dentro del cassette (se detalla más esta información en la). Tanto a 4 como a las 6 días, la fase de germinación ha terminado y la plántula presenta un desarrollo vegetativo típico (parte superior compuesta de hipocotilo y dos cotiledones clorofilados y parte inferior compuesta por la raíz principal), pero la biomasa producida a 6 días es muy superior, especialmente

atendido a la cantidad de raíz. Por lo tanto, los experimentos en nuestro laboratorio determinaron que la duración del experimento en órbita debía ser de 6 días, periodo suficiente para estudiar las fases tempranas del desarrollo vegetativo con la suficiente biomasa.

1.1.3 Observación de las plántulas

Para observar el desarrollo de la plántula mientras crecen en los cassettes se necesitan cumplir dos requisitos adicionales. Por un lado tener imágenes frecuentes y con calidad suficiente (300 DPI) para el análisis post-vuelo, y por otro lado, que las plántulas en cada cassette estén suficientemente espaciadas, para evitar el tigmotropismo entre ellas. En relación al tigmotropismo, experimentos en nuestro laboratorio demostraron que podíamos utilizar tres configuraciones, la nominal con 14 plántulas por cassette (para optimizar la recogida de imágenes), otra a doble densidad, con 28 plántulas por cassette (para optimizar la recogida de biomasa sin arriesgar demasiado el riesgo de tigmotropismos) y una situación intermedia con 22 plántulas en la que solo se captura imagen en una mitad del cassette (**Figura 32C**).

En cuanto al primer requisito, la cámara instalada en el EMCS solo puede capturar medio cassette para obtener la calidad de 300 DPI, por lo que las imágenes deberán de ser reconstruidas posteriormente. La hidratación de las muestras marcará el inicio del experimento, y para asegurarnos de una correcta hidratación, se captará en todos los cassettes un video en el que se verá como el agua entra en el filtro de papel con el medio de cultivo y la membrana gris sobre la que están adheridas las semillas se torna más oscuro, pudiendo aplicar más cantidad de agua si fuera necesario. Además, deberá de proveer de imágenes de calidad (300 DPI) para comprobar el grado de germinación, hacer las mediciones de la longitud de la raíz y de su orientación al crecer, con una frecuencia de 8 horas durante los primeros cuatro días (el tiempo que está con luz blanca) y cada hora en los últimos 2 días (cuando reciben el estímulo con luz roja) en las condiciones SG1/2.

1.1.4 Iluminación de las plántulas

En cuanto a la iluminación, experimentos previos realizados por el grupo del Dr. Kiss, demostraron que el uso de LED blancos, rojos y azules, con apagado-encendido independiente el uno del otro y con orientaciones diferentes, es suficiente para generar las respuestas fototrópicas que buscamos en órbita. Así, los LED blancos se distribuyeron a lo largo del cassette con un grado de fluencia de 40-50 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$. Los LED rojos (660nm) y azules (450nm), que proporcionarán el estímulo lumínico, se orientarán desde un lateral del cassette, con un grado de fluencia de 10 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ (Kiss et al 2006, Kiss et al 2009).

1.1.5 Niveles de gravedad

Los niveles de gravedad a los que estuvieron expuestas las muestras varían desde 1g, hasta microgravedad, pasando por varias gravedades parciales, como 0,1; 0,3; 0,5 y 0,8g (Tabla 5). En la práctica, con estas configuraciones de gravedades parciales y teniendo en cuenta la distribución de la gravedad en las cinco posiciones del cassette, pretendemos cubrir todo el espectro e inferir lo que podría ocurrir en la Luna o Marte, con gravedad de 0,16g en la Luna y de 0,37g en Marte.

Cassette	μg	0,1g	0,3g	0,5g	0,8g	1g	1g
1	0	0,07	0,21	0,34	0,55	0,52	0,69
2	0	0,08	0,25	0,42	0,68	0,64	0,85
3	0	0,1	0,3	0,5	0,8	0,76	1,00
4	0	0,11	0,34	0,58	0,92	0,88	1,16
5	0	0,13	0,39	0,65	1,05	1,00	1,32

Tabla 5: Gravedades reales existentes en los diferentes cassettes durante el experimento SG en la ISS. En el eje vertical aparecen las 5 posiciones de un cassette en el EC. En el eje horizontal se muestra la configuración de la gravedad a la que se pone el EC completo. En negrita destaca el cassette que está realmente a la gravedad deseada. En azul los cassettes que se consideran dentro de la gravedad existente en la Luna. En rojo, los cassettes que se consideran con una gravedad como la de Marte.

1.1.6 Resumen de otros requisitos exigidos para el experimento espacial “Seedling Growth”

Todos estos requerimientos del experimento se tratarán de reproducir lo más fielmente posible en todas las simulaciones previas en tierra. Todos los requisitos que necesitamos durante la fase de crecimiento y análisis de *Seedling Growth* acorde a pruebas previas en nuestro laboratorio, se muestran en la **Tabla 6**.

Condición	Requisito	Comentarios
Duración	6 días	
Temperatura	22°C	Desde el sembrado hasta el análisis
Humedad	90%	±10%
Iluminación (LED)	Blanca	40-50 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$
	Roja (660nm)	10 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$
	Azul (450nm)	10 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$
Hidratación	850 μl	±10 μl
Nivel de g	μg , 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1	
Imágenes	300 DPI	Fotos y videos, espaciado de plántulas
Congelación	-80°C	Constante, nunca superior
Fijación	PFA 8%	En PBS. Mínimo del 60% del volumen total del cassette.
	GA 4,5% + PFA 1,5%	

Tabla 6: Requisitos exigidos para el experimento espacial “Seedling Growth”.

1.2 Definición de las líneas transgénicas/mutantes a utilizar en SG

Los requerimientos de cultivo en cada línea transgénica pueden ser diferentes, por eso hay que adaptar cada una de ellas a las condiciones del hardware experimental a utilizar. Debemos de comprobar como crecen los cassettes y con el sustrato basado en papel que se empleará en el experimento SG y que no es el habitual (sustrato de gel de agar) en el laboratorio.

Los cassettes espaciales (TROPI) tienen unas dimensiones útiles de 1,5 centímetros de ancho, por lo que necesitamos saber la posición a la que se colocarán las semillas en la base del cassette para que se pueda monitorizar su crecimiento durante los 6 días. Para ello, cultivamos las tres colecciones de mutantes: los mutantes de fitocromos (con fondo genético Landsberg erecta (Ler)), los mutantes de la ruta de transporte y de sensibilidad a la auxina (con fondo genético Columbia-0 (Col)) y las correspondientes a los mutantes de crecimiento celular (nucleolina, con fondo genético Columbia-0 (Col)) en soporte papel en condiciones ambientales similares a las del EMCS en la ISS (cámara de cultivo SANYO MLR-350H) y en el mismo hardware TROPI a utilizar en la ISS (aunque en gravedad control 1g). Así hemos determinado la posición de las semillas en función de la longitud que alcancen en condiciones normales (**Figura 33**).

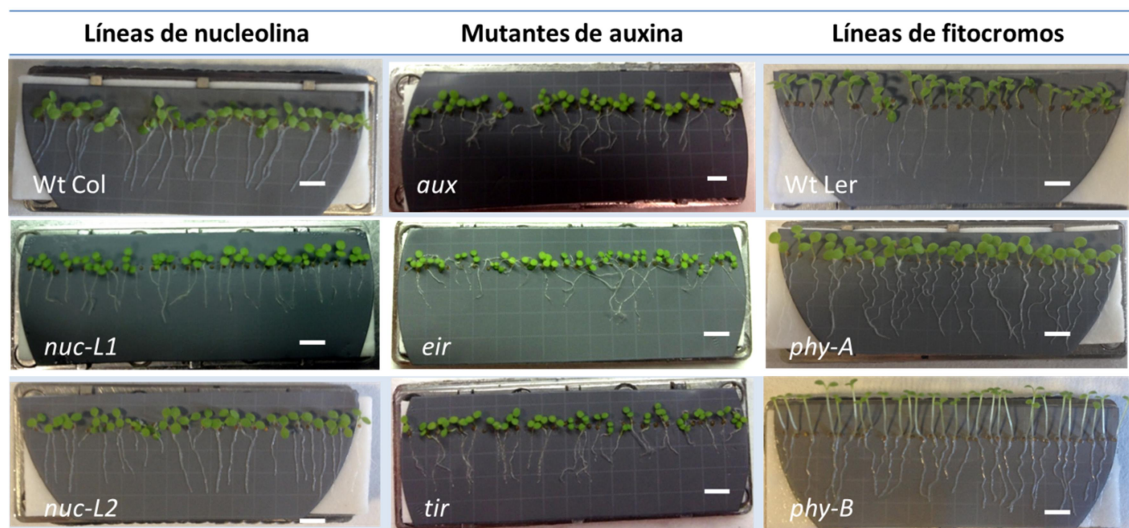


Figura 33: Crecimiento de las líneas a utilizar en "Seedling Growth" en los cassettes TROPI a 6 días. Fotos de los ecotipos crecidos durante 6 días en los cassettes espaciales en las mismas condiciones que lo harán en la ISS. La barra blanca indica 3 mm.

En general el ecotipo Ler y los mutantes con esa base genética tienen un tiempo de germinación más corto que las construcciones con Col-0, y su longitud a los 6 días es ligeramente superior que la de estas (Waters & Grusak 2008). Sin embargo, en cada ecotipo hay pequeñas variaciones en la longitud de cada mutante, por lo que decidimos aplicar la regla que se observa en la **Figura 34B**, para el óptimo posicionamiento de cada ecotipo en el cassette TROPI, con el objetivo principal de que a los 6 días de crecimiento aún tengan espacio suficiente sin alcanzar la cubierta del cassette. Debido a que la cámara es fija, los cassettes que se encuentran en las posiciones distales 1 y 5 de cada EC, no se verían adecuadamente. Por ese motivo, se modifica la altura a la que se colocan las semillas en los cassettes de dichas posiciones para que los bordes del propio cassette no entorpezcan la grabación de la germinación y crecimiento de las plántulas, teniendo en cuenta la superficie útil del cassette (**Figura 34A**). Esa modificación consiste en sembrar las semillas a +1,5mm y -0,15mm respectivamente con respecto a la altura que le corresponde según genotipo (**Figura 34C**).

Atendiendo a la longitud de crecimiento de las plántulas en el hardware Tropi, atribuimos un ecotipo a cada cassette y una distancia de sembrado (**Tabla 7**). Como el ángulo con el que la cámara toma la foto es diferente si el cassette está en la primera o en la última posición, el primer cassette de cada EC estará 1,5 mm por encima de la posición establecida para su ecotipo y los que estén en la última posición estarán 1,5 mm por debajo. Esta configuración también sirvió para el montaje de las test previos del vuelo espacial OVT, del que más tarde se detallará.

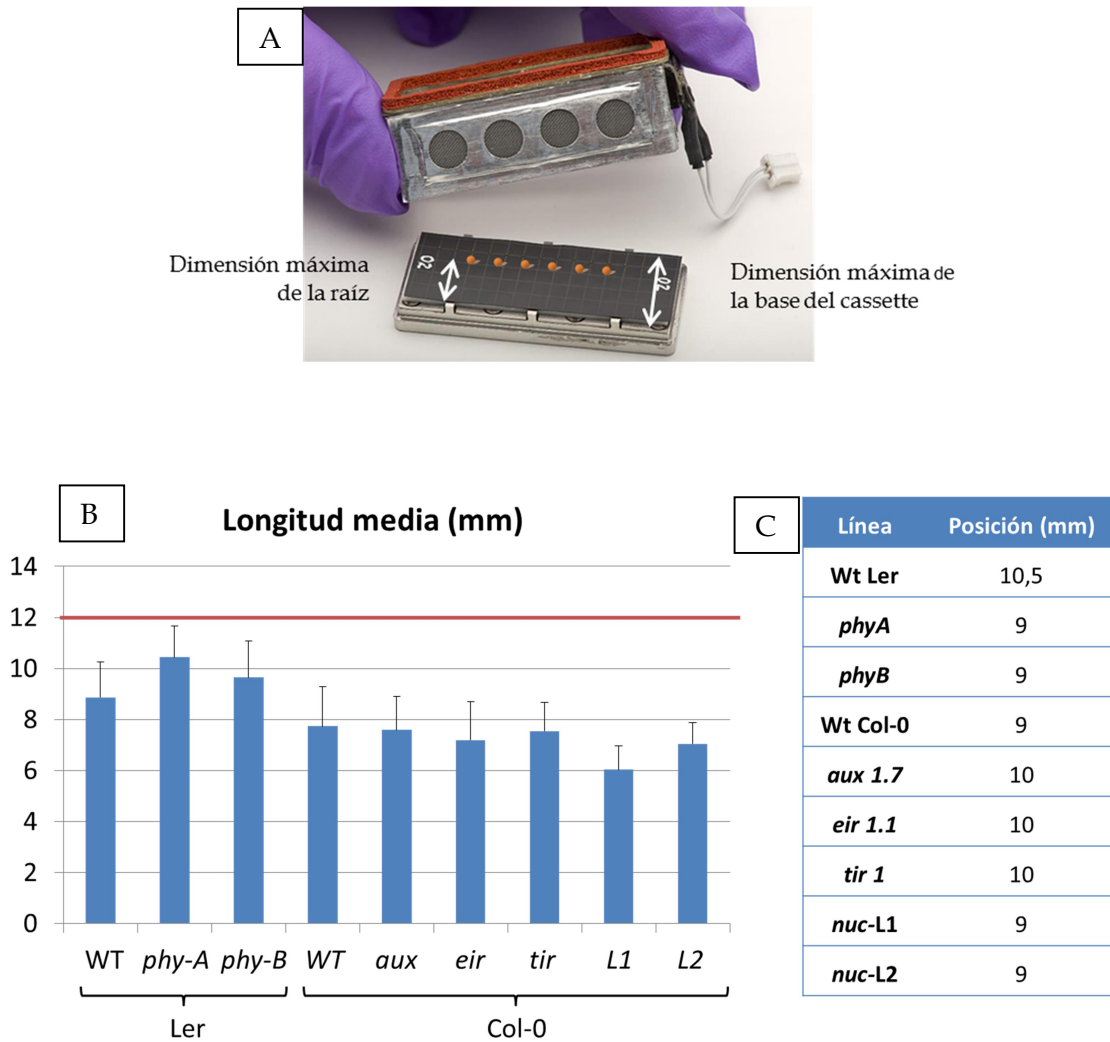


Figura 34: Distancias de sembrado. A) Esquema indicando la superficie máxima de la base del cassette, y la distancia útil que tienen las raíces para crecer durante el experimento. B) Gráfico de la longitud media de las raíces de los diferentes genotipos. Las barras de cada columna representan el error estándar. La línea roja fijada a 12mm representa la distancia máxima a la que se podrían colocarse las semillas de la base del cassette. C) Distancia a la que se siembra cada uno de las líneas de Arabidopsis contado desde la base del cassette y atendiendo a la longitud de la raíz de las plántulas crecidas en el hardware Tropi a 1g en condiciones ambientales similares al vuelo espacial.

		Línea	mm		Línea	mm		Línea	mm		Línea	mm
SG2 - Run 1	EC1	Ler	12	EC2	<i>phyB</i>	10,5	EC3	Ler	12	EC4	Ler	12
		<i>phyB</i>	9		<i>phyA</i>	9		<i>phyA</i>	9		<i>phyA</i>	9
		Ler	10,5		Ler	10,5		<i>phyB</i>	9		<i>phyB</i>	9
		<i>phyA</i>	9		<i>phyB</i>	9		Ler	10,5		Ler	10,5
		<i>phyB</i>	7,5		Ler	9		<i>phyA</i>	7,5		<i>phyA</i>	7,5
SG2 - Run 2	EC5	Ler	12	EC6	<i>phyB</i>	10,5	EC7	Ler	12	EC8	Ler	12
		<i>phyB</i>	9		<i>phyA</i>	9		<i>phyA</i>	9		<i>phyA</i>	9
		Ler	10,5		Ler	10,5		<i>phyB</i>	9		<i>phyB</i>	9
		<i>phyA</i>	9		<i>phyB</i>	9		<i>phyA</i>	9		Ler	10,5
		<i>phy B</i>	7,5		Ler	9		Ler	9		<i>phyA</i>	7,5
SG2 - Run 3	EC9	<i>eir</i>	11,5	EC10	<i>eir</i>	11,5	EC11	Col0	10,5	EC12	Col0	10,5
		<i>Tir</i>	10		<i>tir</i>	10		<i>nuc 1</i>	9		<i>nuc 1</i>	9
		<i>aux</i>	10		<i>aux</i>	10		Col0	9		Col0	9
		<i>nuc 1</i>	9		<i>nuc 1</i>	9		<i>nuc 2</i>	9		<i>nuc 2</i>	9
		<i>nuc 2</i>	7,5		<i>nuc 2</i>	7,5		Col0	7,5		Col0	7,5
	EC13	<i>eir</i>	11,5	EC14	<i>eir</i>	11,5	EC15	Col0	10,5	EC16	Col0	10,5
		<i>tir</i>	10		<i>tir</i>	10		<i>nuc 1</i>	9		<i>nuc 1</i>	9
		<i>aux</i>	10		<i>aux</i>	10		Col0	9		Col0	9
		<i>nuc1</i>	9		<i>nuc 1</i>	9		<i>nuc 2</i>	9		<i>nuc2</i>	9
		<i>nuc2</i>	7,5		<i>nuc 2</i>	7,5		Col0	7,5		Col0	7,5

Tabla 7: Configuración de los cassettes en los diferentes EC que componen SG2. Distancia en milímetros a la que se sembraron las semillas en los diferentes cassettes medido desde la base del papel de nitrocelulosa. Dispusimos de 16 EC que contenía cada uno 5 cassettes, siendo la primera posición el que aparece arriba y la última el que aparece en quinta posición.

1.2.1 Mejora de los lotes y de las semillas

El hardware del experimento espacial tiene una importante limitación de espacio útil. A esto hay que sumarle que la distribución de semillas en el cassette también es una limitación a la hora de obtener biomasa. Lo ideal sería que todas las semillas sembradas germinasen de manera sincrónica y lo hicieran de manera vigorosa y homogénea.

Para obtener la máxima eficiencia en la germinación impusimos un duro proceso de selección de semillas. Se sembraron varios papeles con semillas *wild-type*, unos se dejaron tal cuál y a otros se les sustituyeron todas las semillas con cualquier mínima evidencia de estar rotas o dañadas por otras en buen estado con ayuda de una lupa (Figura 35A y métodos apartado 1.3). La tasa de germinación en los cassettes no seleccionados oscilaba entre el 50 y 70%, mientras que en los que se mantuvieron las semillas seleccionadas superaba el 95%. De esta forma se consigue optimizar la germinación. El siguiente objetivo es conseguir que sean heterogéneas en su crecimiento. Para ello, las semillas deben ser lo más uniformes posibles: mismo tamaño, mismo color y mismo aspecto.

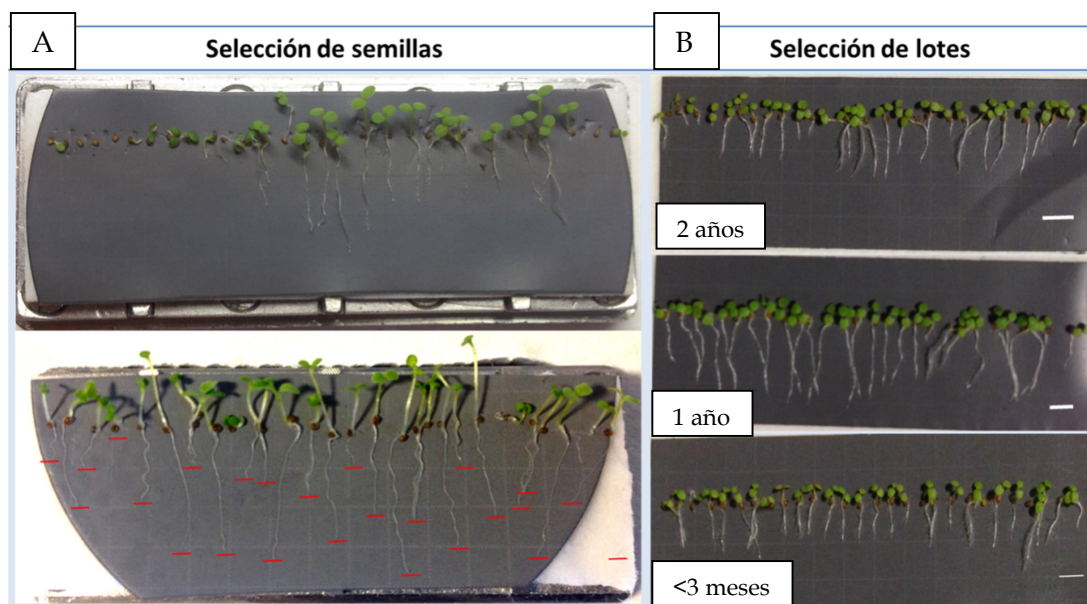


Figura 35: Germinación y crecimiento de las semillas. A) Arriba: semillas sin ningún tipo de selección. Abajo: semillas en las que se retiraron las semillas dañadas, pero no se seleccionaron en función de otros parámetros. Las líneas rojas indican un heterogéneo punto máximo de crecimiento tras 6 días de crecimiento de cada plántula. B) Semillas seleccionadas de lotes del mismo fenotipo *wild type* Col-0 de años consecutivos. La barra blanca indica 3 mm.

Otra característica a tener en cuenta es la vigorosidad. Se pusieron a crecer diferentes semillas de lotes de años consecutivos aplicando una selección de semillas completa (**Figura 35B**). Las más antiguas han perdido ligeramente la vigorosidad, las segundas están en su máximo de vitalidad, mientras que las más recientes, aunque con potencial por su homogeneidad, aún no han madurado lo suficiente y no presentan el crecimiento esperado. Hemos comprobado que los datos mostrados son extrapolables a cualquiera de las otras líneas.

En consecuencia, tanto en el experimento espacial *Seedling Growth*, como en los experimentos de simulación en Tierra, utilizaron lotes y semillas seleccionados.

1.3 Definición de las condiciones de preservación de las muestras espaciales

Es otra etapa crucial del experimento espacial ya que la fijación en estas condiciones implica que el material biológico tiene que ser lo más representativo posible del estado de las células al final del experimento, la preservación tiene que ser de buena calidad para poder aplicar las técnicas de estudio en el laboratorio. Y al final, la fijación tiene que tener en cuenta las limitaciones de los experimentos en la ISS debido al mínimo consumo de tiempo de los astronautas, la limitación de la utilización de líquidos para la fijación (y los niveles de contenimiento/protección), la escasa accesibilidad a bajas temperaturas entre los más importantes.

1.3.1 Congelación de las muestras en condiciones de ingravidez

El hardware TROPI no tiene incorporado ningún sistema de refrigeración que pueda enfriar o congelar las muestras. Se plantearon varias alternativas durante la fase de definición del experimento espacial:

- Sacar las muestras y congelarlas
- Congelarlas en RNALater
- Congelarlas en MELFI

Para la posterior extracción de RNA de las muestras en Tierra, lo óptimo sería tenerlas en un tubo de centrifuga congeladas o con RNALater. Las dos primeras opciones exigirían que el astronauta debería de coger cada uno de los cassettes, abrirlas y coger cada una de las plantas crecidas para ponerlas en el tubo. En condiciones de ingravidez, las muestras podrían soltarse con el mínimo golpe y perderse, además de

que el tiempo óptimo que debe de pasar desde que se termina el crecimiento de las muestras hasta que se congelan no debería exceder de 45 minutos, y todos estos pasos requerirían mucho más tiempo.

Además, la fijación de las muestras en RNALater, introduciendo el líquido en el cassette de forma directa, tampoco es viable porque el hardware TROPI no tiene implementado ningún sistema de introducir más líquidos que el agua de la hidratación al inicio del experimento. No obstante, esta opción si estará disponible un avez que se disponga del FixBox (no disponible para SG1 ni SG2) (ver apartado 1.3.2 de resultados).

Finalmente se optó por utilizar el MELFI, un congelador existente en la ISS que ya se había utilizado en otros experimentos previos. El astronauta debe sacar los cassettes del hardware de uno en uno y directamente los colocará en un cinturón especial que funciona como bolsa térmica. En cada bolsa caben 2 EC (10 CC). Finalmente, colocará dicho cinturón en el congelador.

1.3.2 Fijación de las muestras en condiciones de ingravidez

El experimento espacial Seedling Growth III (SG3) prevé que las muestras sean fijadas para su estudio estructural y transcripcional, sin embargo el hardware experimental (TROPI) no ha sido diseñado para la fijación de muestras en la Estación Espacial. El principal reto que debimos afrontar fue buscar una adaptación a la fijación en el hardware y reducir al máximo la cantidad y la toxicidad de los fijadores empleados.

Por otro lado, inyectar el fijador en un cassette TROPI y lograr que el llenado del cassette sea completo, dificulta aún más el diseño tecnológico de la unidad de fijación (FIXBOX). El aire dentro de los cassettes se comporta como un fluido en microgravedad, es decir, para introducir el fijador, antes debe de ser removido el aire, para no comprometer la estructura del cassette. Como esa tecnología de extracción no está implementada, debemos de conocer el volumen máximo de fijador que se puede introducir sin comprometer la estructura del cassette. Otro problema surge porque en microgravedad los líquidos tienden a aglutinarse, formando burbujas, y ya que es imposible un llenado al 100% del cassette, debemos de asegurarnos que las plántulas estén inmersas en la cantidad de solución fijadora que podamos introducir.

1.3.2.1 Sustitución de los fijadores basados en aldehídos por NotoxHisto

El elevado grado de toxicidad de los fijadores convencionales se debe a su volatilidad, por lo que, tanto el paraformaldehído (PFA) como el glutaraldehído (GA), deben ser contenidos con una triple barrera para evitar posibles fugas en cualquier dispositivo de fijación que se desee utilizar en experimentos espaciales.

Se comparó la calidad de fijación de los dos fijadores convencionales al doble de la concentración normal para compensar la evaporación (PFA al 8% y GA al 6%) con NotoxHisto (NH 1X), un fijador no basado en aldehídos. Las muestras fueron fenotipos silvestres crecidos sobre papel durante 6 días y con diferentes niveles de fijación. Los casos que se podrían dar en los cassettes espaciales serían que las muestras estén completamente sumergidas en el fijador, que no entren en contacto con él y se deban fijar por una atmósfera saturada en vapores o algo intermedio (sin estar sumergidas pero cerca del fijador por capilaridad del papel con la atmosfera saturada) (**Figura 36**).

Se compararon con microscopía de luz transmitida las muestras fijadas con los tres fijadores y en las tres posiciones. También se comparó la conservación del antígeno entre el nuevo fijador y el PFA con anticuerpos antinucleolina-L1 con microscopía confocal.

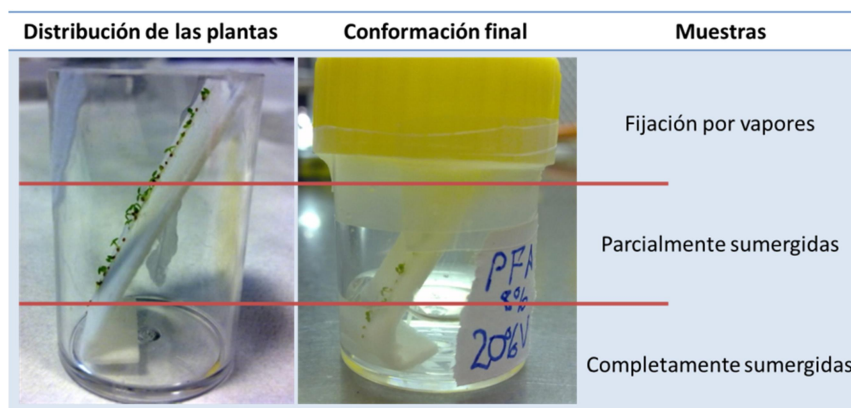


Figura 36: Distribución de las muestras para el experimento de fijación con Notoxhistro. Foto del diseño del experimento de fijación con NotoxHisto. Las plantas crecieron en papel y después se colocó dentro de un tubo con 10 ml de capacidad (izquierda). Después se añadió el fijador correspondiente (derecha) permitiendo tener en el mismo tubo muestras totalmente sumergidas, semibañadas con el fijador y plántulas más distales que podríamos considerar que han tenido una fijación a base de vapores.

La fijación de los meristemos de las muestras sumergidas en NotoxHisto permitió una buena preservación estructural (**Figura 37**) al nivel de como sería la fijación con GA. De la misma forma, este fijador mantiene la antigenicidad lo suficiente como para realizar las oportunas mediciones de nivel de expresión proteico por inmunofluorescencia (**Figura 38**) al mismo nivel que el PFA. Sin embargo, las muestras que no estaban completamente sumergidas no conservaban el epítipo proteico. Usando los fijadores aldehidos, las muestras fijadas por vapores en vez de por inmersión, presentaban una calidad de fijación inferior pero suficiente como para realizar estudios de preservación estructural.

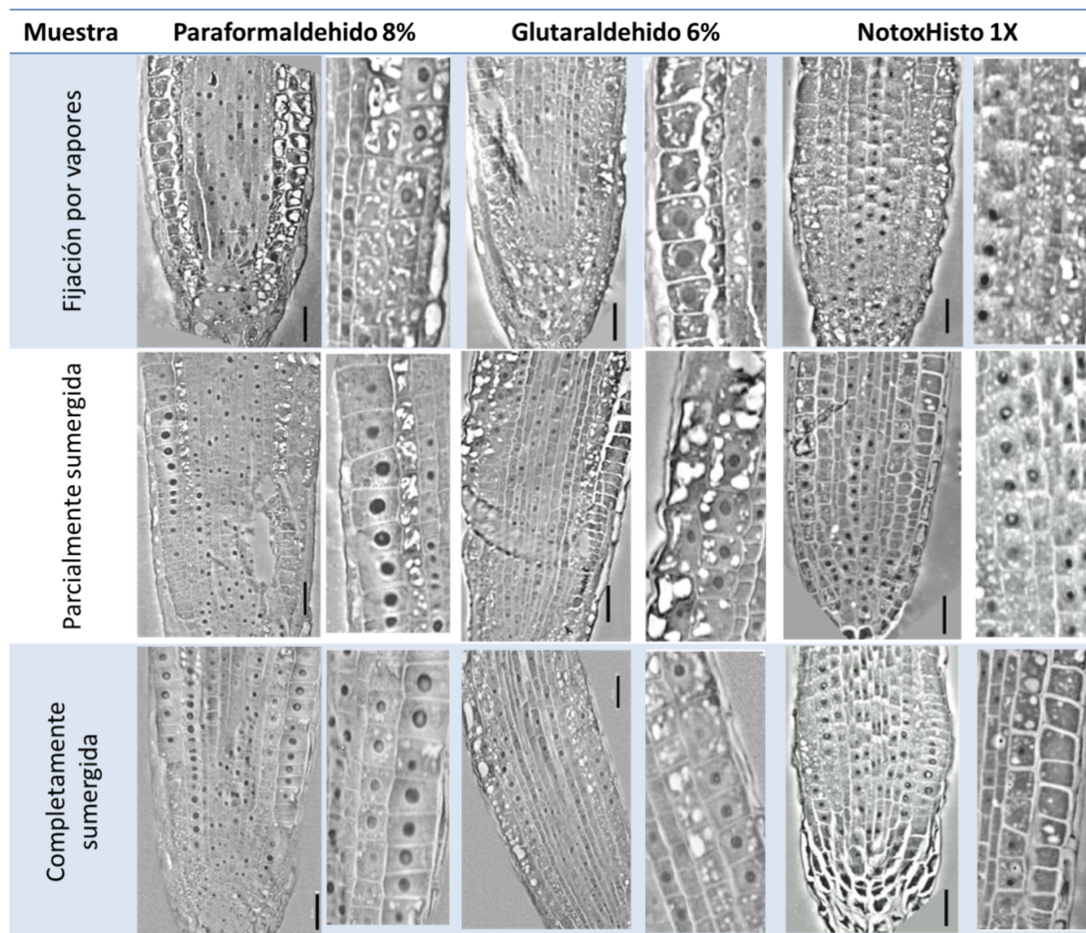


Figura 37: Comparación de la calidad de fijación con PFA y NotoxHisto en muestras sumergidas, húmedas o semi-secas (fijación por vapores). Meristemos de raíz de *wild-type* de 6 días fijados con paraformaldehído 8% (izquierda), con glutaraldehído al 6% (centro) o con Notoxhisto 1X (derecha) durante 2 horas. El grado de inmersión de la muestra en el fijador varía de semi-seco (arriba), húmedas o parcialmente sumergidas (centro) o completamente sumergidas (abajo). La barra negra indica 20 μ m. A la derecha de cada foto se muestra un detalle (no a escala).

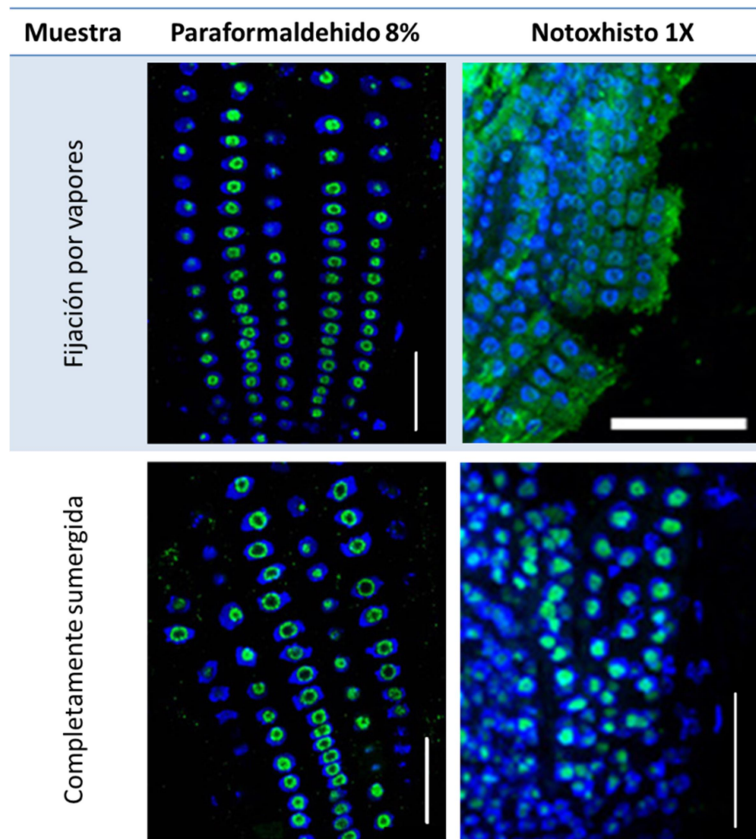


Figura 38: Comparación de la calidad de fijación con PFA y NotoxHisto en muestras sumergidas, húmedas o semi-secas (fijación por vapores). Fotografías de microscopía confocal de inmunofluorescencia con antinucleolina-L1 en meristemas de raíz de *wild-type* de 6 días fijadas durante 2 horas por vapores (arriba) o por inmersión (abajo) en paraformaldehído 8% (izquierda) o en NotoxHisto 1X (derecha). La fluorescencia azul corresponde al DAPI (ácidos nucleicos) y en verde el anticuerpo. La barra blanca indica 25 μm .

1.3.2.2 Fijación de las plántulas en el hardware Tropi: Ferrofluido

Dado que en condiciones de microgravedad la posición de los fluidos dentro del cassette es difícil de predecir, se propuso utilizar un producto llamado Ferrofluido, un líquido que contiene nano partículas con propiedades magnéticas que en presencia de un imán arrastraría el líquido hacia él, que coincidiría con el lugar donde esté la muestra biológica en nuestro cassette. Nuestro papel consistió en testar la biocompatibilidad con nuestras muestras biológicas y la mínima interferencia con las técnicas de laboratorio que se emplearían tras la fijación. En concreto, saber si la mezcla con fijadores produciría algún tipo de reacción inesperada, si las partículas de magnetita dañan la ultraestructura del meristemo, si bloquean su antigenicidad o si dificultan la observación de algún modo. Según requerimientos del fabricante, la mínima concentración eficaz de ferrofluido es el 60% (v/v). A esa concentración es miscible en otros líquidos testados como agua, tampón de solución fosfato (PBS) y fijadores. Se analizaron muestras tras dos horas de fijación (Figura 39).

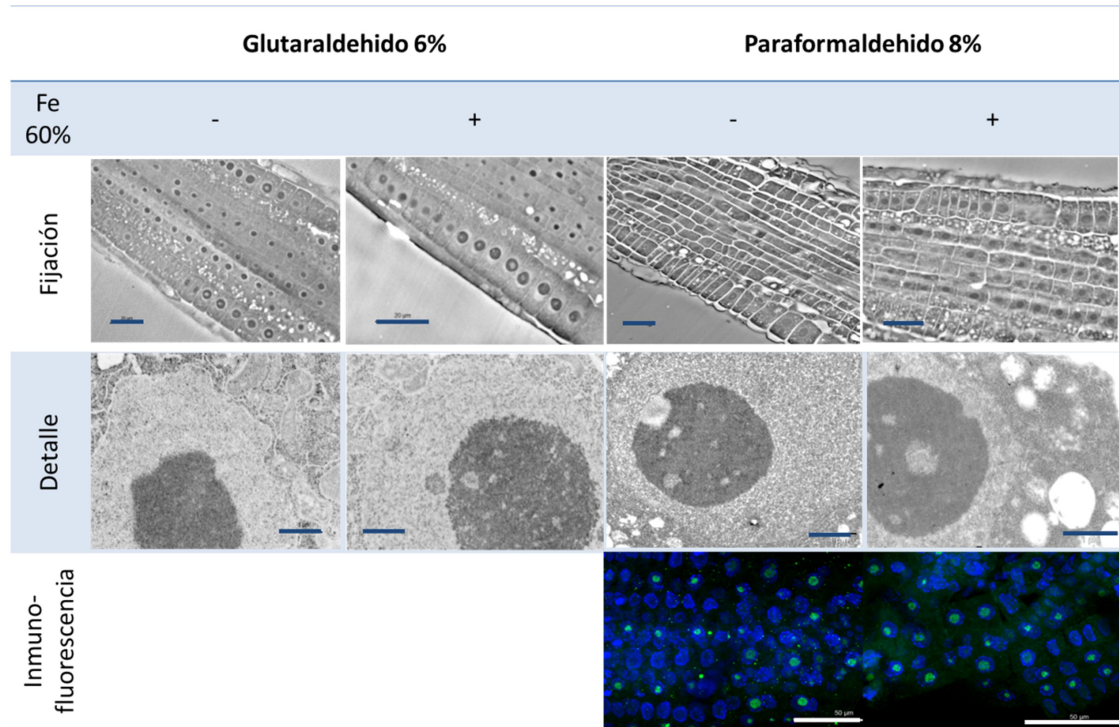


Figura 39: Efecto del ferrofluido en la preservación estructural del meristemo radicular tras 2 horas de fijación con PFA o GA. Arriba) Fotografía de microscopía de luz transmitida sobre meristemos de raíz tras 6 días de crecimiento. La barra de escala azul indica 20 μ m. B) Detalle de una célula meristemática de las preparaciones anteriores a microscopía electrónica. La barra azul indica 1 μ m. C) Inmunodetección in situ del nucleolo (anti-nucleolina en verde) y el núcleo (DAPI) en meristemos de raíz. La barra indica 50 μ m.

En términos de preservación estructural, todas las muestras mostraron una calidad de fijación suficiente, independientemente de usar GA o PFA, solo en PBS o en presencia de 60% de ferrofluido. No se apreció ningún daño estructural a nivel nuclear ya que las nanopartículas de ferrofluido no entraron al interior de las células de las zonas meristemáticas observadas. De hecho, se puede observar en los cortes con glutaraldehido, que el ferrofluido se acumula en la parte externa de la raíz como una línea más gruesa y negra, algo que también se muestra en la fijada con paraformaldehído, y en ningún caso en los controles sin ferrofluido.

Una vez determinada la compatibilidad del ferrofluido con la técnica de fijación nos propusimos definir el tiempo de almacenamiento máximo de las muestras estas soluciones fijadoras con garantía de obtener resultados óptimos en el experimento espacial. Es posible, que debido a los requerimientos de carga y descarga de materiales desde la Estación Espacial, las muestras se deban conservar varios meses en el espacio. En nuestro experimento, fijamos las raíces de *Arabidopsis* a los 6 días tras la germinación durante 2 horas y a temperatura ambiente, tras lo cual conservamos las

muestras a 4°C durante 2 y 6 meses para estudios estructurales (fijación con GA y PFA, **Figura 41A**) y durante 1, 3 y 6 meses para estudios inmunológicos (fijación con PFA, **Figura 41B**).

Tras los 6 meses de almacenamiento en condiciones de gravedad normales, los tubos de ensayo con ferrofluido habían aglutinado las partículas en el fondo (**Figura 40**). Este hecho se observó especialmente en los tubos que contenían glutaraldehído. Como se aprecia en las fotografías mostradas, la estructura morfológica queda bien preservada con y sin ferrofluido, disminuyendo la calidad de las muestras en función del tiempo. A los seis meses las muestras presentan muchos daños estructurales lo que parece agravarse ligeramente en las muestras con ferrofluido, sin embargo a los 2 meses la preservación es suficiente y equivalente a la observada en presencia de ferrofluido. Acorde a los resultados morfológicos, la preservación antigénica es adecuada en las muestras fijadas en condiciones habituales incluso tras 6 meses. Sin embargo, la adición de ferrofluido provoca una ligera disminución de la señal a los 3 meses y la pérdida completa de la antigenicidad tras 6 meses.



Figura 40: Precipitación del ferrofluido. Tubo de ensayo dónde se aprecia la precipitación del ferrofluido en presencia de glutaraldehído tras 6 meses de fijación a 4°C.

v

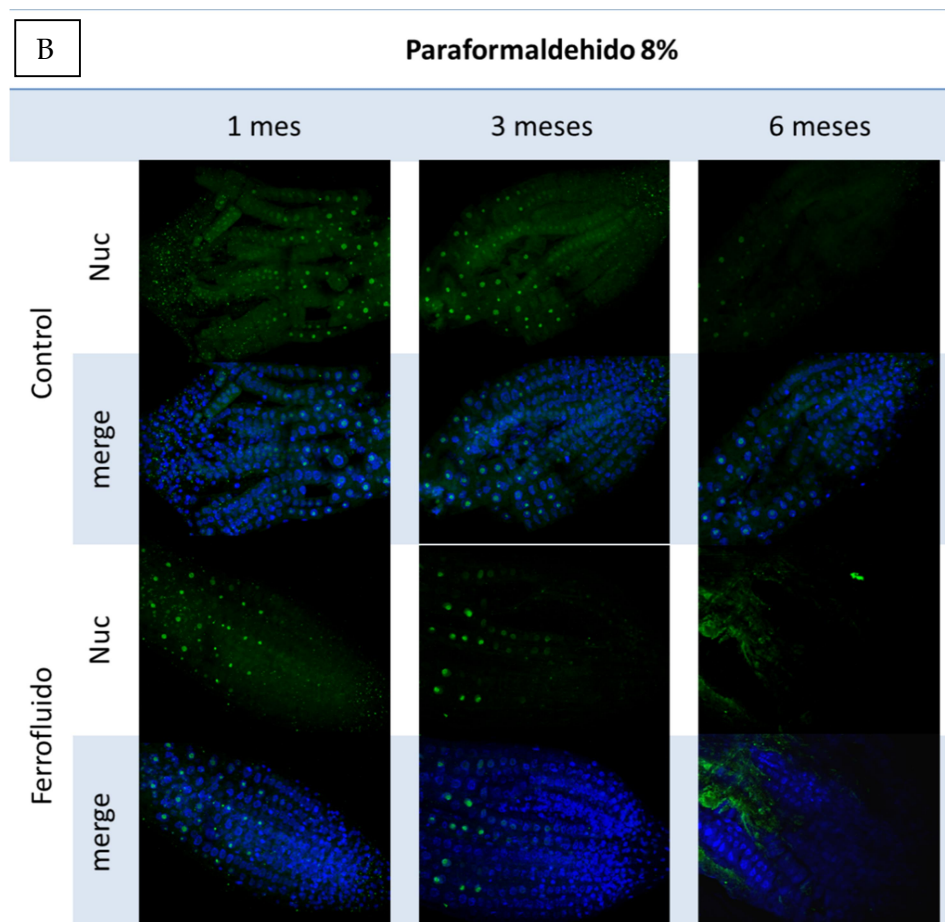
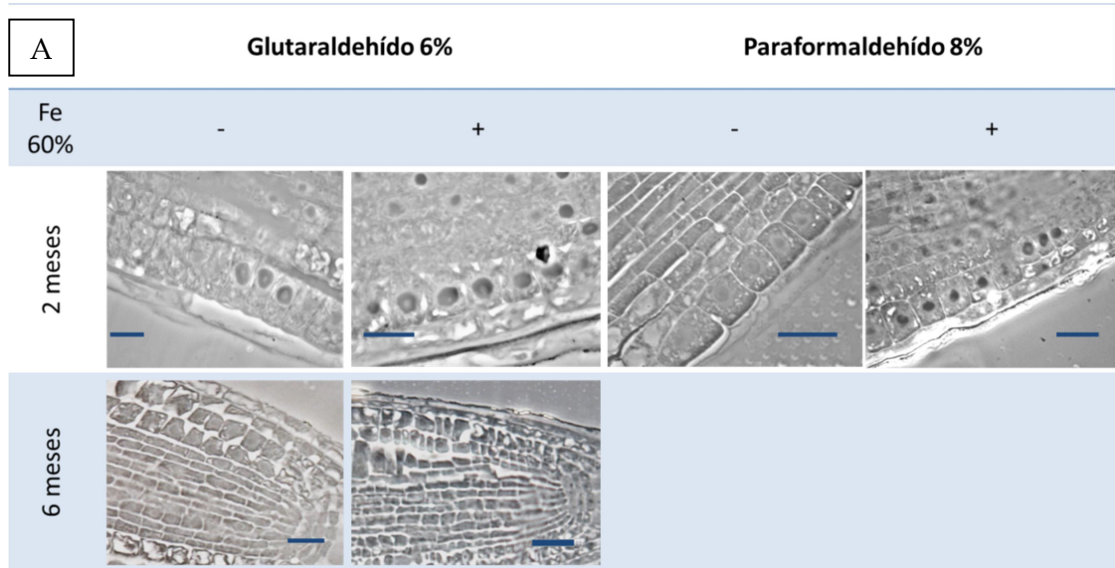


Figura 41: Preservación de muestras en presencia de ferrofluido a tiempos largos. A) Meristemos de raíz fijados en glutaraldehído o paraformaldehído y conservados durante 2 ó 6 meses a 4°C. La barra indica 10 µm. B) Fotografías del meristemo radicular obtenidas por microscopía confocal (proyección máxima) de muestras fijadas con PFA y conservadas durante 3 ó 6 meses con y sin ferrofluido. Nuc: señal del anticuerpo marcador de nucleolina (nucléolos en verde). Merge: señal anterior + DAPI (núcleos en azul).

1.4 Fase de ejecución del experimento espacial “Seedling Growth”

Antes de realizar el experimento en la ISS, es necesario realizar con anterioridad en tierra dos pruebas de las mismas características que las espaciales. Se trata de la prueba de programación (*Schedule Test* - ST) y la prueba de verificación de operaciones (*Operations Verification Test* - OVT). Se realizaron el ST-1 y el OVT-1 con las muestras de SG1 y el ST-2 y OVT-2 con las de SG2 respectivamente. Todos los cassettes utilizados en las pruebas se montaron en el centro de la NASA-ARC y se transportaron hasta el centro noruego N-USOC, dónde se encuentra una réplica del incubador existente en la ISS, dónde el astronauta tiene su entrenamiento.

Los ST sirven para comprobar que las operaciones a realizar, son viables con el tiempo y recursos asignados, que el software y hardware funcionan correctamente (verificar luces, temperaturas, sensores recolectores de datos, etc, tal y como serán en la ISS). Porque el crecimiento de las plantas es secundario, las muestras biológicas no son enviadas porque el programa de crecimiento es uniforme fruto de las diferentes comprobaciones técnicas.

Una vez comprobados todos los parámetros técnicos, se pudo realizar el OVT. Tras el crecimiento de las muestras en las mismas condiciones que lo harían en la Estación, las muestras se transportaron hasta nuestro laboratorio en Madrid para su análisis. El transporte de las muestras tras finalizar los 6 días de crecimiento del OVT-1 se hizo introduciendo los cassettes espaciales en dos racks térmicos (20 cassettes), similares a los de los que dispone el astronauta en su cinturón. Estos racks se metieron en una caja de poliéster con nieve carbónica (-78°C - 80x80x80 cm) y a su vez en un baúl con nitrógeno líquido (-195°C) de un metro cúbico y 60 kilos de peso en total.

El cargamento con las muestras llegó el 3 de octubre de 2012 a Madrid. Cuando llegaron a nuestro laboratorio, los racks se pusieron sobre nieve carbónica y a continuación se llevaron al congelador de -80°C hasta que se procesaron (**Figura 42A**). Los cassettes estaban en perfecto estado y muy congelados, por lo que no se podía observar su interior. Cuando se abrieron los cassettes, lo primero que se apreció fue que prácticamente ninguna plántula se encontraba en su posición original, si no que estaban fragmentadas por la cubierta o por la base (**Figura 42B**). Esto se pudo deber a

que el excesivo embalaje permite mantener las muestras a buena temperatura de conservación, pero dificulta su transporte.

En los estudios transcriptómicos es importante separar la parte aérea de la raíz por dos motivos: porque el rendimiento de la extracción de ácidos ribonucleicos (RNA) de la parte aérea es mayor que en la raíz y porque la expresión de genes puede ser antagónica a los expresados en la parte aérea y la parte radicular. El análisis de estas muestras consistió en una extracción de RNA de las raíces, para validar si la conservación y la cantidad de muestra eran suficientes para los análisis de transcriptómica que se harían con las muestras de la ISS. Las medidas de absorbancia (con Nanodrop) indicaban que la extracción fue correcta, pero la electroforesis indicaba que había sufrido daños o pérdidas del material biológico (**Figura 42C**).

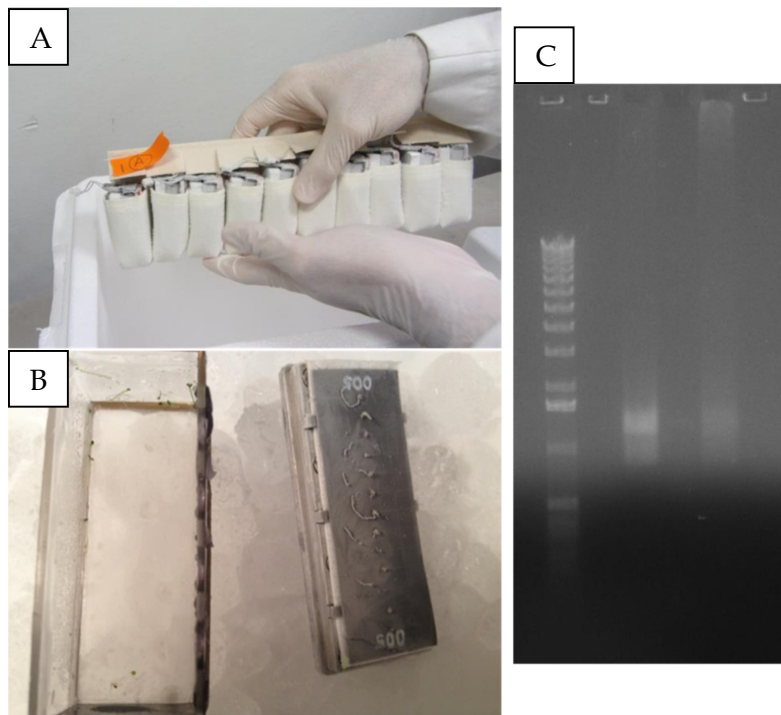


Figura 42: OVT-1. A) Recepción del rack con 10 cassettes congelados. B) Cassette abierto que presenta dispersión de los fragmentos de las plántulas crecidas en el N-USOC. C) Electroforesis con RNA de varios cassettes. El primer carril es el marcador de peso molecular, el segundo son muestras de *phyB* y el tercero de Ler.

Para OVT-2, se siguieron los mismos pasos que para OVT-1, ya que el crecimiento había sido correcto. De hecho la germinación fue muy alta y presentaban buena vigorosidad (**Figura 43A**). Para el vuelo espacial se tuvieron que cambiar 3 de los lotes usados (*aux1.7*, *eir1.1* y *nuc-L1*) por otros más actuales porque superaron en vigorosidad a los lotes usados en el OVT-2. En cambio, se modificó el transporte de las muestras una vez congeladas. En esa ocasión, las muestras serían extraídas en Noruega de los cassette y puestas en RNALater. Al estar inmersas en un conservante de ácido nucleico, se reduciría el volumen de protección térmica y al reducir el peso, no se necesitaría transportar con una transpaleta, de manera que se reducirían los golpes. La extracción de RNA de las muestras OVT-2 fue óptima, porque el RNALater congelado dificulta la degradación de material y como se ve en la electroforesis se encontraba en buen estado de conservación (**Figura 43B**).

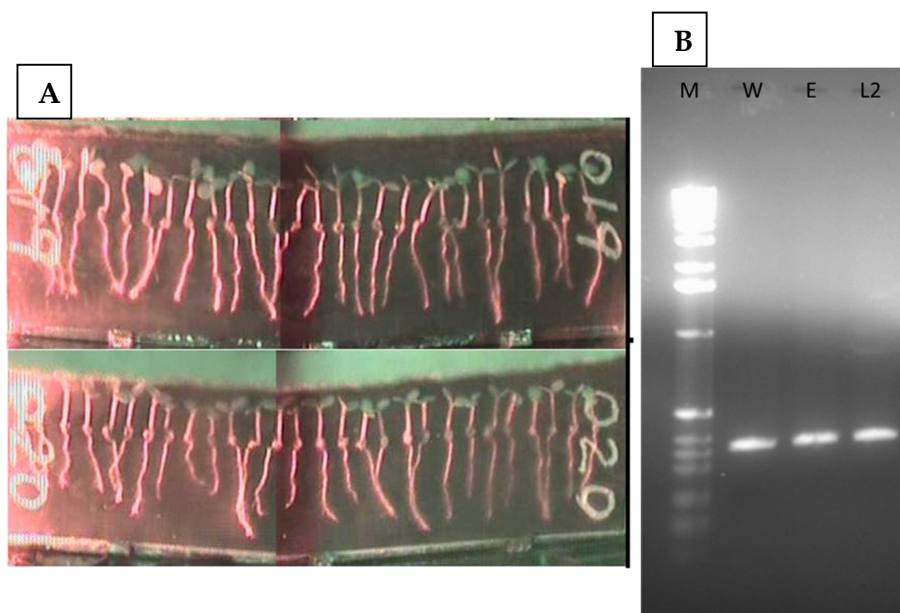


Figura 43: OVT-2. A) Plántulas tras 6 días de crecimiento en la simulación del vuelo espacial en el centro noruego del N-USOC. Arriba plántulas mutantes de *nuc-L2* y abajo el genotipo silvestre Col-0.

B) Electroforesis de extracciones de RNA. El primer carril corresponde con el marcador de peso molecular, mientras que los otros 3 carriles muestran la banda correspondiente al RNA más abundante en cada muestra de Col-0, *eir1.1* y *nuc-L2* respectivamente.

Las tasas de germinación observadas en los respectivos test fueron las esperadas (**Tabla 8**). Las muestras del OVT fueron grabadas desde la germinación hasta el fin del experimento, corroborando un adecuado crecimiento. Como los tiempos de espera entre la siembra, el viaje en transbordador hasta la ISS y el inicio del experimento serían largos y reducirían la tasa de germinación, estas elevadas tasas en los test avalaron los protocolos de mejora de lotes usados en nuestro laboratorio para realizar *Seedling Growth* en la Estación Espacial Internacional.

	Línea	Germinación 4 días	Germinación 6 días
OVT-1	Ler	89%	97%
	<i>phyA</i>	98%	99%
	<i>phyB</i>	95%	96%
OVT-2	Col-0	91%	98%
	<i>aux1.7</i>	95%	99%
	<i>eir1.1</i>	97%	97%
	<i>tir1</i>	100%	100%
	<i>nuc-L1</i>	100%	100%
	<i>nuc-L2</i>	100%	100%

Tabla 8: Tasa de germinación de los diferentes ecotipos en el OVT. Grados de germinación en % a 4 y 6 días desde la hidratación de las muestras en la prueba previa al vuelo espacial.

2 Efectos de la microgravedad en la colección de mutantes de fitocromos

En este capítulo vamos a caracterizar la competencia meristemática de la raíz, por medio de los parámetros de crecimiento y proliferación celular, en los mutantes de los fitocromos PHYA y PHYB en gravedad normal (1g) y en microgravedad simulada en la RPM (sim μ g) y real en la ISS. Concretamente, determinaremos el crecimiento longitudinal de las raíces, el número de células por unidad de longitud de la zona meristemática, el crecimiento celular (actividad nucleolar) y la expresión de genes involucrados en dichos procesos a los 6 días de crecimiento (los cuatro primeros con ciclos de luz/oscuridad y los dos últimos con luz roja o en oscuridad continua (posible compensación entre las rutas de señalización que promueven la respuesta a los estímulos de la luz y la gravedad)), por lo tanto, las condiciones lumínicas RPM-1.

2.1 Efecto de la luz roja en clinostato

Antes de iniciar los experimentos en la RPM se hizo Se pusieron semillas de *wild-type* Col-0 a crecer en el clinostato de Madrid (ONU) durante 6 días en cuatro condiciones lumínicas diferentes y su control 1g en vertical en la misma cámara de cultivo. La primera condición lumínica fue con ciclos de luz 16h / oscuridad 8h (luz), otras muestras se mantuvieron en oscuridad continua (oscuridad), la tercera condición combinó ciclos de luz durante 4 días y después 48 horas en oscuridad (luz+osc) y finalmente otras estuvieron 4 días con ciclo de luz y los dos últimos días con un foco de luz roja desde el flanco izquierdo (luz + rojo).

Las muestras crecidas de esa manera presentan fenotipos esperados, etioladas las que estuvieron en oscuridad continua y desetioladas las que crecieron en ciclo de luz, al igual que las crecieron en ciclo de luz con luz roja al final (**Figura 44**). Las que crecieron en ciclo de luz y oscuridad tenían un aspecto como las de ciclo de luz pero los hipocotilos estaban más alargados. Comparando las que crecieron en microgravedad simulada en el clinostato con su mismo fenotipo crecido a 1g, no apreciamos diferencias, salvo que las raíces presentaban el aspecto agravitrópico característico.

De las muestras crecidas fuera del clinostato, las crecidas en completa oscuridad tenían las raíces más cortas de todas las condiciones, seguida de luz + oscuridad (**Figura 45A**). Las raíces de las muestras crecidas con luz continua eran más largas y las mayores de

todas eran las crecidas con luz y luz roja. En microgravedad simulada ocurría completamente lo mismo. Comparando los mismos fenotipos con el mismo tratamiento de luz, vimos que las crecidas en oscuridad eran prácticamente idénticas, mientras que en los demás casos, la reducción en la gravedad provocaba un decrecimiento de la raíz.

La tasa de proliferación celular local (LCPR) nos indicó que no hubo cambios en la proliferación importantes ni entre muestras ni entre condiciones, salvo en las que crecieron con luz y oscuridad (**Figura 45B**). En este caso, la microgravedad simulada provocaba un aumento significativo en la proliferación, aunque en condiciones normales la proliferación estaba disminuida por sí misma.

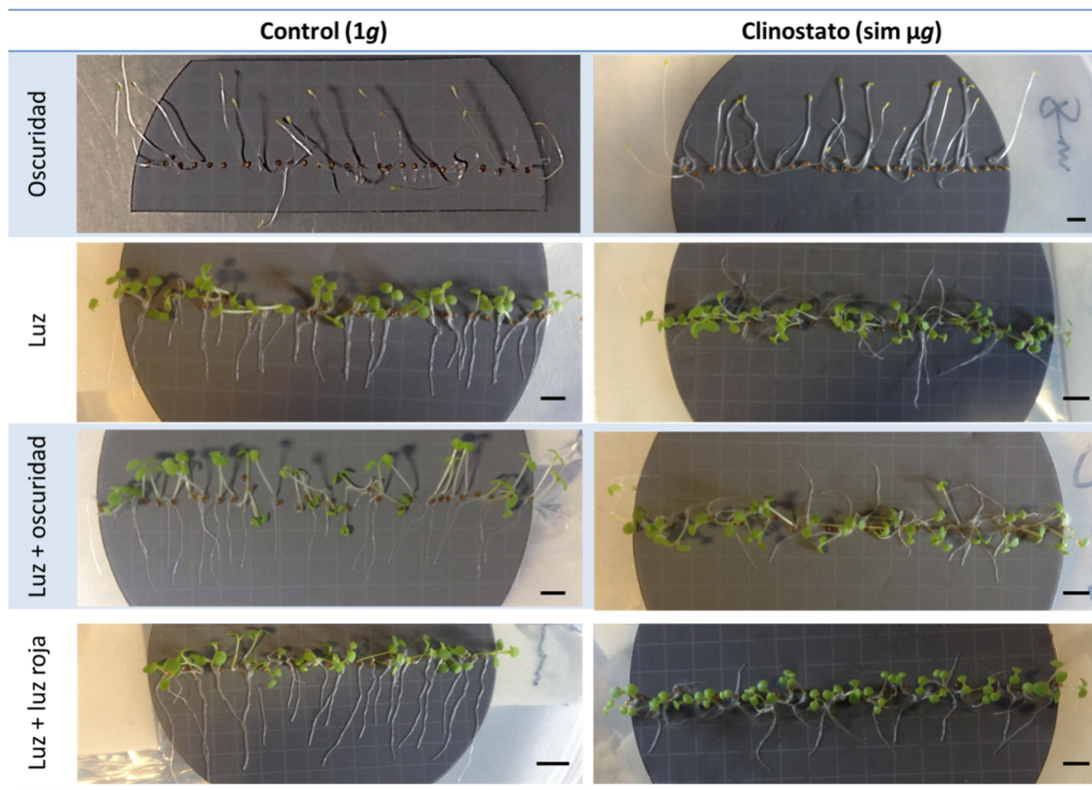


Figura 44: Crecimiento en clinostato en diferentes condiciones lumínicas. Efecto de la luz roja en microgravedad simulada. Plántulas de Arabidopsis de 6 días crecidas en diferentes condiciones lumínicas: oscuridad, ciclo de luz (16h luz/8 oscuridad), 4 días con ciclo de luz y después dos en oscuridad (luz+oscuridad) o con luz roja (luz+luz roja) procedente del lateral izquierdo. Las fotos de la izquierda corresponden con plántulas crecidas fuera del clinostato dentro de la misma cámara de cultivo (Control 1g) y a la derecha las plántulas que crecieron en microgravedad simulada a 1 rpm (Clinostato sim μg). Las barras negras indican 3 mm.

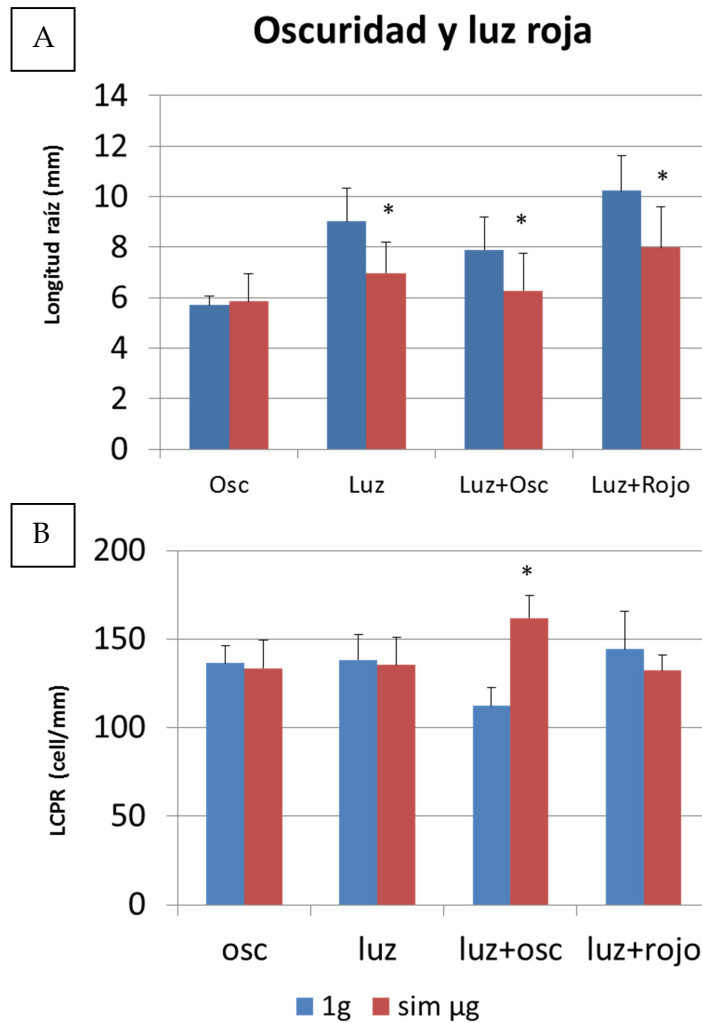


Figura 45: Parámetros medidos en las muestras crecidas en clinostato durante 6 días de crecimiento. A) Gráfica de la longitud de las raíces (en milímetros) de plántulas crecimiento en microgravedad simulada en el clinostato a 1rpm (rojo) y a 1g como control (azul) en diferentes condiciones lumínicas. B) Tasa de proliferación celular local (LCPR) (en células meristemáticas por unidad de longitud) de muestras crecidas en el clinostato (sim µg) y su control (1g). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos (*) las muestras crecidas en microgravedad simulada difiere significativamente con respecto a su mismo fenotipo crecido a 1g.

En el experimento ROOT, dónde crecieron plántulas etioladas de 4 días, se observaron diferencias de crecimiento tanto en el crecimiento longitudinal de la raíz como en la tasa de proliferación, siendo ambas mayores en microgravedad. En el experimento TROPI, que empleaba luz roja en los dos últimos días de su crecimiento, las muestras mostraron reorientación hacia la fuente de iluminación, mientras que este fototropismo no aparece en el clinostato. Sin embargo si que se observaron fenotipos agravitrópicos en las muestras crecidas en microgravedad simulada y hubo unas variaciones importantes en el crecimiento longitudinal de la raíz en las muestras crecidas con algún tipo de luz, así como en la proliferación. La incorporación de luz o luz roja provoca una diferencia ya apreciable en el clinostato en el crecimiento de la raíz e incluso la etiolación tras un periodo con luz provoca variaciones en la tasa de proliferación. Por lo tanto, el uso de estas condiciones lumínicas en la RPM o en la ISS se prevé que pueda aportarnos más datos sobre cómo la luz afecta a las competencias meristemáticas en condiciones de microgravedad real.

2.2 Longitud de los mutantes de fitocromos en la RPM

Una vez establecidas las condiciones lumínicas de estudio más interesantes decidimos iniciar los experimentos principales en la RPM, por ser el simulador más contrastado en el pasado. Se sembraron semillas de Arabidopsis en placas y germinaron en la RPM. Inmediatamente al finalizar el periodo de crecimiento se fotografiaron las placas y se midió la longitud de las raíces primarias (**Figura 46**) con ImageJ. En cuanto al fenotipo, no se apreciaron diferencias importantes entre los tres genotipos expuestos los dos últimos días a luz roja o a oscuridad en gravedad control. Tanto los hipocotilos como la raíz, fueron similares en el fenotipo silvestre y los mutantes. De la misma forma, en microgravedad simulada, las alteraciones radiculares fueron las esperadas, con raíces creciendo en todas las direcciones, de forma no rectilínea e incluso en el mismo sentido que el hipocotilo. Tampoco se observaron diferencias fenotípicas entre las cepas crecidas en condiciones de microgravedad simulada.

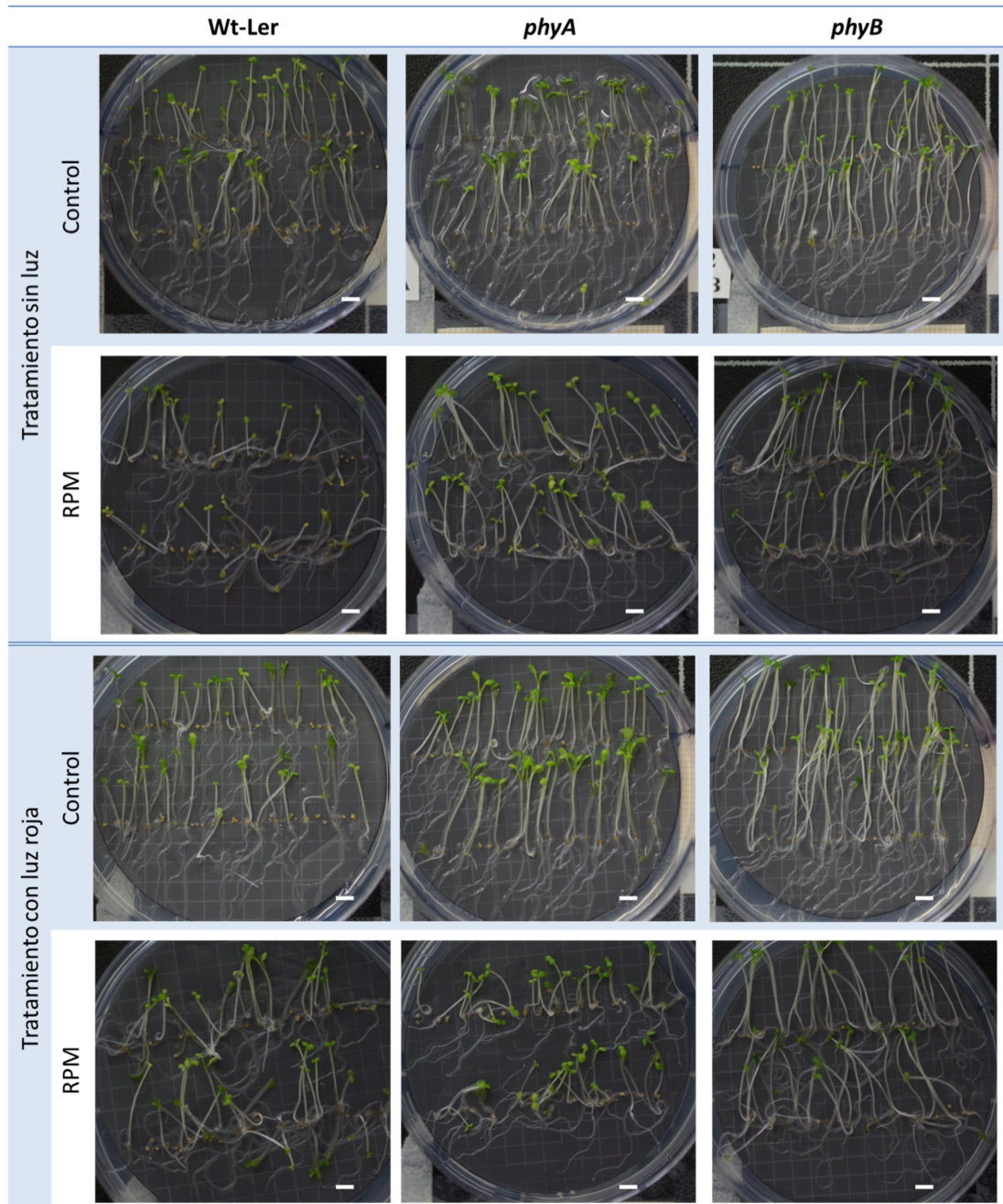


Figura 46: Crecimiento de las plántulas de 6 días en la RPM y control a 1g. Las fotos fueron tomadas tras finalizar la fase de crecimiento bajo diferentes condiciones lumínicas a las placas del fenotipo silvestre (Ler), y los mutantes de fitocromos (*phyA* y *phyB*). La barra blanca indica 3 mm.

Para entender mejor el efecto de la luz roja, empezamos el análisis comparando las muestras en gravedad control en las que variamos los patrones de iluminación (crecidas en oscuridad o con estimulación lumínica con luz roja los dos últimos días). Tan solo la muestra de *phyB* crecida en oscuridad presentaba una raíz más larga de manera significativa (**Figura 47**) comparada con su control biológico, Ler. Sin embargo, si comparamos el mismo ecotipo expuesto a luz roja y oscuridad, todos tendían a una raíz mayor con luz roja siendo significativa en el caso de *phyA*.

Introduciendo la variable de la gravedad, las muestras crecidas en microgravedad simulada en oscuridad presentaban unas raíces más largas en los casos de Ler y *phyB* aunque prácticamente no se apreciaron diferencias en *phyA* (**Figura 48**). Este efecto se compensa aplicando luz roja, porque no se apreciaron diferencias entre ninguna de las muestras crecidas en microgravedad simulada con respecto a su control.

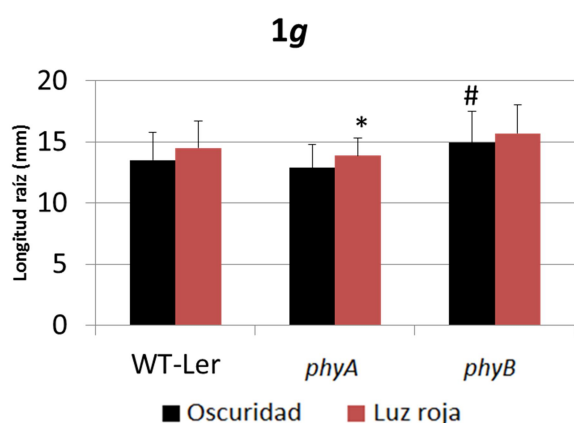


Figura 47: Longitud de raíz (milímetros) de mutantes de fitocromos en condiciones de gravedad control en muestras crecidas durante 4 días en ciclos de luz / oscuridad y los dos últimos días bajo luz roja u oscuridad continua. Las barras indican la desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las mismas condiciones lumínicas con respecto al WT-Ler (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

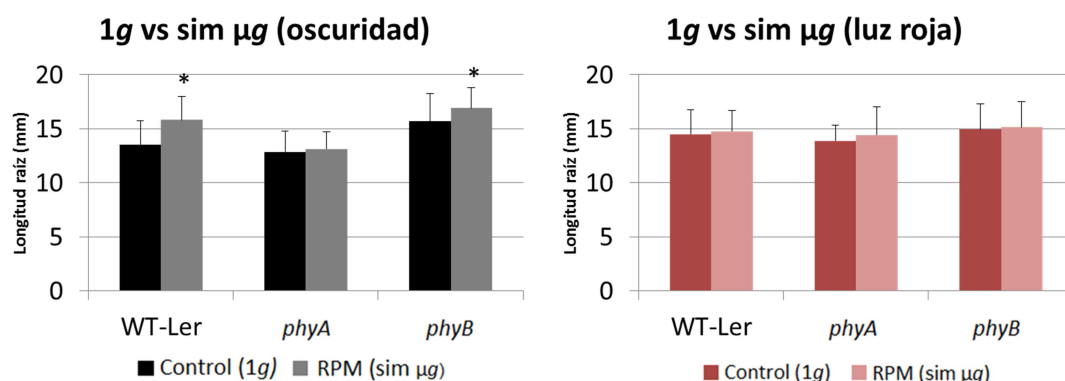


Figura 48: Crecimiento de la raíz primaria (milímetros) de mutantes de fitocromos crecidos en la RPM y control durante 6 días: 4 días con luz y los dos últimos días en luz roja o en oscuridad continua. Las barras indican desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales en el mismo genotipo con $p < 0,05$.

2.3 Proliferación celular en mutantes de fitocromos en la RPM

Tras los 6 días de crecimiento, parte de las muestras fueron fijadas con glutaraldehído y los meristemos radiculares incluidos en resina para analizarlos por microscopía de contraste de fase (Figura 49). Se contó el número de células en las capas con competencia meristemática de la raíz en función de la unidad de longitud. De esta forma estimamos la tasa de proliferación celular local (LCPR).

En condiciones de gravedad control, hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) de la proliferación en los mutantes de fitocromos comparado con el ecotipo silvestre Ler, cuando tras 4 días de crecimiento se les exponía a luz roja. Sin embargo el mutante *phyA* ya tenía mayor proliferación en oscuridad (Figura 50). Comparando el mismo ecotipo y variando la exposición lumínica, se observa que la luz roja incrementa la tasa de proliferación celular local en los tres casos y además lo hace de forma significativa en Ler y *phyB*.

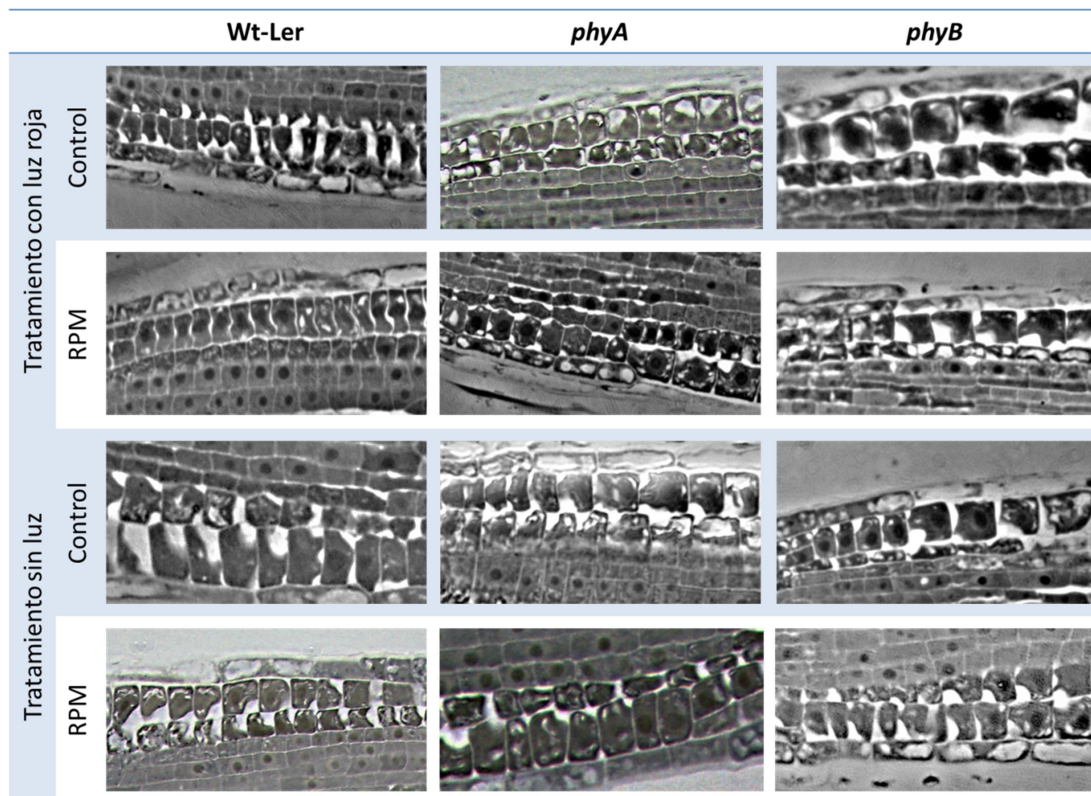


Figura 49: Detalle de la zona meristemática de la raíz obtenido en las inclusiones para microscopía de contraste de fase. Las muestras de los mutantes de fitocromos, *phyA* y *phyB*, y el fenotipo silvestre, Ler, crecieron en microgravedad simulada en la RPM y en gravedad control bajo luz roja u oscuridad durante los dos últimos días de seis de crecimiento.

Incorporando la variable de la microgravedad, las muestras de Ler y *phyB* crecidas en oscuridad muestran una mayor tasa de proliferación, pero con luz roja el efecto es intenso, es decir, la luz roja había compensado el efecto producido por la microgravedad (Figura 51). En el caso de *phyA*, la microgravedad provoca un descenso en su proliferación celular, mientras que la luz roja provoca que no haya diferencias en proliferación.

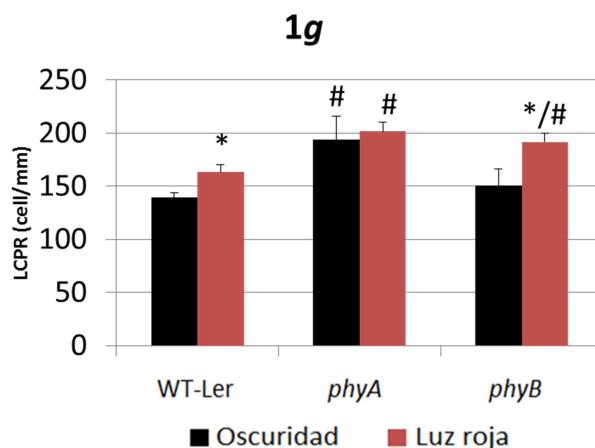


Figura 50: Tasa de proliferación celular local (LCPR) (en número de células meristemáticas entre distancia en milímetros) **de mutantes de fitocromos** crecidas en 1g con luz/oscuridad durante 4 días y con luz roja continua o en oscuridad durante los 2 últimos días medido desde fotos de microscopía de contraste de fase con ImageJ. Las barras indican la desviación estándar de las muestras. Los símbolos indican diferencia significativa de entre genotipos en las mismas condiciones lumínicas con respecto a WT-Ler (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con una $p < 0,05$.

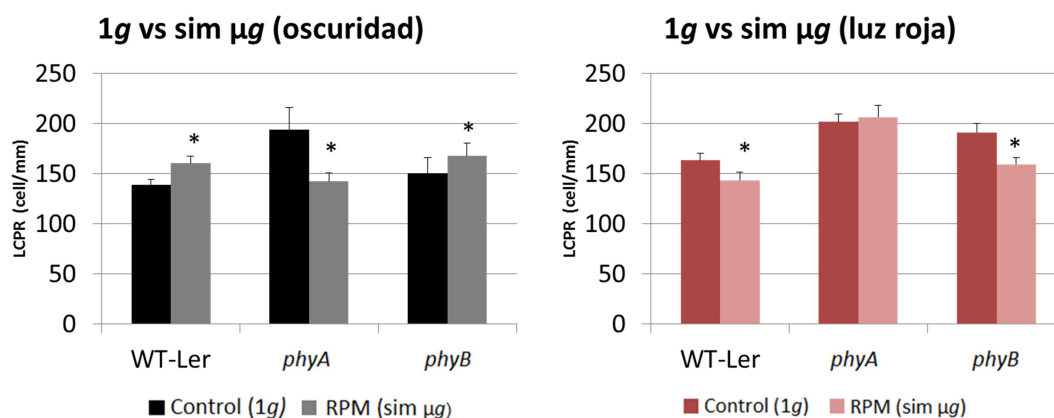


Figura 51: Tasa de proliferación celular local (LCPR) (en número de células entre distancia en milímetros) **de mutantes de fitocromos** crecidos en RPM y control durante 6 días en ciclos de luz/oscuridad durante los 4 primeros y los dos últimos con luz roja (derecha) o en oscuridad (izquierda) continua. Las barras indican la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales en el mismo genotipo con una $p < 0,05$.

2.4 Crecimiento celular en mutantes de fitocromos en RPM

Otra parte de las muestras fueron fijadas con paraformaldehído para su observación con microscopía confocal con antifibrilarina, un marcador específico de actividad nucleolar (Figura 53). Desde un corte central, se midió el área del nucleolo (fluorescencia roja) de las células meristemáticas según los diferentes tratamientos de luz y condición experimental.

Estudiando el área nucleolar de las muestras crecidas en gravedad control, los dos mutantes muestran nucleolos menores al de Ler, tanto si habían crecido en oscuridad, como si habían crecido con exposición a luz roja (Figura 52). Comparando las áreas nucleolares de los mismos ecotipos crecidos en dos condiciones lumínicas, las muestras crecidas con luz roja muestran nucleolos mayores en todos los casos, siendo una diferencia significativa en el caso de Ler y *phyB*.

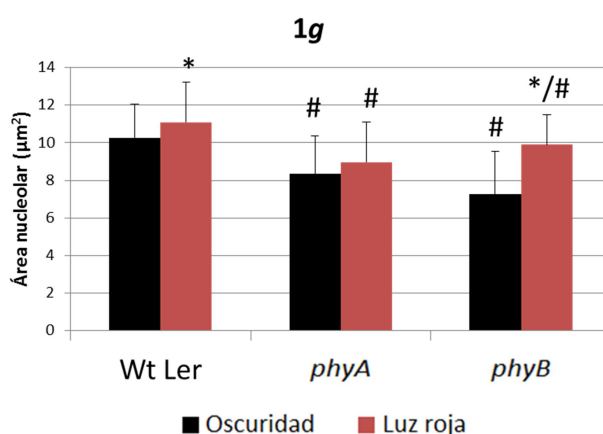


Figura 52: Tamaño del nucleolo (micrómetros cuadrados) de células meristemáticas en mutantes de fitocromos crecidos en condiciones de gravedad control medido desde fotos de microscopía confocal con ImageJ. La fluorescencia empleada era de antifibrilarina con Alexa 488. Las barras indican la desviación estándar. Los símbolos indican diferencia significativa de entre genotipos en las mismas condiciones lumínicas con respecto a WT-Ler (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significación $p < 0,05$.

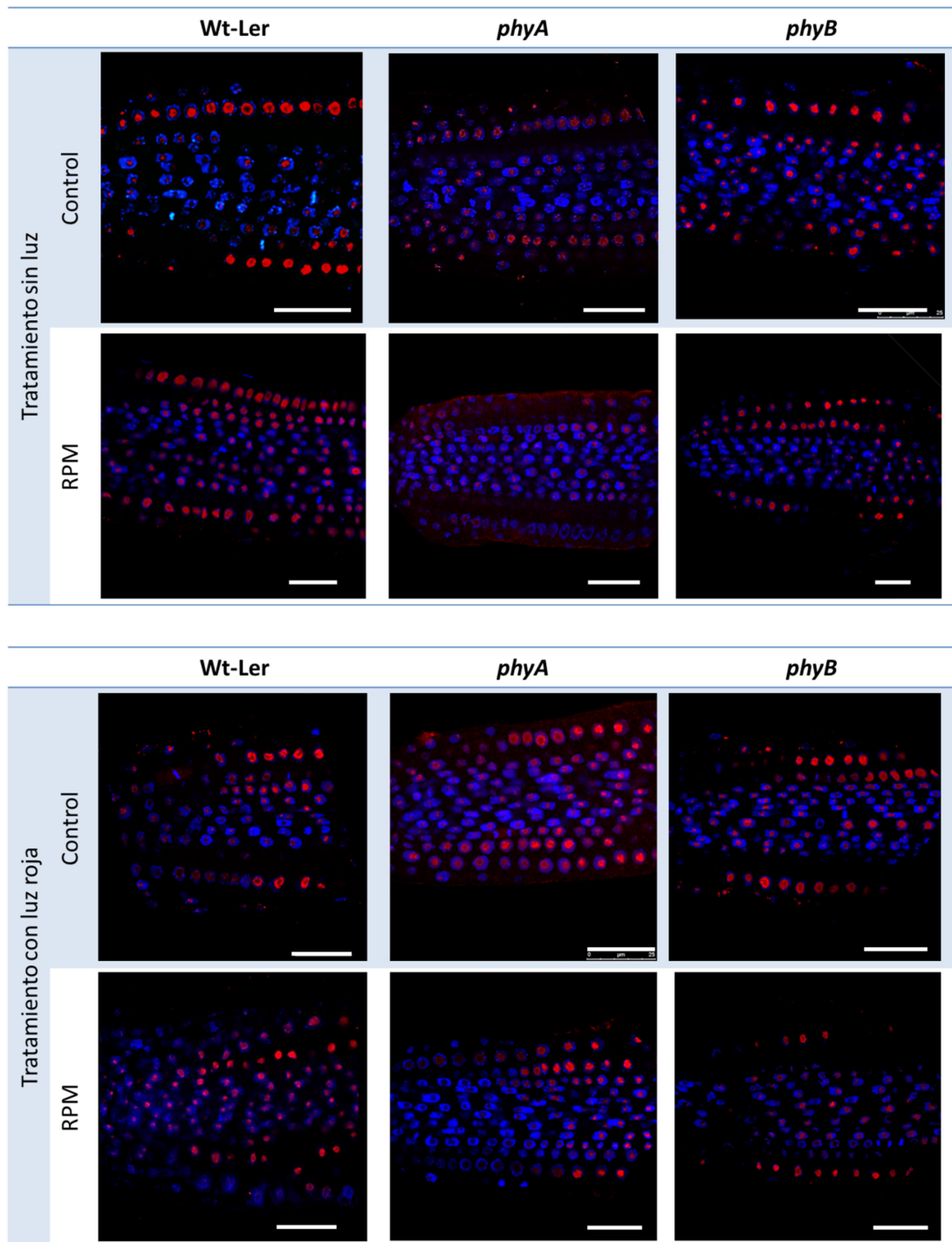


Figura 53: Crecimiento celular determinado por fibrilarina en inmunofluorescencia *in-toto* de meristemos radiculares. Los dos mutantes de fitocromos y el control biológico crecieron a 1g (control) o en microgravedad simulada (RPM) en oscuridad (arriba) y con luz roja (abajo). Las fotos de microscopía confocal muestran cortes centrales de meristemos radiculares siendo las capas exteriores células meristemáticas y las interiores parte de la columna central. El DAPI (señal azul) tiñe los núcleos de todas las células y el anticuerpo de antifibrilarina (señal roja) muestra específicamente todos los nucleolos activos. La barra blanca indica 25 μm .

Las muestras crecidas en la RPM en oscuridad presentaban un área nucleolar inferior a las crecidas en gravedad control, siendo muy significativa en los mutantes de fitocromos (**Figura 54**). También se aprecia esta reducción del tamaño nucleolar al incorporar luz roja en Ler y *phyB*. En el caso de *phyA*, la alteración esopuesta y se aprecia un aumento del área nucleolar que asociamos con el crecimiento celular.

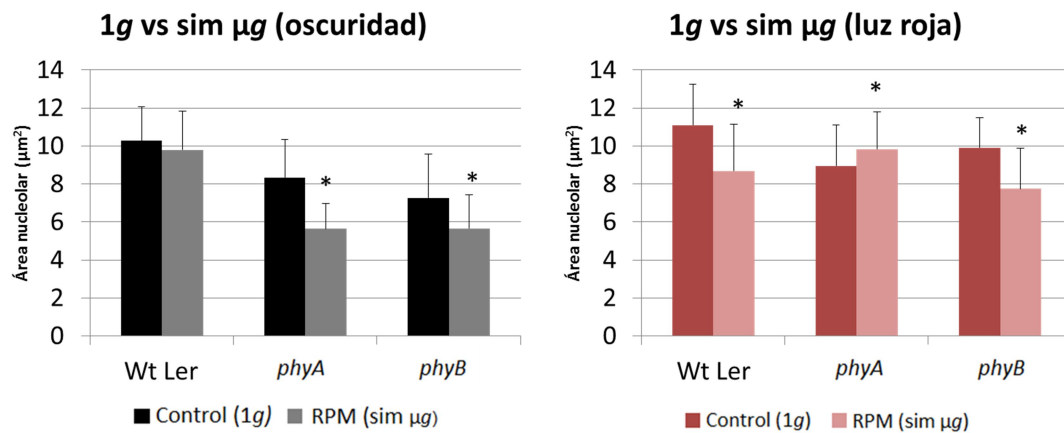


Figura 54: Área nucleolar (en micrómetros cuadrados) de células meristemáticas en mutantes de fitocromos crecidos en gravedad control (1g) y en microgravedad simulada (RPM sim µg). Área medida con fotografías de microscopía confocal con anticuerpos anti-fibrilarina, medido con ImageJ. Las barras indican la variación estándar de las poblaciones. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales en el mismo genotipo con un p-valor de 0,05.

2.5 Expresión de genes en mutantes de fitocromos en la RPM

Debido a que la longitud de la raíz, la proliferación celular y el crecimiento celular de la zona meristemática de la raíz son parámetros que hemos visto alterados en microgravedad, hicimos un estudio de varios genes para estudiar dichos cambios a nivel de expresión génica. Se trata de dos genes relacionados directamente con el transporte de auxina (*EIR*) o su recepción(*TIR*); también estudiamos los genes que codifican la nucleolina (*NUC-L1* y *NUC-L2*) y la fibrilarina (*FIB*), proteínas mayoritarias del nucleolo y por lo tanto necesarias cuando la célula necesita crecer; y genes como los de la caseína quinasa II A (*CK2A*) o la ciclina B1 (*CYC-B1*), proteínas involucradas en el paso de fase G2 a mitosis y por lo tanto, claves para la proliferación celular. Las muestras fueron diseccionadas para separarla parte aérea y raíz, ya que la

expresión de los genes del hipocotilo, que tiene mayor biomasa, enmascara la expresión de los genes en la raíz si se usan plántulas completas. El análisis genético mostrado a continuación muestra únicamente los resultados obtenidos en raíz ya que es nuestro sistema modelo principal.

Por los datos obtenidos de las qPCR, en el genotipo silvestre destacan un ligero aumento en la expresión de los genes de proliferación y una bajada en los de crecimiento (**Figura 55**). En los mutantes de fitocromos hay más disparidad de resultados. En *phyA* se mantiene la expresión de genes de auxina, disminuye la caseína quinasa (proliferación) y varios genes relacionados con crecimiento celular. En *phyB* aumenta la expresión de genes relacionados con proliferación y bajan los de crecimiento.

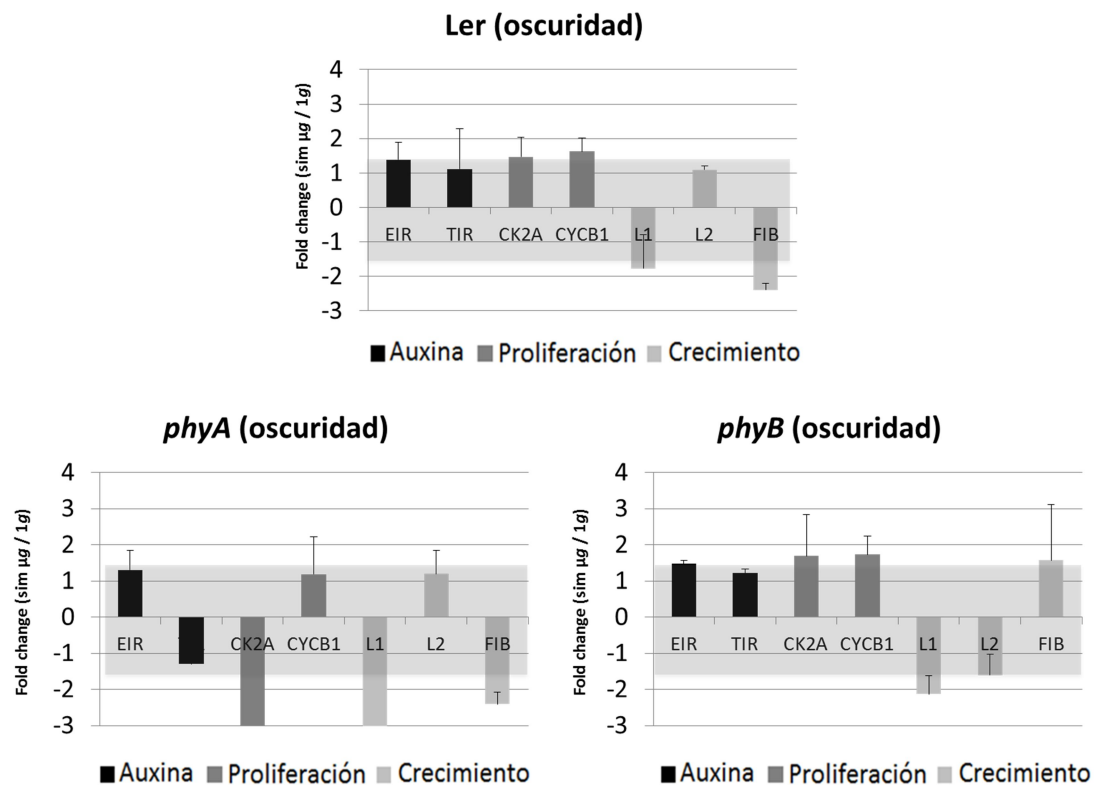


Figura 55: Expresión génica relativa (qPCR) en muestras crecidas con el tratamiento sin luz en RPM de marcadores del tráfico de auxinas (transportadores de auxina (Eir) y sensibilidad a auxina (Tir)), el crecimiento celular (nucleolina (L1 y L2) y fibrilarina (FIB)) y la proliferación celular (Caseína-quinasa 2 (CK2A) y ciclina B1 (CYCB1)). Se representa la diferencia de expresión (*fold change*) entre la muestra crecida en microgravedad simulada y el valor obtenido del mismo ecotipo crecido en gravedad control. Las barras indican la desviación estándar. La caja gris entre los valores de +1,5 y -1,5 ocultan variaciones que consideramos poco relevantes biológicamente por su poca cuantía.

Las muestras del *wild-type* Ler crecida con luz roja durante los dos últimos de crecimiento, presenta un aumento de ciclina y por lo tanto de proliferación (**Figura 56**). Mientras que en los mutantes de fitocromos, destacan los genes relacionados con auxina, tanto de transporte como de sensibilidad a la fitohormona y la proliferación en *phyB*.

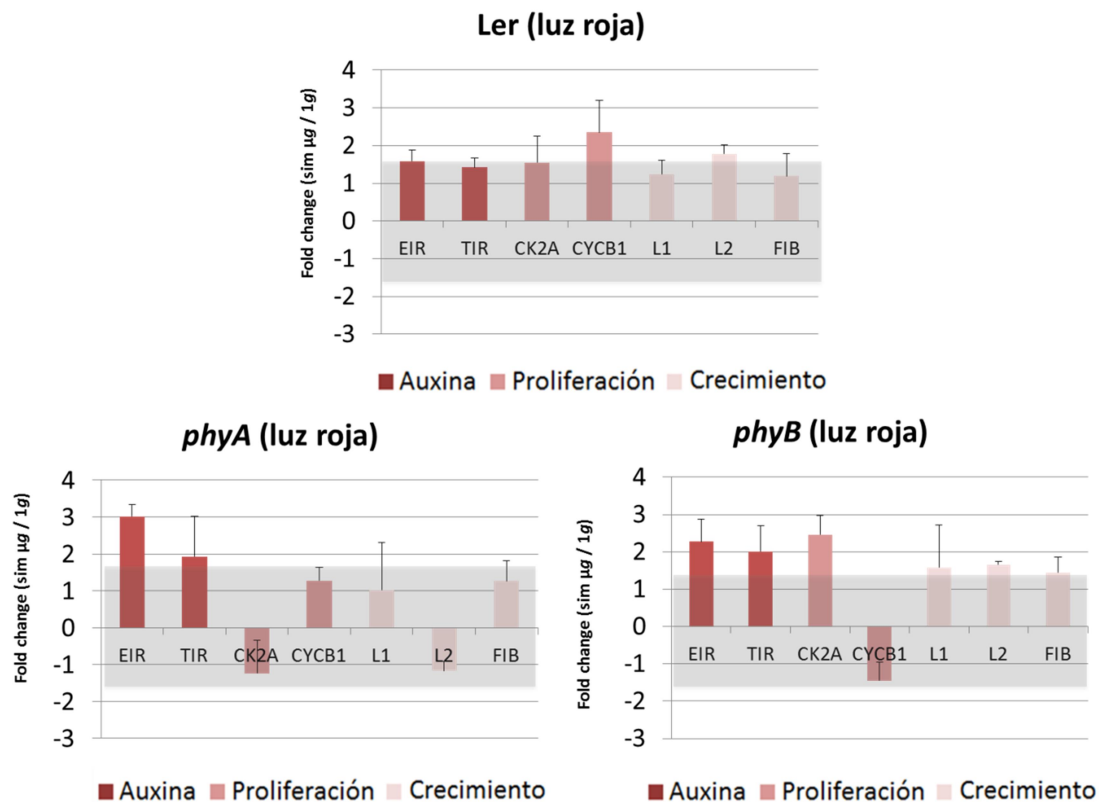


Figura 56: Expresión génica relativa (qPCR) en muestras crecidas con luz roja en RPM de transportadores de auxina (EIR), sensibilidad a auxina (TIR), crecimiento celular (nucleolina (L1 y L2) y fibrilarina (FIB)) y proliferación celular (Caseína-quinasa 2 (CK2A) y ciclina B1 (CYCB1)). Se representa la diferencia de expresión (*fold change*) entre la muestra crecida en microgravedad simulada y el valor obtenido del mismo ecotipo crecido en gravedad control. Las barras indican la desviación estándar. Los valores por encima o debajo de +1,5 y -1,5 (fuera de la caja gris) los consideraremos significativos.

2.6 Longitud de los mutantes de fitocromos en la ISS

Durante el experimento espacial "Seedling Growth I" crecieron las muestras mutantes de fitocromos PHYA y PHYB con su control biológico Ler en condiciones SG1 en la ISS. Durante el transcurso de este trabajo, se han podido analizar las muestras crecidas en luz roja en microgravedad real y su control (**Figura 57**).

Cassettes espaciales del experimento "Seedling Growth-1"

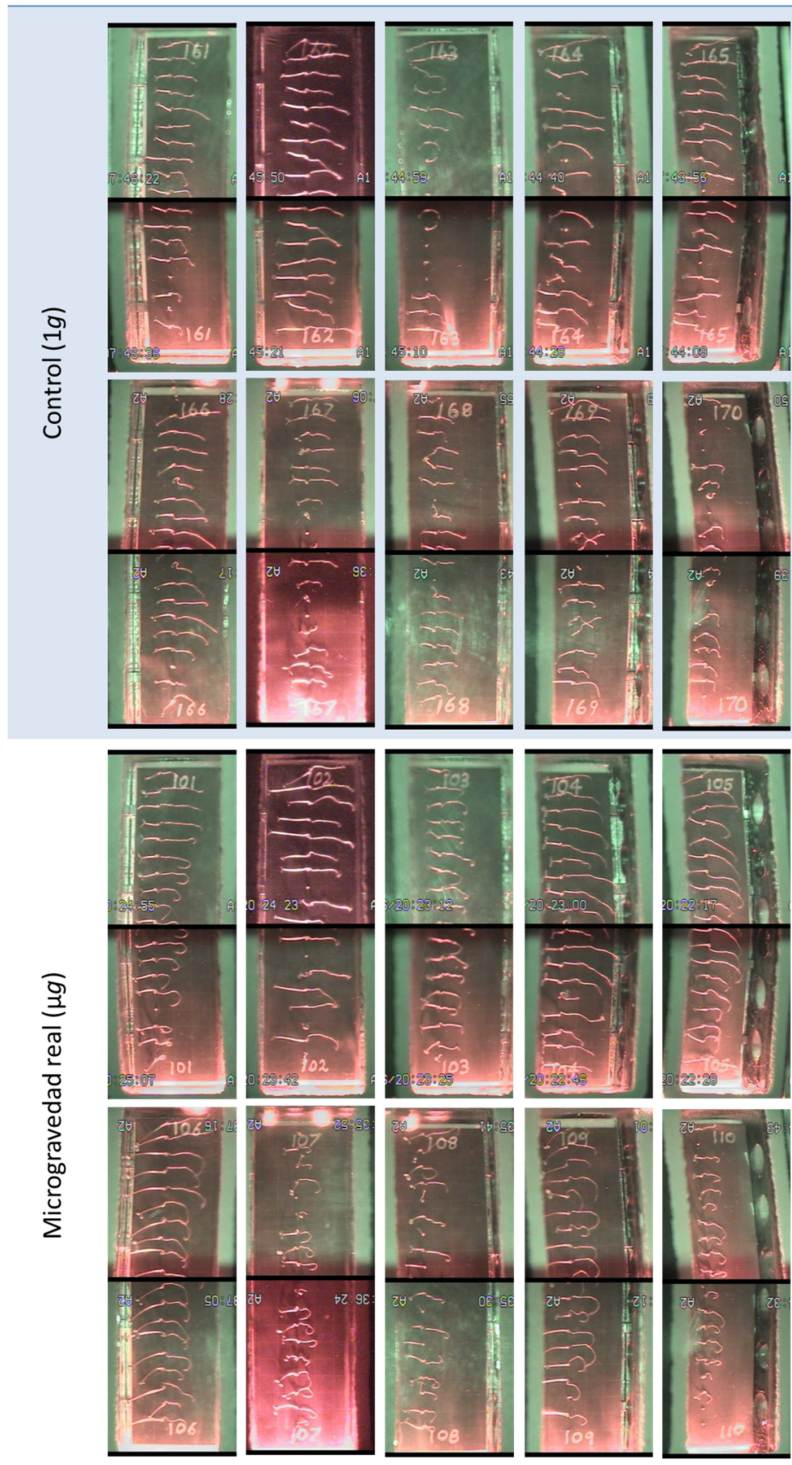


Figura 57: Fotografía tomada a los 6 días de la fase de crecimiento del experimento espacial "Seedling Growth-1" de los runs con luz roja en gravedad control y microgravedad real. La cámara tomaba fotografías de la mitad del cassette y posteriormente fueron reconstituidas. Ler 1g: 161,163, 168 y 170; Ler µg: 101, 103, 108 y 110; *phyA* 1g: 164 y 167; *phyA*µg: 104 y 107; *phyB* 1g: 162, 165, 166 y 169; *phyB*µg: 102, 105, 106 y 109.

Como se aprecia en la **Figura 58**, las raíces de los mutantes de fitocromos crecidos a 1g en la ISS eran mayores que su control biológico y de forma significativa lo era el *phyB*. Comparado con las muestras crecidas en microgravedad real, todas eran más largas que sus homólogos a 1g. De forma significativa el fenotipo silvestre y *phyB* crecidas en microgravedad real eran más largas que las crecidas en gravedad control.

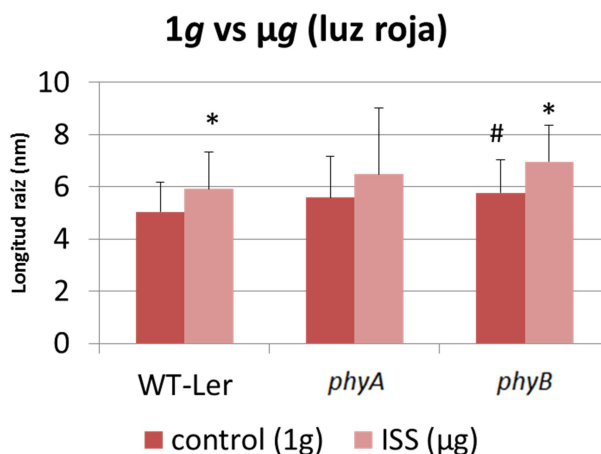


Figura 58: Longitud de la raíz primaria de las plántulas crecidas en el experimento espacial “Seedling Growth-1” en la ISS. Se utilizó el programa ImageJ para las mediciones. Las barras indican la desviación estándar. Los símbolos indican diferencia significativa de entre genotipos en las mismas condiciones lumínicas con respecto a WT-Ler (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significación $p < 0,05$.

2.7 Expresión de genes en mutantes de fitocromos en la ISS

Para las muestras crecidas en microgravedad real en la ISS, se realizaron las mismas mediciones que para las muestras crecidas en microgravedad simulada en la RPM. De la misma forma, las muestras se separaron en hipocotilo y raíz, y a continuación se mostrarán los resultados de esta última.

Las muestras control crecidas en microgravedad real en la ISS con luz roja continua durante los dos últimos días presentan un aumento de la expresión génica de todos los parámetros estudiados, transporte y sensibilidad a auxina, crecimiento y proliferación celular (**Figura 59**). El mutante *phyA* no presenta un aumento significativo en los genes de proliferación y los genes relacionados con auxina y crecimiento celular decaía en en microgravedad real. En el caso de *phyB*, la alteración es similar a la del fenotipo silvestre con aumento de la expresión de los grupos de genes de auxina, proliferación y crecimiento celular.

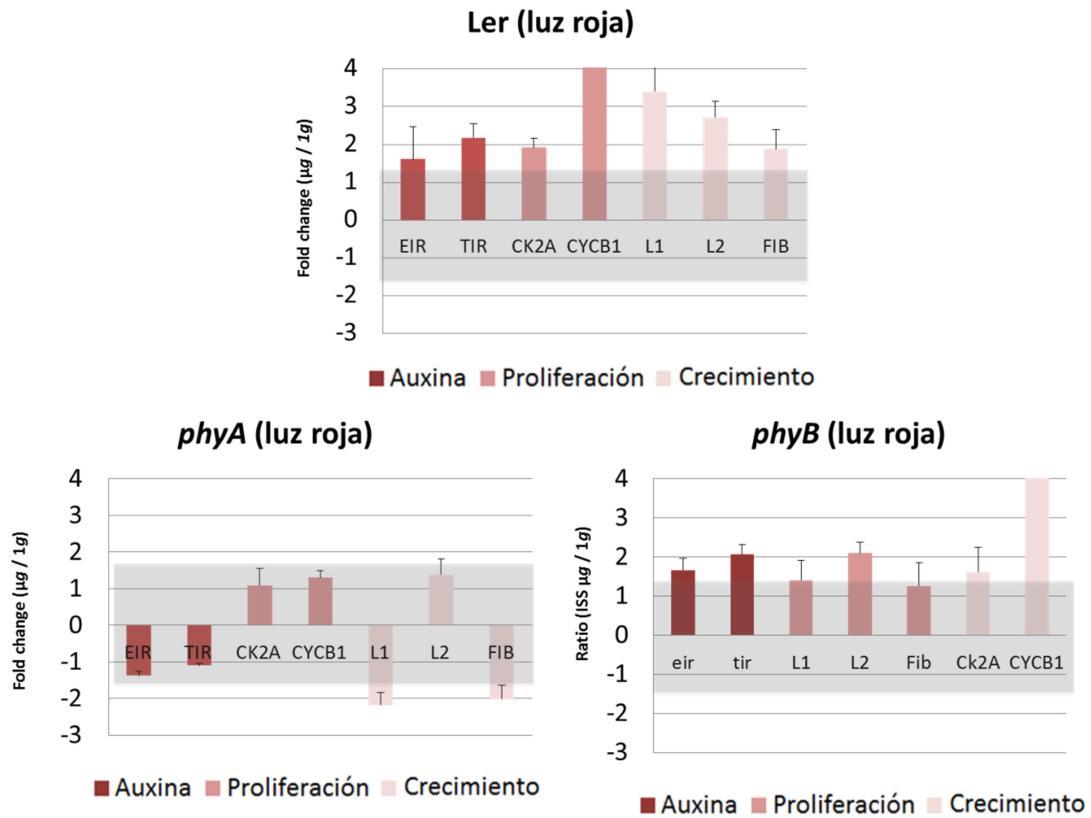


Figura 59: Expresión génica relativa (qPCR) en muestras crecidas con luz roja en la ISS de transportadores de auxina (EIR), sensibilidad a auxina (TIR), crecimiento celular (nucleolina (L1 y L2) y fibrilarina (FIB)) y proliferación celular (Caseína-quinasa 2 (CK2A) y ciclina B1 (CYCB1)). Se representa la diferencia de expresión (*fold change*) entre la muestra crecida en microgravedad simulada y el valor obtenido del mismo ecotipo crecido en gravedad control. Las barras indican la desviación estándar. La caja gris entre los valores de +1,5 y -1,5 destaca los valores significativos por encima o debajo de esos valores.

2.8 Resumen capítulo 2

A continuación se muestra la **Tabla 9** con los principales parámetros estudiados a lo largo de este capítulo con las líneas de fitocromos crecidas en microgravedad simulada (RPM) y real (ISS) en función del tratamiento lumínico recibido.

Condición	Parámetro	Tratamiento oscuridad			Tratamiento luz roja		
		WT-Ler	<i>phyA</i>	<i>phyB</i>	WT-Ler	<i>phyA</i>	<i>phyB</i>
RPM	Longitud raíz	+++	+	+++	+	+	+
	LCPR	+++	-	+++	---	+	+
	Área nucleolar	-	---	---	---	+++	-
qPCR (RPM)	Auxina	+	=	+	+	+++	+++
	Proliferación	+++	---	+++	+++	=	+++
	Crecimiento	---	---	---	+++	+	+++
ISS	Longitud raíz	X	X	X	+++	+	+++
qPCR (ISS)	Auxina	X	X	X	+++	-	+++
	Proliferación	X	X	X	+++	+	+++
	Crecimiento	X	X	X	+++	---	+++

Tabla 9: Resumen de todas las características estudiadas hasta el momento con muestras de fitocromos. RPM: Random Positioning Machine. ISS: Estación Espacial Internacional. LCPR: Tasa de proliferación local. En el paratado de qPCR se agrupan genes de auxinas (*EIR* y *TIR*), genes de proliferación (*CYCB1* y *CK2*) y genes de crecimiento (*NUC-L1*, *NUC-L2* y *FIB*). Los símbolos indican el grado de alteración indicando que no hay cambios ninguno (=) o existe un aumento (+) que puede ser significativo (+++) o una reducción (-) que puede ser significativa (---). El símbolo (X) indica que no existe dicha muestra en determinada condición con ese parámetro.

3 Efectos de la microgravedad en las colecciones de mutantes del transporte de auxinas y los de nucleolina

En este capítulo vamos a estudiar el efecto de proteínas de transporte de auxina AUX y EIR, la proteína de sensibilidad a auxina TIR y las proteínas de biogénesis de ribosomas NUC-L1 y NUC-L2, a través de sus mutantes. Se expusieron las plántulas mutantes a microgravedad simulada en la RPM de Toulouse para conocer las alteraciones producidas a nivel de crecimiento y proliferación celular de raíz. Para ello, se hicieron mediciones en la longitud de la raíz, el número de células con capacidad meristemática por unidad de longitud, la expresión a nivel de transcripción de ciertos genes implicados en competencia meristemática, citometrías de flujo y expresión de la proteína nucleolina.

3.1 Crecimiento de los mutantes del transporte auxinas y los de nucleolina en la RPM

Se germinaron semillas de la cepa silvestre Columbia mutantes de *aux 1.7*, *eir 1.1*, *tir 1*, *nuc-L1.2* y *nuc-L2.2* en medio de cultivo SG con agar y en papel de nitrocelulosa para evaluar el efecto de la microgravedad simulada en la RPM después de 6 días en condiciones lumínicas RPM-2. Como cabía esperar, los tallos de todas las muestras presentaron fototropismo positivo y en el caso de las muestras control crecidas con gravedad 1g, las raíces presentaron gravitropismo positivo excepto en los casos de *aux* y *eir* (**Figura 60**). Todas las muestras crecidas en la RPM presentaban un fenotipo similar al de los genotipos *aux* y *eir* en situación control.

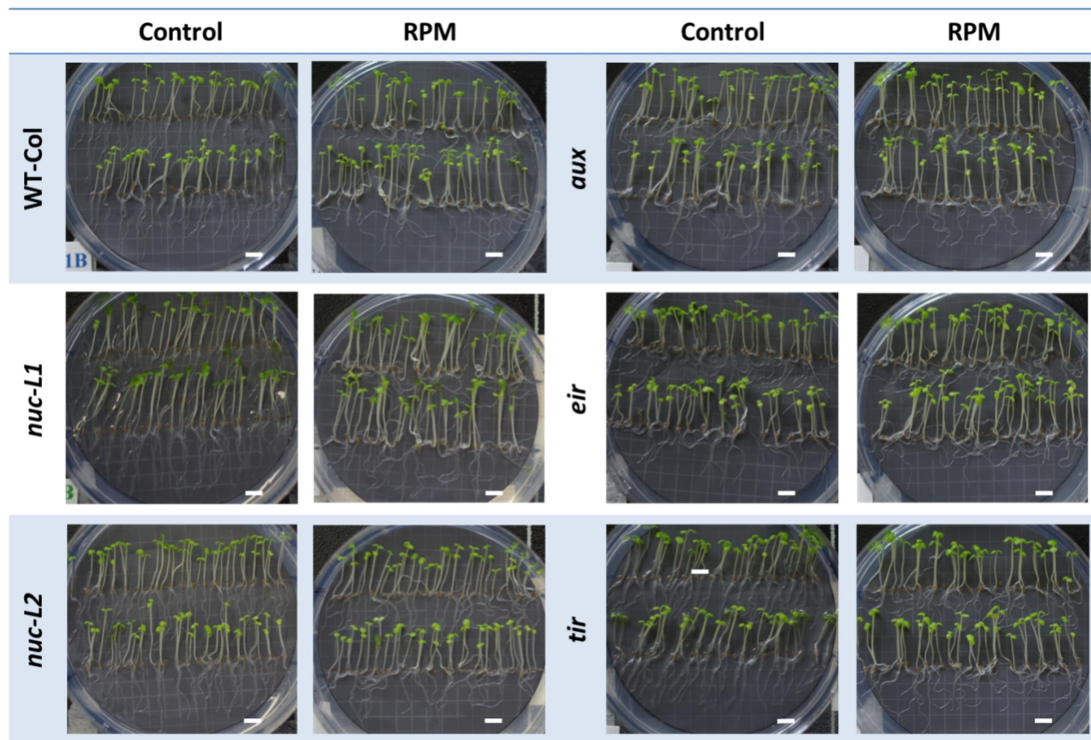


Figura 60: Crecimiento de las plántulas de la colección de auxinas y nucleolinas durante 6 días en gravedad control y en la RPM. Fotografías tomadas con cámara Pentax K10D al finalizar la fase de crecimiento. La barra blanca indica 3mm.

En cuanto a la longitud de la raíz primaria, los tres mutantes relacionados con el transporte polar de auxina presentaban raíces más cortas comparadas con el fenotipo silvestre tanto crecidas a 1g como las expuestas a microgravedad simulada (**Figura 61**). Sin embargo, si comparamos el mismo genotipo, observamos que la RPM produce un incremento en la longitud de la raíz en todos los casos de forma significativa, excepto en *aux*, que sólo permite observar una tendencia similar.

La longitud de la raíz primaria de los dos mutantes de nucleolina comparada con el fenotipo silvestre es menor en el caso de *L1* en situación control, y en los dos casos en las muestras crecidas en la RPM (**Figura 62**). Comparando la muestra crecida a 1g y en microgravedad simulada, la raíz es más larga en el fenotipo silvestre de forma significativa. Esta tendencia también se puede apreciar en el mutante *L1*. Sin embargo en el mutante *L2*, las muestras crecidas en RPM son más cortas.

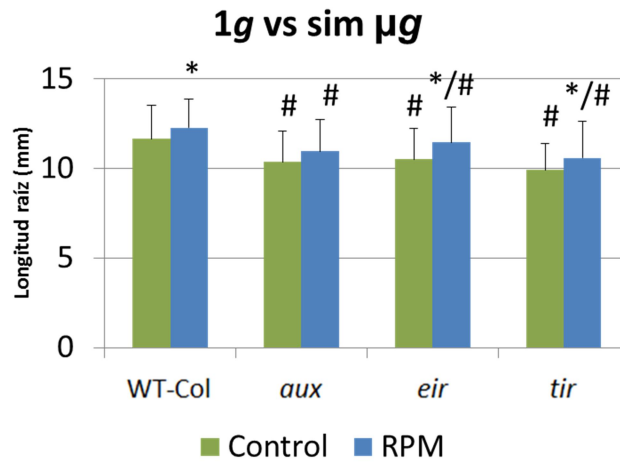


Figura 61: Crecimiento longitudinal de las raíces primarias (en milímetros) de mutantes del transporte y sensibilidad a auxina crecidas en microgravedad simulada en la RPM (azul) y en gravedad control (verde) durante 6 días, medido con ImageJ. La barra indica desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significación de $p < 0,05$.

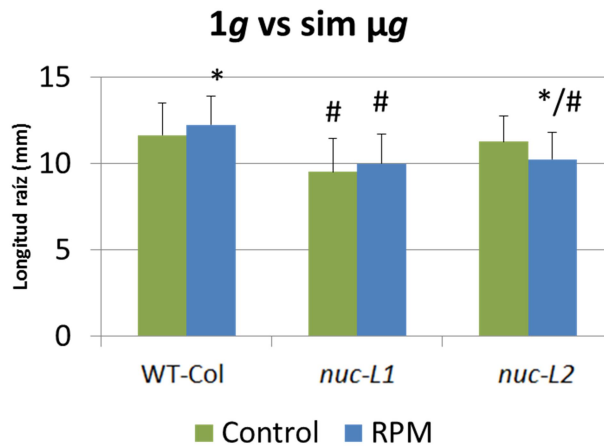


Figura 62: Crecimiento longitudinal de la raíz primaria (en milímetros) de mutantes de nucleolina crecidas durante 6 días en microgravedad simulada en la RPM (azul) y a 1g (verde). Las barras indican la desviación estándar de la población analizada. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

3.2 Proliferación celular en mutantes del transporte de auxina y de nucleolina en la RPM

Las muestras que se fijaron con glutaraldehído tras su crecimiento en la RPM, sirvieron para medir el número de células con competencia meristemática por unidad de longitud (Figura 63), y con ello estimar la tasa de proliferación celular local (LCPR).

Las muestras de mutantes en el transporte o sensibilización a auxina presentaron un ratio de proliferación similar al control silvestre crecido en gravedad control, excepto el mutante *eir* que mostró un ratio superior. Las muestras crecidas en la RPM mostraron ratios de proliferación similares al *wild-type*. Las muestras crecidas en microgravedad poseen una LCPR superior a la de 1g en general, y de forma significativa, excepto en el caso de *eir* (figura 51) que ya tenía un valor relativamente alto en el control a 1g.

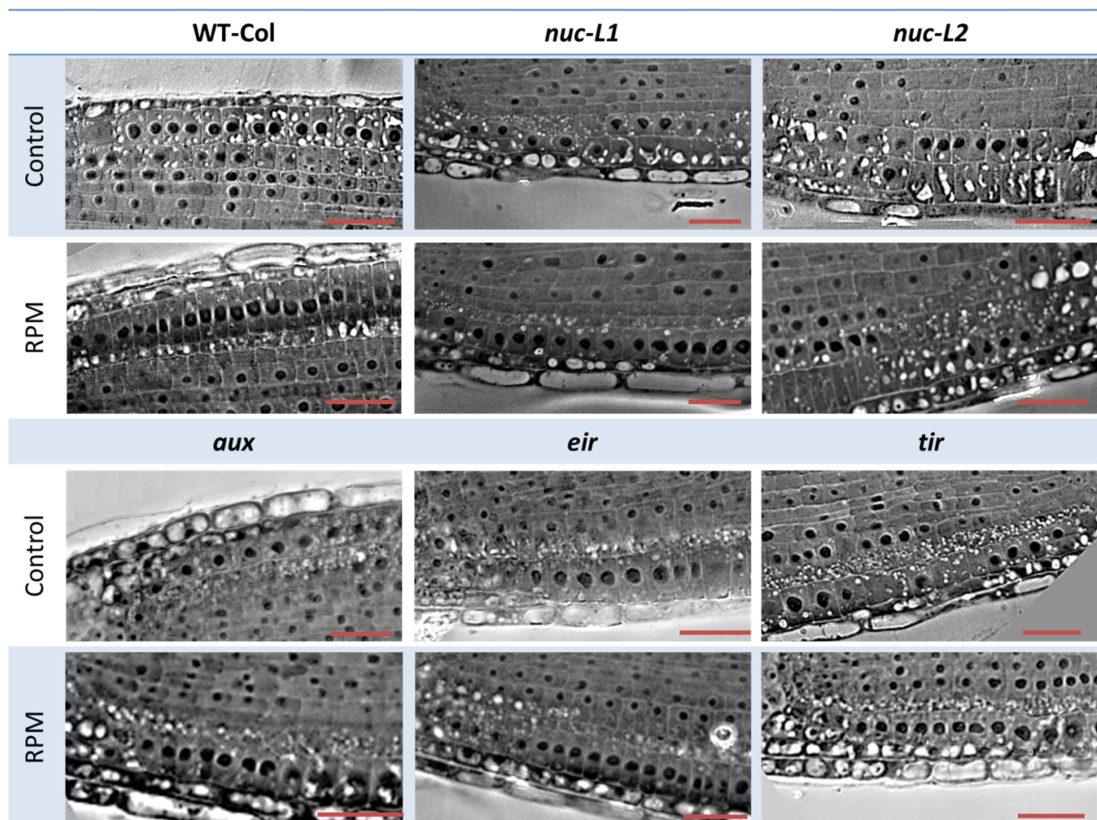


Figura 63: Detalle de zonas meristemáticas de raíz de muestras de colecciones de nucleolina y auxina crecidas durante 6 días en gravedad control y en RPM. Fotografías tomadas con cámara Leica DFC 320 asociada a microscopio de contraste de fase. La barra roja indica 20 μm .

Por su parte, el mutante de nucleolina L1 tenía una tasa de proliferación igual al *wild-type* en gravedad control y ligeramente inferior si crecía en microgravedad simulada. Mientras que el mutante de nucleolina L2 presentaba una tasa superior en gravedad control e inferior si crecía en la RPM. La microgravedad simulada provoca un aumento del ratio de proliferación en el *wild-type*, mantiene la tasa en L1, y la disminuye en el caso del mutante L2 (Figura 65).

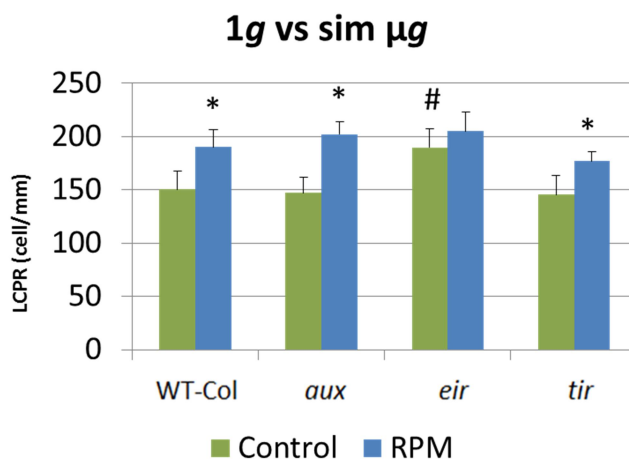


Figura 64: Tasa de proliferación celular local (LCPR) (en número de células meristemáticas entre longitud en milímetros) de muestras de mutantes del transporte y de sensibilidad a auxina crecidas a 1g (verde) o en la RPM (azul) medidas con ImageJ. Las barras indican la desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

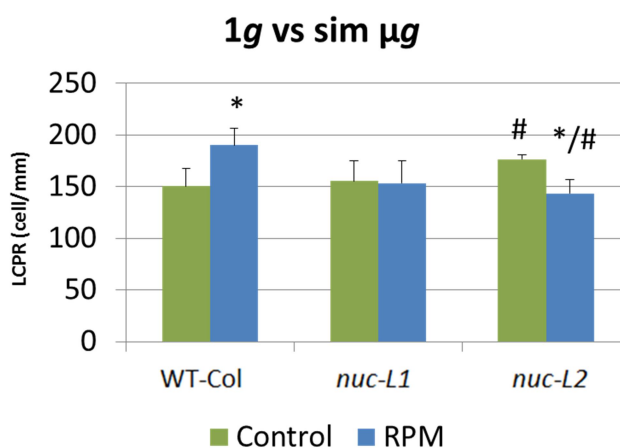


Figura 65: Tasa de proliferación celular local (LCPR) (en células meristemáticas entre unidad de longitud) de las líneas mutantes de nucleolina crecidas en RPM (azul) o control (verde) medidas con ImageJ. Las barras indican la desviación estándar de la población. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

En una aproximación complementaria para validar los resultados se midieron las células de la capa más externa de la zona meristemática, es decir, de la rizodermis. Las muestras crecieron en el clinostato durante 4 días en las condiciones lumínicas descritas para RPM-2. Se fijaron con paraformaldehído para observarlas al microscopio electrónico de barrido y medimos directamente la longitud de las células (Figura 66). El control *wild-type* muestra un crecimiento menor de sus células exteriores en la RPM. Los mutantes relacionados con auxina poseen células más pequeñas, hecho significativo en todos los casos menos en *eir*, aunque también se observa la misma tendencia. En el caso de los mutantes de nucleolina, *L1* muestra tendencia a la baja como el fenotipo silvestre, mientras que a *L2*, muestra lo contrario, es el único caso observado en el que las células de la rizodermis son mayores crecidas en microgravedad simulada (Figura 67).

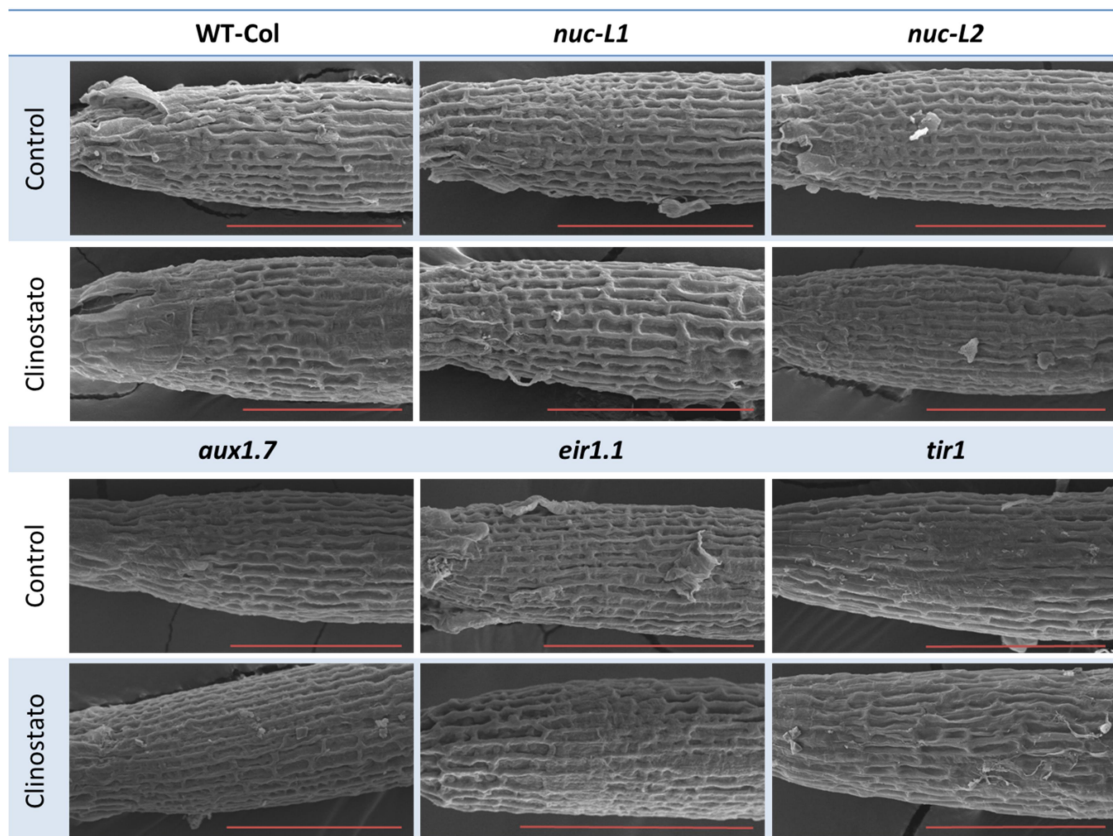


Figura 66: Microscopía electrónica de barrido. Fotografías de meristemas radiculares de mutantes relacionados con auxina y con nucleolina. La barra roja indica 100 μm

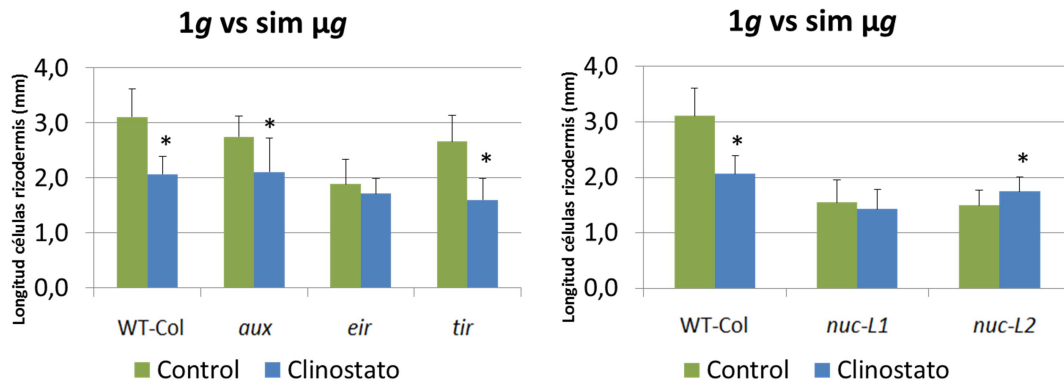


Figura 67: Microscopía electrónica de barrido. Longitud de las células de la rizodermis (en milímetros) de muestras crecidas en tratamiento control (verde) y en el clinostato (azul), medidas con ImageJ desde fotografías de microscopía electrónica de barrido. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos (*) muestran las diferencias significativas con respecto al mismo ecotipo en tratamiento control con p-valor < 0,05.

3.3 Crecimiento celular en mutantes de auxina y nucleolina en RPM

El siguiente parámetro que cuantificamos fue el tamaño del nucleolo de células meristemáticas con muestras fijadas en paraformaldehído tras crecer en la RPM. Estas muestras fueron utilizadas para una inmunofluorescencia *in-situ* con antifibrilarina y antinucleolina y se observaron con microscopía confocal (**Figura 68**).

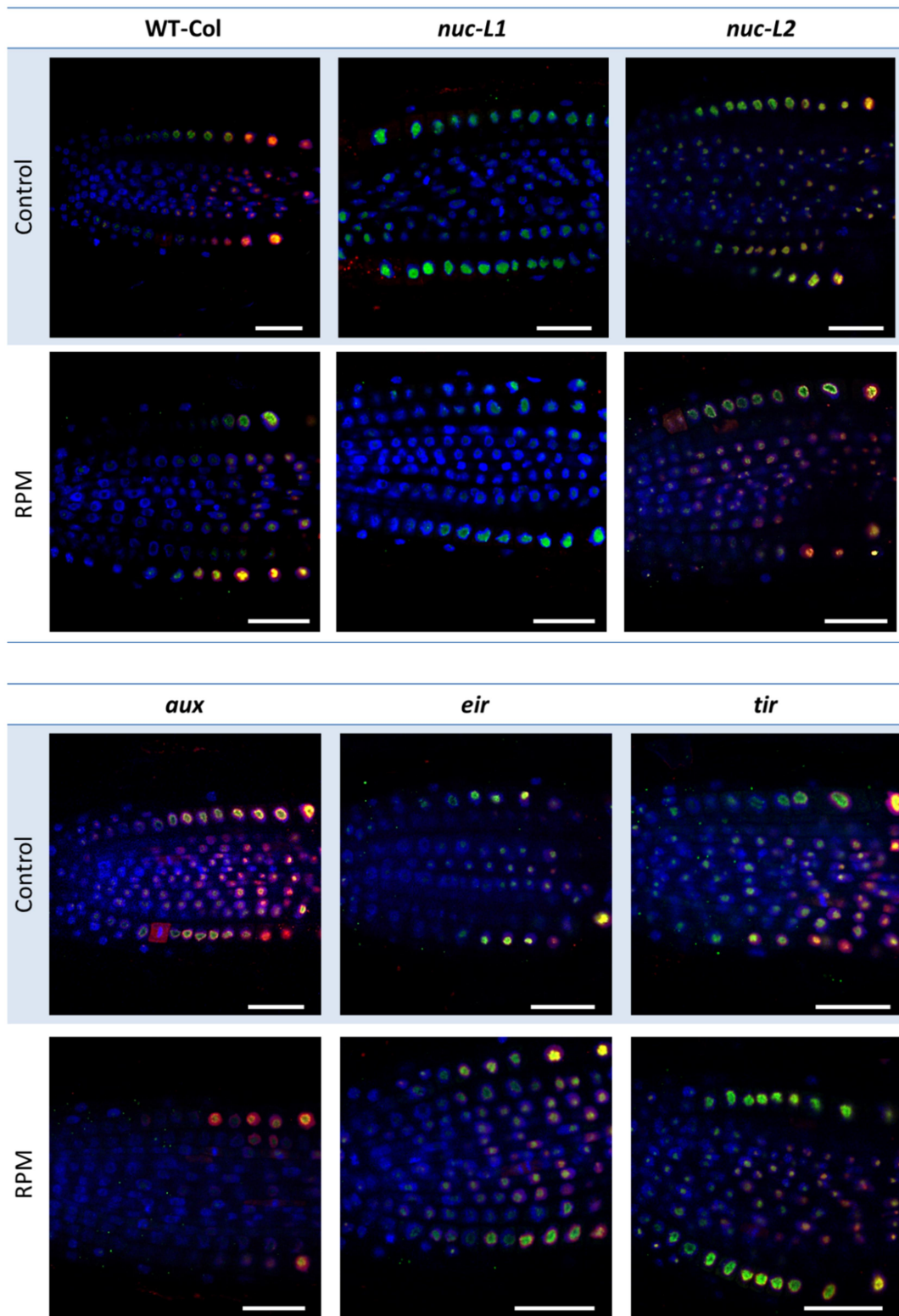


Figura 68: Patrón de expresión de nucleolina y fibrilariana. Fotografías de inmunofluorescencia *in-toto* de meristemos radiculares de muestras crecidas en microgravedad simulada en la RPM y en gravedad control. Las fotos de microscopía confocal muestran cortes centrales de meristemos radiculares siendo las capas exteriores células meristemáticas y las interiores parte de la columna central. El DAPI (señal azul) tiñe los núcleos de todas las células. El anticuerpo antifibrilarina (señal verde) muestra específicamente todos los nucleolos activos al igual que el anticuerpo antinucleolina (señal roja). En muchos nucleolos colocalizan ambas señales (señal amarilla). La barra blanca indica 25 μm.

El área nucleolar de las células meristemáticas de la raíz es muy similar al ecotipo control en los mutantes del ciclo de auxina, excepto en *aux*, que era significativamente menor. En microgravedad simulada, el *wild-type* reduce su área nucleolar con respecto al de las células meristemáticas crecidas en gravedad control. En el caso de los mutantes, todos los nucleolos eran también menores con respecto a la gravedad control de 1g, aunque en el caso de *aux* no llegó a ser significativo (Figura 69).

Los mutantes de nucleolina presentan nucleolos alterados, siendo el de *L1* mayor que el control y el de *L2* menor en gravedad control, ambos de manera significativa. Por su parte, la microgravedad simulada hace disminuir el área que ocupa el nucleolo de células con competencia meristemática, pero en el caso de *L2* era mayor (Figura 70).

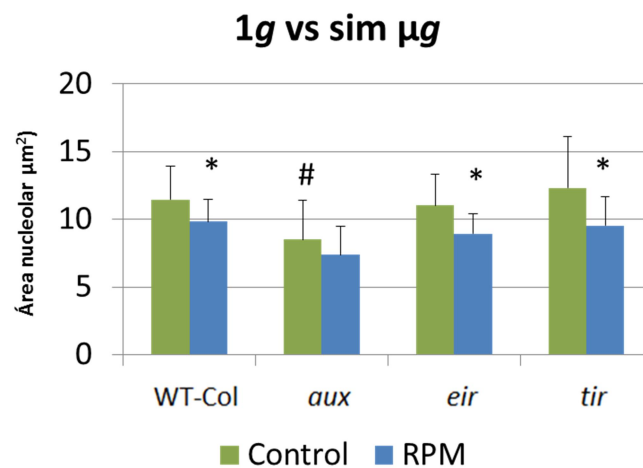


Figura 69: Área del nucleolo (micrómetros cuadrados) de muestras de mutantes de transporte y sensibilidad de auxina crecidas en la RPM (azul) y a 1g (verde). Medidas tomadas con ImageJ desde fotografías de microscopía confocal con anticuerpos para fibrilarina. Las barras indican la desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

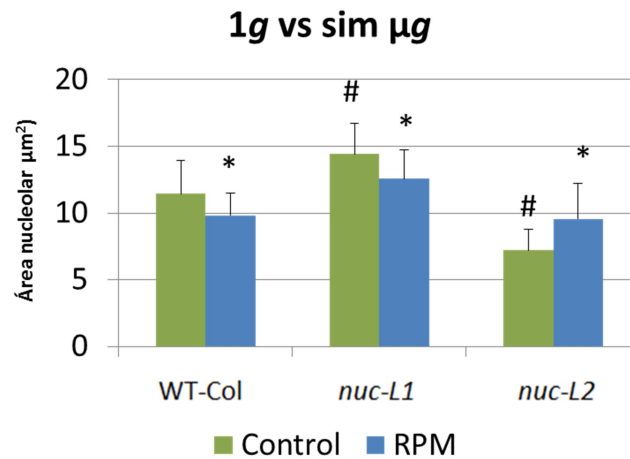


Figura 70: Área nucleolar (en micrómetros cuadrados) de células meristemáticas de muestras de mutantes de nucleolina crecidas en condiciones control (verde) y en la RPM (azul). Datos obtenidos desde microscopía confocal con anticuerpos anti-fibrilarina. Las barras indican la desviación estándar de las muestras. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

Las nucleolinas son proteínas involucradas directamente en la biogénesis de ribosomas y se encuentran por lo tanto en el mayoritariamente en el nucleolo. Para evaluar el estado en el que se encontraba el nucleolo de los mutantes de nucleolina utilizamos la microscopía electrónica de transmisión. En el caso del control biológico Columbia, se observaron con frecuencia nucleolos vacuolados y con varios centros fibrilares (**Figura 71**). Sin embargo en microgravedad, este nucléolo tipo se reducía en tamaño y en número de centros fibrilares era menor. En cuanto a los mutantes de nucleolina, se observaron muchas alteraciones. El mutante *nuc-L1* presenta nucleolos desorganizados, con contornos desfigurados y con centros fibrilares difíciles de localizar. Sin embargo en microgravedad simulada, aunque se mantenía un patrón desorganizado, los nucleolos presentaban un contorno más definido. Finalmente, la estructura nucleolar del mutante *nuc-L2* era muy similar al del *wild-type*, con más o menos centros fibrilares. No obstante, en microgravedad guardaba más similitud con el mutante de nucleolina L1 en condiciones 1g, que con el fenotipo silvestre.

Para confirmar los resultados previos, desde las fotografías de microscopía electrónica medimos el área nucleolar de todas las muestras. En gravedad control, aumenta el tamaño nucleolar en *nuc-L1* y disminuye en *nuc-L2* (**Figura 72**). En microgravedad simulada, se confirma que los nucleolos del fenotipo silvestre y *nuc-L1* se reducen y aumenta en el mutante de nucleolina L2.

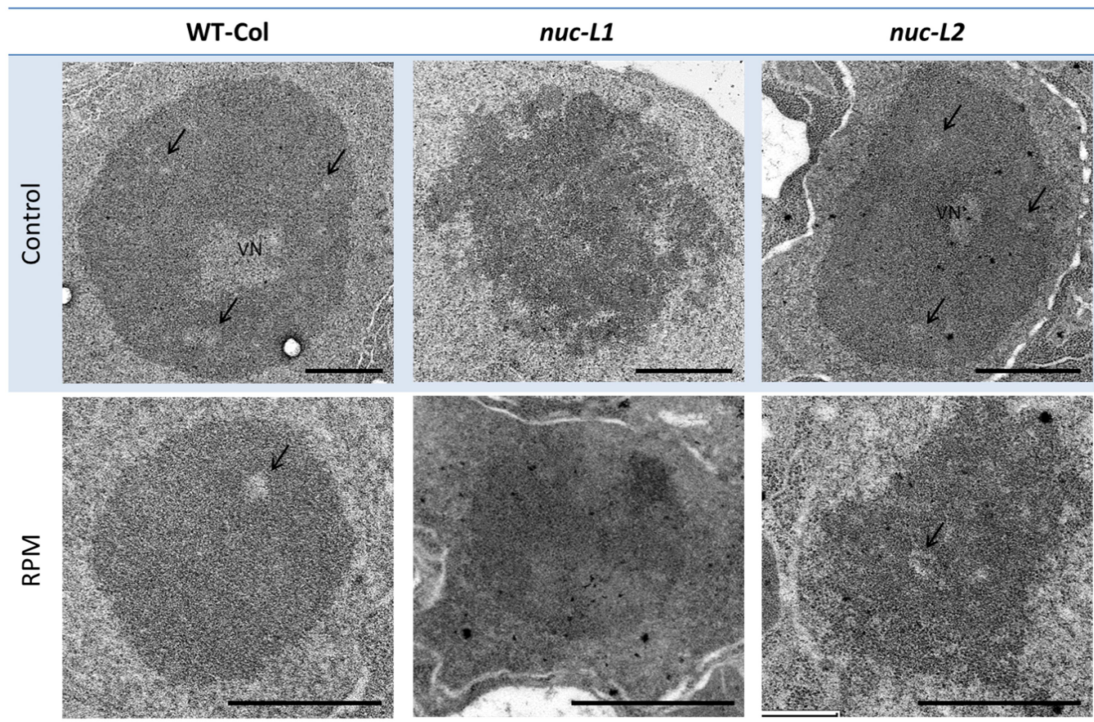


Figura 71: Nucleolos de mutantes de nucleolina crecidos en RPM. Fotografías de nucleolos de células meristemáticas de raíz de *wild type* Columbia y los mutantes de nucleolina L1 (*nuc-L1*) y de nucleolina L2 (*nuc-L2*) crecidos a 1g (control) y en microgravedad simulada (RPM). Las flechas indican centros fibrilares. VN: vacuola nucleolar. Las barras negras indican 1 μm.

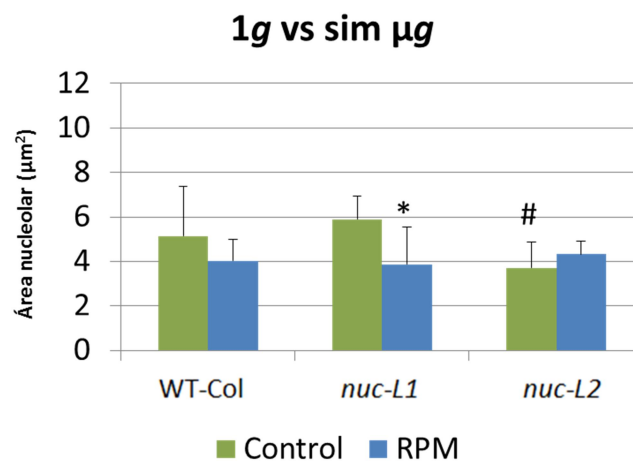


Figura 72: Área nucleolar (micrómetros cuadrados) de células meristemáticas de mutantes de nucleolina, de muestras crecidas en RPM (azul) y en condiciones control (verde), medido con fotografías realizadas con microscopio electrónico de transmisión. Las barras indican la desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las misma condición con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

3.4 Expresión de genes en mutantes de auxina y de nucleolina en la RPM

Con parte de las muestras congeladas crecidas en la RPM de los mutantes relacionados con auxina y nucleolina, se extrajo RNA y se realizaron múltiples qPCR para genes relacionados con el transporte de auxina (EIR), sensibilidad a auxina (TIR), caseína quinasa (CK2A), ciclina B1 (CYCB1), nucleolina (L1 y L2), fibrilarina, con las que poder estudiar proliferación y crecimiento celular a nivel de expresión. Todas las muestras fueron cortadas en parte aérea y raíz, y a continuación se muestran los resultados de expresión únicamente de la raíz.

El ecotipo silvestre en microgravedad simulada mostró un aumento en los tres grupos de genes, especialmente en los de auxinas y crecimiento celular (**Figura 73**). En cuanto a los ecotipos mutantes para transporte y sensibilidad a la auxina, el resultado fue muy parecido al silvestre. Hay una bajada en la expresión de EIR en el mutante *eir1.1* y del gen TIR en el mutante *tir1*. El mutante de la nucleolina NUC-L1 no mostró cambios importantes en los genes estudiados de auxina ni de proliferación, pero la expresión de la otra nucleolina en microgravedad si estaba ligeramente aumentada. El otro mutante de nucleolina mostraba una caída de la expresión en los genes de auxina y proliferación, así como en los de crecimiento. Se aprecia una caída en la expresión de NUC-L1 en el mutante *nuc-L1* y de NUC-L2 en el mutante *nuc-L2*.

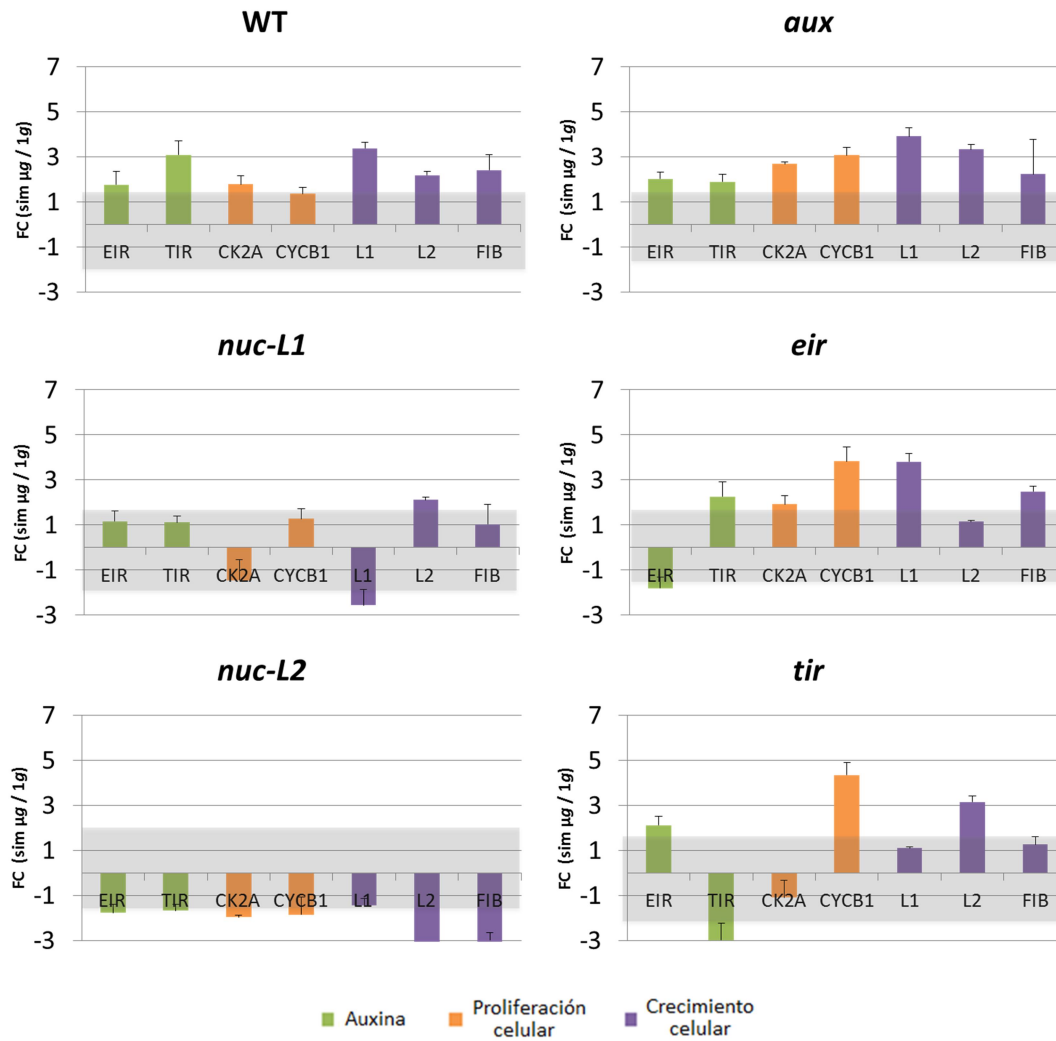


Figura 73: Expresión génica (qPCR) de muestras crecidas en RPM. Plántulas de *wild-type*, mutantes relacionados con la auxina (*aux*, *eir* y *tir*) y mutantes de nucleolina (*L1* y *L2*). La gráfica muestra el *fold change* de las muestras crecidas en microgravedad simulada entre las crecidas en gravedad control. Los genes estudiados relacionados con auxina son EIR y TIR en verde, los genes de proliferación celular caseína quinasa 2 A (CKA2) y ciclina B1 (CYCB1) en naranja y los de crecimiento celular NUC-L1, NUC-L2 y FIB (fibrilarina) en morado. La caja gris entre +1,5 y -1,5, oculta los valores que consideraremos no significativos.

3.5 Expresión de proteínas de crecimiento celular

Con parte de las muestras congeladas crecidas en la RPM, se extrajo proteína para cuantificar la expresión de nucleolina-L1 mediante *Western Blot*. Debido a la pequeña cantidad de proteína obtenida de las raíces en tests previos, la extracción se hizo de la plántula completa.

Primeramente se cuantificó que la extracción de la fracción proteica había sido correcta, y que además, todas las muestras se cargaban con la misma proporción de proteína (**Figura 74A**). Una vez cuantificada la cantidad de proteína de cada muestra, se realizó un *Western Blot* con anticuerpos antinucleolina. El peso molecular de la nucleolina es de 80-100 KDa dependiendo del grado de fosforilación. La fotografía muestra un aumento de la proteína en el fenotipo silvestre crecidas en microgravedad simulada con respecto al control, algo que también se aprecia en *aux*. En los casos de *eir* y *tir* se invierte la tendencia y es el control el que mayor cantidad de proteína de biogénesis de ribosomas posee. De los mutantes de nucleolina, tan sólo el control del mutante *L2*, presenta una cantidad remarcable (**Figura 74B**).

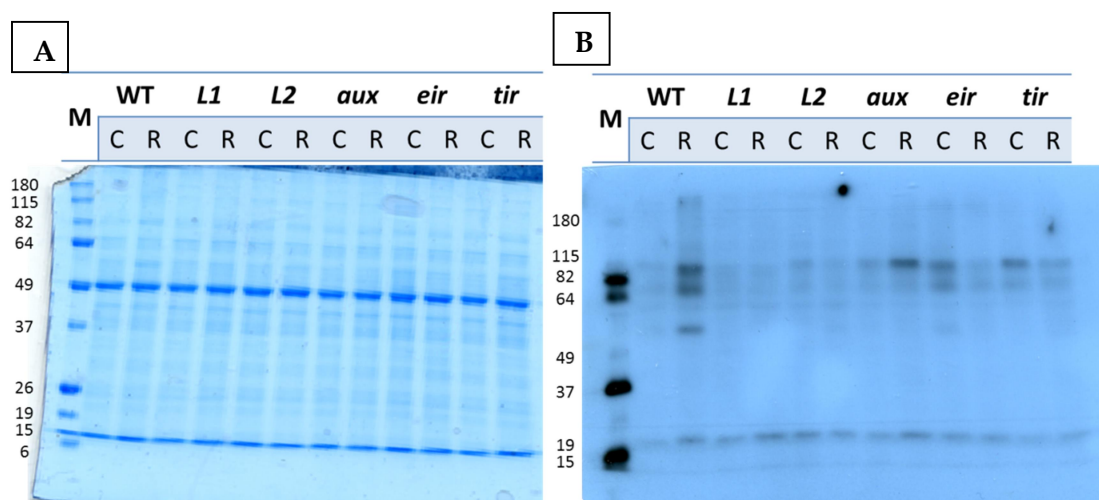


Figura 74: Patrón proteico en raíces de plántulas crecidas en microgravedad simulada en RPM. A) Gel de electroforesis teñido con azul de coomasie de control de carga. B) Fotografía de *western blot* de 1 minuto de exposición para detección de nucleolina. M: marcador; C: muestra control; R: muestra crecida en RPM.

3.6 Estudios con citometría de flujo en clinostato de mutantes de auxina

Conocer el estado del ciclo celular en el que se encuentran los núcleos de células meristemáticas de raíz tras 6 días de crecimiento en el clinostato en condiciones RPM-2 (**Figura 28**, página 78), podría aportarnos información más concreta sobre la alteración de las competencias meristemáticas que sufren las plantas en microgravedad simulada.

En un primer tiempo se optimizó la técnica para adaptarla a nuestras condiciones experimentales. Para esta parte del trabajo, se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* WT con 4 días de cultivo en 1g. Los puntos de la citometría de flujo más importantes que se optimizaron fueron:

- La fijación del material biológico (paraformaldehído 4% o ácido cítrico 0.1M); para asegurarnos que desde que termina su crecimiento hasta su medición el material no se estropea,
- Las condiciones de extracción de los nucleos (cuchilla o barra de cristal); para asegurarnos de que la extracción de los nucleos da un rendimiento máximo,
- Cantidad de raíces (20, 15 o 9 ápices); para conocer el número de meristemas necesarios para una correcta lectura en el citómetro.

Las pruebas hechas están resumidas en la **Tabla 10**.

	Sin fijación			Fijación con PFA	Fijación con ácido cítrico
Muestras	20 ápices	15 ápices	9 ápices	20 ápices	20 ápices
Preservación	800µl de Galbraith + 0.1% Triton x100 + 40 µg/ml RNAsaA			1ml PFA 4% + PBS 1x pH7 Lavado: PBS 1x pH7	500µl á. cítrico 0,1M + Tween20 0,1M
Picado	Barra de cristal	Cuchilla	Cuchilla	Cuchilla 800µl de Galbraith + 0.1% Tritón x100 + 40µg/ml RNAsaA	Cuchilla
Filtrado		33 µm		33 µm	33 µm
Post-filtrado	-	-	-	-	Neutralización: 2,5 ml Na ₂ HPO ₄ 0,4M Añadir: 50 µg/ml RNAsaA
Coloración		YP 50 µg/ml		YP 50 µg/ml	YP 50 µg/ml

Tabla 10: Esquema de los tres protocolos de fijación de muestras para citometría de flujo. Se indica cuántos ápices de muestra se recogieron, la forma de preservación, y según dicha técnica de preservación empleada, la forma de homogeneizar las muestras (picado) y de post-filtrado. Finalmente las muestras se colorearon con yoduro de propidio (YP) antes de pasarlas por el citrómetro de flujo.

Se diseccionó el meristemo apical, cortando la raíz a tan sólo un par de milímetros del ápice para asegurarnos que las células que cogíamos pertenecían en su mayoría a la zona de células meristemáticas y no presentaban las poliploidías propias de las células diferenciadas de la zona de elongación. Los resultados están presentados en la **Tabla 11**.

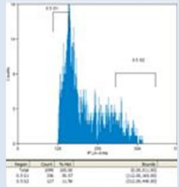
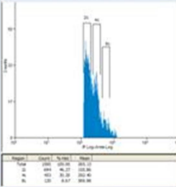
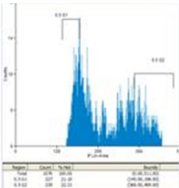
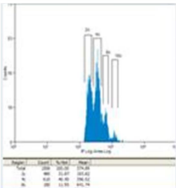
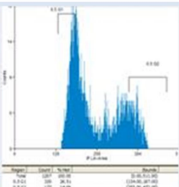
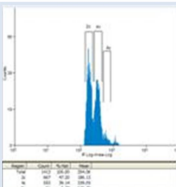
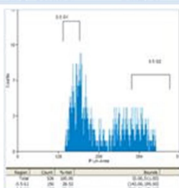
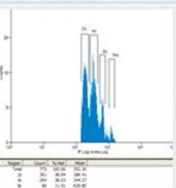
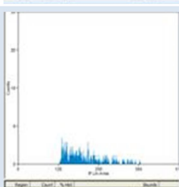
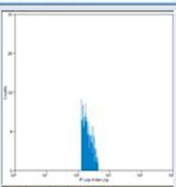
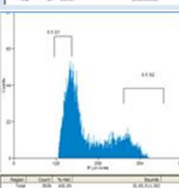
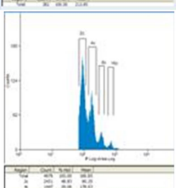
Protocolo	Ciclo celular	Fase	%	Poliploidización	%	
Sin fijación 20 ápices (barra de cristal)		G1	61,15		2C	54,35
		S	15,74		4C	35,47
		G2	23,11		8C	10,18
					16C	0,00
Sin fijación 20 ápices (cuchilla)		G1	42,19		2C	36,45
		S	13,38		4C	46,32
		G2	44,42		8C	13,67
					16C	3,57
Sin fijación 15 ápices		G1	53,02		2C	52,07
		S	17,65		4C	53,17
		G2	29,33		8C	4,76
					16C	0,00
Sin fijación 9 ápices		G1	57,03		2C	42,63
		S	2,28		4C	41,64
		G2	40,68		8C	12,61
					16C	3,12
Fijación PFA		G1	-		2C	-
		S	-		4C	-
		G2	-		8C	-
					16C	-
Fijación ácido cítrico		G1	66,38		2C	55,64
		S	8,97		4C	33,12
		G2	24,66		8C	8,24
					16C	3,00

Tabla 11: Citometría de flujo de muestras de WT Col-0 crecidas a 1g en diferentes protocolos de conservación y extracción de núcleos. Se muestran los resultados (en %) según la fase del ciclo celular (G1, S, G2) en la que se encuentran los núcleos del meristemo radicular además de su grado (en %) de ploidización (2C, 4C, 8C, 16C).

La condición experimental "Sin fijación, 20 ápices y cuchilla" reúne las condiciones estándar de la citometría de flujo. Por esta razón, será considerada aquí como la condición de referencia. Los resultados muestran que en estas condiciones, las fases del ciclo celular (G1, S y G2) están bien representadas ya que no hay deterioro del histograma. Sin embargo, se puede notar una importante poliploidización ya que el contenido de unos núcleos va hasta 16C. Esto demuestra claramente que al momento de recoger las muestras no solo se tomó la zona meristemática, sino que también se tomó parte de la zona de elongación, donde la diferenciación celular se acompaña de un incremento del grado de ploidia de los núcleos. Habrá que considerar de ahora en adelante, que la fase G2 representa en realidad la acumulación de los núcleos diploides en G2 y de los núcleos tetraploides en G1.

La comparación de las muestras 20 y 15 ápices sin fijación y con cuchilla, no muestra diferencias notables, excepto que con 15 ápices no se detectan los núcleos en 16C. Esto puede ser debido a algunas variaciones en la manera de recoger las muestras o que la cantidad de raíces tomadas es demasiado bajo y está por debajo del límite de detección de los núcleos en 16C. En la muestra con 9 meristemas, la cantidad es claramente insuficiente para obtener una correcta señal en el citómetro de flujo. Los siguientes experimentos se realizarán con 20 meristemas.

Al tener las muestras un tamaño medio de 2 mm, la extracción de los núcleos contando varias veces los ápices con una cuchilla, parece una etapa que podría ser mejorada. Por esa razón, se probó otro modo de extraer los núcleos de las células. En este test, se aumenta la superficie de contacto entre las muestras y el instrumento al utilizar la extremidad de una barra de cristal. Los resultados muestran que la detección de los núcleos de 16C extraídos con la barra de cristal es inexistente, mientras que lo son cuando se utiliza la cuchilla. Esta observación podría ser debida a un rendimiento inferior con la barra de cristal. Por lo tanto, se seguirán empleando las cuchillas para el resto del trabajo.

En lo que se refiere a la fijación de las muestras, se probaron dos métodos de fijación química. En el primer método, se fijó el tejido con PFA. Con este método, se fija la ultraestructura celular. La extracción de los núcleos se realiza con los ápices ya fijados. En el segundo método, no se fijaron los tejidos, sino que se fijaron los núcleos con el ácido cítrico a medida que son extraídos. En realidad no es una fijación fuerte como la que se obtiene con el PFA, sino que es una estabilización de los núcleos por el ácido. Al

momento de utilizar los núcleos para pasarlos en el citómetro, se neutraliza la acidez por el fosfato de sodio. Las muestras fijadas con PFA no dan ninguna señal. El PFA fija los tejidos de tal manera que la extracción posterior de los núcleos es imposible. Las muestras fijadas con el ácido cítrico dan unos resultados muy similares a la de referencia. Este método permite una buena manipulación de los núcleos ya que es reversible por simple neutralización del ácido. Se utilizará la fijación al ácido cítrico para los estudios ulteriores. Esta técnica es conocida bajo el nombre de método de Ulrich (Ulrich & Ulrich, 1991).

De este modo, procedimos a realizar citometrías de flujo con los núcleos de células meristáticas de raíz de mutantes relacionados con auxina crecidos en clinostato 2D durante 6 días (**Tabla 12**).

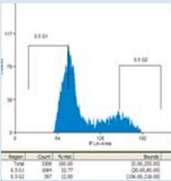
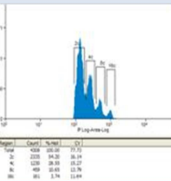
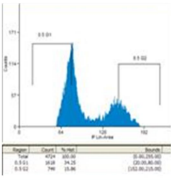
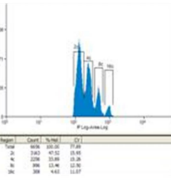
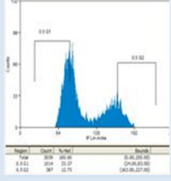
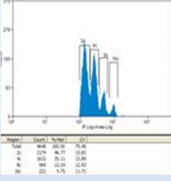
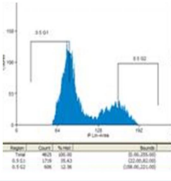
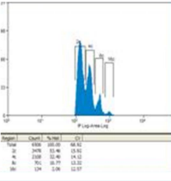
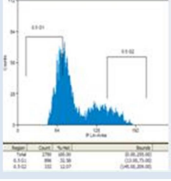
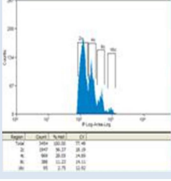
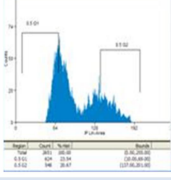
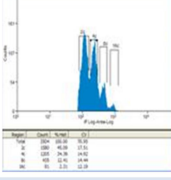
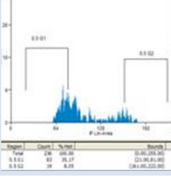
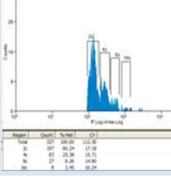
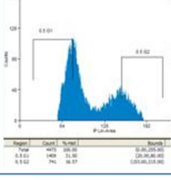
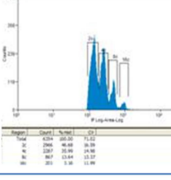
Protocolo	Ciclo celular	Fase	%	Poliploidización	%	
Col-0 1g		G1	65,54		2C	55,79
		S	10,46		4C	29,39
		G2	24,00		8C	10,97
Col-0 μg		G1	68,5		2C	47,76
		S	0,21		4C	34,06
		G2	31,71		8C	13,53
aux1.7 1g		G1	66,73		2C	47,30
		S	7,80		4C	35,51
		G2	25,47		8C	12,38
aux1.7 μg		G1	71,25		2C	54,17
		S	3,63		4C	32,83
		G2	25,12		8C	10,92
eir1.1 1g		G1	65,16		2C	57,28
		S	10,69		4C	28,51
		G2	24,15		8C	11,42
eir1.1 μg		G1	47,08		2C	47,86
		S	11,58		4C	36,5
		G2	41,34		8C	13,18
tir1 μg		G1	70,34		2C	62,54
		S	13,56		4C	26,35
		G2	16,1		8C	8,57
tir1 μg		G1	63,00		2C	46,92
		S	3,87		4C	36,18
		G2	33,13		8C	13,72
					16C	3,18

Tabla 12: Citometría de flujo de mutantes de auxina (aux1.7, eir1.1 y tir1) crecidos en gravedad control 1g y microgravedad simulada en clinostato 2D. La tabla muestra los resultados obtenidos en citometría de flujo. 20 ápices de 2 mm aproximadamente procesados siguiendo el protocolo de Ulrich (Ulrich & Ulrich, 1991). La tabla resume en histogramas y porcentajes, los datos obtenidos durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular y el grado de ploidización (2C, 4C, 8C y 16C) de los núcleos.

Observando en primer lugar la muestra control *wild-type*, vemos que la microgravedad simulada provoca un aumento de 24% de la cantidad de núcleos en fase G2 del ciclo celular y una disminución de 95% de células en fase S (Figura 75). En el caso del mutante de influjo celular de auxina, *aux1.7*, la respuesta es similar al control en lo que se refiere a las fases G1 y S. Sin embargo, no hay diferencia en la fase G2, en este mutante, mientras que con el WT, se nota un aumento de 24% entre el control 1g y la μg simulada. El mutante de eflujo celular de auxina, *eir1.1*, tiene una respuesta a la μg simulada muy distinta al WT, ya que muestra una disminución de 27% en la fase G1 y una aumentación de 41% en la fase G2. En la fase S, no se observa modificación. El mutante de sensibilidad a la hormona, *tir1*, tiene una respuesta muy similar a la del WT para las fases S, con una fuerte disminución de 71%, y G2, con un aumento de 51%. La diferencia con el WT reside en un incremento del 10% de los núcleos en fase G1, mientras que el WT es mucho más ligero ya que solo es de 4%.

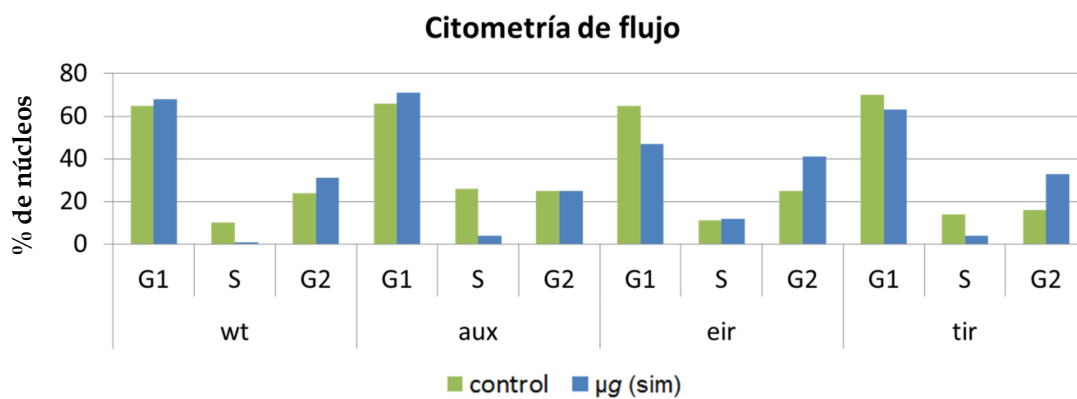


Figura 75: Citometría de flujo de muestras de plántulas silvestres (WT Col-0) y mutantes de auxina (*aux1.7*, *eir1.1* y *tir1*) crecidas en clinostato (μg simulada) o en condición control 1g durante 6 días. Gráfico comparativo de la fase del ciclo celular en el que se encuentran los núcleos (%) de las muestras

Hay que señalar que los experimentos se han repetido al menos dos veces cada uno, pero los resultados no han sido procesados estadísticamente debido a la variabilidad excesiva en la amplitud de las respuestas. Esto muestra que la técnica de citometría de flujo todavía no se ha optimizado lo suficiente para obtener una mejor repetitividad de los resultados. La etapa que parece aquí decisiva es la estandarización (o calibración) del tamaño de la zona de la raíz recuperada. La poliploidización de los núcleos muestra que el área seleccionada es más ancha que la del único meristemo y la variabilidad de los resultados muestra que el tamaño de la zona cortada no es el mismo de una muestra a otra.

3.7 Crecimiento de los mutantes de auxina y de nucleolina en la ISS

Durante el experimento espacial “Seedling Growth-2” crecieron muestras de mutantes de transporte de auxina AUX, EIR y de sensibilidad TIR, además de mutantes en nucleolina NUC-L1 y NUC-L2, todos ellos con una base genética de Columbia-0 (Figura 76). Ninguna de las muestras ha podido ser analizada, ya que su recepción fue posterior al inicio de la escritura de este trabajo. Pero si se ha podido cuantificar la longitud de las raíces a través de las imágenes realizadas durante su crecimiento.

Su grado de germinación fue ligeramente inferior al esperado (Tabla 13), pero aun así, la biomasa producida se espera que sea suficiente para poder llevar a cabo los estudios de transcriptómica y proteómica.

Línea	Nº semillas	Germinación 84h (%)
WT Col-0	234	85
<i>aux 1.7</i>	88	95
<i>eir 1.1</i>	88	88
<i>tir 1</i>	88	97
<i>nuc-L1</i>	172	95
<i>nuc-L2</i>	172	94
TOTAL	842	91

Tabla 13: Tasa de germinación de las muestras crecidas en cassettes en la ISS durante el desarrollo de “Seedling Growth-2” a los 3 días y medio.

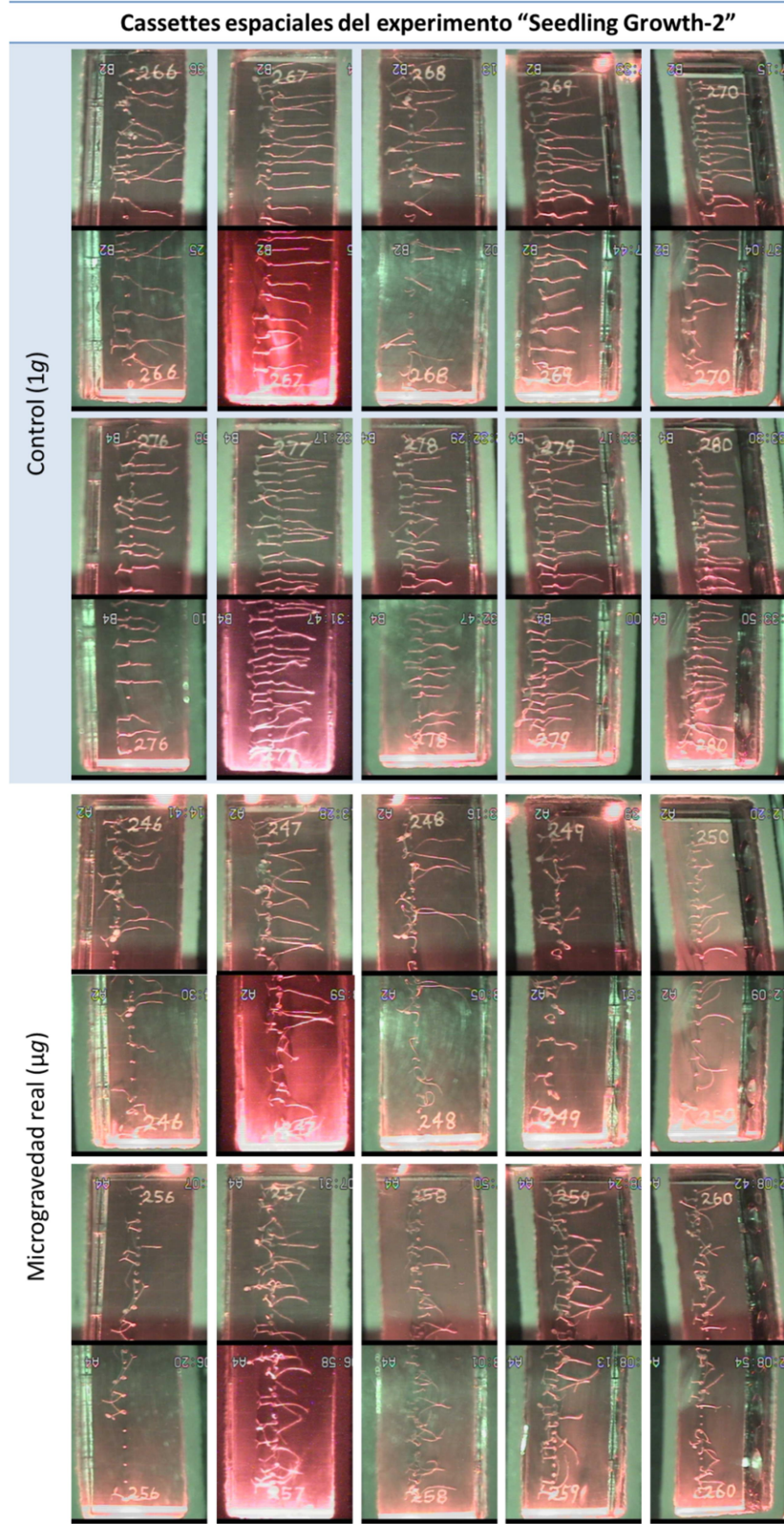


Figura 76: Fotografías del experimento espacial "Seedling Growth-2" tomadas a los 6 días de la fase de crecimiento en los runs con luz roja en gravedad control y microgravedad real. La cámara tomaba fotografías de la mitad del cassette y posteriormente fueron reconstituidas. Col-0 1g: 276, 278 y 280; Col-0 μg : 256, 258 y 260; *aux1.7* 1g: 268; *aux1.7* μg :248; *eir1.1* 1g: 266; *eir1.1* μg : 246; *tir1* 1g: 267; *tir1* μg : 247; *nuc-L1* 1g: 269 y 277; *nuc-L1* μg : 249 y 257; *nuc-L2* 1g: 270 y 280; *nuc-L2* μg : 250 y 260.

El EC donde se encontraba el control Col-0 que iba a crecer en oscuridad no se hidrató correctamente y debido a eso no disponemos de un fenotipo de referencia, por lo que las comparaciones se harán entre tratamientos, tomando como control la muestra crecida a 1g (Figura 77). Las plántulas crecidas en oscuridad eran más cortas que las crecidas con el estímulo de luz roja en todos los casos de los que se disponía muestra además de ser significativa para prácticamente todos los casos. Comparando la muestra crecida en microgravedad con las de 1g en oscuridad, no se apreciaron diferencias en el mutante *aux* y en el de nucleolina L2 era mayor. En el resto de los casos, las raíces crecidas en microgravedad eran menores. Resultados muy similares se obtuvieron en las muestras crecidas con luz roja; no se apreciaron diferencias en el caso del mutante *aux* y todas las muestras en microgravedad real crecieron menos. En el caso de la nucleolina L2 la tendencia era decreciente.

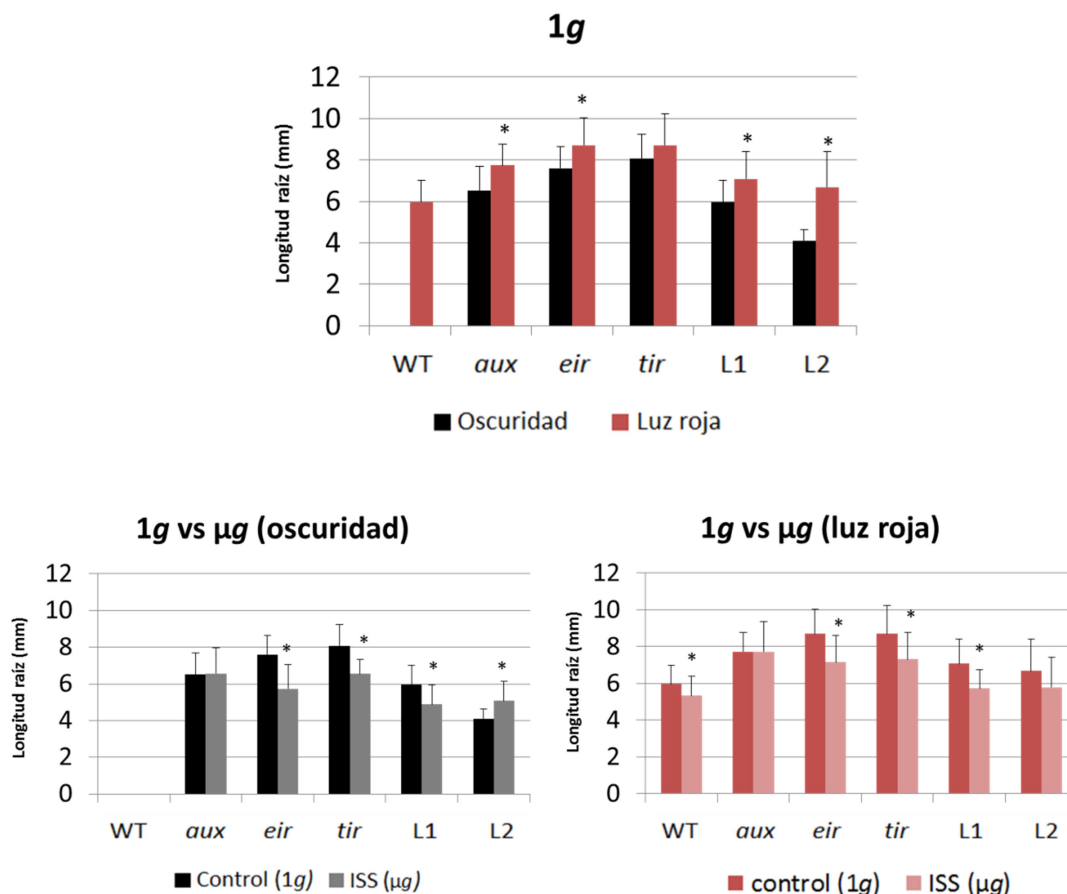


Figura 77: Crecimiento longitudinal de la raíz primaria de las muestras crecidas en cassettes en la ISS. Las barras indican la desviación estándar de la muestra. Los símbolos indican diferencias significativas entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

3.8 Resumen capítulo 3

La tabla mostrada a continuación (**Tabla 14**) muestra los principales parámetros estudiados en este capítulo con las líneas de mutantes relacionadas con auxina y con nucleolina crecidas en microgravedad simulada (RPM) y real (ISS).

Condición	Parámetro	Wt-Col	<i>aux</i>	<i>eir</i>	<i>tir</i>	<i>nuc-L1</i>	<i>nuc-L2</i>
RPM	Longitud raíz	+++	+	+++	+++	=	-
	LCPR	+++	+++	+	+++	=	---
	Área nucleolar	---	-	---	---	---	+++
qPCR (RPM)	Auxina	+++	+++	+++	+++	=	=
	Proliferación	+++	+++	+++	+++	=	-
	Crecimiento	+++	+++	+++	+++	+++	---
ISS	Longitud raíz	X	=	---	---	---	+++
		+++	=	---	---	---	-

Tabla 14: Resumen de todas las características estudiadas hasta el momento con muestras de mutantes de auxina y de nucleolina. RPM: Random Positioning Machine. ISS: Estación Espacial Internacional. LCPR: Tasa de proliferación local. En el paratado de qPCR se agrupan genes de auxinas (*EIR* y *TIR*), genes de proliferación (*CYCB1* y *CK2*) y genes de crecimiento (*NUC-L1*, *NUC-L2* y *FIB*). Los símbolos indican el grado de alteración indicando que no hay cambios ninguno (=) o existe un incremento (+) que puede ser significativo (+++) o un decrecimiento (-) que puede ser significativo (---). El símbolo (X) indica que no existe dicha muestra en determinada condición con ese parámetro.

4 Efectos de la microgravedad simulada en combinación con otros estreses ambientales

La falta de gravedad supone un estrés al que tiene que hacer frente la planta, y aunque no es uno más de los muchos estreses que sufren habitualmente las plantas en la tierra, como la salinidad del suelo o la sequía, los mecanismos moleculares que responden a esos estreses habituales pueden funcionar ante un estrés nuevo, como la ausencia de gravedad. En este apartado vamos a estudiar el comportamiento de las plantas en microgravedad simulada cuando, además, aumenta bruscamente la temperatura, cuando hay fitohormonas en el medio o cómo les afecta la hipergravedad. También utilizaremos un clinostato para ver el grado de afección a raíces secundarias o su efecto con luz roja.

4.1 Microgravedad simulada y choque térmico

Los cambios de temperatura suponen un estrés para la planta y queríamos ver qué ocurre con los diferentes mutantes de nucleolina de los que disponemos ante un aumento brusco de la temperatura ver cómo responde cada uno de ellos ante un estrés de ese tipo. Las muestras empleadas fueron *wild-type* Columbia-0 como control biológico, cuatro mutantes de nucleolina, *nuc-L1.1*, *nuc-L1.2*, *nuc-L2.1* y *nuc-L2.2*, además de una línea mutante de nucleolina L2.2 suplementada con el propio gen NUC-L2.2. Pusimos las muestras a crecer durante 12 días a 22°C y después estuvieron 24 horas a 37°C. Otras muestras estuvieron 48 horas a 37°C y recuperaron durante 48 horas más a 23°C con las que se pudo hacer inmunofluorescencia *in-toto*. Como en los estudios en microgravedad, se midieron la longitud de las raíces, la tasa de proliferación y el área nucleolar de las células meristemales.

La longitud de la raíz de todas las muestras de mutantes de nucleolina crecidas en temperatura control, fue inferior a la del fenotipo control (**Figura 78**). Comparando el mismo fenotipo crecido a temperatura control y con el tratamiento, la raíz era más corta en el fenotipo silvestre crecido con choque térmico. Esta tendencia se apreció también en los mutantes *nuc-L1.1* y *nuc-L2.1*. Sin embargo, en los mutantes *nuc-L1.2*, *nuc-L2.2* y la línea suplementada *nuc-L2.2::2.2*, se producía el efecto contrario, es decir, un aumento en la longitud de las raíces crecidas a 37°C.

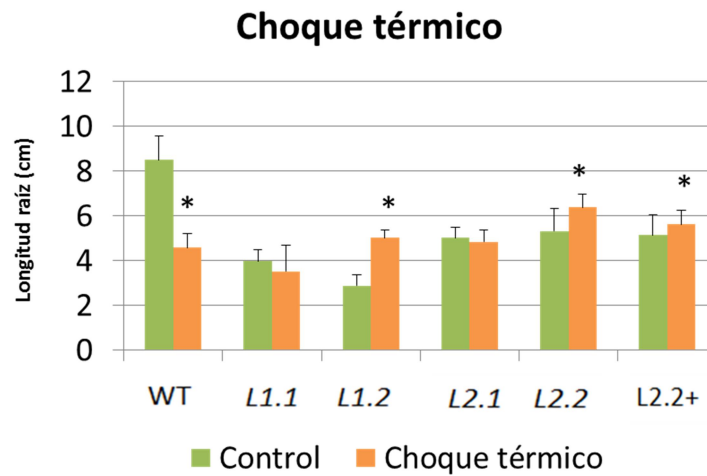


Figura 78: Longitud de la raíz principal de muestras crecidas a temperatura control (verde) y con tratamiento de choque térmico (naranja). *Wild-type* Col-0: WT; mutantes de nucleolina L1: *L1.1* y *L1.2*; mutantes de nucleolina L2: *L2.1* y *L2.2*; línea mutante de nucleolina L2.2 suplementada con L2.2: *L2.2+*. Las barras indican desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas del mismo genotipo entre las condiciones experimentales con un grado de significancia de $p < 0,05$.

La tasa de proliferación celular local (LCPR) en el fenotipo silvestre aumentaba con el tratamiento térmico de manera significativa, tendencia también observada en el fenotipo suplementado de NUC-L2.2 (**Figura 79**). Por el contrario, todos los mutantes experimentaban una alteración opuesta, y esta disminución era significativa en los cuatro casos.

En condiciones de temperatura estándar, los mutantes de nucleolina L2 experimentaron una reducción en el área nucleolar de células radiculares del meristemo, mientras que en el mutante *nuc-L1.2* se produjo un aumento (**Figura 80A**). Las muestras crecidas a 37°C presentaban un área mayor en el caso de los mutantes de nucleolina, excepto en la línea suplementada que era menor. Comparando el mismo fenotipo con diferente tratamiento, se vio que el aumento de temperatura provocaba en el fenotipo silvestre una disminución del área nucleolar, al igual que en la línea *nuc-L2.2::L2.2*. En cuando a los mutantes, los de nucleolina-L1 veían igualmente reducido el área nucleolar, significativo en los dos casos, mientras que los de nucleolina-L2 aumentaron, siendo significativo en el caso de *nuc-L2.2*.

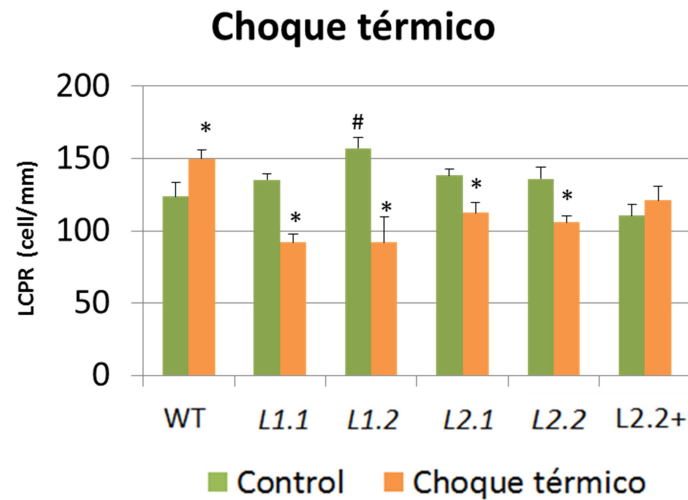


Figura 79: Tasa de proliferación celular local (LCPR) de mutantes de nucleolina en temperatura control (verde) y que han sufrido choque térmico (naranja). Las muestras crecieron durante 14 días (control) a temperatura estándar o 13 días a temperatura estándar y un día a 36°C (CT). *Wild type* Col-0: WT; mutantes de nucleolina L1: L1.1 y L1.2; mutantes de nucleolina L2: L2.1 y L2.2; línea mutante de nucleolina L2.2 suplementada con L2.2: L2.2+. Las barras indican desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las mismas condiciones térmicas con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

Si las plántulas retornan a una temperatura estándar tras el choque térmico, vimos que *wild-type* realmente consigue reajustar el tamaño del nucleolo al mismo tamaño que el control (**Figura 80B**). Algo que también se observó en los mutantes de nucleolina-L2. Por el contrario, ni los mutantes de nucleolina-L1 ni la línea suplementada, fueron capaces de igualar al control.

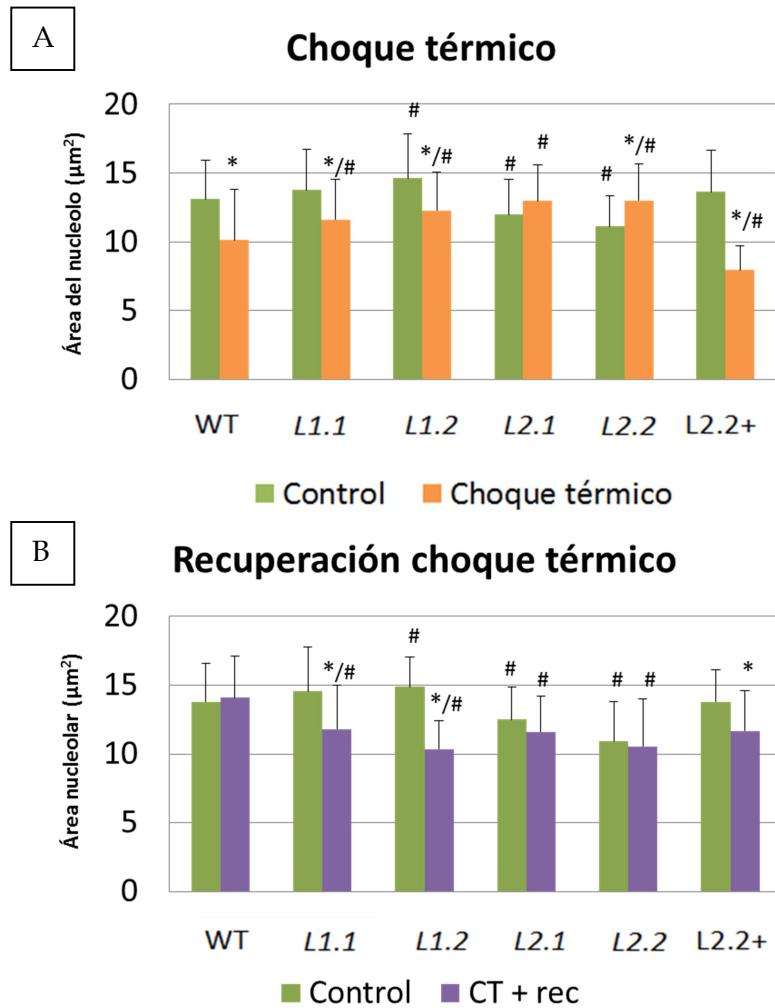


Figura 80: Tamaño del nucleolo (en micrómetros cuadrados) de células meristemáticas de mutantes de nucleolina crecidos en condiciones estándar (verde), con choque térmico (naranja) y en condiciones estándar tras un choque térmico (morado). *Wild type* Col-0: WT; mutantes de nucleolina L1: L1.1 y L1.2; mutantes de nucleolina L2: L2.1 y L2.2; línea mutante de nucleolina L2.2 suplementada con L2.2: L2.2+. Las barras indican desviación estándar. Los símbolos indican diferencias significativas entre genotipos en las mismas condiciones térmicas con respecto al WT-Col (#) o entre condiciones experimentales en el mismo genotipo (*) con un grado de significancia de $p < 0,05$.

4.1.1 Resumen de choque térmico

La tabla a continuación recoge los resultados obtenidos con las muestras de las líneas mutantes de nucleolina sometidos a choque térmico en este capítulo.

Parámetro	WT Col-0	<i>nuc-L1.1</i>	<i>nuc-L1.2</i>	<i>nuc-L2.1</i>	<i>nuc-L2.2</i>	NUC-L2.2::2.2
Longitud raíz	---	-	+++	-	+++	+++
LCPR	+++	---	---	---	---	+
Área nucleolar	---	---	---	+	+++	---
	=	---	---	-	=	---

Tabla 15: Resumen de todas las características estudiadas hasta el momento con muestras de mutantes de nucleolina crecidas a 37°C. La primera fila de área nucleolar indica la alteración con choque térmico, mientras que la segunda indica la alteración tras la recuperación del choque térmico. Los símbolos indican el grado de alteración indicando que no hay cambios ninguno (=) o existe un incremento (+) que puede ser significativo (+++) o un decrecimiento (-) que puede ser significativo (---).

4.2 Desarrollo de raíces secundarias en clinostato

La neoformación de las raíces secundarias es iniciada en el periciclo, después de una acumulación de auxina en estas células. La auxina está también presente en las raíces laterales en formación, incluso después del surgimiento de las raíces laterales. Por lo tanto, la localización *in situ* de la auxina en la raíz principal es un buen indicador de la presencia de las raíces secundarias, incluso en etapas muy tempranas del inicio de las raíces, las cuáles son observadas directamente con dificultad al microscopio.

El estudio de raíces secundarias se realizó en un clinostato con muestras de 4, 6, 10 y 14 días de plántulas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción genética *DR5::GUS*. El fondo genético de estas plántulas es el de *Arabidopsis thaliana Col-0*. Este promotor genético es específico de la presencia de auxina en las células. El hecho de utilizar este lote de plantas permite, mediante la técnica de revelado de expresión del gen reportero GUS, contar las células que a lo largo de la raíz primaria han acumulado auxina y los demás estadios del desarrollo de la raíz secundaria. Para simplificar el estudio, agrupamos los 12 estadios descritos en Malamy y Belfey (1997) en estadios del I-V. El estadio I correspondería con la "célula fundadora" de la raíz secundaria en el periciclo y a las primeras divisiones celulares asimétricas y en las que la célula origen deja de

estar en solitario (**Figura 81 A, B**). El estadio II donde se puede ver una serie de divisiones periclinales conduciendo a la formación de varias capas de células. Todas estas capas celulares permanecen homogéneas (**Figura 81 C, D, E**). En el estadio III, las divisiones han proseguido, y ya se pueden contar varias capas celulares heterogéneas donde se distingue una zona central y una zona cortical. En este estadio, la raíz aún no ha emergido fuera de la raíz primaria (**Figura 81 F, G, H, I**). El estadio IV presenta una raíz lateral ya emergida de la raíz primaria, pero su estructura interna aún no presenta la madurez de una raíz secundaria funcional (**Figura 81 J, K**). En el estadio V, la raíz lateral ya presenta una morfología propia, con una estructura similar a la del meristemo de la raíz principal (**Figura 81 L**).

Las mediciones se hicieron partiendo desde el meristemo de la raíz principal en dirección al tallo y contando por orden el estado de desarrollo de las raíces laterales que se iban encontrando. El número medio de raíces secundarias en función del tiempo muestra que no hay diferencia entre las dos condiciones, es decir, que la microgravedad no modifica el número final de raíces secundarias (**Figura 82A**). Sin embargo, si lo detallamos en función de los diferentes estadios de desarrollo y de los días de crecimiento (**Figura 82B**), se vio que a 4 días aún no hay diferencia entre los diferentes estadios entre las muestras crecidas a 1g y en el clinostato, pero sí que los hay en adelante. En microgravedad simulada, a 6 días había menos raíces laterales en estadio I y IV, y más en el II. A 10 y 14 días sigue siendo significativa la disminución en el estadio I y además es mayor el número de raíces en estadio V. Por lo que la microgravedad no induce un aumento en el número de raíces secundarias pero sí aumenta la emergencia de las mismas.

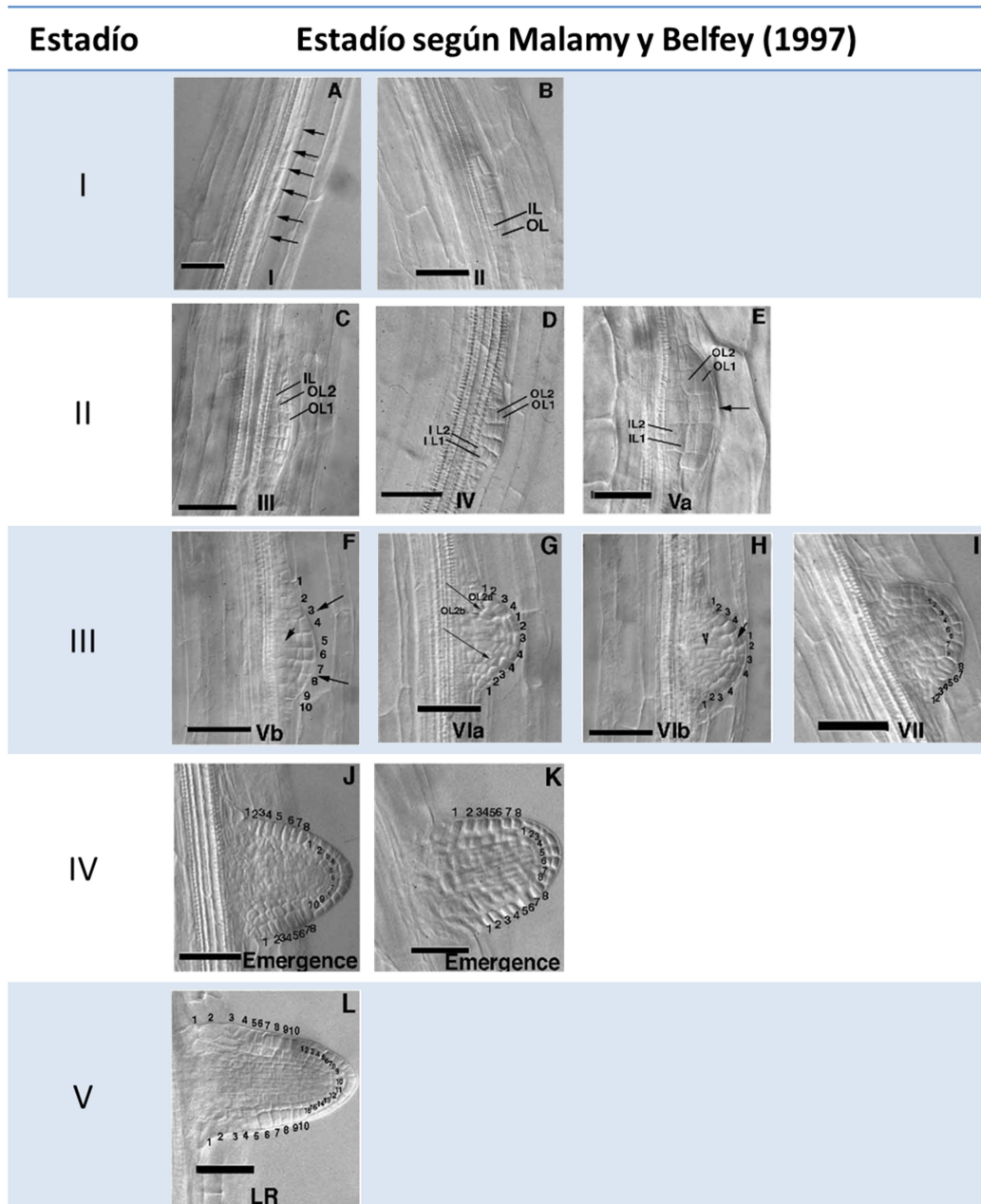
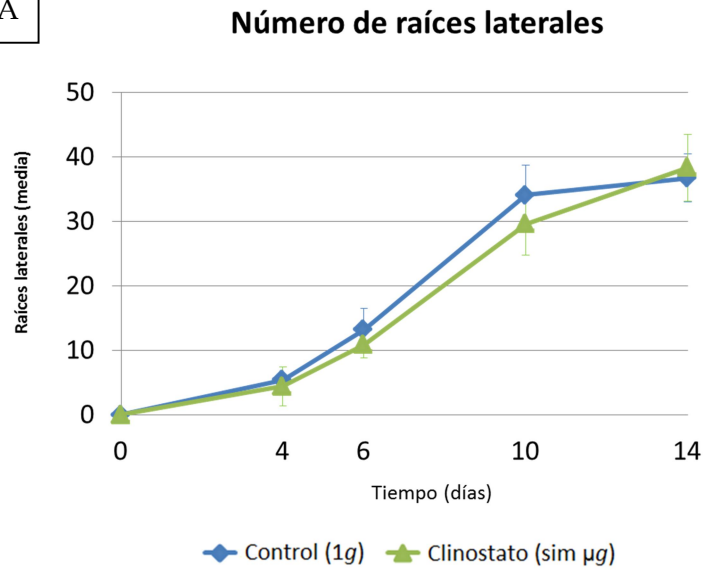


Figura 81: Agrupación de los estadios de desarrollo de las raíces secundarias. Estadio A) flechas indican divisiones en el periciclo. Estadio B) OL: capa exterior; IL: capa interior. Estadio F) Números indican las células. Estadios C, D y E) OL1, OL2: nuevas capas exteriores creadas desde la existente previamente; IL1, IL2: nuevas capas interiores creadas desde las anteriores. Estadios E, F, G y H) Flecha indica división anticlinal entre células de capas exteriores. Estadios F, G, H, I, J, K y L) Nuevas células en las capas exteriores. La barra negra indica 50 μm .

A



B

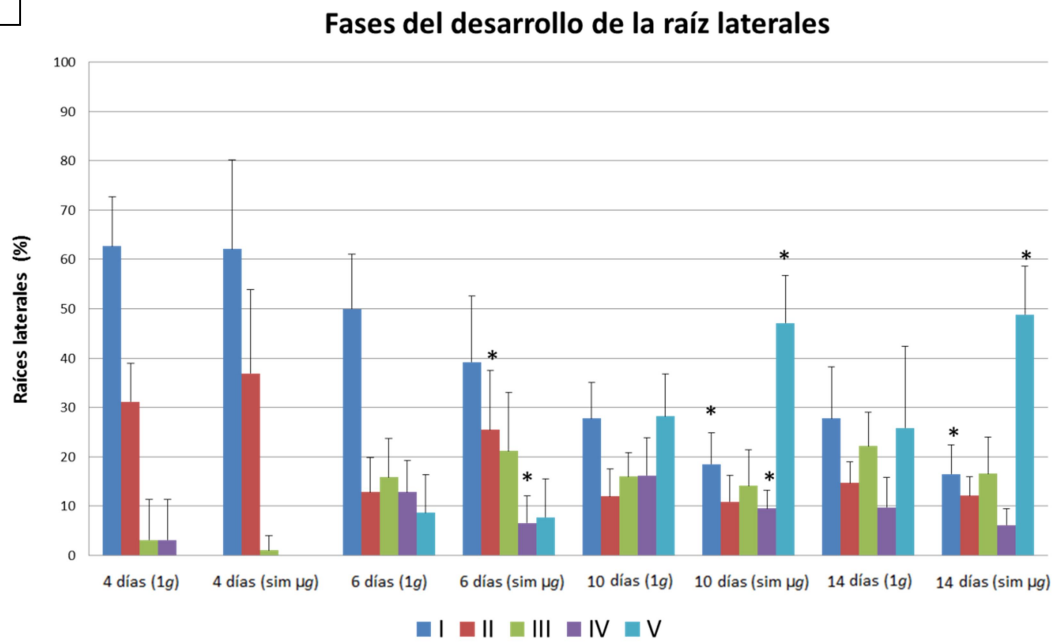
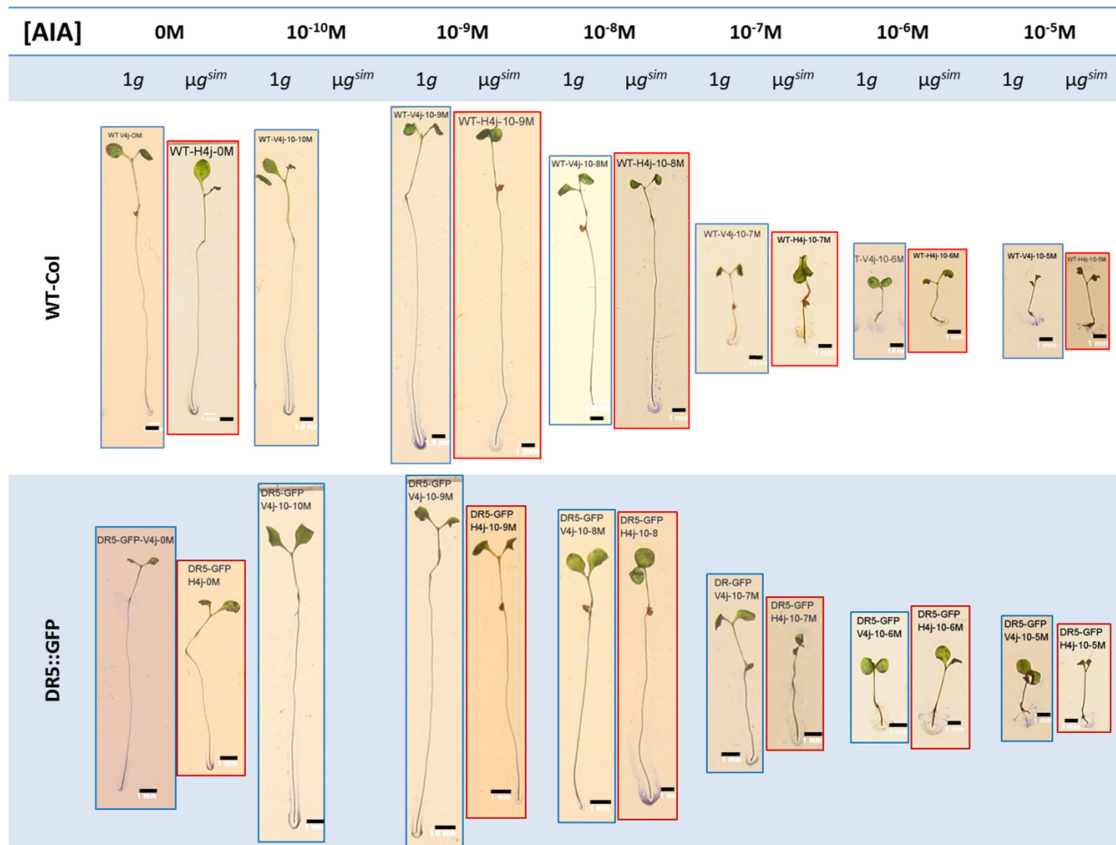


Figura 82: Raíces laterales de plántulas crecidas en clinostatos. A) Gráfica del número medio de raíces laterales en función de los días en muestras crecidas en microgravedad simulada en clinostato (verde) y en clinostato control (azul). B) Gráfica del número de raíces laterales divididas en los diferentes estadios en los que se encuentran en función de los días crecidas. Las barras indican desviación estándar. Los símbolos (*) marcan los estadios en microgravedad simulada (sim µg) diferentes significativamente con respecto a el mismo estadio en gravedad control (1g).

4.3 Efecto sobre el desarrollo de la raíz en diferentes gradientes de auxina

La auxina comunica a las células competentes el grado de actividad proliferante que deben tener. Entender que ocurre cuando esta señal se encontraba de forma exógena en el medio de cultivo dónde la plántula está creciendo y cómo interacciona con la microgravedad en la competencia de las células meristemáticas es muy importante para comprender el gravimorfismo. Sembramos semillas de *Arabidopsis thaliana* wild-type Col-0 y *DR5::GFP* sobre placas de cultivo con diferentes concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA) de 0 M hasta 10^{-5} M, que crecieron durante 4 días en el clinostato control y simulando microgravedad y medimos la longitud de las raíces primarias (Figura 83).

La raíz principal de las plántulas disminuye a medida que aumenta la concentración de auxina exógena, siendo significativo a partir de 10^{-7} M en adelante. No se observa ninguna diferencia entre las muestras crecidas a 1g y en microgravedad, por lo que un exceso de señal auxínica en el exterior provoca *per se*, la inhibición del crecimiento de la raíz independiente de la señal gravitropica.



[AIA] exógena

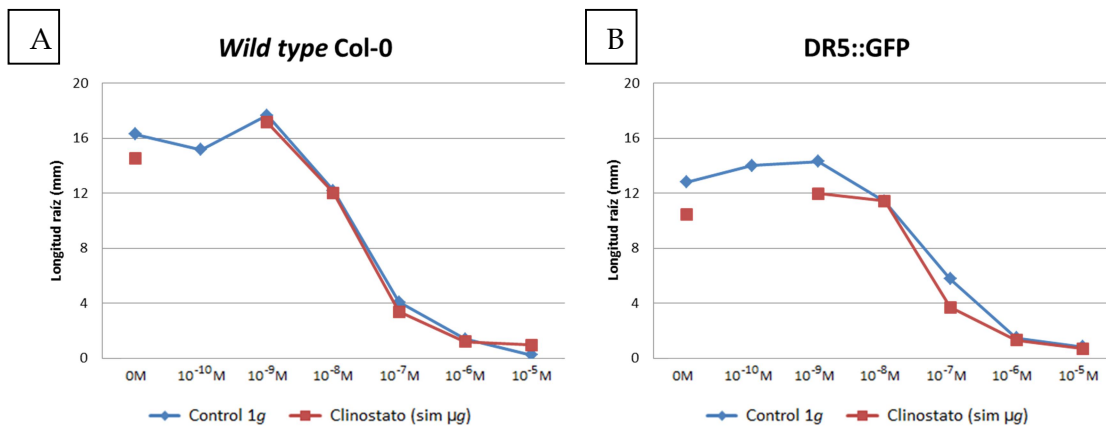


Figura 83: Crecimiento de la raíz principal de plántulas crecidas en medios de cultivo con diluciones de auxina. Arriba) Fotos tipo de las plántulas de *wild type* y de *DR5::GFP* crecidas durante 4 días en clinostato control (1g) y en clinostato simulando gravedad (μg^{sim}) en función de diferentes concentraciones de auxina exógena desde 0M hasta 10⁻⁵M. La barra negra indica 1 mm. Abajo) Gráficos con la longitud de la raíz primaria de plántulas de 4 días crecidas en el clinostato en microgravedad simulada (rojo) y en el clinostato a 1g (azul) medido en milímetros en función de la concentración molar de auxina exógena (AIA) en el medio de cultivo A) de *wild type* Col-0 y B) de *DR5::GFP*.

Tras terminar el crecimiento de las plántulas en el clinostato, las raíces se midieron inmediatamente en el microscopio Apotomo, de manera que pudimos calcular el ratio de proliferación, además de observar el patrón de difusión de la auxina, valiéndonos de la señal GFP de la línea transgénica *DR5::GFP* (**Figura 84**).

El ratio de proliferación no mostró cambios significativos comparando el control con la muestra crecida en microgravedad simulada, tan sólo una tendencia, en la que el ratio aumenta en microgravedad a todas las concentraciones, excepto para la línea transgénica cuando la dilución es alta que se llega a invertir la tendencia.

En cuanto al perfil de expresión de *DR5*, en el control 1g 0 M, se puede ver una acumulación de auxina en el centro quiescente, en la columela de la caliptra y una línea celular de la parte central del meristemo. En nivel de gravedad control, se puede ver que al aumentar la concentración en auxina el patrón de acumulación se distorsiona a partir de una concentración de auxina exógena de 10^{-7} M, coincidiendo con el acortamiento longitudinal de la raíz principal. Este patrón también se ve, en las muestras crecidas en microgravedad simulada pero a concentraciones menores de 10^{-9} M, indicando un aumento de la sensibilidad de las raíces a la auxina.

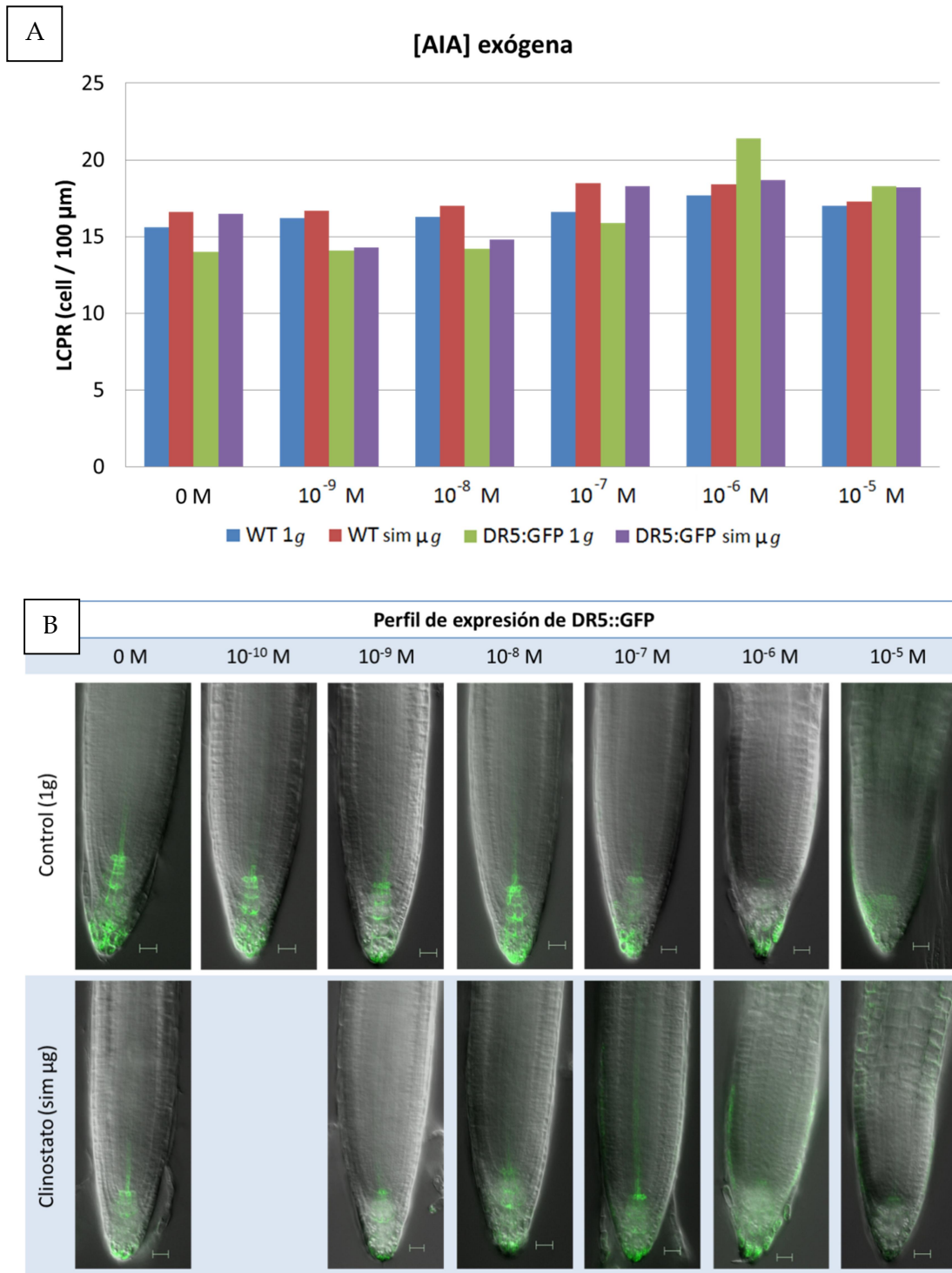


Figura 84: Muestras *wild-type* y *DR5::GFP* de 4 días crecidas en clinostato en diferentes concentraciones de auxina desde 0 hasta 10^{-5} M. A) Tasa de proliferación celular local (LCPR) (en células/100 μm) en función de la dosis de auxina exógena (AIA) medido en células / 100 del fenotipo silvestre Col-0 (WT) y de *DR5::GFP*. B) Meristemos de líneas *DR5::GFP* bajo un microscopio confocal Apotomo. Arriba las muestras crecidas en gravedad control (1g) y abajo en microgravedad simulada (sim μg). La barra blanca indica 20 μm .

4.4 Muestras con gen reportero GFP

Utilizaremos líneas con genes reporteros GFP para genes específicos que servirán para estudiar directamente los procesos relacionados con transporte de auxina (PIN2:GFP), crecimiento celular (NUC-L1-GFP) y proliferación celular (CYC-B1-GFP) en microgravedad. PIN2:GFP marca la presencia in-situ de la proteína. Las otras dos carecen de la caja de destrucción, por lo que la fluorescencia no tiene porqué indicar la situación exacta de las proteínas. Las semillas crecieron en el clinostato (μg^{RPM}), fuera (control 1g^{RPM}), en hipergravedad con una centrifuga de gran diámetro (2g), el control de la LCD (control 1g^{LDC}) que se colocó sobre el eje de rotación de la LCD y además se insertó una RPM portátil dentro de unas de las góndolas de la LCD ($\mu\text{g}^{\text{RPM}+\text{LDC}}$), de esta forma, se conseguía microgravedad pero con un ambiente alrededor diferente del existente en la microgravedad conseguida con la otra RPM (**Figura 85**).

El patrón de referencia será el control 1g^{RPM} para la microgravedad simulada, y 1g^{LDC} para los experimentos crecidos en las gravedades alteradas con la LDC. PIN2:GFP muestra un claro patrón de localización en las membranas plasmáticas (superior) de las células de las capas meristemales. En microgravedad simulada este patrón se ve alterado con una disminución de la presencia de la proteína en la membrana. El control de la LCD presenta un patrón similar al control externo de la RPM, pero con una señal ligeramente menos marcada en las muestras crecidas en la centrifuga. Comparadas con el control 1g^{LDC} , las muestras en microgravedad ($\mu\text{g}^{\text{RPM}+\text{LDC}}$) y en hipergravedad (2g) se ven más alterada que en la RPM. Las muestras de CYCB1 y de NUC-L1:GFP, presentan patrones de expresión muy parecidos entre si y a su vez parecidas con los resultados del patrón de localización obtenido en PIN2. De nuevo la microgravedad simulada alteraba el patrón de CYCB1 y NUC-L1. El control en LCD en este caso presentaba una similitud mayor con el control de la RPM.

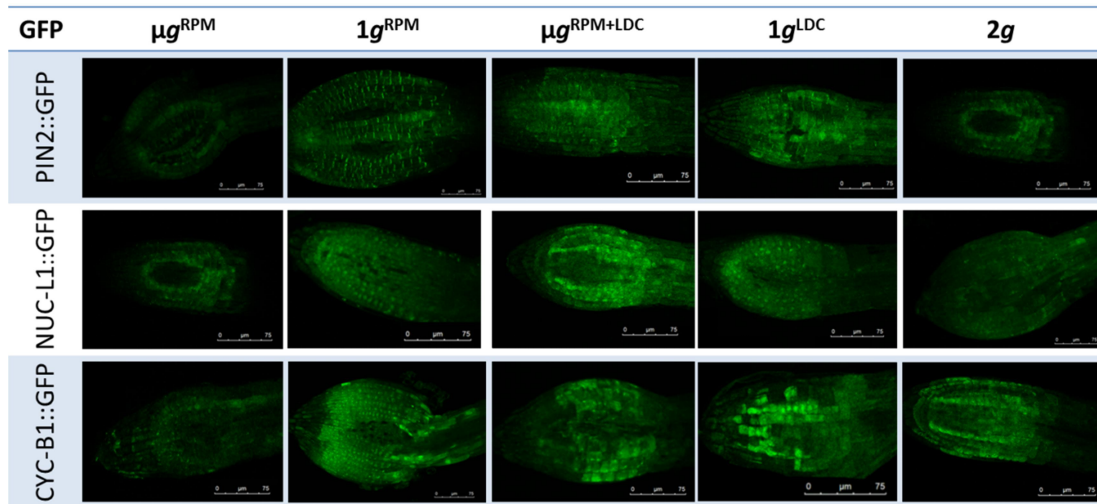


Figura 85: Meristemos de raíz de las diferentes muestras de Arabidopsis con el gen reportero GFP para PIN2, NUC-L1 y CYCB1 en un microscopio de fluorescencia. Las muestras crecieron en diferentes niveles de gravedad simulada. En la segunda columna se muestran las que crecieron estáticas en el mismo incubador dónde está la RPM y que se considerará el control de todo el experimento ($1g^{RPM}$). En la primera están las plántulas que crecieron en microgravedad simulada en la RPM (μg^{RPM}). En la cuarta columna está el control de la LDC ($1g^{LDC}$), en la tercera las muestras que crecieron en la RPM dentro de la LDC ($\mu g^{RPM+LDC}$) y en la última, las muestras que crecieron en la góndola de la LCD ($2g$). Las barras blancas indican $75 \mu m$.

DISCUSIÓN

- 1 HACIENDO REALIDAD EL EXPERIMENTO ESPACIAL “SEEDLING GROWTH”
- 2 CONFIRMANDO LA GENERALIDAD DEL DESAJUSTE ENTRE EL CRECIMIENTO Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CONDICIONES DE GRAVEDAD ALTERADA
- 3 DESVELANDO LOS MECANISMOS QUE CONECTAN EL FOTOTROPISMO Y EL GRAVITROPISMO SOBRE LA COMPETENCIA MERISTEMÁTICA EN MICROGRAVEDAD
- 4 BUSCANDO LOS EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE CONTROLAN LA PROLIFERACIÓN CELULAR
- 5 BUSCANDO EL MECANISMO QUE DESREGULA EL CRECIMIENTO CELULAR EN MICROGRAVEDAD
- 6 VALIDANDO LAS HERRAMIENTAS DE MICROGRAVEDAD SIMULADA CON DATOS DE MICROGRAVEDAD REAL (SG)
- 7 FUTUROS EXPERIMENTOS A REALIZAR EN MICROGRAVEDAD REAL Y SIMULADA

Discusión

1 Haciendo realidad el experimento espacial “Seedling Growth”

El objetivo principal de la tesis es la realización con éxito del experimento espacial Seedling Growth para estudiar los efectos de la microgravedad sobre las competencias meristemáticas en *Arabidopsis thaliana*.

Como actividades previas al lanzamiento espacial, se realizaron diversos experimentos con el objetivo de optimizar el crecimiento de plántulas en las condiciones ambientales y el hardware disponible en el espacio. El éxito de estos experimentos previos a *Seedling Growth* se demostró con una elevada tasa de germinación de plántulas crecidas en la ISS (marzo de 2013 (SG1) y particularmente en noviembre de 2014 (SG2)). Además, los experimentos realizados para optimizar las condiciones de fijación y preservación ultraestructural de muestras para microscopía serán determinantes en el éxito de la tercera parte del experimento (SG3) que se ejecutará en 2016. Con los resultados obtenidos en estos tres bloques de experimentación SG1, SG2 y SG3, daremos un paso importante hacia uno de los principales objetivos planteados en el campo de investigación de experimentos espaciales: comprender cómo interaccionan la luz y la auxina en la pérdida de la competencia meristemática en el espacio (Herranz & Medina 2014) y como consecuencia, avanzar hacia la optimización de sistemas de soporte vital que obtengan oxígeno en la ISS gracias a formas vegetales viables en ingravidez (Paradiso et al 2014). El hecho de poder disponer de una fuente de oxígeno alternativa, permitiría abaratar las expediciones espaciales, factor de gran interés para toda la comunidad aeroespacial (Zwart et al 2009). Esperamos que los resultados de esta tesis sirvan para que los experimentos que ya se están realizando en sistemas de soporte vital cerrados sean reajustados teniendo en cuenta el papel de la microgravedad, y particularmente, su interacción con otros parámetros ambientales subóptimos presentes en los viajes y estancias en el espacio.

¿Cuáles serán las condiciones experimentales en el experimento espacial Seedling Growth?

En la optimización de las condiciones ambientales fue necesario fijar las condiciones de crecimiento, elección de los mutantes objeto de estudio, disposición de las semillas y tiempo de crecimiento en los cassettes espaciales:

1. Las condiciones de crecimiento utilizadas para un crecimiento óptimo empleando semillas de *Arabidopsis thaliana*, derivaron de las descritas en otros experimentos previos como TROPI donde se había fijado la temperatura, la intensidad de la iluminación y la humedad (Kiss et al 1999). Los cassettes y las semillas de *Arabidopsis* WT utilizados en SG, son los mismos que los de TROPI. Eso nos permitió coger las condiciones de cultivo de TROPI como elemento de referencia para SG. Teniendo en cuenta que SG también se realiza con semillas de *Arabidopsis* mutantes, tuvimos primero que asegurarnos que esas condiciones también eran válidas para ellos antes de realizar el experimento.
 - Los mutantes fueron elegidos de tal forma que sean adecuados en cada una de las rutas de estudio, para cubrir en la medida de lo posible cada necesidad, por ejemplo cuando se introduce una mutación en el primero (Pontvianne et al 2007). Nos hemos valido de los mutantes de ambos genes para los experimentos en microgravedad, porque se ha demostrado que son sensibles a las variaciones ambientales (*nuc-L1.2* y *nuc-L2.2*) (Durut et al 2014). Estos dos mutantes, al afectar a un proceso tan importante para la célula como la biogénesis de ribosomas entre otros, crecen con menos vigor que el silvestre. A pesar de todo, se consiguieron tasas de germinación suficientes para permitir su uso en el contexto del experimento espacial SG. Complementariamente, disponemos de una batería de mutantes de nuceolina más amplia que se ha empleado en el experimento de choque térmico (*nuc-L1.1* y *nuc-L2.1*) que se discutirá más adelante. Estas últimas son líneas con fenotipo nucleolar menos claro. El uso de estos mutantes y los de auxina, contruidos también en el ecotipo Columbia-0, utilizó la variante silvestre de este ecotipo como control biológico.

2. Se ha definido que los cassettes de SG se hidratan con 850 μ l porque es la cantidad óptima que permite el crecimiento correcto de las plántulas durante todo el experimento, sin riesgo de que se seque ni de saturar demasiado la cámara de cultivo (**Figura 32**). La cantidad de agua que hay que añadir el cassette para tener una buena hidratación de las plántulas resulta de un compromiso entre la cantidad mínima necesaria para la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y la capacidad de absorción del filtro Whatman. La dificultad de esta etapa es que la experiencia espacial tiene que desarrollarse con un mínimo de intervención humana. La inyección del agua dentro del cassette solo se efectúa una vez para iniciar el experimento. Las condiciones de microgravedad complican el cultivo de las plántulas en el sentido en que el agua en exceso no acumula en el fondo del cassette, sino que flota por todo el cassette sin ser aprovechado por las plantas. Eso significa que si se inyecta agua en exceso, el espacio interior del cassette resultara ocupado por una o varias gotas de agua flotando, lo cual podría un obstáculo para la observación de las plántulas durante el cultivo. Otro factor importante en el reparto del agua dentro del cassette es la evapotranspiración de las plántulas. Así que después de la germinación, las plántulas absorben el agua del filtro Whatman y sueltan parte de lo que han absorbido en el atmosfera bajo la forma de vapor de agua. Este elemento es crucial para la preparación de los vuelos espaciales de largo tiempo porque las plantas podrán ser utilizadas para mantener una humedad atmosférica necesaria para los astronautas, pero dentro de los cassettes para los experimentos de SG puede resultar una “niebla” impidiendo la observación de las plantas. Este fenómeno debido a la evapotranspiración ha sido controlado al momento optimizar la cantidad de agua.
3. El ritmo de crecimiento de los mutantes en los cassettes, y concretamente la longitud de la raíz, sirvió para determinar la duración del experimento ya que inicialmente se contemplaban varias alternativas. Los 9 días planteados inicialmente fueron desechados porque las plantas excederían el tamaño de la cámara de cultivo. Los pequeños ajustes en la altura a la que se coloca cada genotipo en función de su mayor o menor tasa de crecimiento permite fijar con seguridad la duración del experimento en 6 días de tiempo de crecimiento desde la germinación (**Figura 34**). El crecimiento de *Arabidopsis thaliana* fue

inicialmente considerado a 9 días, porque corresponde a un desarrollo vegetativo de la planta. La diferencia de tres días entre el tiempo de crecimiento considerado al principio y el tiempo de crecimiento seleccionado, no cambia la etapa de desarrollo de la planta de manera significativa. A los 6 días de cultivo, la parte aérea de las plantas presenta los dos cotiledones y una o dos hojas, y la raíz principal también tiene ya presentes los primeros estadios de desarrollo de las raíces laterales.

4. En cada cassette es posible colocar hasta 100 semillas sin respetar el espacio entre ellas, pero si mantenemos el espaciado de la cuadrícula de la membrana de nitrocelulosa (3 mm) entrarían 14. Este número es perfecto para el estudio del fototropismo con los mutantes de fitocromos (Millar et al 2009) que requiere evitar totalmente el tigmotropismo (Lopez et al 2014). Sin embargo, la biomasa producida no es suficiente para los estudios de transcriptómica (**Figura 42**). En los mutantes de auxina y nucleolina hemos priorizado el uso de técnicas transcriptómicas frente al posible efecto del tigmotropismo (que en cualquier uno de los pasos de las mismas.
 - **Ruta de captación de la luz:** La elección de los mutantes pretendía cubrir todos los pasos en las rutas de captación de la luz. Los fotones rojos (captados por PHY-A) y los azules (captados principalmente por PHY-B) son los principales para la planta a la hora de captar la luz (Kiss et al 2003). De hecho, les permiten reconocer el contexto espacio-temporal en el que se encuentran (Pierik & Testerink 2014) o incluso la estación en la que están (Chamovitz 2012). Por tanto, se utilizaron las líneas de mutantes *phyA-201* y *phyB-1* y la variable silvestre del mismo ecotipo, *Landsberg erecta*, como control biológico. La utilización de organismos mutantes en los proyectos espaciales puede ser un freno a la realización del experimento, ya que los mutantes no se comportan como el organismo WT. Eso puede implicar tener que desarrollar protocolos o cassettes específicos de cada mutante lo cual es un factor limitante para los experimentos espaciales. De este modo, tras la selección de los mutantes *phyA* y *phyB*, tuvimos que comprobar que crecían de forma adecuada bajo las condiciones de crecimiento definidas previamente

(Figura 34). Este resultado ha permitido que la NASA acepte el uso de estos mutantes en la experimentación espacial.

- **Ruta de la auxina:** la auxina es una hormona sintetizada en los ápices de la planta, principalmente en el del tallo, y transportada desde allí hasta el meristemo radicular. Numerosas proteínas facilitan y regulan el transporte polar de auxinas. De todos eso transportadores, algunos de ellos son específicos de la zona radicular o incluso de la zona del meristemo radicular, de ahí la elección del mutante de influjo celular de auxina AUX (*aux1.7*) (Swarup et al 2001) y del de eflujo celular PIN2 (*eir1.1*) (Luschnig et al 1998). El mutante de la proteína TIR (*tir1*), tiene alterada la percepción a la auxina, al carecer de una de las principales moléculas efectoras de auxina en las células donde la hormona tiene que promover la proliferación (Shimizu-Mitao & Kakimoto 2014). Estos tres mutantes nos permiten seguir por completo el ciclo de transporte y respuesta a la auxina (Overvoorde et al 2010). Los resultados de tasa de germinación y crecimiento de estas muestras en los cassettes espaciales permitió incorporar dichas líneas en el hardware TROPI y ser enviadas por primera vez a la ISS en un experimento espacial. Tanto estos mutantes como los de nucleolina tomarán la muestra de Columbia-0 como control biológico, y no será posible compararlas con el fenotipo *Landsberg erecta* porque este presenta *per se* un crecimiento muy superior al fenotipo Columbia-0 (Kliebenstein et al 2002, Waters & Grusak 2008).
- **Mutantes de nucleolina:** hay muchos estudios que avalan a dicha proteína como crucial en la biosíntesis de ribosomas (Medina et al 2010). Como los ribosomas son necesarios para la síntesis de proteínas y la célula requiere proteínas cuando van a crecer, la nucleolina nos informa indirectamente sobre el estado del crecimiento celular (Tajrishi et al 2011a). El gen AtNucL1 es esencial, y de hecho, en plantas existe una segunda copia que se expresa solamente en momentos y tejidos muy específicos, pero que puede suplir al gen principal en momentos de caso se controlará con experimentos paralelos con microgravedad simulada en tierra). Por lo tanto, teniendo en cuenta la limitación de carga espacial, en la que no podríamos disponer de un cassette para estudiar

fototropismo y otro para estudiar la transcriptómica con el mismo mutante, se optó por utilizar un número intermedio de 22 semillas con los mutantes de auxina y con los de nucleolina. La solución pasaba por dividir el cassette en dos mitades de manera teórica. En la parte de la izquierda se colocan las semillas con un espacio de 3 mm entre ellas y en la derecha se ponen las mismas semillas pero con 1,5mm de separación. Con esta densidad, la mitad de la izquierda serviría para estudiar el fototropismo, como se hizo en SG1 (Kiss et al 2014) e incrementar la biomasa con la parte derecha para permitir realizar estudios de transcriptómica (**Figura 43**).

La optimización de estos parámetros en cada uno de los mutantes que hemos incluido en el estudio ha permitido realizar de forma muy controlada y predecible el experimento en la ISS. Gracias a estos resultados, hemos aprendido lo suficiente para extrapolarlo a otras condiciones experimentales, incluso a modelos de plántulas, lo que puede favorecer en gran medida el crecimiento de otras plantas en el espacio.

¿Cómo se fijarán las muestras en el experimento espacial Seedling Growth?

Una vez analizado el fototropismo de las muestras crecidas en la ISS por teleciencia, las plántulas necesitan ser conservadas para su análisis posterior en Tierra. El modo de conservación dependerá de si se desea realizar un estudio molecular a nivel de transcriptómica y proteómica o un estudio ultraestructural por microscopia. Para métodos de biología molecular la mejor opción de preservación fue la congelación, ya que las otras opciones descritas en el apartado 1.3.1 de resultados no se consideraron viables. De hecho, las muestras recibidas de SG1 que han sido analizadas hasta ahora (microgravedad real y 1g crecidas con luz roja) por qPCR (**Figura 59**), se encontraban en perfecto estado de conservación. Estas muestras se preservaron congeladas tras el crecimiento en la ISS (rack térmico, GLACIER, MELFI) y desde N-USOC, el equipo científico sacó las plántulas de los cassettes para ponerlas en RNALater y enviarlas a nuestro laboratorio en Madrid. Las pruebas OVT sirvieron para corroborar esas decisiones.

La principal novedad de SG en cuando al sistema de conservación de muestras espaciales llegará en la misión SG3. En esta tercera parte las muestras serán fijadas y el hardware de crecimiento original no tiene implementado un sistema de fijación. Experimentos anteriores como GRAVI habían empleado la fijación con formaldehidos (Yu et al 1999) pero el hardware es muy diferente y adaptado para otro sistema vegetal, *Lens culinaris* (Legué et al 1996). En nuestro caso, se promovió el diseño de un nuevo hardware que permitiera la fijación de las muestras para su preservación estructural y el posterior empleo de técnicas de microscopía.

La mejora en los protocolos, el aumento de la seguridad, la comodidad de trabajo, la eficiencia del resultado o el abaratamiento del proceso son máximas buscadas continuamente en la investigación y más aún por las agencias espaciales. Precisamente por la toxicidad de los aldehídos, se ensayó un fijador no basado en aldehídos (NotoxHisto), como los utilizados hasta el momento, para probar su implementación en futuros experimentos espaciales (Acton et al 2005). A la vista de los resultados (**Figura 37**), la fijación de muestras sumergidas en NH es suficiente para poder realizar con ella microscopía electrónica y estudiar detenidamente la organización nuclear, así como microscopía confocal con anticuerpos por la preservación de antigenicidad. Pero las muestras no inmersas presentan daños estructurales a nivel microscópico y una mala conservación de antígeno. Por lo tanto, NH se comporta como un buen fijador cuando la muestra está inmersa, con propiedades de conservación estructural y de antigenicidad al mismo nivel que PFA y GA, pero no puede ser implementado en el experimento espacial al no tener asegurada la inmersión de la muestra en el fluido (Balsamo et al 2014).

El uso de ferrofluido en el experimento espacial pretende controlar los movimientos que los fijadores, como fluidos que son, pueden tener en microgravedad. Manteniendo los fluidos cerca del lateral en el que está el imán, se evitará la formación de burbujas en el fijador, por lo que las muestras se fijarán de manera uniforme. Esta ventaja, junto a su biocompatibilidad y no interacción con los estudios posteriores, que se ha demostrado en esta tesis (**Figura 39**), justifica el uso del ferrofluido en el experimento espacial.

No obstante, el ferrofluido se debe utilizar con mucha precaución en cualquier experimento espacial. Su principal problema es su caducidad (**Figura 40**), un almacenaje superior a 3 meses pone en riesgo una fijación óptima y con frecuencia esta ventana temporal es difícil de compatibilizar con los calendarios y restricciones de las agencias espaciales para la preparación y recolección de las muestras. Este hecho es logísticamente relevante, pues impone la necesidad de recurrir a ferrofluido recién fabricado para los experimentos. Con respecto a la aglutinación del ferrofluido observado una vez mezclado con el fijador, existe el riesgo de que el fijador se separe del ferrofluido y por lo tanto, pierda toda efectividad. Este suceso es sin embargo más lento en ausencia de la gravedad en condiciones de almacenamiento en la ISS, por lo que lo consideramos improbable en el marco del experimento SG3.

En resumen, aunque los problemas de toxicidad podrían ser resueltos con NotoxHisto, se ha preferido seguir utilizando los fijadores convencionales en un triple contenedor. Este contenedor se podrá llenar parcialmente para no comprometer la estructura del cassette por sobrepresión durante la inyección del fijador, y consiguiendo una fijación óptima gracias a que el ferrofluido mantendrá los fijadores en la base del cassette junto a las plántulas.

2 Confirmando la generalidad del desajuste entre el crecimiento y la proliferación celular en condiciones de gravedad alterada

La microgravedad altera las competencias meristemáticas, desacoplando la proliferación del crecimiento (Matía et al 2010, Matía et al 2007). En nuestros estudios, se han incluido tratamientos de microgravedad, tanto simulada en la RPM como real en la ISS, pero también distintos tratamientos de luz. A esto hay que añadir que se ha trabajado principalmente con siete mutantes diferentes correspondientes a tres rutas diferentes. Para determinar dicha alteración se utilizaron parámetros generales como la longitud de la raíz (más vinculado con el tráfico de auxinas), parámetros celulares para la tasa de proliferación (LCPR) y el crecimiento celular (tamaño del nucléolo) y además parámetros moleculares (estudios de expresión génica por qPCR) de marcadores de proliferación, crecimiento, tráfico de auxinas y fototropismos.

La longitud de la raíz es un parámetro general que evalúa un órgano completo y por tanto, engloba el crecimiento y la proliferación en el meristemo pero también en la zona de elongación y la zona de diferenciación. Sobre esta medida afectan muchos otros factores, como por ejemplo la concentración de auxina, responsable de diferenciar la zona de proliferación de la de elongación (Abas et al 2006, Swarup et al 2005). Otra de las medidas realizadas es la tasa de proliferación local en las células del meristemo radicular. Este dato, así como el parámetro de área nucleolar en el mismo conjunto de células, ya no tiene en cuenta el resto del órgano ni la interferencia con otros parámetros.

Los resultados de qPCR con genes clave en rutas de auxina (EIR y TIR), nos ayudarán a comprender los resultados obtenidos en la longitud de la raíz (Migliaccio et al 2009, Overvoorde et al 2010, Perez-Torres et al 2008, Vieten et al 2005). También, se compararán las variaciones de expresión en los genes de proliferación (CK2-A2 y CYC-B1) con el parámetro LCPR (Litchfield 2003, Meggio & Pinna 2003, Nimeus-Malmstrom et al 2010). Por último, la expresión de los genes relacionados con crecimiento (NUC-L1, NUC-L2 y FIB) servirá para entender mejor las alteraciones detectadas gracias al tamaño del nucléolo (González-Camacho & Medina 2005, Medina et al 2010). Hay que tener en cuenta que CK2, al activar otras proteínas por fosforilación, afecta tanto a los genes relacionados con proliferación como a los de crecimiento. Aunque la vamos a

asignar preferentemente al grupo de proliferación, se tendrá en cuenta su función en la fosforilación de proteínas de crecimiento (Lebrin et al 2001, Vilks et al 1999).

En el experimento ROOT, precursor de esta tesis, las plantas crecidas en microgravedad real estaban etioladas (dado que fueron mantenidas en oscuridad todo el tiempo) observándose un incremento en la proliferación y una disminución del crecimiento celular (Matía et al 2010). Los mismos resultados se obtuvieron en microgravedad simulada inducida por RPM (Boucheron-Dubuisson et al pendiente). Pero no así en el experimento de clinostato ONU (**Figura 44**), donde quisimos reproducir el experimento, y bajo esas condiciones no se observaron diferencias significativas en la longitud de la raíz ni en cuanto a la proliferación celular, aunque es importante recordar que la longitud de la raíz puede no variar aunque proliferación y crecimiento celular estén alterados. Solo podemos explicar esta aparente contradicción en el hecho de que la microgravedad simulada en clinostato (clinorotación lenta a 1 rpm), al ser el giro en un solo sentido, requiera más días para dicho desacople o diferente velocidad de rotación (van Loon 2007).

Sin embargo, si que se observaron diferencias cuando se incluyeron ciclos de luz blanca/oscuridad, o con fases de luz roja u oscuridad en los dos últimos días de crecimiento. Esto indica que la microgravedad provoca una alteración de la competencia meristemática visible fenotípicamente en todas las condiciones lumínicas observadas y es con estímulos lumínicos cuando además en el clinostato se observan diferencias a nivel de proliferación celular. Las alteraciones de las competencias meristemáticas se mantienen en mutantes de fitocromos, transporte de auxina o de nucleolina a la vista de otros experimentos realizados en la RPM.

3 Desvelando los mecanismos que conectan el fototropismo y el gravitropismo sobre la competencia meristemática en microgravedad

La luz modula el desarrollo de la planta en momentos como la germinación, la desetiación, el establecimiento de la arquitectura de hojas y nódulos o la floración, iniciando estos efectos los fotoreceptores (Smith 2000). La cascada de quinasas que estos provocan, regula la competencia meristemática mediante la redistribución del transporte polar de auxina. Dicho transporte se altera en ausencia de gravedad (Ueda et al 1999). Durante los 6 días de duración de nuestro experimento, las semillas solo alcanzan las fases del desarrollo de germinación y la de estabilización, es decir, el periodo en el que la plántula germina y se convierte en autotrófica. Fitocromos (PHYA y PHYB) y criptocromos colaboran en el proceso de maduración de cloroplastos y demás regulaciones de la desetiación. Al disponer de los mutantes de estos fitocromos, pudimos estudiar cómo se comportan en ausencia de gravedad y con diferentes tratamientos lumínicos.

El genotipo silvestre crecido en la RPM en oscuridad aumentó su proliferación y disminuyó su crecimiento celular (**Figura 51**). Estos datos están apoyados en los estudios transcriptómicos (**Figura 55**), de manera que incrementos en la expresión de genes de proliferación como CYCB1 y CK2 se ven correlacionados con un aumento en la proliferación y una bajada en la expresión de las nucleolinas se correlaciona con una bajada en el crecimiento celular. También concuerda con otros experimentos en la ISS como ROOT (Matía et al 2010, Matía et al 2007). De la misma forma concuerda con nuestro experimento SG1 (Kiss et al 2009): entre las muestras crecidas en la ISS, las crecidas en microgravedad real tenían una longitud de raíz mayor que las crecidas a 1g de manera significativa y las variaciones en la expresión de los genes estudiados corroboran las mismas tendencias que las muestras crecidas en la RPM.

Al añadir ciclos de luz con una fase final de luz roja continua, la proliferación celular disminuye en microgravedad. En otras palabras, si la microgravedad provoca un aumento de la proliferación, al crecer bajo luz roja el efecto se corrige e incluso llega a invertirse la tendencia.

Las raíces de mutantes de fitocromos mostraban un incremento en su longitud en microgravedad simulada, mientras que dicha tendencia se mostraba significativa en

microgravedad real. Las qPCR de genes de auxina (EIR y TIR), confirmaron las tendencias observadas fenotípicamente.

Tal y como esta descrito en la bibliografía, CK2 y CYCB1 participan en el desarrollo de meristemo (Dello Ioio et al 2007, Espunya et al 1999, Marques-Bueno et al 2011). Es decir, hay una correlación entre un aumento en la expresión de estos genes y su efecto activador de la proliferación. Esta propiedad se respeta también en microgravedad, sirviendo como buenos marcadores de proliferación. Por otra parte, la luz roja ha reducido la tasa de proliferación cuando en oscuridad se producía un aumento (**Figura 51**). Se sabe que la luz roja desencadena fototropismos (Hohm et al 2013) porque la luz modifica, a través de CK2, la fosforilación de NPH3 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3), responsable de movilizar el calcio disponible en el citoplasma para que se produzca una redistribución de auxinas asimétricas (Shacklock et al 1992). CK2 es responsable de reubicar a proteínas de PIN y PINOID, por lo que su alteración provocaría que dichas familias de proteínas modificasen los gradientes de auxina y con ello el patrón de proliferación celular (Marques-Bueno et al 2011). La LCPR no ha podido ser medida en mutantes de fitocromos expuestos a microgravedad real porque los sistemas de fijación no estaban implementados cuando se realizó SG1. Con todos estos datos, podríamos definir la ruta de proliferación dependiente de auxinas tras un estímulo lumínico con luz roja tal y cómo se muestra en la **Figura 86**.

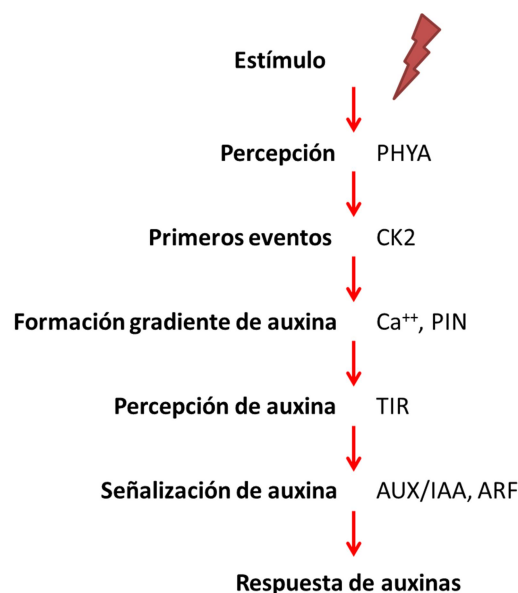


Figura 86: Esquema de la respues a auxinas tras la percepción de un estímulo lumínico de luz roja.

En cuanto al crecimiento celular, la luz ha provocado una variación en la expresión génica. Es decir, en oscuridad y microgravedad simulada, los genes de crecimiento celular estudiados (NUC-L1 y NUC-L2) disminuían significativamente su expresión mientras se observaba una caída en el área nucleolar (**Figura 52**), y por otro lado, bajo condiciones lumínicas, el crecimiento celular seguía disminuido mientras que la expresión de los genes de nucleolina había aumentado. En condiciones normales, un aumento en la expresión de nucleolina conlleva un incremento del crecimiento celular, pero si ese aumento es debido a una respuesta ambiental, la sobreexpresión de nucleolina reprime la transcripción de rDNA (Alvarez et al 2003). Esto explicaría los aumentos de expresión de nucleolina en muestras crecidas con luz en microgravedad y que ello no esté asociado a un aumento en el crecimiento celular. Como durante SG1 no crecieron muestras en oscuridad continua, estos parámetros no pudieron ser medidos en microgravedad real.

Si observamos el efecto producido en los mutantes de fitocromos en oscuridad, *phyB* se comporta como el fenotipo silvestre, tanto en proliferación como en crecimiento celular. Sin embargo, *phyA* presenta una variación en la tasa de proliferación celular en sentido opuesto a la observada en los otros dos genotipos, es decir, en microgravedad la proliferación en muestras crecidas en oscuridad se reduce y con luz aumenta, mientras que el crecimiento se reduce tanto en oscuridad como con el ciclo de luz. Si prestamos atención a los resultados de los estudios de transcriptómica, el mutante *phyA* crecido en microgravedad no mostró un incremento en la expresión de ningún bloque de genes mientras que se observaban variaciones en el genotipo silvestre. Como los receptores PHYA y PHYB actúan de manera sinérgica en el momento de la germinación y la desetiolación (Smith 2000), la diferencia entonces radica en la longitud de onda que capta cada uno de ellos. Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a un papel más importante de la luz roja como desencadenante de la movilización de auxina para que se reajuste la proliferación celular en base al estrés que induce la microgravedad.

Para sintetizar, en los mutantes de fitocromos aumentó su proliferación celular y disminuyó su crecimiento celular en oscuridad y con luz la proliferación volvía a niveles normales mientras que el crecimiento seguía disminuido. Esto pone de manifiesto que la luz roja ajusta niveles alterados de proliferación en microgravedad pero de forma independiente a como afecta al crecimiento en condiciones normales. Se

puede pensar que en condiciones normales las rutas que desencadenan la gravedad y la luz están solapadas, pero en microgravedad se desacoplan. Son en esos puntos de desacople dónde se distingue de alguna manera la respuesta para crecimiento y la respuesta para proliferación. Seguramente hay todavía más mediadores que distingua de alguna manera cuál ha sido el origen de la señal a lo largo de la cascada de proteínas que intervienen en la competencia meristemática. En la **Figura 87** se muestra la reacción entre las cascadas de señalización de los distintos estímulos ambientales, i.e. la gravedad y la luz, y como se entremezclan hasta desembocar en la disrupción de la competencia meristemática

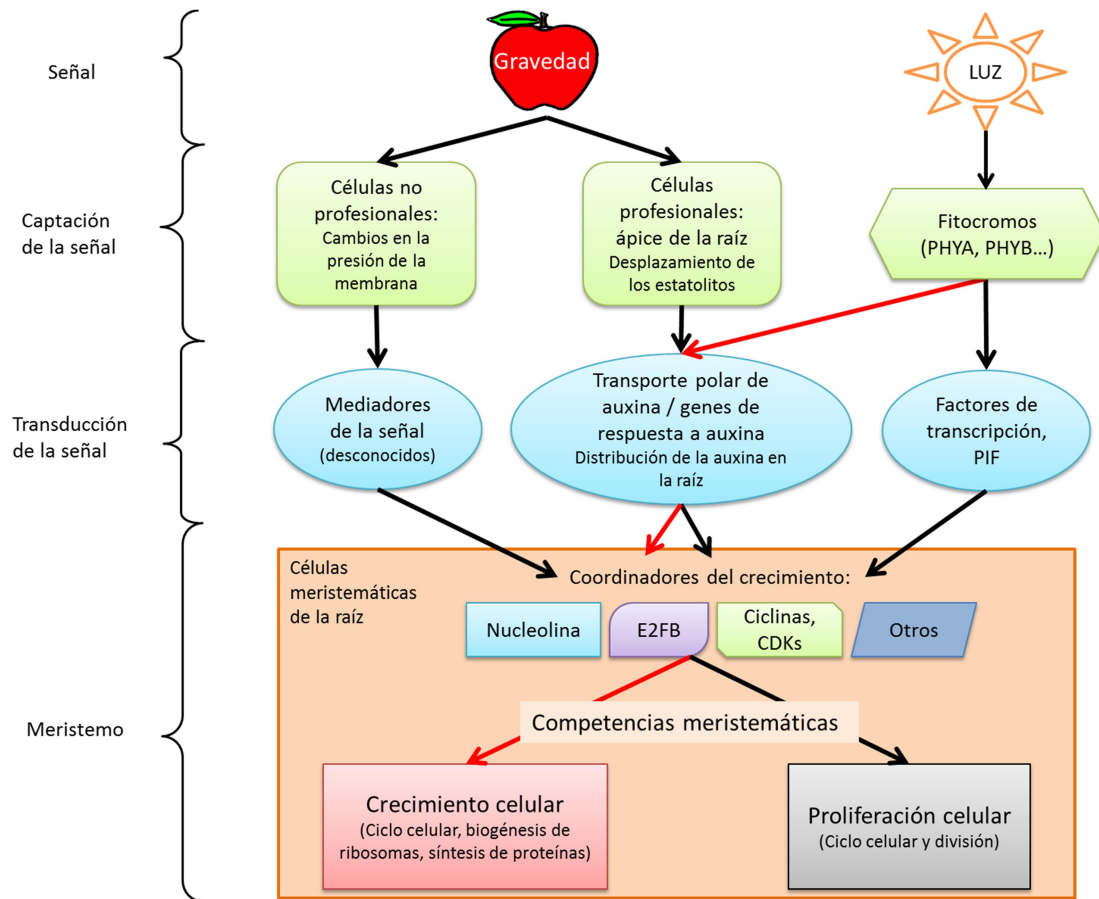


Figura 87: esquema de de la transducción de las señales lumínica y gravitatoria hacia la respuesta de crecimiento y proliferación en el meristemo. La señal puede ser captada por estatolitos en células profesionales de la columela o por otros mecanismos menos conocidos en células aisladas, como las de un cultivo celular. Esa señal se transmite a través de un gradiente en la distribución de auxina, mediante otros mediadores. La respuesta proliferante se puede monitorizar por nucleolina, fibrilarina (marcadores de crecimiento celular), ciclinas, CDKs o E2FB (marcadores de proliferación celular) en el contexto del balance entre la biogénesis de ribosomas/crecimiento y el programa de división celular/proliferación característico de la competencia meristemática (caja marrón en la figura).

4 Buscando los efectos de la microgravedad en las vías de señalización que controlan la proliferación celular

En condiciones normales y en tejidos meristemáticos, un crecimiento celular bien regulado precede al inicio de la proliferación celular como parte del ciclo celular, siendo la microgravedad capaz de provocar un desacople de dichos procesos biológicos. Es conocido que la auxina es la principal hormona que promueve la proliferación desencadenando la división celular y por tanto, es muy interesante evaluar la respuesta de mutantes del transporte y reconocimiento de la auxina a la microgravedad para desvelar si el mecanismo que altera la proliferación celular en el espacio está relacionado con el tráfico de auxinas.

En nuestros experimentos de simulación en la RPM de Toulouse utilizamos el ciclo de luz RPM-2, es decir luz/oscuridad 16/8h durante los 6 días de crecimiento con mutantes relacionados con el transporte (*aux 1.7* y *eir 1.1*) y sensibilidad a auxina (*tir 1*), además de los mutantes de nucleolina L1 y de nucleolina L2 (*nuc-L1* y *nuc-L2*), los mismos genotipos que se usaron en SG2 y que se usarán en SG3. Los parámetros de nuestro control biológico Col-0 confirmaron los resultados previos: su raíz creció más en microgravedad simulada que en 1g, el ratio de proliferación fue mayor y el área del nucléolo (crecimiento celular) fue menor en condiciones de microgravedad simulada.

Los tres mutantes relacionados con auxina, a pesar de mostrar un gravitropismo muy diferente en la tierra (por ejemplo los mutantes *aux* y *eir* tienen un fenotipo agravitrópico evidente con transporte de auxina desregulado), desde el punto de vista de la alteración de la competencia meristemática se comportaron de igual manera que el *wild type*. La expresión de los genes estudiados correlaciona los caracteres medidos de longitud y de proliferación celular, es decir, un aumento en la expresión de EIR y TIR en microgravedad está directamente relacionada con una raíz más larga, así como, un aumento en la expresión de CYCB1 y CK2 se correlaciona con un ratio de proliferación mayor. El aumento en la tasa de proliferación también se observó mediante microscopía electrónica de barrido con muestras crecidas en microgravedad simulada con una disminución en el tamaño de las células de la rizodermis de la zona del meristemo de la raíz (**Figura 67**).

El hecho de que el patrón de expresión de la auxina esté alterado a la altura del meristemo y no podamos encontrar una diferencia concreta entre los mutantes de transporte de auxina ni siquiera a la que desencadena la cascada de expresión de genes dependientes de auxina, sugiere que la alteración de la proliferación inducida por la microgravedad ocurre más abajo en la cascada de la transducción de la señal gravitropica que está afectada diferencialmente en estos mutantes.

Por su parte, en los mutantes de nucleolina se observaron patrones de desarrollo diferentes. En primer lugar, en el mutante *nuc-L1* ni se observó una raíz más larga ni una mayor tasa de proliferación, mientras que el mutante *nuc-L2* presentó una raíz más corta y una tasa de proliferación menor en las muestras crecidas en microgravedad simulada. Aunque el comportamiento de estos mutantes se discutirá en el siguiente apartado, dichas observaciones en los mutantes de nucleolina se correlacionan con la expresión de los genes de auxina (*EIR* y *TIR*) y de proliferación (*CYCB1* y *CK2*), sin variación entre las muestras crecidas en microgravedad simulada y 1g en *nuc-L1* y con caídas de expresión en las muestras de *nuc-L2* crecidas en RPM. Las alteraciones en la proliferación de las muestras crecidas en microgravedad simulada en ambos mutantes también se observaron mediante microscopía electrónica de barrido. Los resultados sugieren que aunque los niveles de auxina cambian en los mutantes de nucleolina expuestos a microgravedad, podríamos pensar que es al nivel del nucléolo donde se producen las causas de la alteración del crecimiento celular y que esto provoca una posterior alteración en la proliferación y sus marcadores moleculares.

Por último, los resultados de citometría de flujo muestran que en el fenotipo silvestre hay menos células en fase S, mientras que aumenta el número de células en fases de crecimiento (G1 y G2) en microgravedad simulada (Yu et al 1999), algo también observado en *aux* (**Figura 75**). En *eir* y *tir* también se produce el aumento en G2, pero G1 se reduce. Los aumentos observados en la subpoblación de células en G2 pueden deberse a que el ciclo celular se retrase si se detecta algún problema al entrar en mitosis en microgravedad. Este efecto se ha observado también en células proliferantes en cultivos en suspensión en suspensión y en callos (Moustafa 2014).

El crecimiento durante SG2 de los mutantes relacionados con el transporte (*aux1.7* y *eir1.1*) y sensibilidad a auxina (*tir1*) y de nucleolina (*nuc-L1.2* y *nuc-L2.2*) se llevó a cabo con un grado de germinación alto generando la biomasa necesaria para futuros experimentos de transcriptómica y proteómica. Sin embargo, comparar su crecimiento

con el de las muestras crecidas en RPM es complicado porque no pudimos reproducir el mismo tratamiento lumínico en nuestro experimento de simulación. Las muestras crecidas previamente al vuelo espacial en RPM estuvieron con ciclos luz/oscuridad (RPM-2) y en microgravedad real crecieron con ciclos de luz y los dos últimos días en oscuridad o luz roja continua (ISS-2) previamente al vuelo espacial (luz oscuridad + oscuridad o luz roja) tuvieron otro tratamiento lumínico. Los experimentos complementarios y el análisis de muestras pendientes de SG2 y el experimento SG3 están siendo realizados en el laboratorio por el próximo becario FPI asignado al proyecto Seedling Growth.

¿Cómo influye la auxina en el medio al desarrollo de la plántula?

Otra forma de evaluar la relación entre las auxinas y la microgravedad era evaluar la sensibilidad a auxina en este entorno, y concretamente los efectos sobre la aparición de raíces secundarias. ¿Altera la auxina en microgravedad al desarrollo de la plántula?

La auxina exógena juega un papel importante a la hora de configurar la estructura de la raíz primaria, siendo perniciosa a concentraciones por encima de 10^{-7} M (**Figura 83**). Como los ratios de proliferación se mantienen, esto nos indica que las variaciones en la longitud de la raíz se deben a cierta inhibición del proceso de elongación y no a la disminución del ritmo de divisiones de las células meristemáticas (**Figura 84**). En todos estos casos, el nivel de gravedad no altera nuestros parámetros básicos, pero sí consigue difundir el patrón de concentración de la auxina en la punta de la raíz. Todo esto sugiere que la concentración de auxina exógena configura la estructura de la raíz de *Arabidopsis*, pero los niveles internos de auxina se alteran de manera independiente al alterar los niveles de gravedad, como lo harían sin adicionar la hormona al medio (Ottenschlager et al 2003). O dicho de otra manera, bajo estas condiciones, la proliferación tiende a ser mayor en microgravedad, el crecimiento celular decae y el patrón de auxina se modifica independientemente de que se aporte auxina exógena al medio.

¿Cómo se comportan las raíces secundarias en microgravedad?

Todos los experimentos están centrados en lo que le puede ocurrir al meristemo radicular, que es dónde se concentran las actividades que configurarán la estructura general de la raíz. Pero ¿Cómo se desarrollan las raíces secundarias en microgravedad?

La hipótesis más aceptada sugiere que las raíces laterales surgen desde células del periciclo que están predeterminadas desde su origen en la zona del meristemo (Moreno-Risueño et al 2012). Como se observó con la línea DR5::GUS crecida en microgravedad simulada el número de células predeterminadas / raíces laterales se mantuvo con respecto a las muestras de DR5::GUS crecidas a 1g (**Figura 82**). Esto sugiere que la predeterminación celular es correcta, dado que aunque se le cambien las condiciones de crecimiento de manera prolongada desde su germinación, el número de raíces laterales se mantiene. Sin embargo, si se está produciendo una alteración en el patrón de auxina que no afecta a la colocación espacial de los puntos de inicio de la raíz lateral, debe de ser porque la auxina es importante pero no suficiente para establecer dicho punto y serían expresiones oscilantes de genes en el meristemo que no se ven alterados por la microgravedad los que determinarían la frecuencia espacio-temporal de dichos puntos (Moreno-Risueño & Benfey 2014).

El cambio que si provocó la microgravedad fue la emergencia de las mismas, es decir, el pasar de células predeterminadas o bajos estadios de desarrollo a ser raíces secundarias funcionales. Que este cambio sea independiente de la formación de célula precursoras se debería a que los genes que establecen esas células son diferentes de los genes que provocan el desarrollo de la raíz secundaria (Moreno-Risueño et al 2010). Estos genes sí se verían alterados por la microgravedad. Que esto suceda bajo un estrés como la desorientación producida por la microgravedad puede deberse a que utilice las raíces secundarias como un ancla, una manera de aumentar su superficie de fijación al sustrato (Coutts 1983). Otra hipótesis propuesta se basa en que haciendo emerger más raíces secundarias para desarrollar más estatolitos intenta poder orientarse al perder su funcionalidad los de la raíz primaria (Kiss et al 2002).

5 Buscando el mecanismo que desregula el crecimiento celular en microgravedad

La medición del tamaño del nucléolo se confirma como un marcador útil para determinar la tasa de producción de rRNA y por ende la cantidad de proteínas que la célula está sintetizando, algo que hace especialmente durante las fases de crecimiento celular. Es decir, el tamaño nucléolar es un indicador directo de crecimiento celular (Boulon et al 2010).

Las muestras crecidas en RPM en condiciones lumínicas RPM-2 (**Figura 28**) también sirvieron para observar el tamaño de los nucléolos de las células meristemáticas de raíz mediante inmunofluorescencia con fibrilarina. Como era de esperar, la microgravedad simulada en RPM redujo el área nucleolar del genotipo Col-0 de manera significativa. Los mutantes relacionados con auxina (*aux*, *eir* y *tir*) tenían un nucléolo más pequeño, por lo que experimentaron una alteración en microgravedad similar a la del genotipo silvestre, algo ya observado cuando se midieron parámetros de proliferación.

En cuanto a los mutantes de nucleolina, sí se observaron curiosas alteraciones. El mutante *nuc-L1* presenta mayores nucléolos y más desorganizados, efecto aparentemente revertido en microgravedad simulada (los nucleolos eran menores y menos desorganizados), mientras que los de *nuc-L2* son normalmente nucléolos más pequeños que el control biológico a 1g y sin embargo mayores si las plántulas crecían en la RPM.

Observar los nucléolos por microscopía electrónica de transmisión se convierte en algo necesario para comprobar *in-situ* el estado de actividad en el que se encuentra el nucléolo, ya que el tamaño nucleolar por si solo no siempre es suficiente para determinar la actividad nucleolar. El control biológico muestra un nucleolo típico de G1 con una pequeña vacuola nucleolar rodeado de centros fibrilares (**Figura 71**). El mutante *nuc-L1* a 1g carece de la proteína nucleolar más abundante que entre otras funciones organiza el nucleolo. Cuando la plántula crece bajo un estrés, como es la ingravidez, comienza a expresarse NUC-L2, que aunque no suple las funciones de L1, ayuda ligeramente a la reorganización nucleolar, de ahí que reaparezca un contorno nucleolar más nítido en microgravedad. En el mutante *nuc-L2* crecido a 1g, el nucleolo está organizado porque sigue presente la forma mayoritaria L1. Mientras que al crecer en microgravedad simulada, la actividad de L1 disminuye ya que se espera a que

aparezca la nucleolina del estrés (L2), de la que el mutante carece, por tanto, la desconfiguración de la estructura y actividad del nucleolo se hace más patente. El tamaño del nucleolo de nuc-L1 es mayor que el del *wild-type* porque aparece disperso por el núcleo, pero no porque realmente sea más activo. Los patrones del tamaño del nucleolo fueron los mismos que se observaron con la microscopía confocal con anticuerpos (**Figura 72**). Si no se aprecian las mismas diferencias significativas es claramente por la cantidad de nucleolos medidos. Mientras en microscopía confocal prácticamente todos los nucleolos meristemáticos son medibles, la cantidad de nucleolos bien fijados para microscopía electrónica se reduce drásticamente.

La cantidad de RNA mensajero o de proteína nucleolina en la célula no es suficiente indicador para conocer si está desregulada la biosíntesis de rDNA, pues fosforilaciones (Tajrishí et al 2011b), glicosilaciones (Carpentier et al 2005a), metilaciones (Pellar & DiMario 2003) o acetilaciones (Das et al 2013) en la nucleolina, controlan positiva o negativamente su localización y las múltiples funciones (Durut & Sáez-Vásquez 2015). En ese sentido, analizamos por *western-blot* la expresión de la proteína L1 con el objetivo de corroborar los datos obtenidos con los genes de crecimiento. El aumento del gen observado en el fenotipo silvestre mostró ciertamente un aumento en la cantidad de proteína final (**Figura 74**). Las bajadas de expresión observadas en los mutantes de nucleolina también se veían reflejadas con una bajada en la expresión de proteína en las muestras crecidas en microgravedad. Este resultado parece indicar, que un aumento en el mRNA no es suficiente para que aumenten los niveles de proteína, bien porque no se sintetice en gran cantidad o bien porque sea inestable (**Tabla 16**).

	WT-Col0	<i>aux</i>	<i>eir</i>	<i>tir</i>	<i>nuc-L1</i>	<i>nuc-L2</i>
Área nucleolar	---	-	---	---	---	+++
qPCR L1	+++	+++	+++	+	---	-
WB L1	+++	+++	---	-	---	-

Tabla 16: Comparación entre el tamaño nucleolar de los mutantes de la colección de auxina y de nucleolina (área nucleolar), con la expresión de nucleolina-L1 a nivel génico (qPCR L1) y a nivel proteico (WB L1). Los símbolos indican el grado de alteración indicando que existe un incremento (+) que puede ser significativo (+++) o un decrecimiento (-) que puede ser significativo (---).

Por tanto, podemos concluir que existe una correlación clara entre expresión génica y síntesis proteica pero no implica que vaya acompañado de un aumento del área nucleolar, probablemente porque el área nucleolar venga determinado por otros factores adicionales. Es un hecho que la nucleolina-L1 es muy importante para la configuración del nucleolo, pero hay otros muchos factores que intervienen tanto en la determinación del área del nucleolo como en el crecimiento celular (Gonzalez-Camacho & Medina 2006). Continuar con estudios de NUC-L2, concretamente cuando dispongamos de las muestras incluidas en SG3, promete darnos muchas más pistas de lo que ocurre realmente con el desacople de crecimiento y proliferación celular en el espacio.

¿Se responde al estrés gravitatorio de forma similar a otros estreses abióticos?

Por último, hemos realizado un experimento de choque térmico para comparar los resultados de estrés en microgravedad con los de un estrés habitual en la tierra, como un aumento súbito de la temperatura, en los mutantes de nucleolina. Las plántulas de 6 días no sobreviven a una exposición de 24 horas a 37°C, por tanto se esperó hasta los 12 días para someterlas a un aumento de 15 grados centígrados por encima de la temperatura habitual de cultivo de *Arabidopsis*.

Los efectos registrados en los mutantes *nuc-L1.1* y *nuc-L2.1* fueron iguales o más débiles que en *nuc-L1.2* o *nuc-L2.2* (Tabla 15). Esto se puede deber a la naturaleza misma de la mutación, ya que las versiones .1 son deleciones parciales mientras que en las .2 la función de la proteína correspondiente está totalmente perdida. Este hecho podría permitir a los mutantes .1 generar niveles de proteína parcialmente activa generando un efecto más laxo que en el caso de los mutantes .2 donde los niveles de proteína son nulos.

Cabría esperar que la construcción suplementada con nucleolina-L2 sobre el mutante L2 (*nuc-L2.2::L2.2*) se comportase como el fenotipo silvestre, pero no fue así. En cuanto a la longitud de la raíz se comportó como el mutante y no marcó una tendencia clara en cuanto a su proliferación celular. Tras el choque térmico, el tamaño del nucleolo se redujo como en el *wild-type*, pero no recuperó su tamaño como si lo hicieron las líneas de Col-0 o el mutante *nuc-L2.2*. Es decir, la suplementación de NUC-L2 no rescata el

fenotipo salvo en la reducción del nucleolo tras el choque térmico. En otros estudios se observó que la reintroducción del gen en el mutante restablecía las funciones de organización de rDNA como en el *wild-type* (Durut et al 2014), pero debido a mecanismos alternativos de conversión génica de rRNA (Schuermann et al 2005) la expresión del gen no alcanzaría los niveles de expresión como en la cepa silvestre.

Con los datos obtenidos de los mutantes *nuc-L1.2* y *nuc-L2.2* crecidos en microgravedad simulada y esos mismos mutantes sometidos a choque térmico, podremos comparar los parámetros fenotípicos medidos (Tabla 17). Bajo el estrés térmico las tasas de proliferación y de crecimiento son prácticamente idénticas. La longitud de la raíz principal es la más desajustada y puede deberse a que la edad de las plántulas era de 6 días en microgravedad y de 13 en shock térmico. Al ser una raíz más adulta, la forma en la que le afecta el estrés sería diferente, y como se trata de un órgano completo los mecanismos que le afectan también serían diferentes. Por eso, centrándonos en el desacople de la proliferación y el crecimiento celular, que sólo afectan al meristemo, se deduce que la defensa de la planta ante el estrés, ya sea térmico o que afecte a la gravedad, sería un modo genérico para ambos.

	WT-Col0		<i>nuc-L1.2</i>		<i>nuc-L2.2</i>	
	RPM	CT	RPM	CT	RPM	CT
Longitud raíz	+++	---	+	+++	-	+++
LCPR	+++	+++	=	---	---	---
Área nucleolar	---	---	---	---	+++	+++

Tabla 17: Resumen de los resultados obtenidos en mutantes de nucleolina crecidos bajo estrés de ingravidez en la RPM y con choque térmico (CT). Se compara la longitud de la raíz, la tasa de proliferación local (LCPR) y el tamaño del nucleolo. Los símbolos indican el grado de alteración indicando que no hay cambios ninguno (=) o existe un incremento (+) que puede ser significativo (+++) o un decrecimiento (-) que puede ser significativo (---).

Las HSP (*Heat Shock Proteins*) son proteínas evolutivamente muy conservadas y se expresan en todas las células de todos los organismos cuando se produce estrés (aumento o disminución de temperatura, cambio presión osmótica o pH, radiación, toxinas...). Además, estas proteínas tienen una función protectora contra radiaciones en plantas, lo que ayudaría a su viabilidad en el espacio (Kozeko et al 2015). Son las principales proteínas encargadas de la termoresistencia ante un aumento de la temperatura y como consecuencia se producen hormonas como ácido abscísico o etileno que modifican el ciclo celular (Kotak et al 2007). Monitorizar el estado de expresión y el nivel de transducción de la familia HSP también ayudaría a conocer mejor todos estos parámetros.

Para mantener una condición interna estable que compense los cambios en el entorno, las plantas tienen la capacidad de ajustar los patrones de crecimiento y proliferación, entre otras formas de compensación, en un proceso conocido como homeostasis (May et al 1998). De esta forma, las plantas se defienden de los estreses abióticos mediante la expresión de genes que les permite adaptarse (Bohnert et al 1995).

Por ejemplo, ante un déficit moderado de estrés hídrico, las hojas llegan a aumentar su número de células y tamaño (Aguirrezabal et al 2006), mientras que si sequía es fuerte, el crecimiento celular se restringe de forma más abrupta, compensándose inicialmente con un aumento de las divisiones celulares y si persiste, con una caída también en el ratio de proliferación como consecuencia de un choque osmótico por falta de agua que mantenga el balance de solutos en las células (Boyer 1982). Estos efectos se han confirmado en especies de interés agrícola (Alves & Setter 2004). La raíz percibe la escasez de agua en primer lugar y se adaptan aumentando su longitud y volumen para maximizar la superficie de absorción de humedad (Wahid et al 2007). Mientras esto sucede, la raíz envía una señal de ácido abscísico (ABA) que desencadena la síntesis de ácido giberelínico (GA) en las hojas, y todo esto detiene la respiración celular, el crecimiento celular de las hojas y prepara el choque osmótico que sufrirán (Skirycz & Inzé 2010). La reducción del número de células se explica por la parada del ciclo celular entre G1/S (Skirycz et al 2010). La cascada de genes regulados por etileno que protege las células del choque osmótico se detiene tras la rehidratación (Fricke et al 2006).

Otro estrés al que las plantas se someten comúnmente es la falta de nutrientes y la escasez de luz. La luz activa la auxina para sintetizar PLETHORA al final de una cascada de genes activados por ARF en las hojas. Esto permite continuar el ciclo celular correctamente y sortear el checkpoint G1/S (Aida et al 2004). Pero la falta de luz, bajo ratio R/RF, favorece la síntesis de etileno en las hojas para salir del ciclo celular (G0) y también moviliza la auxina, para bloquear DELLA e impedir el desarrollo de la raíz (Wolters & Jurgens 2009).

Bajo un estrés térmico, pero en este caso por frío, se ha observado que la expresión del gen de nucleolina se sobreexpresa (Alvarez et al 2003). Este incremento también provoca la disgregación fisiológica del nucléolo y de igual manera una mayor cantidad de nucleolina produce una parálisis en la transcripción de rDNA. Bajo este estrés, esta acción debe de ser una manera de mantener la homeostasis celular.

El deterioro y la explotación de los suelos están provocando una salinización de los suelos fértiles. Un aumento en la concentración de los iones Na^+ y Cl^- pueden desplazar al resto de iones. En este caso, el agua que entra en las células cesa de hacerlo porque la concentración salina es mayor en el xilema (Passioura & Munns 2000). Para restaurar las condiciones de homeostasis, las células pierden turgencia inmediatamente y dejan además de crecer (Yeo et al 1991). El ácido abscísico y la citoquinina son las responsables de la síntesis de aquaporinas para que las raíces puedan absorber mayor cantidad de agua, y así, restablecer una osmolaridad que permita el crecimiento celular y la turgencia de las plantas (Freundl et al 2000, Hose et al 2000).

Cómo se ha descrito en los párrafos precedentes, los estreses desencadenan unas rutas de defensa complejas y estamos lejos de comprender totalmente que proteínas y hormonas intervienen en todas ellas, lo que ocurre en las raíces y en la parte aérea de forma diferencial y si muchas más proteínas interaccionan en rutas que aún desconocemos (Depuydt & Hardtke 2011). Muchas de las respuestas a estrés no son específicas porque las células monitorizan el estrés basándose en el daño macromolecular sin tener en cuenta el tipo de estrés que lo causa (Shinozaki & Yamaguchi 1997, Vinocur & Altman 2005). Asimismo, las células pueden cuantificar el estrés e incluso activar la apoptosis cuando se exceden los límites de tolerancia (Kültz 2005). Y a todo esto hay que sumar que son varios los estreses que la planta puede sufrir de manera simultánea. Unas proteínas ya conocidas y de gran importancia en plantas son las LSM (SM-Like), pequeñas nucleoriboproteínas encargadas del replazo

y splicing de mRNA relacionado con desarrollo en Arabidopsis. Estas proteínas regulan los niveles de expresión de muchos genes incluidos en la germinación de la semilla, desarrollo de la raíz o embriogénesis. La regulación post-traduccional tiene un papel importante en el control de la expresión génica relacionada con el desarrollo de plantas (Perea-Resa et al 2012). Su estudio también ayudaría a buscar puntos de unión de las rutas de defensa de estrés.

En la **Figura 88** se muestra un resumen de los diferentes estreses comentados hasta el momento y su modo de afectar al crecimiento y a la proliferación celular, además de mostrar las principales hormonas que intervienen o las proteínas más destacadas.

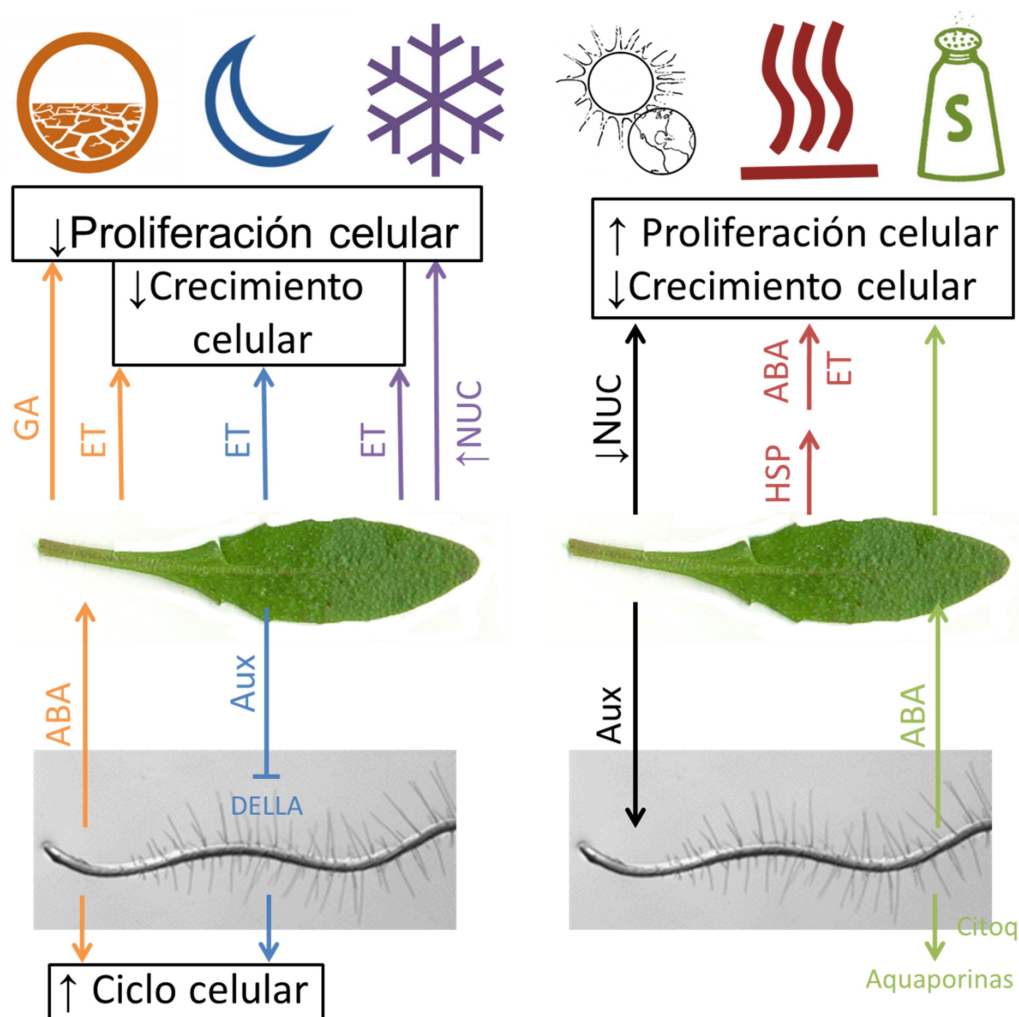


Figura 88: Esquema de cómo afectan diferentes tipos de estrés ambiental a la competencia meristemática. De izquierda a derecha se muestran los efectos provocados por la sequía, la falta de nutrientes (falta de luz), el frío, la microgravedad, el choque térmico y la salinidad además de las hormonas u otras proteínas que intervienen de manera crucial en hojas o raíces sobre el crecimiento y la proliferación celular. ABA: ácido abscísico; Aux: auxina; Citoq: citoquininas; ET: etileno; GA: giberelina; HSP: proteínas de choque térmico. \uparrow : Aumento de la expresión; \downarrow : Disminución de la expresión.

6 Validando las herramientas de microgravedad simulada con datos de microgravedad real (SG)

El elevado coste de un experimento espacial, no sólo económico, si no también logístico, la dificultad de reproducir el experimento en la ISS y las limitaciones de material a emplear hacen necesario la búsqueda de alternativas viables. Por eso, la microgravedad simulada que se consigue en diferentes GBF es una útil herramienta para adelantar resultados, probar materiales etc. Comparar el experimento realizado en la ISS con el realizado en las GBF, es una oportunidad que no se debe perder para que mejoremos nuestro conocimiento sobre la calidad de la simulación de microgravedad en Tierra.

Para conocer mejor el grado de correspondencia entre los resultados obtenidos en microgravedad simulada y real, hemos realizado experimentos muy similares en la RPM en condiciones RPM-1 y en la ISS en condiciones ISS-1. Todas ellas empleaban mutantes de fitocromos, utilizaban el mismo programa lumínico y la misma proporción de nutrientes. Podemos comparar la longitud de la raíz primaria, además de los estudios de expresión génica. Los otros parámetros fenotípicos no pueden ser comparados ya que se necesita material fijado que no estará disponible hasta que se realice SG-3.

Cuando comparamos los resultados entre microgravedad real (ISS) y simulada (RPM), las muestras mutantes de fitocromos y su control biológico mostraban raíces con tendencias similares en los parámetros disponibles, aunque la significación estadística se alcanza con más frecuencia en la ISS (cambios significativos en microgravedad real frente a variaciones en el mismo sentido pero que solo marcan una tendencia). En cuanto a las variaciones en la expresión génica, tanto en el *wild-type* como en el mutante *phyB*, los datos obtenidos en microgravedad simulada y la real correlacionan y lo hacen significativamente (**Tabla 18**). Los resultados de PCRq del mutante *phyA* no permiten confirmar ni desmentir lo anterior, ya que la mayor parte de sus resultados no son significativos.

		Fitocromos	Ler	<i>phyA</i>	<i>phyB</i>
Lon-	gitud	RPM	+	+	+
		ISS	+++	+	+++
Gen:	aux	RPM	+	+++	+++
		ISS	+++	-	+++
Gen:	prol	RPM	+++	=	+++
		ISS	+++	+	+++
Gen:	crec	RPM	+++	+	+++
		ISS	+++	-	+++

Tabla 18: Resumen de los datos obtenidos en experimentos comparables entre microgravedad simulada (RPM) y real (ISS). Longitud de la raíz primaria: (longitud); cambios de expresión de los genes relacionados con auxina en la qPCR (aux); relacionados con proliferación (prol); y relacionados con crecimiento (crec). Los símbolos indican el grado de alteración indicando que: no hay cambios (=), existe una tendencia al aumento (+) que puede ser significativa (+++) o una tendencia al descenso (-) que puede ser significativa (---).

Esto confirma que la RPM, es un brillante simulador de microgravedad para muestras que requieran crecer durante varios días cómo es necesario con las plantas (Manzano et al 2012). Además, el desarrollo tecnológico alcanzado en los últimos años ha permitido situar LED en el interior de los simuladores para ampliar los estudios en microgravedad simulada con diferentes fuentes lumínicas. Aunque la RPM simula la microgravedad, no lo hace con una homología perfecta a la ISS, porque los efectos parecen ser similares pero ligeramente más pronunciados en la ISS. Podría ser que el ambiente de gravedad 1g en el que se encuentra la RPM perturbe al desarrollo de las plantas en microgravedad. Especialmente atendiendo a los datos de transcriptómica, esta herramienta de simulación de ingravidez sería muy útil para adelantar los resultados que se obtendrían en la ISS aunque su efecto fenotípico sea más suave.

En cuanto a los valores absolutos de las medidas de la longitud de la raíz de las plántulas (en milímetros) se puede comprobar que en el espacio son inferiores a esas mismas muestras crecidas en la RPM. Las diferencias en este caso se pueden asociar a las limitaciones propias de la investigación en la ISS, que son, la necesidad de preparar las semillas con meses de antelación y conservarlas en un pequeño compartimento hasta la hidratación que dispara la germinación, la presencia de una cantidad difícilmente controlable de radiación cósmica y una ventilación limitada que conlleva la exposición a una alta concentración de etileno producido por las plantas usadas en experimentos previos (Guisinger & Kiss 1999) que perjudica el crecimiento de las siguientes.

En cuanto al clinostato 2D, como el disponible en Madrid, las condiciones de cultivo tras 6 días de crecimiento llegan a provocar alteraciones en el patrón de crecimiento y desarrollo visibles en el fenotipo desde el mismo momento de la germinación. Sin embargo, esos cambios no se llegan a apreciar a nivel celular. Por ejemplo, en el experimento ROOT, donde crecieron muestras en microgravedad real en oscuridad continua, las plántulas experimentaron un incremento en la proliferación celular a la vez que una disminución del crecimiento celular. Esos efectos no se observaron en las muestras crecidas en el clinostato 2D. De la misma manera, el crecimiento con ciclos de luz durante 4 días y 2 días finales con luz continua roja en la ISS durante el experimento TROPI, provocaba que las plántulas un fototropismo hacía la fuente de luz roja (Sindelar et al 2014). En nuestro caso, no se observó ningún tipo de reorientación del crecimiento de la raíz, es decir, el crecimiento en microgravedad simulada por clinostato 2D no consigue que aparezca el fototropismo hacía una fuente de luz roja. Dado que este comportamiento no es visible en la tierra y si en el espacio, parece evidente que aunque fenotipo agravitrópico si se consigue recrear en el simulador, el fototropismo ancestral solo reaparece en condiciones de simulación de muy alta calidad. Por otro lado, es posible que las alteraciones de las competencias meristemáticas requieran más días de crecimiento o más velocidad de giro (como la utilizada en la RPM) para mostrarse de manera significativa. En ese sentido, podemos apuntar que se produjo un aumento significativo en la proliferación celular de las muestras que crecieron en luz+oscuridad, que se llegó a igualar aplicando luz roja. Estos datos son comparables a los vistos en microgravedad simulada con la RPM.

¿Qué ocurre a las plántulas que crecen en otros niveles de gravedad?

La búsqueda de una fuente de oxígeno basada en plantas fuera de la Tierra tiene dos metas. Una de ellas es conseguir que crezcan y sean viables en ambientes en microgravedad, como la existente en la ISS o la que habría durante cualquier viaje espacial. Y la otra sería que esas plantas también pudieran desarrollarse en planetas o satélites a los que podemos tener la necesidad de enviar una misión tripulada. Los astros con alguna posibilidad de habitabilidad más próximos a nosotros tienen gravedades parciales, entre la microgravedad del viaje espacial y la gravedad de la Tierra, como la Luna, Marte, Io, Europa..., pero estamos empezando a catalogar múltiples planetas potencialmente habitables fuera de nuestro sistema solar que tienen gravedad mayor a la terrestre (hipergravedad) como Gliese 581 o Kepler 22 B (Vogt et al 2012).

Por lo tanto hemos realizado un experimento complementario para evaluar los efectos de la hipergravedad y también del efecto de la simulación de microgravedad en un entorno de hipergravedad. Por eso, se pusieron a crecer plantas con construcciones GFP para detectar la variación en los patrones de auxina (PIN2::GFP), y en marcadores de proliferación celular (CYCB1::GFP) o marcadores de crecimiento celular (NUC-L1::GFP) en RPM, en LCD y en RPM dentro de LDC (ver figura 70).

- En primer lugar, ya se aprecian variaciones entre los dos controles, los crecidos en el incubador de la RPM en posición vertical constante ($1g^{RPM}$), y los crecidos en la LDC sobre el eje de rotación de la centrífuga ($1g^{LDC}$). Aunque es fácil asignar esas variaciones a las vibraciones de la rotación de la LDC, también es posible que se deba a que la temperatura y la humedad no se controlan con la misma precisión en los dos equipos. Esto apoya las críticas de los estudios en microgravedad real, ya que en la ISS también existen vibraciones propias del movimiento orbital que podrían ocasionar alteraciones en el desarrollo de las plantas (Thirsk et al 2009, Tryggvason et al 2001). No obstante, la fuerza centrífuga existente sobre el eje de rotación de la LDC es muy pequeña porque la fuerza $2g$ en las góndolas se alcanzan a relativa baja velocidad. Por lo tanto, las variaciones observadas en la microgravedad dentro de la LDC ($\mu g^{RPM+LDC}$) y

en hipergravedad (2g) con respecto a su control se deben a los efectos en la variación de la gravedad y no al uso de máquina en sí.

- La microgravedad creada por la RPM (μg^{RPM}) es la que más altera todos los procesos biológicos en los tratamientos de gravedad estudiados. De hecho, el patrón de fluorescencia observado tanto en PIN2 como en ciclina B1 y nucleolina crecidos en microgravedad simulada están claramente alterados frente al control 1g. Esto está en clara consonancia con todos los estudios de este trabajo, en el que se encuentran muy alteradas las rutas de transporte de auxina, de crecimiento celular y de proliferación celular. Sin embargo en la microgravedad simulada por RPM dentro de una góndola de la LDC ($\mu\text{g}^{\text{RPM}+\text{LDC}}$), aunque también están alterados, los patrones de expresión aún permiten observar que las construcciones de ciclina y nucleolina marcan zonas semejantes a las de 1g^{LDC} aunque quizá con un patrón más suave o difuso. Por lo tanto, se puede concluir que la gravedad basal desde la que realizamos la simulación afecta a las alteraciones producidas por la microgravedad simulada. Es decir, que aunque nominalmente la fuerza gravitatoria residual sería $<0,005\text{g}$ en ambos casos, no es lo mismo crear microgravedad en un punto rodeado de 1g que de 2g.
- En cuanto a las muestras crecidas al doble de la gravedad normal (2g), los patrones son más parecidos a los de microgravedad en LDC que al control 1g. Esto indica que la pérdida de gravedad altera crecimiento y proliferación, pero también lo hace una mayor fuerza de la gravedad.

7 Futuros experimentos a realizar en microgravedad real y simulada

La obtención de soporte vital en el espacio utilizando plantas es algo todavía lejano. La utilización de formas vegetales para proveer a la ISS (microgravedad) o a colonias en la Luna o en Marte (microgravedad parcial) requiere más investigación. Gracias a nuestros trabajos, se ha comprobado que los simuladores de microgravedad en Tierra como la RPM o el clinostato, facilitarán el número de experimentos y la cantidad de muestras a usar en los experimentos en microgravedad real. Por otra parte, el análisis de las muestras crecidas en la ISS también acelerará la manera de obtener un soporte vital fuera de nuestro planeta. Cabe recordar, que quedan por analizar las muestras crecidas con un ciclo final de luz azul y todas las muestras crecidas en gravedades parciales.

Nuestro laboratorio se encuentra preparando la tercera parte de *Seedling Growth* (SG-3) en la que se fijarán muestras crecidas en el hardware TROPI. La cantidad de información que retornará será enorme y vital para comparar el grado de similitud alcanzado en los dispositivos de clinorotación. Sumado a esto, queda una cuarta parte de *Seedling Growth* (SG-4), pendiente aún de los datos obtenidos de las tres anteriores, y pendiente de definición en sus condiciones y líneas biológicas. Sería de gran utilidad fijar los mutantes de fitocromos en la ISS, repetir alguna de las muestras y correspondientes controles que se vieron afectados por un fallo de hidratación en SG-2, o aumentar el número de muestras en gravedad parcial de SG-3. De esa manera, tendríamos una perspectiva mucho más completa de lo que le ocurre a la competencia meristemática en ausencia de gravedad total o parcial.

Durante ese tiempo se podrían ir realizando diversos experimentos en la RPM como por ejemplo, utilizar los mutantes de auxina y nucleolina en la RPM con un programa lumínico ISS-2. También sería muy importante continuar buscando la manera de hacer crecer las plantas en soporte papel dentro de la RPM. Al comienzo de este trabajo ese era uno de los objetivos y se intentó hacer en la RPM con placas Petri. Aunque las plantas en placa y cassette espacial crecían correctamente en los incubadores de nuestro laboratorio, con esas mismas condiciones en el incubador de la RPM las plantas no germinaban, se deshidrataban o no crecían correctamente, y a día de hoy se desconoce la razón. Esta dificultad en reproducir en tierra los resultados de la estación

espacial no debe empujarnos a dejar de buscar la mejor simulación posible de la ISS en nuestro planeta sino todo lo contrario. El problema de la reproducibilidad de los resultados espaciales es fundamental para el avance de la Biología Espacial y debe ser resultado en el futuro próximo.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los experimentos preliminares y las pruebas realizadas recogidas en la presente memoria han contribuido a hacer posible que el experimento espacial “Seedling Growth” (SG) se esté ejecutando con éxito en la Estación Espacial Internacional (ISS) y esté empezando a producir resultados. En particular, merecen destacarse los siguientes puntos:
 - a. Tanto las condiciones de crecimiento definidas para las líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas en el experimento TROPI como las de preservación y procesamiento de muestras congeladas en órbita han funcionado en las misiones SG1 y SG2.
 - b. Las condiciones de procesamiento y fijación en soluciones basadas en aldehídos en combinación con el ferrofluido como parte del desarrollo del nuevo hardware FixBox, permiten abordar con garantías de éxito los objetivos de preservación ultraestructural de las muestras de la misión SG3, que volará en 2016.
2. Hemos confirmado que el desacople entre el crecimiento y la proliferación celular observado en el meristemo de raíz de *Arabidopsis* observado anteriormente en microgravedad real y oscuridad (experimento ROOT), se reproduce con diferente intensidad en todas las líneas mutantes de fitocromos, mutantes de transporte y sensibilidad a auxina y mutantes de nucleolina expuestas a condiciones de microgravedad real y simulada y diferentes patrones de iluminación.
3. Cuando las plantas germinan y crecen en presencia de luz (ciclo luz blanca/oscuridad) se ha observado que la microgravedad simulada también provoca un aumento de la proliferación y una disminución en el crecimiento celular, si bien este efecto es menos evidente que en oscuridad.
 - a. La estimulación con luz roja por sí sola ocasiona una disminución en la proliferación celular, pero no afecta al crecimiento celular.
 - b. El efecto casi nulo observado en mutantes *phyA* sugiere que la señal lumínica que recoge el fitocromo PHYA está implicada en este efecto.

4. La microgravedad simulada no siempre consigue reproducir con fidelidad los efectos que se observan en muestras expuestas a condiciones ambientales similares en microgravedad real, por ejemplo en la ISS. En concreto, los resultados obtenidos con muestras vegetales en la RPM son muy similares a los del espacio, mientras que el clinostato (1 rpm) requiere más tiempo de exposición para obtener los mismos efectos.
5. Hemos analizado el papel del tráfico de auxinas en el aumento de la tasa de proliferación (LCPR) en microgravedad.
 - a. Ninguno de los mutantes relacionados con auxina estudiados (*aux1.7*, *eir1.1* y *tir1*) presentaron tasas de proliferación, o patrones de expresión génica diferentes al genotipo silvestre. El efecto de la microgravedad sobre la proliferación celular parece estar regulado río abajo en la transducción de la señal gravitatoria.
 - b. El desarrollo de las raíces está afectado en condiciones de microgravedad simulada, observándose el mismo número de raíces secundarias aunque una maduración más rápida de las mismas.
6. La disminución en el crecimiento celular en microgravedad se manifiesta en la actividad nucleolar, y particularmente con el aumento en la expresión del gen de respuesta a estrés de la nucleolina (NUC-L2).
 - a. La aparición de la nucleolina L2 en situaciones de estrés provoca dicha disminución en el tamaño celular, aunque su expresión forzada en el mutante NUC-L1 hace que esas plantas tengan una respuesta favorable en microgravedad, potencialmente interesante para la agricultura espacial.
 - b. Otros estreses abióticos, como el aumento de la temperatura, provocan igualmente un aumento en la tasa de proliferación y una disminución en el crecimiento celular. La interpretación de este resultado es que la planta no ha desarrollado mecanismos específicos para responder al estrés gravitacional y utiliza mecanismos generales de respuesta a otros estreses abióticos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Bibliografía Citada

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, et al. 2006. Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature cell biology* 8: 249-56
- Acton A, Harvey T, Grow MW. 2005. An examination of non-formalin-based fixation methods for *Xenopus* embryos. *Developmental dynamics* 233: 1464-69
- Aguirrezabal L, Bouchier-Combaud S, Radziejowski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier C. 2006. Plasticity to soil water deficit in Arabidopsis thaliana: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant, cell & environment* 29: 2216-27
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, et al. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119: 109-20
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, et al. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301: 653-57
- Alvarez M, Quezada C, Navarro C, Molina A, Bouvet P, et al. 2003. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301: 152-58
- Alves AA, Setter TL. 2004. Response of cassava leaf area expansion to water deficit: cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Annals of botany* 94: 605-13
- Aris J, Blobel G. 1991. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 931-35
- Austin AT, Ballaré CL. 2014. Plant interactions with other organisms: molecules, ecology and evolution. *New Phytologist* 204: 257-60
- Baldwin KL, Strohm AK, Masson PH. 2013. Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *American journal of botany* 100: 126-42
- Balsamo M, Barravecchia I, Mariotti S, Merenda A, De Cesari C, et al. 2014. Molecular and Cellular Characterization of Space Flight Effects on Microvascular Endothelial Cell Function-Preparatory Work for the SFEF Project. *Microgravity Science and Technology* 26: 351-63
- Ballaré CL, Scopel AL, Sánchez RA. 1990. Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* 247: 329-32
- Band LR, Wells DM, Fozard JA, Ghetiu T, French AP, et al. 2014. Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex. *The Plant cell* 26: 862-75
- Barjaktarovic Z, Nordheim A, Lamkemeyer T, Fladerer C, Madlung J, Hampp R. 2007. Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of Arabidopsis cell cultures. *Journal of experimental botany* 58: 4357-63

- Baum G, Long JC, Jenkins GI, Trewavas AJ. 1999. Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca²⁺. *PNAS* 96: 13554-59
- Beeckman T, Burssens S, D. I. 2001. The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* 52: 403-11
- Beemster GT, Baskin TI. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology* 116: 1515-26
- Benfey PN, Scheres B. 2000. Root development. *Current biology* 10: 813-15
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Peer WA, Makam SN, Murphy AS. 2004. Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* 134: 28-31
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, et al. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433: 39-44
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant cell* 7: 1099-111
- Bongers FJ, Evers JB, Anten NP, Pierik R. 2014. From shade avoidance responses to plant performance at vegetation level: using virtual plant modelling as a tool. *New Phytologist* 204: 268-72
- Borst AG, van Loon JJWA. 2009. Technology and Developments for the Random Positioning Machine, RPM. *Microgravity Science and Technology* 21: 287-92
- Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, Rombauts S, Mylle E, et al. 2010. Functional modules in the Arabidopsis core cell cycle binary protein-protein interaction network. *The Plant cell* 22: 1264-80
- Boucheron-Dubuisson E, Manzano A, Matía I, Medina FJ. pendiente. Effect of simulated microgravity on meristematic cell functions in Arabidopsis thaliana roots.
- Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. 2010. The nucleolus under stress. *Molecular cell* 40: 216-27
- Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F. 1998. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *The Journal of biological chemistry* 273: 19025-30
- Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-48
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54
- Breuer C, Ishida T, Sugimoto K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Current opinion in plant biology* 13: 654-60
- Brinckmann E. 1999. Spaceflight opportunities on the ISS for plant research - the ESA perspective. *Adv Space Res* 24: 779-88
- Brinckmann E. 2005. ESA hardware for plant research on the International Space Station. *Advances in Space Research* 36: 1162-66
- Brinckmann E, Brillouet C. 2000. Space plant research on the ISS with the European Modular Cultivation System and with BIOLAB, SAE Technical Paper
- Brown AH. 1992. Centrifuges: evolution of their uses in plant gravitaional biology and new directions for research on the ground and in spaceflight. *ASGSB Bulletin* 5: 43-57
- Buckley N, Johnson-Green P, Piekutowski T, Steinberg M, Clement J, et al. 2012. *ISS Benefits for Humanity*.

- Caizergues-Ferrer M, Belenguer P, Lapeyre B, Amalric F, Wallace M, Olson M. 1987. Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. *Biochemistry* 26: 7876-83
- Calderón Villalobos LI, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, et al. 2012. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature chemical biology* 8: 477-85
- Campana SE, Melendez DT. 41st International Conference on Environmental Systems 2011: 5261.
- Carpentier M, Morelle W, Coddeville B, Pons A, Masson M, et al. 2005a. Nucleolin Undergoes Partial N- and O-Glycosylations in the Extranuclear Cell Compartment†. *Biochemistry* 44: 5804-15
- Carpentier M, Morelle W, Coddeville B, Pons A, Masson M, et al. 2005b. Nucleolin undergoes partial N-and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* 44: 5804-15
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, et al. 2003. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science* 8: 165-71
- Cerdido A, Medina FJ. 1995. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* 103: 10
- Clarke JT, Warnock RC, Donoghue PC. 2011. Establishing a time-scale for plant evolution. *The New phytologist* 192: 266-301
- Clay NK, Nelson T. 2005. The Recessive Epigenetic swellmap Mutation Affects the Expression of Two Step II Splicing Factors Required for the Transcription of the Cell Proliferation Gene STRUWWELPETER and for the Timing of Cell Cycle Arrest in the Arabidopsis Leaf. *The Plant cell* 17: 1994-2008
- Consentino L, Lambert S, Martino C, Jourdan N, Bouchet P-E, et al. 2015. Blue-light dependent reactive oxygen species formation by Arabidopsis cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytologist* 206: 1450-62
- Cooper G. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates.
- Correll MJ, Kiss JZ. 2002. Interactions between gravitropism and phototropism in plants. *J Plant Growth Regul* 21: 89-101
- Coutts M. 1983. Root architecture and tree stability. *Plant and Soil* 71: 171-83
- Chamovitz D. 2012. *What a Plant Knows: A Field Guide to the Senses of Your Garden-and Beyond*. Oneworld Publications.
- Chentao L. 2002a. Blue Light Receptors and Signal Transduction. *The Plant cell*: 207-20
- Chentao L. 2002b. Phototropin Blue Light Receptors and Light-Induced Movement Responses in Plants. *Science Signaling* 2002: 1-3
- Christianen PC. 2010. Tuneable gravity using strong gradient magnetic fields. *Elgra news letter* 7: 9-12
- Darwin C, Darwin F. 1880. *The power of movement in plants*. John Murray.
- Das S, Cong R, Shandilya J, Senapati P, Moindrot B, et al. 2013. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS Letters* 587: 417-24
- Daya-Makin M, Sanghera JS, Mogentale TL, Lipp M, Parchomchuk J, et al. 1994. Activation of a tumor-associated protein kinase and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Research* 54: 2262-68
- De Parolis MN, Crippa G, Chegancas J, Olivier F, Guichard J. 2006. MELFI ready for science-ESA's-80° C freezer begins work in space. *ESA bulletin* 128: 26-31

- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frei dit Frey N, Laplaze L, et al. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134: 681-90
- de Wit M, Spoel SH, Sanchez-Perez GF, Gommers CM, Pieterse CM, et al. 2013. Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75: 90-103
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, et al. 2007. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* 17: 678-82
- Depuydt S, Hardtke CS. 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* 21: R365-73
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, et al. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry* 344: 141-43
- Driss-Ecole D, Lefranc A, Perbal G. 2003. A polarized cell: the root statocyte. *Physiologia plantarum* 118: 305-12
- Driss-Ecole D, Legue V, Carnero-Diaz E, Perbal G. 2008. Gravisensitivity and automorphogenesis of lentil seedling roots grown on board the International Space Station. *Physiologia plantarum* 134: 191-201
- Durut N, Abou-Ellail M, Pontvianne F, Das S, Kojima H, et al. 2014. A duplicated nucleolin gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*. *The Plant cell*: 1-15
- Durut N, Sáez-Vásquez J. 2015. Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription. *Gene* 556: 7-12
- Edwards K, Logan J, Saunders N. 2004. *Real-time PCR: an essential guide*. Horizon Bioscience.
- Eshel A, Beeckman T. 2013. *Plant roots: the halfhidden* pp. 848. CRC Press.
- Espunya M, Combetter B, Dot J, Chaubet-Gigot N, Martínez M. 1999. Cell-cycle modulation of CK2 activity in Tobacco BY-2 cells. *The plant Journal* 19: 655-66
- Faust M, Schuster N, Montemar M. 1999. Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *Federation of European Biochemical Societies* 462: 51-56
- Firn RD, Wagstaff C, Digby J. 2000. The use of mutants to probe models of gravitropism. *Journal of experimental botany* 53: 1323-40
- Folta KM, Lieg EJ, Durham T, Spalding EP. 2003. Primary inhibition of hypocotyl growth and phototropism depend differently on phototropin-mediated increases in cytoplasmic calcium induced by blue light. *Plant Physiol* 133: 1464-70
- Fossum KR, Kittang A-I, Iversen T-H, Brinckmann E, Schiller P. 2005. Testing the European Modular Cultivation System (EMCS) for ISS plant and cell research, SAE Technical Paper
- Franklin KA, Allen T, Whitlam GC. 2007. Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50: 108-17
- Franklin KA, Larner VS, Whitlam GC. 2005. The signal transducing photoreceptors of plants. *The International journal of developmental biology* 49: 653-64
- Franklin KA, Quail PH. 2010. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of experimental botany* 61: 11-24
- Freundl E, Steudle E, Hartung W. 2000. Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* 210: 222-31

- Fricke W, Akhyyarova G, Wei W, Alexandersson E, Miller A, et al. 2006. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *Journal of experimental botany* 57: 1079-95
- Friml J. 2003. Auxin Transport - shaping the plant. *Current opinion in plant biology* 6: 7-12
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayaydin F, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science* 220: 1049-51
- George T. 2000. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature cell biology* 2: 71-72
- Ghisolfi L, Kharrat A, Joseph G, Amalric F, Arard M. 1992. Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *European Journal of Biochemistry* 209: 541-48
- Gilroy S. 2008. Plant tropisms. *Curr Biol* 18: 275-77
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 761-72
- González-Camacho F, Medina F. 2005. The nucleolar structure and nucleolar proteins as indicators of cell proliferation events in plants. *J. Appl. Biomed* 3: 167-74
- Gonzalez-Camacho F, Medina FJ. 2004. Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics* 4: 407-17
- Gonzalez-Camacho F, Medina FJ. 2006. The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells. *Histochemistry and cell biology* 125: 139-53
- Goyal A, Szarzynska B, Fankhauser C. 2013. Phototropism: at the crossroads of light-signaling pathways. *Trends in Plant Science* 18: 393-401
- Guisinguer MM, Kiss JZ. 1999. The influence of microgravity and spaceflight on columella cell ultrastructure in starch-deficiente mutant of Arabidopsis. *American journal of botany* 86: 1357-66
- Haga K, Hayashi K, Sakai T. 2014. PINOID AGC kinases are necessary for phytochrome-mediated enhancement of hypocotyl phototropism in Arabidopsis. *Plant Physiol* 166: 1535-345
- Hangarter RP. 1997. Gravity, light and plant form. *Plant, cell & environment* 20: 796-800
- Heidstra R, Sabatini S. 2014. Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 301-12
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schafer E. 2002. Phytochrome E Controls Light-Induced Germination of Arabidopsis. *Plant Physiology* 128: 194-200
- Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen PC, et al. 2013a. Ground-Based Facilities for Simulation of Microgravity: Organism-Specific Recommendations for Their Use, and Recommended Terminology. *Astrobiology* 13: 1-17
- Herranz R, Larkin OJ, Dijkstra CE, Hill RJ, Anthony P, et al. 2012. Microgravity simulation by diamagnetic levitation: effects of a strong gradient magnetic field on the transcriptional profile of Drosophila melanogaster. *BMC genomics* 13: 1-13
- Herranz R, Manzano AI, van Loon JJ, Christianen PC, Medina FJ. 2013b. Proteomic signature of Arabidopsis cell cultures exposed to magnetically induced hyper- and microgravity environments. *Astrobiology* 13: 217-24
- Herranz R, Medina FJ. 2014. Cell proliferation and plant development under novel altered gravity environments. *Plant Biol (Stuttg)* 16 23-30

- Herranz R, Valbuena M, Manzano A, Y Kamal K, Medina FJ. 2015. Use of Microgravity Simulators for Plant Biological Studies In *Plant Gravitropism: Methods and Protocols*, ed. EB Blancaflor, pp. 239-54: Springer
- Hill R. 2010. Stable diamagnetic levitation of water droplets and biological organisms. *Elgra news letter* 7: 12-15
- Hirschi A, Cecchini M, Steinhardt RC, Schamber MR, Dick FA, Rubin SM. 2010. An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nature structural & molecular biology* 17: 1051-57
- Hoang N, Bouly JP, Ahmad M. 2008. Evidence of a light-sensing role for folate in Arabidopsis cryptochrome blue-light receptors. *Molecular plant* 1: 68-74
- Hofmann NR. 2009. Opposites attract: some phytochromes do not form homodimers. *The Plant cell* 21: 698-99
- Hohm T, Preuten T, Fankhauser C. 2013. Phototropism: translating light into directional growth. *American journal of botany* 100: 47-59
- Hose E, Steudle E, Hartung W. 2000. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta* 211: 874-82
- Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M. 1992. Changes in plant growth processes under microgravity conditions simulated by a three-dimensional clinostat. *The Botanical Magazine* 105: 53-70
- Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M, Buchen B. 1997. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* 203: 187-97
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279-84
- Huijser R. 2000. Desktop RPM: new small size microgravity simulator for the bioscience laboratory. *Fokker Space Magazine* R: 1-17
- Iino M. 1995. Gravitropism and Phototropism of Maize Coleoptiles: Evaluation of the Cholodny-Went Theory Through Effects of Auxin Application and Decapitation. *Plant and Cell Physiology* 36: 361-67
- Jaillais Y, Chory J. 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & molecular biology* 17: 642-5
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *the EMBO journal* 6: 3901-07
- Jones VA, Dolan L. 2012. The evolution of root hairs and rhizoids. *Annals of botany* 110: 205-12
- Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, et al. 2000. CDK-related protein kinases in plants In *The Plant Cell Cycle*, pp. 63-76: Springer
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C. 2010. Light-Regulated Plant Growth and Development. *Current topics in developmental biology* 91: 29-66
- Kellogg DR. 2003. Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *Journal of Cell Science* 116: 4883-90
- Kiss JZ. 2007. Where's the water? Hydrotropism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 4247-48
- Kiss JZ, Aanes G, Schiefloe M, Coelho LHF, Millar KDL, Edelmann RE. 2014. Changes in operational procedures to improve spaceflight experiments in plant biology in the European Modular Cultivation System. *Advances in Space Research* 53: 818-27
- Kiss JZ, Edelmann RE, Wood PC. 1999. Gravitropism of hypototyls of wild type and starch-deficient Arabidopsis seedlings in space flight studies. 209: 96-103

- Kiss JZ, Kumar P, Bowman RN, Steele MK, Eodice MT, et al. 2006. Biocompatibility studies in preparation for a spaceflight experiment on plant tropisms (TROPI). *Advances in Space Research* 39: 1154-60
- Kiss JZ, Kumar P, Millar K, Edelmann R, Correll M. 2009. Operations of a spaceflight experiment to investigate plant tropisms. *Advances in Space Research* 44: 879-86
- Kiss JZ, Millar KD, Edelmann RE. 2012. Phototropism of *Arabidopsis thaliana* in microgravity and fractional gravity on the International Space Station. *Planta* 236: 635-45
- Kiss JZ, Millar KDL, Kumar P, Edelmann RE, Correll MJ. 2011. Improvements in the re-flight of spaceflight experiments on plant tropisms. *Advances in Space Research* 47: 545-52
- Kiss JZ, Miller KM, Ogden LA, Roth KK. 2002. Phototropism and gravitropism in lateral roots of *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 43: 35-43
- Kiss JZ, Mullen JL, Correll MJ, Hangarter RP. 2003. Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol* 131: 1411-17
- Kittang AI, Iversen TH, Fossum KR, Mazars C, Carnero-Diaz E, et al. 2014. Exploration of plant growth and development using the European Modular Cultivation System facility on the International Space Station. *Plant Biology* 16: 528-38
- Kliebenstein D, Pedersen D, Barker B, Mitchell-Olds T. 2002. Comparative Analysis of Quantitative Trait Loci Controlling Glucosinolates, Myrosinase and Insect Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161: 325-32
- Komaki S, Sugimoto K. 2012. Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant & cell physiology* 53: 953-64
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology* 10: 310-6
- Kozeko L, Talalaiev O, Neimash V, Povarchuk V. 2015. A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds. *Life Sciences in Space Research* 6: 51-58
- Krek W, Maridor G, Nigg EA. 1992. Casein Kinase II Is a predominantly nuclear enzyme. *The Journal of Cell Biology* 116: 43-55
- Kültz D. 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology* 67: 225-57
- Landesman-Bollag E, Romieu-Mourez R, Song DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, Seldin DC. 2001. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 20: 3247-57
- Lapeyre B, Amalric F, Ghaffari S, Rao S, Dumber T, Olson M. 1986. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *Journal of Biological Chemistry* 261: 9167-73
- Laurenzio L, Wysocka-Diller, J., Malamy J, Pysh L, Helariutta Y, et al. 1996. The scarecrow gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-34
- Lebrin F, Chamvaz E, Bianchini L. 2001. A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit alpha. *Oncogene* 20: 2010-22
- Lechertier T, Grob A, Hernandez-Verdun D, Roussel P. 2009. Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Experimental Cell Research* 315: 928-42

- Legué V, Yu F, Driss-Ecole D, Perbal G. 1996. Effects os gravitropic stress on the developptmen of the primary root of lentil seedlings grown in space. *Journal of Biotechnology* 47: 129-35
- Leitinger N, Wesierska-Gadek J. 1993. ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells. *Journal of cellular biochemistry* 52: 153-58
- Leitz G, Kang BH, Schoenwaelder ME, Staehelin LA. 2009. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing Arabidopsis columella cells. *The Plant cell* 21: 843-60
- Lempiainen H, Shore D. 2009. Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21: 855-63
- Lewis DR, Miller ND, Splitt BL, Wu G, Spalding EP. 2007. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporter genes. *The Plant cell* 19: 1838-50
- Leyser O. 1999. Plant hormones: Ins and outs of auxin transport. *Current Biology* 9: 8-10
- Liscum E, Reed JW. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development In *Auxin Molecular Biology*, ed. C Perrot-Rechenmann, G Hagen, pp. 387-400: Springer Netherlands
- Litchfield DW. 2003. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369: 1-15
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, et al. 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *The Plant cell* 17: 1090-104
- Lopez D, Tocquard K, J.S. V, Legué V, Roeckel-Drevet P. 2014. Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-6
- Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR. 1998. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 12: 2175-87
- Malamy JE, Benfey PN. 1997a. Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends in plant sciences* 2: 390-96
- Malamy JE, Benfey PN. 1997b. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* 124: 33-44
- Manzano A. 2011. *Cambios funcionales en células proliferantes de Arabidopsis thaliana crecidas en ambientes de microgravedad alterada*. Universidad Complutense de Madrid
- Manzano A, Herranz R, Van Loon J, Medina FJ. 2012. Cell growth and cell proliferation decoupling under hypergravity environments induced by centrifugation. *Microgravity Sci Technol* 24: 373-81
- Manzano AI, Larkin OJ, Dijkstra CE, Anthony P, Davey MR, et al. 2013. Meristematic cell proliferation and ribosome biogenesis are decoupled in diamagnetically levitated Arabidopsis seedlings. *BMC Plant Biology* 13: 124-38
- Manzano AI, Matía I, González-Camacho F, Carnero-Díaz E, van Loon JJWA, et al. 2008. Germination of Arabidopsis Seed in Space and in Simulated Microgravity: Alterations in Root Cell Growth and Proliferation. *Microgravity Science and Technology* 21: 293-97
- Marhavy P, Vanstraelen M, De Rybel B, Zhaojun D, Bennett MJ, et al. 2013. Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *the EMBO Journal* 32: 149-58
- Marques-Bueno MM, Moreno-Romero J, Abas L, De Michele R, Martinez MC. 2011. A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* 67: 169-80

- Matía I, Gonzalez-Camacho F, Herranz R, Kiss JZ, Gasset G, et al. 2010. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *J Plant Physiol* 167: 184-93
- Matía I, González-Camacho F, Marco R, Kiss J, Gasset G, Medina F. 2005. Nucleolar structure and proliferation activity of Arabidopsis root cells from seedlings germinated on the International Space Station. *Advances in Space Research* 36: 1244-53
- Matía I, González-Camacho F, Marco R, Kiss JZ, Gasset G, et al. 2007. The “Root” experiment of the “Cervantes” Spanish Soyuz Mission: cell proliferation and nucleolar activity alterations in Arabidopsis roots germinated in real or simulated microgravity. *Microgravity Science and Technology*: 128-32
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, van Montagu M, Inzé D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of experimental botany* 48: 649-67
- Mazars C, Briere C, Grat S, Pichereaux C, Rossignol M, et al. 2014a. Microgravity induces changes in microsome-associated proteins of Arabidopsis seedlings grown on board the international space station. *PLoS one* 9: 1-18
- Mazars C, Brière C, Grat S, Pichereaux C, Rossignol M, et al. 2014b. Microsome-associated proteome modifications of Arabidopsis seedlings grown on board the International Space Station reveal the possible effect on plants of space stresses other than microgravity. *Plant Signaling & Behavior* 9: 1-12
- McCully M. 1995. How do real roots work? *Plant Physiol* 109: 1-6
- Medina F, Cerdido A, de Cárcer G. 2000. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *European journal of histochemistry* 44: 117-31
- Medina F, González-Camacho F, Manzano A, Manrique A, Herranz R. 2010. Nucleolin, a major conserved multifunctional nucleolar phosphoprotein of proliferating cells. *Journal of Applied Biomedicine* 8: 141-50
- Medina FJ, Herranz R. 2010. Microgravity environment uncouples cell growth and cell proliferation in root meristematic cells: the mediator role of auxin. *Plant Signal Behav* 5: 176-79
- Meggio F, Pinna LA. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *the FASEB Journal* 17: 349-68
- Meinke D, Koornneef M. 1997. Community standards for Arabidopsis genetics. *The Plant Journal* 12: 247-53
- Migliaccio F, Fortunati A, Tasonne P. 2009. Arabidopsis root growth movements and their symmetry. *Plant Signal Behavior* 4: 183-90
- Millar KD, Kumar P, Correll MJ, Mullen JL, Hangarter RP, et al. 2009. A novel phototropic response to red light is revealed in microgravity. *The New phytologist* 186: 648-56
- Mizukami Y. 2001. A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Current opinion in plant biology* 4: 533-39
- Molas ML, Kiss JZ, Correll MJ. 2006. Gene profiling of the red light signalling pathways in roots. *Journal of experimental botany* 57: 3217-29
- Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S. 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65: 309-18
- Moore I. 2002. Gravitropism: lateral thinking in auxin transport. *Current biology : CB* 12: 452-54
- Moreno-Risueño MA, Benfey PN. 2014. Time-based patterning in development. *Transcription* 2: 124-29

- Moreno-Risueño MA, Van Norman JM, Benfey PN. 2012. Transcriptional switches direct plant organ formation and patterning. *Current topics in developmental biology* 98: 229-57
- Moreno-Risueño MA, Van Norman JM, Moreno A, Zhang J, Ahnert SE, Benfey PN. 2010. Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic Arabidopsis Root Branching. *Science* 329: 1306-11
- Morgan DO. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology* 13: 261-91
- Morimoto H, Okamura H, Haneji T. 2002. Interaction of protein phosphatase 1 delta with nucleolin in human osteoblastic cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50: 1187-93
- Moustafa KYK. 2014. *Alteraciones inducidas por cambios gravitatorios en células proliferantes en cultivo de Arabidopsis thaliana*. Universidad Complutense de Madrid. 306 pp.
- Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrasek J, et al. 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135: 3345-54
- Müller A, Guan C, Iweiler LG, Tänzler P, Huijser P, et al. 1998. AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *the EMBO journal* 17: 6903-11
- Munstermann U, Fritz G, Seitz G, Yiping L, Schneider HR, Issinger OG. 1990. Casein kinase I is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *European Journal of Biochemistry* 189: 251-57
- Nagatani A. 2010. Phytochrome: structural basis for its functions. *Current opinion in plant biology* 13: 565-70
- Nagatani A, Reed JW, Chory J. 1993. Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiology* 102: 269-77
- Nagy F, Kircher S, Schäfer E. 2001. Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *Journal of Cell Science* 114: 475-80
- Niefind K, Pütter M, Guerra B, Issinger OG, D. S. 1999. GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nature Structural and Molecular Biology* 6: 1100-03
- Nimeus-Malmstrom E, Koliadi A, Ahlin C, Holmqvist M, Holmberg L, et al. 2010. Cyclin B1 is a prognostic proliferation marker with a high reproducibility in a population-based lymph node negative breast cancer cohort. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127: 961-67
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS. 2003. Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423: 999-1002
- Ochs RL, Lischwe MA, Spohn WH, Busch H. 1985. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the Cell* 54: 123-33
- Olson MOJ, Hingorani K, Szebeni A. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *International Review of cytology* 219: 199-266
- Ottenschlager I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, et al. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2987-91
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. 2010. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: 1-16

- Page V, Blösch RM, Feller U. 2012. Regulation of shoot growth, root development and manganese allocation in wheat (*Triticum aestivum*) genotypes by light intensity. *Plant Growth Regulation* 67: 209-15
- Paradiso R, De Micco V, Buonomo R, Aronne G, Barbieri G, De Pascale S. 2014. Soilless cultivation of soybean for Bioregenerative Life-Support Systems: a literature review and the experience of the MELiSSA Project – Food characterisation Phase I. *Plant Biology* 16: 69-78
- Passioura JB, Munns R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Functional Plant Biology* 27: 941-48
- Pellar GJ, DiMario PJ. 2003. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* 111: 461-69
- Perea-Resa C, Hernandez-Verdeja T, Lopez-Cobollo R, del Mar Castellano M, Salinas J. 2012. LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development. *The Plant cell* 24: 4930-47
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, et al. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14: 399-408
- Perez-Torres CA, Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, et al. 2008. Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in Arabidopsis by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor. *The Plant Cell Online* 20: 3258-72
- Petricka JJ, Nelson TM. 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol* 144: 173-86
- Pickard BG, Thimann KV. 1964. Transport and distribution of auxin during tropistic response. The lateral migration of auxin in phototropism of coleoptiles. *Plant Physiology* 39: 341-50
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M. 1990. The aux1 mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94: 1462-66
- Pierik R, Testerink C. 2014. The art of being flexible: how to escape from shade, salt, and drought. *Plant Physiol* 166: 5-22
- Pih KT, Yi MJ, Liang YS, Shin BJ, Cho MJ, et al. 2000. Molecular cloning and targeting of a fibrillar homolog from Arabidopsis. *Plant Physiol* 123: 51-58
- Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, et al. 2010. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS genetics* 6: 13
- Pontvianne F, Matia I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, et al. 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Molecular biology of the cell* 18: 369-79
- Qian A, Yin D, Yang P, Jia B, Zhang W, Shang P. 2009. Development of a ground-based simulated experimental platform for gravitational biology. *Applied Superconductivity, IEEE Transactions on* 19: 42-46
- Raaf J, Brunstein E, Issinger OG, Niefind K. 2008. The interaction of CK2alpha and CK2beta, the subunits of protein kinase CK2, requires CK2beta in a preformed conformation and is enthalpically driven. *Protein Science* 17: 2180-86
- Raftery M, Hoffman J. 2013. International Space Station as a base camp for exploration beyond low Earth orbit. *Acta Astronautica* 85: 25-32
- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18: 325-34
- Raven JA, Edwards D. 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of experimental botany* 52: 21

- Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J. 1994. Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. *Plant physiology* 104: 1139-49
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J. 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant cell* 5: 147-57
- Reichow SL, Hamma T, Ferre-D'Amare AR, Varani G. 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic acids research* 35: 1452-64
- Rockwell NC, Lagarias JC. 2006. The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *The Plant Cell Online* 18: 4-14
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC. 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual review of plant biology* 57: 837-58
- Roger B, Moisan A, Amalric F, Bouvet P. 2003. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma* 111: 399-407
- Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR. 1995. Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* 139: 1393-409
- Rosso M, G., Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B. 2003. An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant molecular biology* 53: 247-59
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M. 1998. The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes and Development* 12: 198-207
- Saez-Vasquez J, Caparros-Ruiz D, Barneche F, Echeverria M. 2004. A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Molecular and cellular biology* 24: 7284-97
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K. 2000. RPT2: a signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis. *the Plant Cell Online* 12: 225-36
- Sarrouilhe D, Filhol O, Leroy D, Bonello G, Baudry M, et al. 1998. The tight association of protein kinase CK2 with plasma membranes is mediated by a specific domain of its regulatory B-subunit. *Biochimica et Biophysica Acta* 1403: 199-210
- Schneider HR, Reichert GH, OG I. 1986. Enhanced casein kinase II activity during mouse embryogenesis. *European Journal of Biochemistry* 161: 733-38
- Scheres B, Benfey P, Dolan L. 2002. Root development. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 1: 1-18
- Schneider HR, Issinger O-G. 1989. Growth-dependent modulation of casein kinase II and its substrate nucleolin in primary human cell cultures and HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1014: 98-100
- Schuermann D, Molinier J, Fritsch O, Hohn B. 2005. The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends in Genetics* 21: 172-81
- Serin G, Joseph G, Fucher C, Ghisol L, Buche G, et al. 1996. Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* 78: 530-38
- Shacklock PS, Read ND, Trewavas AJ. 1992. Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature* 358: 753-55
- Shimizu-Mitao Y, Kakimoto T. 2014. Auxin sensitivities of all Arabidopsis Aux/IAAs for degradation in the presence of every TIR1/AFB. *Plant & cell physiology* 55: 1450-9

- Shin DH, Cho MH, Kim TL, Yoo J, Kim JI, et al. 2010. A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development. *The Journal of biological chemistry* 285: 32151-59
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M. 1994. The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant physiology* 104: 363-71
- Shinozaki K, Yamaguchi K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response'. *Plant Physiol.* (1 997) 11 5: 327-334 115: 327-34
- Simmons C, Migliaccio F, Masson P, Caspar T, Söll D. 1995. A novel root gravitropism mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting altered auxin physiology. *Physiologia plantarum* 93: 790-98
- Sindelar T, Millar KDL, Kiss JZ. 2014. Red Light Effects on Blue Light-Based Phototropism in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences* 175: 731-40
- Skirycz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, et al. 2010. Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol* 152: 226-44
- Skirycz A, Inzé D. 2010. More from less: plant growth under limited water. *Current opinion in biotechnology* 21: 197-203
- Smith H. 2000. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature* 407: 585-91
- Snaar S, Wiesmeijer K, Jochemsen AG, Tanke HJ, Dirks RW. 2000. Mutational analysis of fibrillarlin and its mobility in living human cells. *The Journal of Cell Biology* 151: 653-62
- Stanek D. 2000. Pre-ribosomal RNA is processed in permeabilised cells at the site of transcription. *European Journal of Cell Biology* 79: 202-07
- Stimpson AJ, Pereira RS, Kiss JZ, Correll MJ. 2009. Extraction and labeling methods for microarrays using small amounts of plant tissue. *Physiologia plantarum* 135: 229-36
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, et al. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development* 15: 2648-53
- Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, et al. 2004. Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *The Plant cell* 16: 3069-83
- Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HM, et al. 2005. Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature cell biology* 7: 1057-65
- Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. 2011a. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & integrative biology* 4: 267-75
- Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. 2011b. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & integrative biology* 4: 267-75
- Taliansky ME, Brown JWS, Rajamäki ML, Valkonen JPT, Kalinina NO. 2010. 5-Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems In *Advances in Virus Research*, ed. K Maramorosch, AJ Shatkin, FA Murphy, pp. 119-58: Academic Press
- Tepperman JM, Hudson ME, Khanna R, Zhu T, Chang SH, et al. 2004. Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *the plant Journal* 38: 1725-739

- Testillano P, González-Melendi P, Ahmaidian P, Risueño M. 1995. The Methylation-Acetylation Method: An Ultrastructural Cytochemistry for Nucleic Acids Compatible with Immunogold Studies. *Structural Biology* 114: 123-39
- Testillano PS, Sanchez-Pina M, Olmedilla A, Ollacarizqueta M, Tandler C, Risueño MC. 1991. A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 39: 1427-38
- Thirsk R, Kuipers A, Mukai C, Williams D. 2009. The space-flight environment: the International Space Station and beyond. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l' Association medicale canadienne* 180: 1216-20
- Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt E. 1993. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72: 443-57
- Toyota M, Gilroy S. 2013. Gravitropism and mechanical signaling in plants. *American journal of botany* 100: 111-25
- Trupkin SA, Legris M, Buchovsky AS, Tolava Rivero MB, Casal JJ. 2014. Phytochrome B Nuclear Bodies Respond to the Low Red to Far-Red Ratio and to the Reduced Irradiance of Canopy Shade in Arabidopsis. *Plant Physiol* 165: 1698-708
- Tryggvason BV, Duval WMB, Smith RW, Rezkallah KS, Varma S, et al. 2001. The vibration environment on the International Space Station: its significance to fluid-based experiments. *Acta Astronautica* 48: 59-70
- Tuazon PT, Traugh JA. 1991. Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 23: 123-64
- Ueda J, Miyamoto K, Yuda T, Hoshino T, Fujii S, et al. 1999. Growth and Development, and Auxin Polar Transport in Higher Plants under Microgravity Conditions in Space: BRIC-AUX on STS-95 Space Experiment. *Journal of plant research* 112: 487-92
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant cell* 9: 1963-71
- Ulrich I, Ulrich W. 1991. High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. *Protoplasma* 165: 212-15
- Valla JJ. 2007. *Morfología de la plantas superiores*. Buenos Aires. 352 pp.
- van Loon JJWA, Krause J, Cunha H, Goncalves J, Almeida H, Schiller P. *Proc of the 'Life In Space For Life On Earth Symposium', Angers, France2008*: 22-27.
- van Loon JWA. 2007. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Advances in Space Research* 39: 1161-65
- Vanstraelen M, Benkova E. 2012. Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology* 28: 463-87
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, et al. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521-31
- Vilk G, Saulnier RB, Pierre RS, Litchfield DW. 1999. Inducible Expression of Protein Kinase CK2 in Mammalian Cells: evidence for functional specification of CK2 isoforms. *The Journal of biological chemistry* 274: 14406-14
- Vinocur B, Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology* 16: 123-32
- Vitha S, Zhao L, Sack FD. 2000. Interaction of root gravitropism and phototropism in Arabidopsis wild-type and starchless mutants. *Plan physiology* 122: 453-62
- Vogt SS, Butler RP, Haghighipour N. 2012. Additional evidence for a Super-Earth in the habitable zone. *Astronomische Nachrichten* 333: 561-75

- Volkman D, Baluska F. 2006. Gravity: one of the driving forces for evolution. *Protoplasma* 229: 143-8
- von Sachs J. 1879. Ueber Ausschliessung der geotropischen und heliotropischen Krümmungen während des Wachstums. *Würzburger Arbeiten* 2: 209-15
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad M. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199-223
- Wang S, Hagen G, Guilfoyle TJ. 2013. ARF-Aux/IAA interactions through domain III/IV are not strictly required for auxin-responsive gene expression. *Plant Signal Behav* 8: 1-6
- Waters BM, Grusak MA. 2008. Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3. *The New phytologist* 177: 389-405
- Wayne R, Staves MP, Leopold AC. 1990. Gravity-dependent polarity of cytoplasmic streaming in *Nitellopsis*. *Protoplasma* 155: 43-57
- Weise S, Kiss J. 1999. Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *International Journal of Plant Sciences* 160: 521-27
- Wolff S, Coelho L, Karoliussen I, Jost A-I. 2014. Effects of the Extraterrestrial Environment on Plants: Recommendations for Future Space Experiments for the MELiSSA Higher Plant Compartment. *Life* 4: 189-204
- Wolters H, Jurgens G. 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature reviews. Genetics* 10: 305-17
- Wolverton C, Paya AM, Toska J. 2011. Root cap angle and gravitropic response rate are uncoupled in the *Arabidopsis* pgm-1 mutant. *Physiologia plantarum* 141: 373-82
- Yeo AR, Lee SS, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ. 1991. Short and long term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany* 42: 881-89
- Yu F, Driss-Ecole D, Rembur J, V. L, G. P. 1999. Effect of microgravity on the cell cycle in the lentil root. *Physiologia plantarum* 105: 171-78
- Zwart SR, Kloeris VL, Perchonok MH, Braby L, S.M. S. 2009. Assessment of Nutrient Stability in Foods from the Space Food System After Long-Duration Spaceflight on the ISS. *Journal of Food Science* 74: 209-17