



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
University of Tuscia – Viterbo

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI
Department of Environmental Sciences

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA - XXII Ciclo
PhD Course in Biological and Biochemical Evolution – XXII Cycle

**RUOLO DELL'AUXINA NELLA RISPOSTA DELLE PIANTE A
CONDIZIONI SPAZIALI SIMULATE: RADIAZIONE
NEUTRONICA E MICROGRAVITÀ**
*Auxin is involved in the plant response to simulated space
conditions: neutron radiation and microgravity*
(BIO/03)

Coordinatore: Prof.ssa Laura Zucconi

Firma.....

Tutor: Prof. Silvano Onofri

Firma.....

Co-Tutor: Dott. Fernando Migliaccio

Firma.....

Dottoranda: Paola Tassone

Firma.....

Tabella abbreviazioni

ACC	Acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico
ARF	Fattore di risposta all'auxina
ASI	Agenzia Spaziale Internazionale
AuxRE	Elementi di risposta all'auxina
Biolab	Laboratorio compatto composto high-tech, a bordo del laboratorio spaziale europeo Columbus.
CME	Esplosioni di massa della corona solare
Col	Piante wilde-type ecotipo Colombia
ER	Reticolo Endoplasmatico
ERB	Radiazioni della fascia terrestre
ESA	Agenzia Spaziale Europea
FNG	Generatore di neutroni di Frascati
GCR	Raggi Cosmici Galattici
GUS	β -glucuronidasi
Gy	Gray (unità di dose assorbita)
HZE	Componente dei raggi cosmici galattici, composta da elementi di nuclei pesanti ad alta energia (E) ad alto numero atomico (Z)
IAA	Acido 3-indolacetico (auxina)

ISS	Stazione Spaziale Orbitante
LEO	Orbita Terrestre Bassa
Ler	Piante wilde-type ecotipo Landsberg
LET	Trasferimento Lineare di energia
MIR	Stazione Spaziale Russa
NAA	Acido naftalenacetico
NASA	Amministrazione Nazionale dell'Aeronautica e dello Spazio
NPA	Acido naftilftalamico
PI	Ioduro di Propidio
PSII	Fotosistema II
qPCR	Razione a catena della polimerasi di tipo quantitativo
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
RPM	Random positioning machine
SOD	Superossido dismutasi
SpaceLab	Laboratorio scientifico da usare a bordo dello Shuttle in volo
SPE	Eventi di Particelle Solari
STS	Sistema di Trasporto Spaziale (Space Shuttle)
STS	Missioni con lo Space Shuttle
Sv	Sievert (unità di dose equivalente)
TBARS	Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico
TIBA	Acido 2,3,5-tri-iodobenzoico
UV	Raggi Ultravioletti
Ws	Piante wilde-type ecotipo Wassilewskja

INDICE

Tabella delle abbreviazioni.....	III
Indice.....	V

PRIMA PARTE.....	1
------------------	---

I	Nuove risorse per la vita nello spazio: le piante.....	3
1.1	Il contributo delle piante nello stabilire condizioni di vita nello spazio.....	4
1.2	Effetto delle condizioni ambientali spaziali sulle piante e su altri organismi viventi.....	6
II	Condizioni ambientali spaziali simulate: radiazioni neutroniche e microgravità.....	9
2.1	Le componenti della radiazione spaziale.....	10
2.1.1	<i>I neutroni.....</i>	<i>12</i>
2.1.2	<i>Dosimetria delle radiazioni assorbite durante le missioni spaziali.....</i>	<i>13</i>
2.1.3	<i>Danni causati dalle radiazioni nei diversi stadi di organizzazione della materia vivente.....</i>	<i>17</i>
2.1.4	<i>Effetto delle radiazioni sulle piante.....</i>	<i>18</i>
2.2	Microgravità.....	20

2.3	Movimenti delle piante.....	22
2.3.1	<i>Gravitropismo.....</i>	23
2.3.2	<i>Trasporto dell'auxina e gravità.....</i>	26
2.4	Auxina: il suo coinvolgimento nella senescenza.....	30
2.5	Gravitropismo e ricerche spaziali.....	31
III	Scopo del lavoro.....	33
IV	Materiale e Metodi.....	35
4.1	Materiale vegetale e condizioni di crescita.....	36
4.2	Estrazione di RNA totale da pianta ad analisi RT-PCR.....	37
4.3	Analisi quantitativa di <i>real time</i> qPCR.....	38
4.4	Set-up sperimentale per il trattamento con i neutroni.....	40
4.4.1	<i>Misurazione della fluorescenza della clorofilla e misura della perossidazione lipidica di membrana (saggio TBARS).....</i>	41
4.5	Set-up sperimentale per la microgravità simulata.....	43
4.5.1	<i>Analisi dei livelli di β-tubulina mediante Western-blot.....</i>	44
4.5.2	<i>Saggio di vitalità cellulare in piante sottoposte a microgravità.....</i>	44
4.6	Isolamento e caratterizzazione di un nuovo mutante parzialmente agravitropico: <i>rha1</i>.....	46
4.6.1	<i>Materiale vegetale e condizioni di crescita per gli esperimenti di caratterizzazione del mutante <i>rha1</i>.....</i>	46
4.6.2	<i>Selezione dei mtanti.....</i>	46
4.6.3	<i>Caratterizzazione dei mutanti.....</i>	47
4.6.4	<i>Determinazione dello slanting e del gravi tropismo.....</i>	48
4.6.5	<i>Crescita delle piante su diversi substrati e analisi della risposta.....</i>	48
4.6.6	<i>Clonaggio e sequenziamento del gene <i>RHA1</i> mediante TAIL-PCR.....</i>	49
4.6.7	<i>Estrazione dell'RNA totale e analisi RT-PCR.....</i>	49
4.6.8	<i>Estrazione DNA genomico.....</i>	51
4.6.9	<i>Complementazione del mutante <i>rha1</i>.....</i>	51
4.6.10	<i>Saggio istochimico GUS.....</i>	52
SECONDA PARTE.....		55

V	Simulazione dell'ambiente spaziale: effetto della radiazione neutronica.....	57
5.1	Effetto rapido dell'esposizione alla radiazione neutronica di piante di <i>Arabidopsis thaliana</i> wild-type e mutate nel trasporto auxinico.....	60
5.1.1	<i>Effetto dei neutroni sui geni coinvolti nel metabolismo dell'auxina.....</i>	<i>60</i>
5.1.2	<i>Risposta dei geni coinvolti nella senescenza e nella difesa contro stress ossidativi.....</i>	<i>62</i>
5.1.3	<i>Controllo dello stato fisiologico e biochimico delle piante dopo trattamento con neutroni.....</i>	<i>63</i>
5.1.4	<i>Recupero a breve termine degli effetti della radiazione neutronica.....</i>	<i>64</i>
5.2	Effetti tardivi dei neutroni.....	66
5.3	Discussione.....	69
VI	Simulazione dell'ambiente spaziale: effetto della microgravità.....	73
6.1	Effetto della microgravità sulle componenti del citoscheletro.....	76
6.1.1	<i>Espressione dei geni che codificano le sub-unità della tubulina.....</i>	<i>76</i>
6.1.2	<i>Regolazione della sintesi della β-tubulina in condizioni di microgravità.....</i>	<i>77</i>
6.2	Risposta dei geni coinvolti nella senescenza e agli stress ossidati.....	79
6.3	L'esposizione alla microgravità simulata causa danni alle radici primarie di <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	82
6.4	Discussione.....	84
VII	Isolamento e caratterizzazione di un nuovo mutante di <i>Arabidopsis thaliana</i> parzialmente agravitropico: <i>rha1</i>	89
7.1	Isolamento del mutante <i>rha1</i> e analisi genetica.....	90
7.2	Caratterizzazione fisiologica di <i>rha1</i>.....	93

7.3	Analisi dell'espressione del gene <i>RHA1</i> in risposta all'auxina.....	97
7.4	Localizzazione dell'attività trascrizionale del gene <i>RHA1</i>.....	99
7.5	Discussione.....	101
VIII	Conclusioni e prospettive future.....	105
	 Letteratura citata.....	 111
	 Ringraziamenti.....	 131

PRIMA PARTE

I

Nuove risorse per la vita nello spazio: le piante

Le piante sono essenziali per la vita sulla Terra e potrebbero diventare indispensabili anche per le future missioni spaziali. Notevoli sono gli interessi della comunità scientifica internazionale rivolti verso la possibilità di poter germinare e crescere le piante a bordo di stazioni spaziali. Infatti, sia l'Agenzia Spaziale Italiana (ASI), sia l'European Space Agency (ESA) che la National Aerospace Administration (NASA), hanno nei loro futuri programmi l'intenzione di realizzare lunghe missioni nello spazio (figura 1.1b). Pertanto, le piante possono rappresentare una parte essenziale per i "sistemi di supporto alla vita" degli astronauti, non solo come una possibile fonte di cibo, ma anche come utile strumento per la depurazione dell'aria, il riciclo dell'acqua ed, attraverso il riciclo di rifiuti umani (CO_2 e H_2O), fornire sostanze nutritive, quali cibo, H_2O , O_2 , (Fertl *et al* 2002; figura 1.1a).

1.1 Il contributo delle delle piante nello stabilire condizioni di vita nello spazio

Il ruolo principale che le piante potrebbero fornire nelle future missioni spaziali è quello di provvedere al sostegno degli astronauti durante le lunghe permanenze su stazioni spaziali, come l'International Space Station (ISS; figura 1.2a). Le piante, infatti, forniscono cibo, ossigeno, materie prime; producono zuccheri primari, grassi, proteine, carboidrati complessi e vitamine.

L'ambiente spaziale ha un particolarmente vasto ed unico insieme di fattori di stress, che possono limitare la normale capacità di crescita di un qualsiasi organismo, comprese le piante (Salisbury, 1991). Negli ultimi decenni gli hardware e i contenitori costruiti per garantire la crescita di materiale biologico nello spazio, per poter effettuare esperimenti in orbita, si sono molto perfezionati (Brinckmann, 2005). Attualmente i progetti spaziali dedicati alla ricerca biologica sono volti a studiare le combinazioni degli stress che caratterizzano questi habitat, quali: microgravità, radiazioni cosmiche, bassa pressione atmosferica, elevata CO₂ ed elevate escursioni termiche. Altrettanto importante è studiare l'effetto delle singole fonti di stress, simulandole in laboratorio, per verificarne l'effetto sui meccanismi di risposta operati dagli organismi viventi.

Attuali stime riportano che, per una missione di circa 3 anni e con un equipaggio di 6 persone, servirebbero 216,000 kg di materiali di consumo. L'80% della fornitura sarebbe rappresentato dall'acqua (10,680 l). Considerando che uno vettore spaziale carico ha una portata massima di 25,000 kg, il trasporto del materiale di consumo richiederebbe 11 voli (Henninger, 2002). Ulteriori valutazioni riportano che le spese di stivaggio e rifornimento della missione variano linearmente con la durata della missione (figura 1.2b). Inoltre, per le missioni con durata inferiore ai 2 anni, i costi associati al supporto della vita, utilizzando un sostegno vitale vegetale, sono effettivamente superiori ai costi di stivaggio e rifornimento. Tuttavia, i costi incrementano tanto più lentamente quanto più aumenta la durata della missione, oppure quando si utilizzano i supporti di "bio-rigenerazione". Di conseguenza, i "sistemi di supporto alla vita", quali le piante ed i microrganismi, diventeranno essenziali per le missioni che superano i 2-3-anni di durata (Ferl *et al.* 2002).

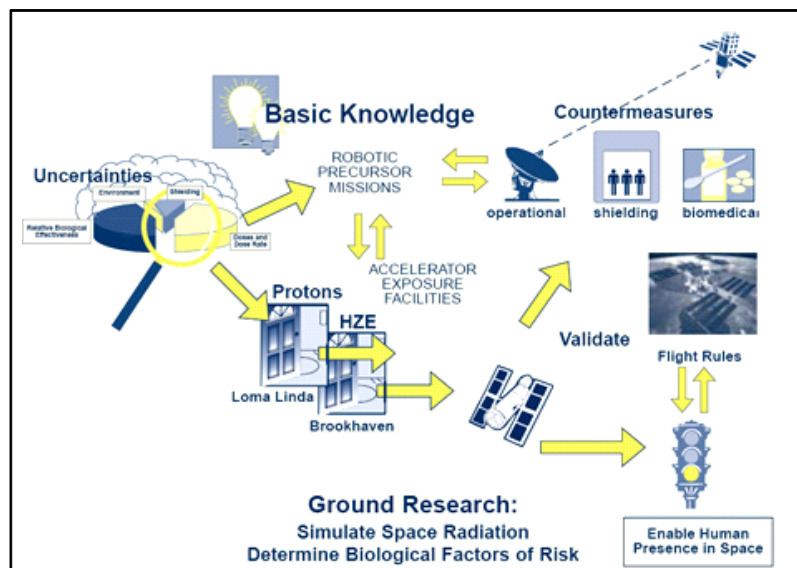
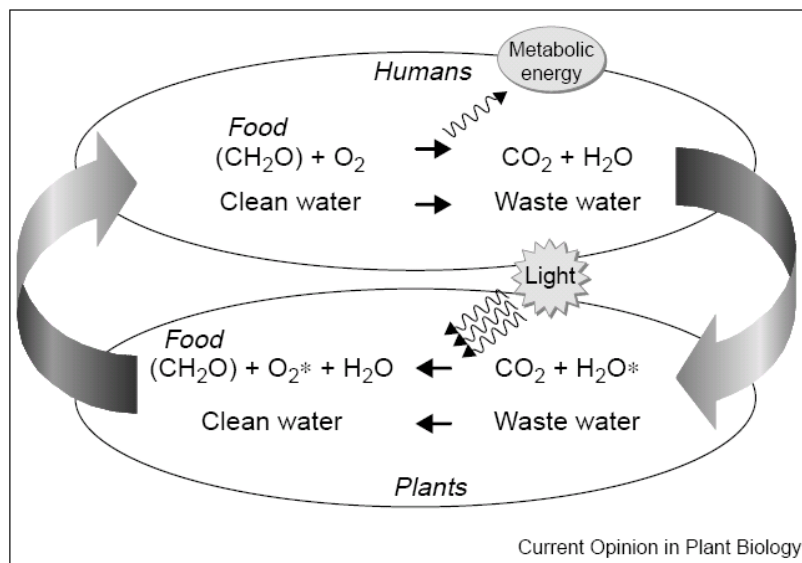


Figura 1.1. a) Rappresentazione schematica della relazione ciclica tra le interazioni pianta-animale. L'asterisco (*) rappresenta molecole di ossigeno associate alla fotolisi dell'acqua (Feri *et al.* 2002). **b)** Percorso a tappe per la realizzazione di un piano di studio volto ad assicurare la presenza umana permanente nello spazio (NASA's Strategic Program Plan for Space Radiation Health Research 1998).

1.2 Effetto delle condizioni spaziali sulle piante e sugli altri organismi viventi

Normalmente le piante presentano una notevole capacità di percezione della gravità, rispondendo a questo stimolo tramite l'invio di segnali ben precisi alle radici ed al fusto. Questo comportamento rientra nei fenomeni noti come tropismi della pianta, cioè movimenti indotti in risposta agli stimoli esterni. In particolare, il movimento in risposta alla gravità è denominato gravitropismo (o geotropismo). Ma come fanno le piante a sapere in quale direzione crescere in condizioni di assenza di gravità? Questo è uno degli interrogativi che ancora affascina gli scienziati e poco è noto sui meccanismi molecolari che ne sono coinvolti. In orbita, le piante sono esposte ad un particolare ambiente in cui la gravità è notevolmente diminuita (microgravità).

Normalmente, le stazioni spaziali orbitano ad altitudini di circa 400 Km dalla superficie terrestre. A causa delle condizioni di assenza di peso, si ha la necessità di gestire il riciclaggio di acqua e di nutrienti in strutture che funzionano in microgravità; ad esempio la gravità presente sulla superficie lunare è un 1/6 di quella terrestre mentre quella di Marte è pari ai 2/5 della gravità terrestre.

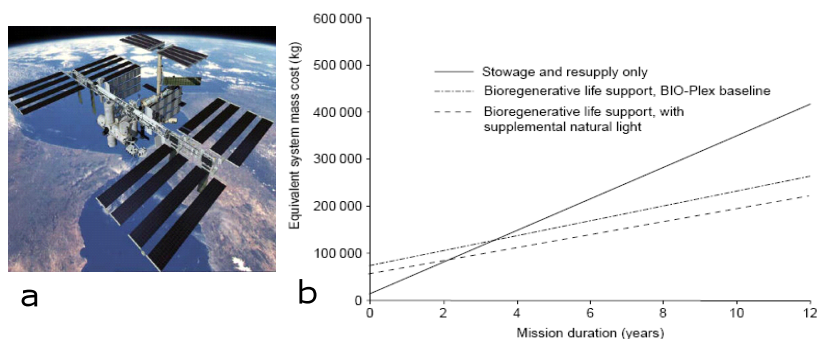


Figura 1.2. a) Stazione Spaziale Internazionale (ISS). **b)** Costo di una missione spaziale espressa in Costo Equivalente del sistema di massa; misura che comprende le spese di spedizione e di lancio del sistema in relazione alla durata della missione (Fertl *et al.* 2002).

In letteratura viene riportato che l'assenza di gravità può influenzare alcune funzioni fisiologiche e biochimiche delle cellule vegetali (Hampp *et al.* 1997, Matia *et al.* 2009). Uno dei dati più importanti è una generale tolleranza degli organismi superiori alla microgravità, anche per periodi prolungati. Le ragioni di questa tolleranza, sono probabilmente da ricercarsi nei meccanismi omeostatici di compensazione e di

adattamento, in grado di ristabilire un nuovo equilibrio in risposta alle mutate condizioni ambientali. Tuttavia, negli astronauti sono state osservate alterazioni indotte nei tessuti muscolare e osseo causate dall'assenza di gravità. Alcune di tali alterazioni si manifestano dopo pochi minuti, come il disorientamento ed il rapido spostamento dei fluidi corporei; altri si manifestano solo dopo una lunga permanenza nello spazio, come l'aumento dell'attivazione dei meccanismi di controllo dell'invecchiamento, la riduzione della massa e della forza muscolare, il decondizionamento cardiovascolare, la demineralizzazione e degradazione della struttura ossea, e l'alterazione dell'adattamento neurosensoriale e neurovestibolare. (Anken, 2006; Bäuerle *et al.* 2003; Hilbig *et al.* 2003). Studi su cellule animali in coltura, condotti in microgravità, mostrano un'alterazione nella proliferazione dei linfociti del melanoma e tumorigenico (Dai *et al.* 2007), o l'osteogenesi del midollo osseo (Taga *et al.* 2006).

Diversi sono gli studi che hanno investigato la crescita delle piante in ambiente spaziale (Dutcher *et al.* 1994; Halstead *et al.* 1997; Musgrave *et al.* 1997; Stankovic, 2001; Ferl *et al.* 2002; De Micco & Aronne 2008). In particolare, le ricerche condotte in questo ultimo decennio hanno focalizzato l'attenzione sugli effetti che tali condizioni hanno su: riproduzione (Musgrave *et al.* 1997); crescita e sviluppo (Krikorian *et al.* 1992; Kordium 1997; Musgrave *et al.* 2000); cambiamento del metabolismo della parete delle cellule vegetali (Braam *et al.* 1997; Levine *et al.* 2001); gravisensibilità (Driss-Ecole *et al.* 2008); circumnutazione delle piante (Johnsson *et al.* 2009; Solheim *et al.* 2009).

Un altro aspetto di una certa rilevanza è dato dalla deposizione di lignina e lo sviluppo vascolare delle piante; due processi evolutivi che caratterizzano la crescita verticale, opponendosi alla gravità terrestre. Molti ricercatori hanno condotto studi sull'effetto delle condizioni spaziali su questi due importanti meccanismi che rendono la cellula turgida e resistente agli stress meccanici. Protoplasti sottoposti a microgravità manifestano una rigenerazione più lenta della parete cellulare (Rasmussen *et al.* 1994), e la biosintesi di lignina sembra essere repressa (Cowels *et al.* 1994; Sato *et al.* 1999). Altri studi evidenziano che, anche in condizioni di microgravità, la biosintesi di lignina e di microfilamenti è sufficientemente attiva per permettere alle piante di mantenere la propria forma (Levine *et al.* 2001; De Micco *et al.* 2006; De Micco & Aronne 2008). Esperimenti effettuati in volo, su semi di girasole e fagiolo, evidenziano modifiche nel normale decorso del ciclo cellulare e della mitosi (Krikorian & O'Conner 1984), presentando una sostanziale

riduzione del numero di divisioni cellulari, con significativi disturbi cariologici, come ad esempio rotture, delezioni e traslocazioni cromosomiche, rispetto a piante di controllo tenute alle stesse condizioni di crescita, ma a terra. Infine, un'altro problema da non sottovalutare, durante le missioni spaziali, è rappresentato dai livelli di radiazioni spaziali di tipo ionizzante che non vengono schermate e che giornalmente sono assorbite a bordo dei vettori spaziali (Benton & Benton 2001; Vanhavere *et al.* 2008). Questo comporta, per l'astronauta, un costante aumento del rischio di malattie degenerative, quali il cancro, con effetto anche ereditario (Yasuda 2009).

II

Condizioni ambientali spaziali simulate: radiazione neutronica e microgravità

Due sono le condizioni che principalmente contraddistinguono l'ambiente spaziale dall'ambiente terrestre: la ridotta, o assente, gravità e le radiazioni. Entrambe contribuiscono ad alterare sia le proprietà dei materiali che il comportamento dei sistemi biologici.

2.1 Le componenti delle radiazioni spaziali

Le radiazioni ad alta energia, che compongono le radiazioni in ambiente spaziale, rappresentano un ragguardevole interesse per poter sviluppare e supportare la vita nello spazio; anche per questo motivo sono oggetto di indagine sia per la radiobiologia che l'esobiologia (o astrobiologia). Tre sono le principali fonti primarie delle radiazioni ionizzanti (figura 2.1) nella Bassa Orbita Terrestre (Low Earth Orbit, LEO), riassunte in:

- Raggi Cosmici Galattici (**Galactic Cosmic Rays, GCR**), composti da particelle cariche provenienti dallo spazio interplanetario;
- Elettroni e protoni energizzati intrappolati nel campo magnetico terrestre che costituiscono le Radiazioni della fascia Terrestre (**Earth's Trapped Radiations Belts, ERB**);
- Eventi di Particelle Solari (**Solar Particle Events, SPE**), composti da elevati flussi di particelle cariche formatosi durante rare, ma intense, tempeste ed Esplosioni di Massa della Corona solare (Crown Mass Explosions, CME).

Quando le particelle che compongono le radiazioni ionizzanti attraversano un vettore spaziale in orbita, si verificano una serie di collisioni nucleari che producono una complessa interazione fra le particelle secondarie cariche e le particelle neutre. Queste ultime, in particolare, rappresentano una componente della radiazione incidente particolarmente difficile da schermare. Le fonti di radiazioni ionizzanti che si trovano nella LEO (tabella. 2.1) e nello spazio interplanetario sono per lo più particelle derivanti da interazioni fra particelle cariche primarie, massa del veicolo spaziale ed il suo contenuto.

In quest'ultimo decennio si sono sviluppati molti metodi per effettuare accurate misure dosimetriche delle radiazioni a bordo dei veicoli spaziali (Benton & Benton 2001; Cougnet *et al.* 2005; Vanhavere *et al.* 2008).

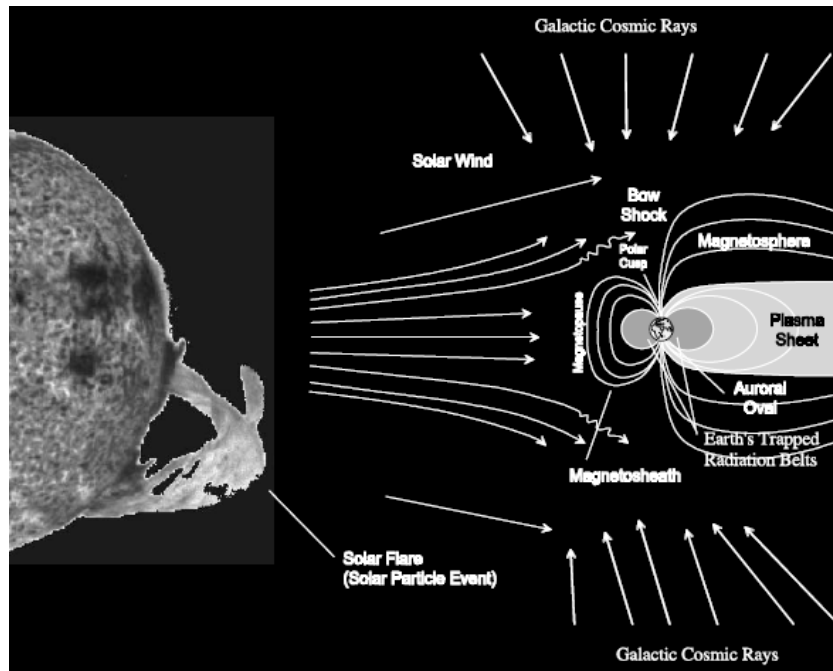


Figura 2.1. Le tre principali fonti di radiazione. Le principali fonti di radiazione spaziale sono i Raggi Cosmici Galattici (GCR), le Radiazioni Intrappolate nei ERB e le particelle provenienti da tempeste solari (SPE). (Benton & Benton 2001)

Queste misure rivelano che le dosi equivalenti dipendono tanto dalla qualità e dal tipo di schermatura (Shurshakov *et al.* 2006) quanto dalla quota, inclinazione e orientamento della sonda rispetto alla Terra, tenendo in considerazione la fase del ciclo Solare (Benton & Benton 2001).

Le particelle cariche che costituiscono i GCR sono formate da elementi con nuclei pesanti ad alta energia (High-Energy, HE) e ad alto numero atomico (denominate particelle HZE). Lo spettro GCR è formato dall'85% di protoni, il 14% di elio, e l'1% di particelle più pesanti (figura 2.2a). Le particelle HZE possiedono un'energia sufficientemente alta da penetrare parecchi centimetri di tessuto o altro materiale. Per questa ragione, anche se il numero di particelle HZE è relativamente basso, esse possiedono un significativo impatto biologico, paragonabile a quello dei protoni (Simpson 1983).

Le Earth's Radiations Bealt (ERB) sono intense fasce di protoni ed elettroni energizzati che circondano la Terra, denominate anche fasce di Van Allen (figura 2.1). Queste particelle sono intrappolate dalle radiazioni del campo geomagnetico terrestre, dove seguono un movimento molto complesso.

La terza fonte di radiazione ionizzante, l'SPE, è data dall'insieme delle particelle energetiche emesse dal sole durante tempeste solari ed esplosioni della corona solare.

Questi flussi includono particelle quali elettroni, protoni e particelle cariche pesanti. L'energia di queste particelle è molto elevata, tuttavia anche se le schermature dei veicoli spaziali sono molto efficaci, una frazione di queste particelle interagisce proprio con i nuclei degli elementi che costituiscono il veicolo, producendo particelle secondarie (figura 2.3, Benton & Benton 2001). Le particelle secondarie prodotte dall'attraversamento del veicolo sono a loro volta protoni, neutroni, e particelle α e γ . Le particelle secondarie sono a loro volta soggette ad ulteriori reazioni nucleari, che, nel caso dei neutroni ad alta energia, sono difficili da schermare, avviando così una cascata di reazioni con elevate probabilità di causare danni biologici.

2.1.1 I neutroni

I neutroni si differenziano dalle altre particelle secondarie per l'assenza di carica elettrica. Le particelle cariche (come i protoni, gli elettroni e le particelle α) perdono energia quando attraversano la materia, a causa delle forze elettromagnetiche. Il neutrone risente tuttavia soltanto marginalmente di queste forze.

L'assenza di carica lo rende non solo difficile da rilevare, ma anche difficile da controllare (Gustafson, 2006). Ecco perché in ambito della dosimetria spaziale la misurazione accurata dei flussi neutronici, e il loro contributo alla dose equivalente (tabella 2.2) durante il volo spaziale, rimane una delle sfide più grandi. Comunque, sono ancora scarse le conoscenze in merito alle conseguenze dell'esposizione degli astronauti ai neutroni. Alcune stime a bordo della Stazione Spaziale Internazionale (ISS) indicano che quando orbita con una inclinazione di 51.6° e un'altitudine di *ca* 450 km, il contributo dei neutroni va dal 30 al 60% della dose totale equivalente per astronauta (Armstrong & Colborn. 1998; Badhwar *et al.* 2001). Il fattore di qualità (tabella 2.2), indice di rischio per unità di dose assorbita, per i neutroni è 4-5 volte superiore rispetto a quello stimato per le particelle cariche (Cucinotta, 1998).

Tabella 2.1 Sorgenti delle radiazione in ambiente spaziale in LEO.

	Classe	Origine	Ambiente	Intensità	Descrizione
Ionizzanti	SPE	naturale	Al di fuori del veicolo, nello spazio o sulla superficie del pianeta	Imprevedibili, ma infrequenti con alta intensità	Prodotti dalla dinamica di eventi solari, come massimo solare
	Particelle intrappolate	naturale	Localizzati al di fuori di veicolo	Costante con moderata intensità	All'interno del campo magnetico terrestre, nelle regioni polari, sulla superficie dei pianeti e nello spazio profondo
	GCR	naturale	Ubiquitari e penetrante in tutto l'universo	Costante con bassa Intensità	Permeano la galassia e si muovono con velocità vicina a quella della luce
Non-ionizzanti	Fonti tecnologiche	artificiale	All'interno del veicolo	Costante, con bassi livelli di intensità	Derivati da apparecchiature artificiali o dispositivi
	UV		Al di fuori e all'interno del veicolo attraversano alcune finestre	Costante, relativamente alti i livelli di intensità	Prodotto dalla corona solare

Fonte: Letlaw J. "Radiation Biology" 1997

2.1.2 Dosimetria delle radiazioni assorbite durante le missioni spaziali

I metodi di dosimetria spaziale si distinguono per l'uso di due differenti rilevatori: passivi o attivi. Entrambi questi strumenti sono costruiti cercando di aumentare la sensibilità in termini di energia, flusso e risoluzione delle particelle. Gran parte dei dati di dosimetria delle radiazioni spaziali, che sono stati acquisiti nel corso degli ultimi decenni, sono riportati in termini di dosaggio o media dell'intensità della dose.

Questi dati indicano anche che le misurazioni effettuate, nello stesso periodo, in posizioni diverse all'interno dello stesso veicolo, cambiano (Benton & Benton 2001). Questa differenza è legata alle difformità delle schermature limitrofe all'ubicazione del dosimetro (Badhwar, 1998). Secondo i risultati dei differenti programmi di ricerca dedicati alla misurazione della dose a bordo delle navicelle, i livelli di radiazione appaiono fortemente contrastanti. (Benton & Benton 2001).

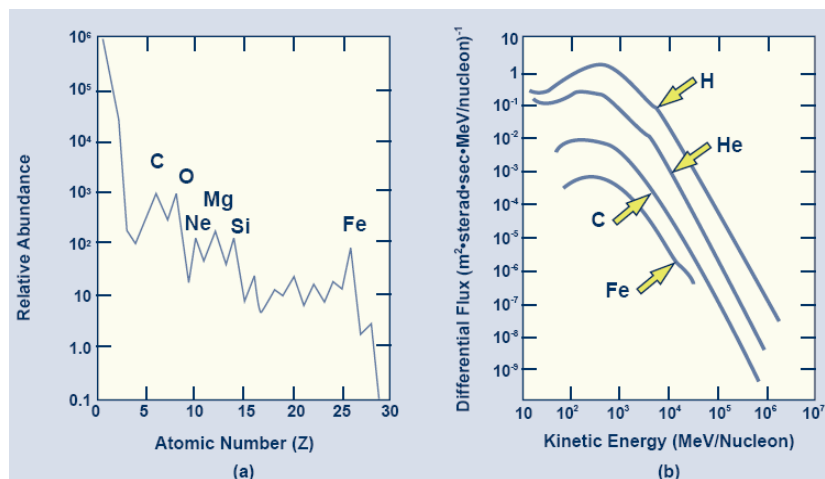


Figura 2.2. Elementi che compongono i raggi cosmici galattici. a) Abbondanza relativa degli elementi dei GCR in funzione del numero atomico; **b)** Spettro di Energia degli elementi che compongono i GCR (Simpson, 1983).

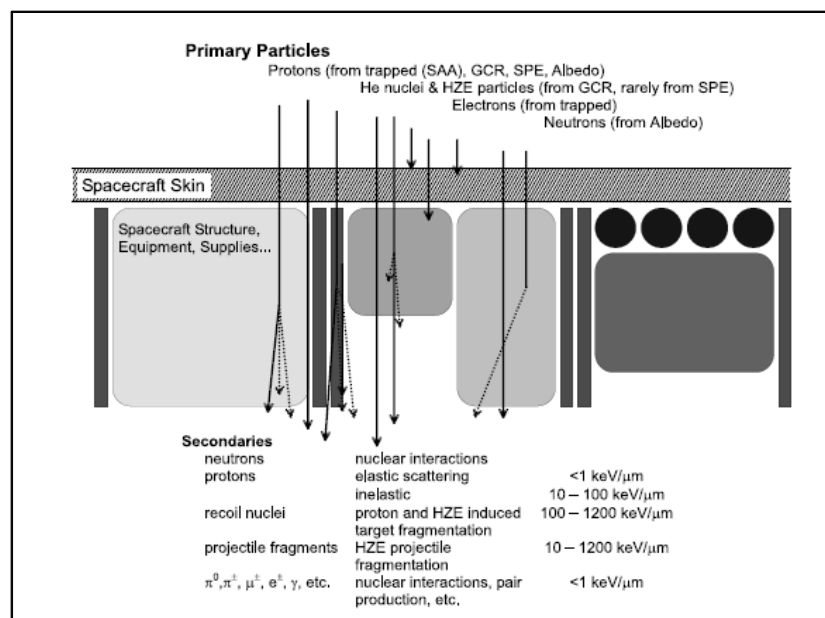


Figura 2.3. Schema delle radiazioni primarie che attraversano la schermatura del veicolo spaziale, con generazione di radiazione secondarie. Le radiazioni secondarie più importanti in termini di protezione sono le radiazioni neutroniche e le radiazioni ad alto LET (Benton & Benton 2001).

Tabella 2.2 Definizioni e unità di misura utilizzate in radioprotezione

	DEFINIZIONE	UNITÀ DI MISURA
Dose Assorbita (D)	Energia media assorbita per unità di massa di qualsiasi materiale	1 Gray (Gy) = 1 J kg ⁻¹ = 100 rad
Fluenza (F)	Numero di particelle incidenti per unità di area (sferica)	
Trasferimento lineare di energia (LET)	Quantità di energia assorbita a livello locale, per unità di lunghezza del percorso, quando una particella carica attraversa i tessuti. Il LET dipende dalla velocità e dalla carica delle particelle ionizzanti. Radiazioni ad alto LET: particelle α , neutroni, protoni Radiazioni a basso LET: Raggi X, γ ed elettroni veloci	keV μm^{-1}
Fattore di qualità (Q)	Fattore di ponderazione per la dose, proporzionale al rischio stimato per unità di dose (diverso per i diversi tipi di radiazioni)	
Dose equivalente (H)	Prodotto fra dose assorbita e fattore qualità Q (o fattore di ponderazione w_R) della radiazione sommato su tutti i tipi di radiazioni presenti nel fascio incidente $H = D \times Q$ ($H = \sum D_R \times w_R$) - La stessa dose ha diverse conseguenze biologiche in diversi tessuti per i diversi tipi di radiazioni - Scala di rischio comuni per le diverse dosi ($Q = 1$ per i raggi X)	1 Sv = 100 rem
Dose efficace (E)	Prodotto fra dose equivalente e fattore di ponderazione del tessuto w_T sommato su tutti i tipi di tessuti irradiati $E = \sum S \times w_R \times w_T \times D_{T,R}$ ($D_{T,R}$ = dose media di radiazione R nel tessuto T; w_R = radiazione fattore di ponderazione; w_T = fattore di ponderazione del tessuto)	1 Sv = 100 rem
Efficacia della dose biologica relativa (RBE)	Rapporto tra le dosi di radiazioni con LET diverso, che causano lo stesso effetto	

Fonte: Radiation Protection Guidance for Activities in Low-Earth Orbit, 2001.

Infatti, le prime misure delle dosi medie annue, effettuate a bordo della Stazione Spaziale Russa Salyut, dal 1960 al 1983, andavano da 100 a 300 $\mu\text{Gy day}^{-1}$, ad eccezione del volo del 1965 in cui si raggiunsero i 650 $\mu\text{Gy day}^{-1}$ a causa dell'elevata orbita raggiunta

dal veicolo con apogeo di 500 Km (Petrov *et al.* 1975; Markelov *et al.* 1982; Vorobyov *et al.* 1983). Dalle prime misurazioni effettuate durante le missioni Gemini, Apollo, e Skylab (tabella. 2.3) è stato osservato un intervallo medio della dose che andava da 220 a 1,270 $\mu\text{Gy day}^{-1}$ (Benton & Benton 2001). Il contributo dei neutroni alla dose andava dal 3.65 al 14.6%, mentre la dose equivalente presentava un contributo fornito dai neutroni dal 14.4 fino al 60% (tabella 2.5) (Badhwar *et al.* 2001). Inoltre, queste misurazioni sono influenzate dal tipo di rilevatore utilizzato, come evidenziato dal confronto delle misure eseguite con un detector termoluminescente (TLD) (tabella. 2.4) oppure un detector fotografico nucleare ad emulsione (tabella. 2.5). Recentemente, sono stati pubblicati i dati relativi alle misure della dose a bordo della ISS nel 2006, durante il progetto DOBIES (*Dosimetria di Esperimenti Biologici nello Spazio*). In questo studio sono stati utilizzati diversi tipi di rilevatori contemporaneamente, posti negli stessi contenitori adibiti ai campioni biologici. Questi primi dati preliminari hanno evidenziato che i valori medi delle quantità totali della dose all'interno della ISS è pari a $\sim 220 \mu\text{Gy day}^{-1}$ (Vanhavere *et al.* 2008). Ancora oggi, comunque, le radiazioni presenti nell'ambiente spaziale rimangono tra i maggiori fattori di rischio per la salute umana e per la vita di qualsiasi organismo.

Tabella 2.3. Misura, con relativa durata, della dose assorbita e tasso medio delle dosi all'interno del veicolo delle missioni spaziali americane Gemini, Apollo e Skylab (Benton & Benton 2001).

Mission	Duration	Inclination	Apogee (km)	Perigee (km)	Absorbed dose (mGy)	Mean dose rate ($\mu\text{Gy/day}$)
Gemini 4	97.3 h	32.5°	296	166	0.46	110
Gemini 6	25.3 h	28.9°	311	283	0.25	230
Apollo 7	260.1 h		227.8	283.4	1.60	150
Apollo 8	147 h		Lunar orbital flight		1.60	260
Apollo 9	241 h		190	192	2.00	200
Apollo 10	192 h		Lunar orbital flight		4.80	600
Apollo 11	194 h		Lunar flight		1.80	220
Apollo 12	244.5 h		Lunar flight		5.80	570
Apollo 13	142.9 h		Lunar orbital flight		2.40	400
Apollo 14	216 h		Lunar flight		11.40	1270
Apollo 15	295 h		Lunar flight		3.00	240
Apollo 16	265.8 h		Lunar flight		5.10	460
Apollo 17	301.8 h		Lunar flight		5.50	440
Skylab 2	28 days	50°		Mean alt = 435	15.96	570
Skylab 3	59 days	50°		Mean alt = 435	38.35	650
Skylab 4	90 days	50°		Mean alt = 435	77.40	860
ASTP	216 h	50°		Mean alt = 220	1.06	120

Tabella 2.4. Misure dello dosi equivalenti di neutroni ottenute a bordo di alcuni veicoli spaziali (Benton & Benton 2001).

Mission	Launch date	Altitude (km)	Inclination (°)	Neutron energy			Mean total neutron $H^*(10)$ rate (μ Sv/day)	Mean absorbed dose rate in TLDs (μ Gy/day)	Neutron contribution to total $H^*(10)$ (%)
				<0.2 eV	0.2 eV–1 MeV	>1 MeV			
STS-3	3/22/82	280	40.3	0.04 $\pm$ 0.01	3.11 $\pm$ 1.51	4.5	7.7	65 $\pm$ 2	10.6
STS-4	6/27/82	297	28.5	0.06 $\pm$ 0.02	2.86 $\pm$ 1.42	8.8	11.7	63 $\pm$ 2	15.7
STS-5	11/1/81	297	28.5	0.06 $\pm$ 0.02	1.72 $\pm$ 0.86	9.7	11.5	56 $\pm$ 5	17.1
STS-6	4/4/83	284	28.5	0.06 $\pm$ 0.02	4.66 $\pm$ 2.33	5.73	10.5	55 $\pm$ 2	16.0
STS-41A	11/28/83	241	57						
SL-1 Module				0.01 $\pm$ 0.01	3.03 $\pm$ 1.49	19.3	22.3	100 $\pm$ 10	18.3
SL-1 Pallet				0.01 $\pm$ 0.01	8.87 $\pm$ 4.41	20.68	30.0	184 $\pm$ 7	13.8
STS-51F	7/29/85	322/304	49.5	0.05 $\pm$ 0.02	14.66 $\pm$ 7.33	19.06	33.8	313 $\pm$ 15	9.7
Cosmos-936	8/3/77	419/224	62.8	0.06 $\pm$ 0.02	3.90 $\pm$ 1.95	32.0	36.0	237 $\pm$ 5	13.2
Cosmos-1129	9/25/79	394/226	62.8	0.09 $\pm$ 0.03	4.87 $\pm$ 2.41	31.9	36.8	187 $\pm$ 28	16.5
Cosmos-2044	9/15/89	294/216	82.3	0.18 $\pm$ 0.06	3.03 $\pm$ 1.49	15.5	18.7	83 $\pm$ 6	18.4
LDEF	4/6/84	478	28.5						
A0015 Earthside				0.02 $\pm$ 0.01	1.40 $\pm$ 0.70	172.2	173.6	2370 $\pm$ 120	6.8
A0015 westside				0.02 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.48	70.6	71.6	1180 $\pm$ 60	5.7
P0006 westside				0.06 $\pm$ 0.02	4.06 $\pm$ 1.96	97.3	101.4	946 $\pm$ 47	9.7

Tabella 2.5. Tasso delle dosi equivalente di neutroni misurate a bordo del Space Shuttle usando l'emulsione nucleare fotografica (Badhwar *et al.* 2001).

Shuttle flight	STS-55	STS-57	STS-65	STS-94
Altitude (km)	302	470	306	296
Neutron dose rate (μ Gy/day)	5.9 $\pm$ 1.4	25.3 $\pm$ 6	11 $\pm$ 2.7	3.7 $\pm$ 0.8
Neutron dose-equivalent rate (μ Sv/day)	52.0 $\pm$ 13	220 $\pm$ 55	95 $\pm$ 23.5	30.8 $\pm$ 8
Mean crew dose rate (μ Gy/day)	57.2	461.9	75.2	101.5
Mean crew dose equivalent rate (μ Sv/day)	120.1	859.4	157.8	213.9
Neutron contribution to dose	10.3%	5.5%	14.6%	3.65%
Neutron contribution to dose equivalent	43.4%	25.6%	60.2%	14.4%

2.1.3 Danni causati dalle radiazioni nei diversi stadi di organizzazione della materia vivente

Le particelle corpuscolari cariche (elettroni, protoni, particelle alfa, ioni leggeri) dissipano energia per la produzione diretta di coppie di ioni. Le ionizzazioni prodotte da raggi X, fotoni gamma e neutroni sono indirette in quanto coinvolgono elettroni secondari o protoni di rimbalzo che a loro volta ionizzano la materia man mano che cedono energia. L'azione diretta o indiretta delle radiazioni sulle biomolecole dà luogo all'ampia gamma di effetti biologici osservati nei diversi organismi viventi irradiati:

Livello di organizzazione	Principali effetti delle radiazioni
<i>Molecolare</i>	Danno a macromolecole: enzimi RNA, DNA, interferenza con i processi metabolici.
<i>Subcellulare</i>	Danni alle membrane cellulari, ai nuclei, ai cromosomi, ai mitocondri, ai lisosomi.
<i>Cellulare</i>	Inibizione della divisione cellulare, morte della cellula, degenerazione maligna.
<i>Tessuto, organo</i>	Compromissione di alcuni sistemi: sistema nervoso centrale (S.N.C.), midollo osseo, intestino, che può condurre a morte; induzione di neoplasia.
<i>Animale intero</i>	Morte, accorciamento della durata della vita.
<i>Popolazione di animali</i>	Cambiamenti delle caratteristiche cromosomiche in individui singoli della specie.

2.1.4 Effetto delle radiazioni sulle piante

Pur considerandone la rilevanza scientifica e applicativa, è comunque ancora scarsa la letteratura relativa agli effetti delle radiazioni spaziali sulle piante. Fattore limitante per tali sperimentazioni è probabilmente l'esiguo numero di voli spaziali a disposizione per effettuare, e ripetere, esperimenti che abbiano come soggetto organismi vegetali. La maggior parte dei lavori pubblicati su questo tema riguardano gli effetti delle radiazioni ionizzanti (Todd, 2001; Tim *et al.* 2007). Queste ricerche evidenziano come l'esposizione delle piante alle radiazioni ionizzanti alterano alcuni processi fisiologici quali la respirazione, l'emissione di etilene, l'accumulo di saccarosio, e la fotosintesi (Wada *et al.* 1998; Cho *et al.* 2000; Kim *et al.* 2005; Nagata *et al.* 2005). In particolare, grazie alle tecniche di analisi dei profili di espressione trascrizionale su larga scala (e.g. microarray genomici), sono state controllate le variazioni dei livelli di mRNA trascritto di numerosi geni di plantule di *Arabidopsis thaliana*, sia dopo il volo spaziale (Paul *et al.* 2005) che dopo trattamento con sistemi di simulazione delle radiazioni spaziali, come radiazioni ionizzanti e neutroni (Kim *et al.* 2007; Fortunati *et al.* Submitted). Queste analisi hanno evidenziato che la maggior parte dei geni il cui profilo di espressione veniva alterato sono coinvolti in diversi meccanismi: crescita e divisione cellulare, sviluppo, trasduzione del segnale, difesa e risposta a stress, trasporto e risposta all'auxina, ed anche sintesi di heat-shock factors (Kranz *et al.* 1994; Nagata *et al.* 2005; Paul *et al.* 2005; Sahr *et al.* 2005; Fortunati *et al.* Submitted). Esperimenti effettuati utilizzando alte dosi di raggi gamma hanno inoltre evidenziato che le piante attivano, come risposta immediata, geni che codificano per le proteine coinvolte nei meccanismi di difesa da stress ossidativo e nella regolazione del bilanciamento tra produzione e detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Miller *et al.* 1987; Nagata *et al.* 1999). Le piante sottoposte a tali dosi di radiazioni presentano una forte perossidazione dei lipidi di membrana e una degradazione delle proteine di membrana (Landry *et al.* 1995; Mittler 2002; Frohnmeier & Staiger 2003; Yannarelli *et al.* 2006), evidenziando inoltre specifici cambiamenti anche nella morfologia stessa della pianta (Hectors *et al.* 2007). In aggiunta, a sostegno di tali evidenze sono i risultati ottenuti su cellule di tessuti animali esposte al volo spaziale; esse infatti mostrano un aumento dell'espressione dei geni che codificano per heat-shock proteins (HSP), geni di risposta a stress e coinvolti nella divisione cellulare (Hammond *et*

al. 2000; Ohnishi *et al.* 1998; Yamakuchi *et al.* 2000). Tali studi evidenziano da un lato la ridotta conoscenza degli effetti delle radiazioni sui sistemi biologici quanto dall'altro la necessità di investigare tale fenomeno con maggiore e rinnovata attenzione, in particolare se inserito nel contesto più ampio ed attuale delle contromisure necessarie alla difesa contro tali effetti durante missioni spaziali di media e/o lunga durata.

2.2 Microgravità

Durante l'evoluzione della flora e della fauna sul pianeta Terra si sono verificati continui cambiamenti dei fattori ambientali, ma l'attrazione gravitazionale è stata una costante forza percepita tanto dalle piante, quanto dagli animali. Gli esperimenti di biologia spaziale vegetale, condotti nell'ultimo decennio, hanno avuto come obbiettivo quello di esaminare l'effetto sulle piante dell'alterazione dello stimolo gravitazionale, fino a dimostrare che la ridotta forza di gravità, o microgravità, causa modifiche sul normale sviluppo, alterando alcune delle primarie funzioni cellulari (Halsted *et al.* 1987; Dutcher *et al.* 1994; Musgrave *et al.* 1997; Stankovic 2001; Ferl *et al.* 2002; De Micco & Aronne 2008).

La gravità è una delle quattro forze fondamentali della fisica che regolano l'universo; essa dipende direttamente dalla massa dei corpi ed è inversamente proporzionale al quadrato della distanza fra essi:

$$F = Gm_1m_2r^{-2}.$$

Un modo per annullare la gravità è quello di compensare i suoi effetti mediante l'imposizione di un'appropriata forza di accelerazione esattamente con la stessa intensità in valore assoluto (o modulo) della forza di gravità, ma con una direzione opposta a quella del vettore di gravità locale. Ne risulta una sommatoria di due forze vettoriali con stesso modulo e direzione opposta che è pari a zero. L'equilibrio di forze che ne risulta è definito "assenza di gravità". Tuttavia, poiché questa condizione di equilibrio è difficilmente ottenibile, ci si riferisce ad essa con il termine di **microgravità**.

La microgravità colpisce molti dei fenomeni fisici che agiscono nei sistemi biologici, quali la pressione idrostatica nel liquido cellulare, la sedimentazione di organelli citoplasmatici, la convezione dei flussi e del calore. Questi fenomeni possono, a loro volta, direttamente e/o indirettamente influenzare la morfologia cellulare, il metabolismo, la secrezione della matrice extracellulare e dei segnali solubili, compreso l'assemblaggio dei tessuti. Gli studi volti a distinguere gli effetti specifici della gravità sui sistemi biologici, richiedono la possibilità di poter a) controllare e variare la gravità sistematicamente, ad esempio utilizzando l'ambiente spaziale oppure dispositivi di simulazione di volo in iper e microgravità; b) mantenere costanti tutti gli altri fattori che normalmente si monitorano in campo sperimentale: intensità luminosa, umidità e temperatura (Freed & Vunjak-

Novakovic 2002). Gli Hardware di volo tuttora disponibili sono ideati per cercare di rispondere a tali esigenze e, in larga misura, vengono realizzati sulla base del disegno sperimentale e dagli obiettivi scientifici richiesti nell'esperimento da realizzare (Brinckman, 2005, Driss-Ecole *et al.* 2008, Johnsson *et al.* 2009; Solheim *et al.* 2009). Attualmente, non è ancora del tutto chiaro se la gravità agisca direttamente sulla cellula ed i suoi componenti, oppure se il suo effetto sia mediato dall'ambiente chimico-fisico circostante. Alcuni esperimenti evidenziano che gli statoliti, in alcune cellule specializzate dell'apice radicale (figura 2.4) o del fusto, sono altamente sensibili alla gravità. (Kiss *et al.* 1989; Weise & Kiss 1999). Tuttavia, la gravità, influenzando le proprietà della materia, ha un effetto sui meccanismi chimico-fisici alla base della fisiologia animale e vegetale. Tra i processi vegetali che potrebbero esserne influenzati vanno ricordati la traspirazione, la fotosintesi e l'assorbimento da parte della radice dei nutrienti. Perciò è importante sottolineare che ad esempio, se in ambiente spaziale non avviene una perfetta ventilazione delle camere di crescita, le piante potrebbero avere degli effetti negativi legati all'insufficiente circolazione d'aria intorno alle foglie. Ovviamente, questo renderà difficoltoso lo scambio dei gas, limitando così le capacità di fotosintesi e di traspirazione delle piante. (Kitaya *et al.* 2003; Monje *et al.* 2003; Hirai & Kitaya 2009). Anche per questa ragione le agenzie spaziali investono molti finanziamenti nel settore dell'ingegneria applicata alla costruzione di hardware e contenitori speciali per effettuare esperimenti su organismi viventi. In linea generale, si cerca di effettuare studi di ricerca di base e applicata, sia in condizioni simulate che reali di volo spaziale, con l'obiettivo di ottimizzare e raggiungere parametri tecnici e biologici tali da poter sfruttare i risultati nelle future missioni interplanetarie.

2.3 Movimenti delle piante

Le piante sono riuscite, durante l'evoluzione, a compensare la loro natura sessile sviluppando risposte precise e adattamenti ai continui cambiamenti dell'ambiente circostante. Tali risposte sono conosciute con il termine tropismi. A seconda della fonte dello stimolo i tropismi si suddividono in: fototropismo (risposta funzionale alla direzione della luce); gravitropismo (risposta funzionale alla direzione della gravità); idrotropismo (risposta alla disponibilità di acqua); tigmotropismo (risposta al contatto) (Esmon *et al.* 2005; Migliaccio *et al.* 2009). A questi tropismi si aggiungono movimenti spontanei, indotti da fattori esterni, ma con direzione definita detti movimenti nastici e circumnutazionali (Migliaccio *et al.* 2009). Questi ultimi agiscono simultaneamente al gravitropismo positivo sulla crescita della radice (Migliaccio & Piconese 2001). Il risultato dell'azione combinata di tutti questi fattori induce la radice a crescere verso il basso, mentre la circumnutazione ne determina un andamento ellittico, secondo due modelli di crescita, definiti come: "waving" (ondulante) e "coiling" (elicoidale).

Questo argomento è stato molto dibattuto. Storicamente iniziato da Charles Darwin il quale, in collaborazione con il figlio Francis, pubblicò nel 1880 *The power of movement in plants*. Darwin aveva osservato, più di un secolo fa, che le piante avevano la tendenza a percepire l'ambiente a loro circostante, al fine di orientarsi e crescere in modo ottimale. In realtà la circumnutazione si verifica in quasi tutti gli organi delle piante e in tutte le fasi dello sviluppo (Johnsson, 1997; Larson, 2000). I movimenti nastici di solito interessano i movimenti delle foglie, provocati da pulvini che si trovano alla base del picciolo, a differenza di tutti i movimenti descritti, i movimenti nastici sono gli unici ad essere reversibili.

Molti sono i progressi fatti per la comprensione di come le piante percepiscono e reagiscono agli stimoli tropici. In particolare, un significativo contributo è stato fornito dalla biologia molecolare, che negli ultimi dieci anni, grazie al sequenziamento dell'intero genoma di *Arabidopsis thaliana*, ha fornito informazioni su molti geni e le relative funzioni di molte proteine coinvolte in questo meccanismo.

Le piante, come detto in precedenza, cercano di mantenere la crescita ottimale nonostante le condizioni ambientali. Tutto questo è possibile grazie alla coordinazione di

molti segnali. Ma come le piante trasducano tali segnali ed attuino una risposta adeguata, non è ancora stato chiarito.

2.3.1 Gravitropismo

Le piante possono orientare la loro direzione di crescita in risposta a vari stimoli ambientali. Se lo stimolo è la gravità, questo viene indicato come risposta gravitropica, che a sua volta si distingue in: gravitropismo negativo (in opposizione al vettore gravità) e positivo (secondo il vettore gravità) (Liscum, 2002). Il primo guida il movimento della parte aerea della pianta (verso l'alto), mentre il secondo guida la crescita delle radici (verso il basso). Recenti sviluppi della biologia cellulare vegetale suddividono la risposta gravitropica in quattro fasi: I, riconoscimento del vettore gravità; II, conversione di un segnale biofisico in uno biochimico, attraverso la trasduzione del segnale; III, trasmissione agli organi di risposta del segnale; IV, movimento dell'organo (Tasaka *et al* 1999).

Negli anni '20, Cholodny e Went, e successivamente Thimann (Went & Thimann, 1937), proposero che fosse il trasporto laterale dell'ormone auxina ad innescare la risposta di stimoli direzionali, come luce e gravità, mediante una sua ridistribuzione asimmetrica all'interno degli organi. Molti ricercatori ancora si chiedono dove sia localizzato il sito di percezione della gravità nelle radici e nel germoglio. Una prima serie di studi, sugli apici radicali, aveva evidenziato che la zona della cuffia radicale era responsabile della risposta gravitropica. Successivamente, altri esperimenti di sedimentazione degli amiloplasti in diversi tessuti (coleottili, base dei nodi delle monocotiledoni, guaini del fascio dell'ipocotile ed infiorescenze delle dicotiledoni), avevano suggerito che gli amiloplasti avessero un ruolo importante nel gravitropismo (figura 2.4; 2.5) (Kiss *et al.* 1989; Sack 1997; Blancaflor *et al.* 1998; Tsugeki *et al.* 1998; Martzivanou & Hampp 2003; Morita, 2008). Inoltre, sono stati raggiunti importanti progressi su questo argomento grazie anche all'utilizzo di *Arabidopsis thaliana* come pianta modello. Questa pianta possiede molti vantaggi sperimentali: genoma completamente sequenziato, ciclo vitale breve, piccole dimensioni, alta riproduttività, ed infine un alto grado di trasformabilità, mediante ingegneria genetica, grazie alla quale si possono produrre piante transgeniche (Meyerowitz 2001). Indagini molecolari evidenziano come molti geni, dopo stimolo gravitropico, vengano attivati (Moseyko *et al.* 2002; Kimbrough *et al.* 2004). In particolare, i geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e nella difesa delle piante, come gli heat-shock

factors (Fortunati *et al.* 2008a), nel metabolismo, nella sintesi della parete e membrana cellulare, nella trasduzione del segnale e controllo ormonale (Martzivanou & Hampp 2003, Kimbrough *et al.* 2004).

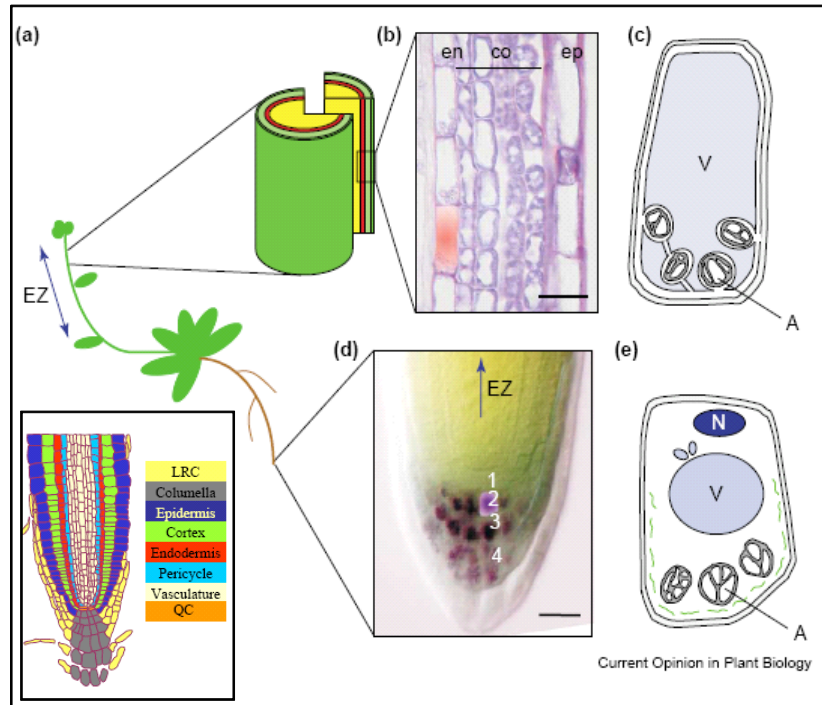


Figura 2.4. Struttura degli organi gravitropici in *Arabidopsis*. **a)** zona di allungamento (EZ), regione di cellule staminali giovanili, poste al di sotto del meristima apicale. **b)** Epidermide (ep), corteccia (co), endodermide (en), sono tessuti disposti concentricamente. **c)** Cellula dell'endoderma vegetale polare, con evidenziati gli amiloplasti (A) depositati nella zona basale. **d)** Immagine al microscopio di un apice radicale, colorato con ioduro di potassio. I numeri indicano i livelli delle cellule della columella. La freccia indica la EZ. **e)** Ingrandimento di una cellula della columella, con evidenziati il nucleo (N), il vacuolo (V) e gli amiloplasti (A); linee verdi rappresentano il reticolo endoplasmatico (ER) (Morita & Tasaka 2004).

Grazie alla generazione di un crescente numero di mutanti privati della funzione di geni coinvolti, o parzialmente coinvolti, nel gravitropismo (Boonsirichai *et al.* 2003; Noh *et al.* 2003; Fortunati *et al.* 2008) si è potuto far luce su diversi aspetti molecolari e funzionali del meccanismo di risposta delle piante alla gravità. I risultati così ottenuti suggeriscono che il gravitropismo è un complesso processo multi-stadio, regolato da differenti elementi. In particolare, i mutanti *sgr1/scr* e *sgr7/shr* (*shoot gravitropism1* e *7*) esibiscono un'assenza di risposta alla gravità nell'infiorescenza e nell'ipocotile (Kato *et al.* 2002), mentre le radici mostrano una normale risposta gravitropica (Fukaki *et al.* 1998).

Questi due mutanti (*sgr1* e *sgr7*) presentano la particolarità di essere sprovvisti di tessuto endodermico, sia nella radice che nella parte aerea della plantula. Tale difetto esclude la possibilità che l'endoderma possa essere, nel caso delle radici, il tessuto deputato alla percezione della gravità, in quanto queste nei mutanti, pur non possedendo endoderma, presentano una regolare risposta gravitropica.

Due sono le ipotesi proposte dagli scienziati per spiegare la percezione della gravità da parte delle piante. La prima si basa sul cosiddetto modello gravitazionale a pressione (Staves, 1997), mentre la seconda affida agli statoliti la gravipercezione. Questa ultima ipotesi è stata fortemente sostenuta da una vasta varietà di approcci sperimentali su differenti specie vegetali (Sack, 1997), in quanto gli statoliti, nella cellule della columella, e nelle cellule dell'endoderma, sono amiloplasti che sedimentano seguendo la direzione della gravità (Kiss *et al.* 1989; Weise & Kiss 1999). E' interessante evidenziare che insieme al movimento degli statoliti, anche le endomembrane del reticolo endoplasmatico (ER) sembrano essere coinvolte nel rilevare la gravità (Leitz *et al.* 2009). Secondo recenti studi, le cellule della columella sarebbero polari, in quanto il nucleo si localizza nel lato prossimale, e l'ER sul lato distale (figura 2.5, Leitz *et al.* 2009). Le analisi ultrastrutturali su tabacco hanno inoltre evidenziato che l'ER acquisisce una forma specializzata, denominata ER nodale, che si distribuisce a livello della membrana plasmatica (Zheng & Staehelin 2001). Tutte queste osservazioni si aggiungono a quelle evidenze sperimentali che sostengono l'ipotesi per cui l'ER, insieme con gli amiloplasti, sia responsabile della gravipercezione, in concerto con una terza struttura cellulare, il vacuolo (Kato *et al.* 2002; Morita *et al.* 2002; Yano *et al.* 2003). Per quanto riguarda le possibili vie di trasduzione del segnale, la letteratura suggerisce che la mediazione sia effettuata da alcuni ioni citosolici. Tra i vari ioni presenti a livello cellulare, anche se alcuni esperimenti mostrano risultati contraddittori, i maggiori candidati a svolgere la funzione di secondi messaggero, sono i protoni e gli ioni calcio (Ca^{2+}) (Blancaflor & Masson 2003). Infatti, misurazioni *in situ* hanno evidenziato cambiamenti di concentrazione di Ca^{2+} nelle cellule della columella dopo gravistimolazione (Legue *et al.* 1997; Plieth & Trewavas 2002). Comunque, altri studi attribuiscono piuttosto al cambiamento di pH, e quindi della carica protonica cellulare, il ruolo maggiore nella via di trasduzione del segnale gravitropico (Fasano *et al.* 2001; Monshausen & Sievers 2002). Inoltre, è stato suggerito che le interazioni dirette tra gli statoliti e l'ER possano indurre transienti movimenti degli ioni Ca^{2+} (Volkman &

Sievers 1979). Tuttavia, non si esclude che alcune proteine e geni, siano coinvolti nella trasduzione del segnale gravitropico (Sedbrook *et al.* 1999; Fortunati *et al.* 2008).

Un'altra serie di esperimenti attribuisce al citoscheletro cellulare un ruolo importante nel rilevare lo stimolo gravitropico (Baluska & Hasenstein 1997; Blancaflor, 2002). In particolare, è stato osservato che, bloccando la polimerizzazione dei filamenti di actina, in fusti e radici, sia ha un'alterata risposta gravitropica (Yamamoto & Kiss 2002; Hou *et al.* 2003). Altre ipotesi collegano la sedimentazione degli amiloplasti all'alterazione della normale distribuzione dell'actina microfibrillare legata alla membrana plasmatica (Blancaflor & Masson 2003), attivandone i canali ionici (Yoder *et al.* 2001).

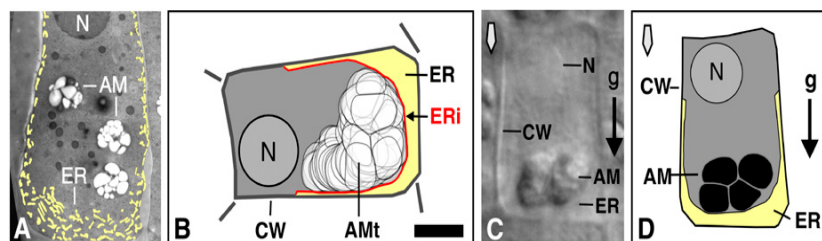


Figura 2.5. Cinetica di sedimentazione degli statoliti. **A)** ER (giallo), visualizzato al microscopio elettronico su *Arabidopsis* (Ws), di cellule della columella orientate verticalmente. **B)** Movimento dell'ER (giallo) dopo cambiamento della posizione della cellula da verticale ad orizzontale. **C)** Fotografia al microscopio elettronico di una cellula della radice verticale. **D)** Sedimentazione degli statoliti in relazione alla posizione dell'ER dopo riorientamento della radice. N = nucleo; ER = reticolo endoplasmatico; AM = amiloplasti; CW = parete cellulare; N = nucleo. (A) e (C) immagini al microscopio; (B) e (D) immagini schematiche delle cellule (Leitz *et al.* 2009).

2.3.2 Trasporto dell'auxina e gravità

Cholodny e Went, tra il 1927 e 1937, lavorando indipendentemente, proposero che la ridistribuzione di una sostanza prodotta dalla pianta fosse responsabile dell'attivazione della crescita cellulare differenziale, come risposta fototropica. Questa sostanza fu chiamata auxina, dal greco aumentare, per la sua caratteristica di promuovere l'allungamento delle cellule. Questa sostanza fu purificata e fu definita a tutti gli effetti "ormone vegetale", in quanto prodotto da parti diverse della pianta, agisce raggiungendo siti anche distanti, ed anche a basse concentrazioni.

L'acido 3-indolacetico (IAA) è la principale forma delle due auxine naturali presenti nelle piante, sintetizzato all'interno degli apici dei tessuti giovani, e poi trasportato

ai tessuti bersaglio. Le prove a supporto di come l'auxina abbia un ruolo anche nella risposta gravitropica (Evans, 1991; Lomax *et al.* 1995) derivano dalle seguenti osservazioni: a) l'applicazione asimmetrica di auxina induce la curvatura, sia nei germogli che nelle radici; b) gli inibitori del trasporto auxinico inibiscono la curvatura degli apici radicale; c) IAA marcato si accumula lungo gli organi gravistimolati (Young *et al.* 1990; Marchant *et al.* 1999). L'auxina viene trasportata attraverso due vie: 1) per diffusione passiva; 2) mediante un trasporto attivo polare asimmetrico (Tsurumi & Ohwaki 1978). Il trasporto passivo dell'auxina su ampie distanze si ritiene che avvenga attraverso il floema, mentre quello attivo richiede specifici trasportatori transmembrana. In ogni caso, è stato dimostrato che il trasporto polare dell'auxina, oltre che controllare la fertilità, la fioritura, la senescenza e il differenziamento delle cellule vascolari (Fukuda, 2004), occupa un ruolo importante anche nelle risposte tropiche (Marchant *et al.* 1999; Friml *et al.* 2002).

Il trasporto polare dell'auxina viene mediato da due famiglie di proteine. I trasportatori responsabili dell'efflusso dell'auxina dalla cellula sono le proteine PIN (PIN-FORMED) (Chen *et al.* 1998; Müller *et al.* 1998; Paponov *et al.* 2005), mentre le proteine di influsso dell'auxina verso la cellula sono denominate AUX1/LAX (AUXIN1/LIKE-AUXIN1) (Marchant *et al.* 1999, figura 2.6a). Molti studi attribuiscono sia alla famiglia delle proteine PIN (Galweiler *et al.* 1998; Müller *et al.* 1998; Geldner *et al.* 2001; Friml *et al.* 2002; 2003; Noh *et al.* 2003), che ad AUX1, una connessione con la risposta gravitropica delle radici e dei germogli (Maher & Martindale 1980; Marchant *et al.* 1999).

I mutanti, che sono stati isolati per le diverse isoforme delle proteine PIN (*pin-formed2*, 3, 4 e 7), presentano alterata risposta gravitropica, anche se è interessante notare come il mutante *pin3* presenta solo una parziale perdita di questa risposta (Friml *et al.* 2002), suggerendo funzioni ridondanti per uno o più PIN (Friml *et al.* 2002). Al contrario, il mutante *aux1* (*auxin resistant1*) mostra gravi difetti nella risposta gravitropica (Chen *et al.* 1998). Ulteriori prove a conferma del coinvolgimento dell'auxina nelle risposte gravitropiche, sono state recentemente fornite da esperimenti di microgravità simulata (utilizzando un clinostato 3-D, ovvero Random Positioning Machine, RPM), studiandone la risposta nei mutanti *aux1* e *eir1/pin2/agr1* (Piconese *et al.* 2003). Anche le nuove tecnologie microscopiche ad alta risoluzione e l'utilizzo di marcatori fluorescenti come la green fluorescence protein (GFP), per la co-localizzazione di proteine, ha fornito un grande contributo alla comprensione dei meccanismi di trasporto dell'auxina (Teale *et al.* 2006).

Ad oggi, risulta chiaro che il meccanismo di trasporto dell'auxina avviene tramite vescicole contenenti le proteine PIN, le quali vengono riciclate nel Golgi e successivamente passando nel citoplasma, raggiungono la membrana plasmatica (figura 2.6a). Comunque, il movimento di queste vescicole richiede il coinvolgimento dei filamenti di actina (Estelle, 2001). AUX1 è localizzata preferenzialmente nella membrana plasmatica delle cellule del protofloema, ossia le cellule che andranno a costituire il procambio nel meristema primario. La corretta localizzazione di AUX1 è favorita da una seconda proteina chiamata AXR4/RGR1 (figura 2.6a; Dharmasiri *et al.* 2006; Sedbrook *et al.* 1999; Boonsirichai *et al.* 2003). Infatti, il mutante *axr4/rgr1* (*auxin resistant 4/gravitropic 1*) non riesce a ridistribuire bene l'auxina nel cuffia radicale. Sembrerebbe che la proteina AXR4 intervenga direttamente nel regolare la funzione delle proteine PIN (Boonsirichai *et al.* 2003). Inoltre, fino ad oggi, tutti i mutanti isolati per la resistenza alle alte concentrazioni di auxina, mostrano una ridotta risposta gravitropica, sostenendo in tal modo il ruolo dell'auxina come mediatore nel gravitropismo. Il meccanismo di azione dell'auxina è regolato da repressori ed attivatori trascrizionali di geni bersaglio che rispondono alla variazione di concentrazione di IAA. Tali fattori trascrizionali appartengono a due famiglie di proteine: gli ARF (fattori di risposta all'auxina), che attivano l'espressione dei geni di risposta all'auxina (Guilfoyle & Hagen 2001; Tiwari *et al.* 2003); e gli Aux/IAA, considerati inibitori dei geni regolati dall'auxina (Abel & Theologis 1996; Ulmasov *et al.* 1999; Tiwari *et al.* 2001; Tiwari *et al.* 2004). Gli ARF legano sequenze specifiche denominate Elementi di Risposta all'auxina (AuxRE), presenti sui promotori di geni bersaglio. Le proteine ARF hanno una funzione combinata con gli Aux/IAA che, dimerizzando con gli ARF e ne bloccano la funzione. Quando l'auxina entra nel nucleo, riconosce e lega un complesso proteico ubiquitina-ligasi denominato SCF^{TIR1} (SCAFFOLD TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT 1) (Parry & Estelle 2006). Il complesso così formato IAA- SCF^{TIR1} lega Aux/IAA, viene poi ubiquinato ed indirizzato verso il proteasoma dove viene demolito (Dharmasiri *et al.* 2005; Kepinski & Leyser 2005). Con la diminuzione degli inibitori Aux/IAA, i fattori ARF sono liberi di legarsi alle Aux/RE ed attivare la trascrizione di diversi geni auxina-indotti (figura 2.6b).

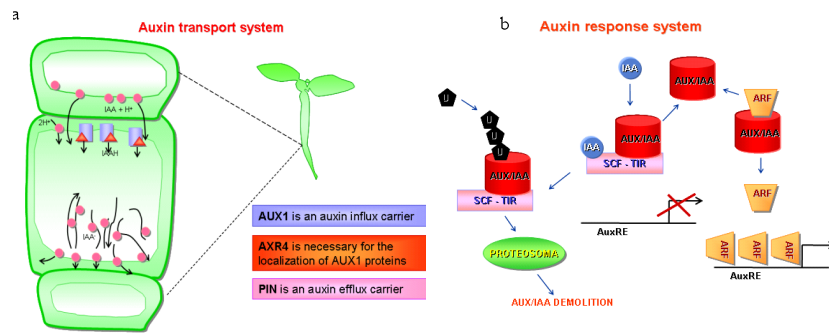


Figura 2.6. Il metabolismo dell'auxina in pianta. a) Rappresentazione del sistema di trasporto polare dell'auxina nelle cellule del cilindro centrale della radice. AUX1 = trasportatore di afflusso; PIN = trasportatore di efflusso; AXR4 = localizzatore di AUX1. **b)** Sistema di risposta molecolare alle variazioni di concentrazione dell'auxina. Aux/IAA = Auxin/indole acetic acid induced proteins; ARF = Auxin Response Factors; AuxRE = Auxin Response Elements).

2.4 Auxina: il suo coinvolgimento nella senescenza

Per più di un secolo, i biologi vegetali sono stati affascinati dai meccanismi alla base delle risposte fisiologiche della pianta legate alla sintesi e traslocazione dell'auxina, in particolare la risposta gravitropica. Tuttavia, solo recentemente sono state chiarite alcune delle basi molecolari di tali risposte. Nelle piante, sia fattori endogeni che ambientali regolano i processi fisiologici di germinazione e sviluppo, fioritura e senescenza. L'auxina può indurre la senescenza (Ellis *et al.* 2005) insieme con altri ormoni come l'etilene e acido abscissico; mentre, citochinine e gibberelline, possono a loro volta svolgere un ruolo di inibizione della senescenza (Lim *et al.* 2003). Inoltre, è noto che l'auxina reprime la trascrizione di alcuni geni la cui espressione è correlata con la senescenza (Noh & Amasino 1999; Hong *et al.* 2000; Tucker *et al.* 2002). L'auxina risulta quindi essere la chiave di avvio di molti processi vegetali: germinazione del seme, embriogenesi, fioritura e senescenza. (Abel & Theologis 1996; Guilfoyle & Hagen 2007). La maggior parte di questi processi viene mediata e/o attivata attraverso l'espressione di geni regolati dall'auxina (figura 2.6b) (Guilfoyle & Hagen 2007; Guilfoyle *et al.* 2001; Tiwari *et al.* 2003). In *Arabidopsis*, 23 geni sono stati identificati come responsabili della codificazione di proteine attivate in risposta a variazioni della concentrazione di auxina, gli AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) (Ulmasov *et al.* 1999; Guilfoyle *et al.* 2001); e 24 geni che codificano per le proteine Aux/IAA (Auxin/indole acetic acid). La funzione biologica dei fattori ARF non è ancora chiara. E' noto che essi si legano a sequenze specifiche presenti sui promotori di geni bersaglio denominate elementi di risposta all'auxina (AuxRE). Come molti fattori di trascrizione, gli ARF contengono differenti domini, che possono funzionare in modo indipendente l'uno dall'altro o in cooperazione (Guilfoyle *et al.* 2001; Tiwari *et al.* 2003). Ulteriori indagini evidenziano come l'espressione dei geni *ARF* risponda sia a segnali ambientali che ormonali. Durante la senescenza fogliare indotta dalla luce i livelli di espressione dei geni *ARF2*, *ARF7* e *ARF19* aumentano moderatamente, mentre quelli di *ARF1* diminuiscono. In aggiunta, il mutante *arf2-6* presenta una ritardata fioritura e senescenza (Ellis *et al.* 2005; Li *et al.* 2005; Okushima *et al.* 2005). Inoltre, il mutante *arf2-6* ha un'anormale struttura delle infiorescenze, con grandi fusti, ovuli e semi, a causa del numero maggiore di cellule. Questo suggerisce che ARF2 possa agire inibendo la crescita e la divisione cellulare (Ellis, 2005).

2.5 Gravitropismo e ricerche spaziali

Nell'ultimo decennio, numerosi sono stati gli esperimenti condotti nello spazio, con lo scopo di studiarne l'effetto sullo sviluppo e la crescita nelle piante. La risposta di una pianta esposta all'assenza di gravità (o microgravità) si riflette in cambiamenti fisiologici, cellulari e biochimici di diversa intensità ed in organi diversi. L'interpretazione dei dati ottenuti da tali esperimenti risulta inoltre complicata dal fatto che le piante, oltre a risentire della gravità, tuttavia sono anche influenzate da diversi parametri fisiologici, come: la qualità e l'intensità della luce, l'umidità, la temperatura e l'impianto di areazione, ovvero la concentrazione di CO₂.

Per questo motivo alcuni esperimenti condotti in orbita presentano dati contrastanti, sia per lo stato fisiologico delle piante prima e dopo il lancio, sia per l'utilizzo di differenti hardware, compresi i differenti protocolli sperimentali eseguiti (Levine *et al.* 2001; De Micco & Aronne 2008; Johnsson *et al.* 2009). I dati ottenuti durante la missione Foton-M2 nel 2005, hanno evidenziato che piantine di soia cresciute per 5 giorni in microgravità subiscono differenti cambiamenti morfologici, anatomici e citologici. Le piantine sviluppate in volo appaiono più piccole (Link *et al.* 2003), suggerendo una parziale inibizione, o quanto meno rallentamento, della crescita (De Micco & Aronne 2008). Numerosi altri esperimenti condotti nello spazio su piantine di diverse specie (frumento, avena, girasole e fagiolo) suggeriscono che la riduzione o l'inibizione della divisione cellulare possa essere causata da aberrazioni genetiche (Perbal, 2001). Tra le ipotesi più probabili, tale fenomeno può essere spiegato a) con una ritardata germinazione; b) un rallentamento del tasso di crescita; c) l'inibizione prematura e blocco dello sviluppo delle piantine.

È inoltre ipotizzato che l'assenza di gravità induca cambiamenti nella distribuzione degli amiloplasti (Perbal *et al.* 1997; Kiss *et al.* 1999; Driss-Ecole *et al.* 2000), alteri il metabolismo cellulare (Hampp *et al.* 1997) e la distribuzione degli ioni calcio (Merkys & Darginaviciene 1997). Questi ultimi sono fondamentali per quasi tutti i processi metabolici, poiché mediano i meccanismi di traduzione del segnale nelle piante (Sheen, 1996; Sinclair & Trewavas 1997; Roos, 2000). Quindi il calcio, oltre ad essere coinvolto

nella traduzione del segnale, è associato ai meccanismi di orientamento delle cellule secondo la gravità (Reddy *et al.* 1987; Merkys & Darginavicien 1997; Kiss, 2000).

Anche i movimenti della radice primaria delle piante sembra essere alterato dalla microgravità. In *Arabidopsis thaliana*, normalmente il movimento circumnutazionale si manifesta con dei "weaving" (movimenti ondulatori), mentre piante sottoposte a microgravità simulata presentano una crescita della radice regolata da "coiling", ovvero crescendo secondo un piano elicoidale schiacciato (Piconese *et al.* 2003). Infine, studi di espressione genica, tramite microarray, su colture cellulari di *Arabidopsis* sottoposte a ipergravità simulata (7g per 1 ora), evidenziavano un attivazione di *ca* 300 geni, dei quali il 12% coinvolti nella fosforilazione/defosforilazione di proteine, il 6% nella risposta agli stress, il 2% al gravipercezione (Martzivanou & Hampp 2003), ad indicare la complessa influenza della gravità sugli organismi vegetali come la necessità di approfondire con maggiore forza l'indagine molecolare sui meccanismi alla base della risposta alla gravistimolazione.

III

Scopo del lavoro

Le piante sono essenziali per la vita sulla Terra e potrebbero diventare indispensabili anche per le future missioni spaziali, non tanto solo come fonte di cibo, quanto per il loro contributo nel ciclo di depurazione dell'aria e riciclo dell'acqua. Per tali motivi, notevoli sono gli interessi, soprattutto applicativi, che le agenzie spaziali nazionali ed internazionali hanno per gli esperimenti di biologia spaziale.

Lo scopo di questo lavoro sarà quello di studiare gli effetti causati da stress da permanenza in ambiente di tipo spaziale in pianta, simulandone, per quanto possibile, le varie componenti che contraddistinguono l'ambiente spaziale da quello terrestre. Questo studio sarà suddiviso in tre parti: risposta fisiologica e ruolo dell'auxina alla microgravità simulata; effetto della radiazione neutronica sulle piante; ed infine caratterizzazione di un nuovo mutante nella risposta gravitropica.

La prima e la seconda parte saranno quindi focalizzate in particolare su due specifici parametri costituenti l'ambiente spaziale: microgravità e la radiazione neutronica. Nella prima parte, verrà studiato in dettaglio l'effetto che la parziale assenza di gravità ha sugli organismi vegetali, ed il coinvolgimento del fitormone auxina nella loro risposta a tali condizioni. L'auxina controlla differenti processi morfogenetici, che vanno dalla fioritura alla senescenza, al metabolismo delle piante; inoltre interagisce con differenti recettori specifici inducendo specifiche risposte fisiologiche. È anche ipotizzato che abbia un ruolo centrale nelle risposte legate al tropismo, ovvero la capacità della pianta di percepire i

cambiamenti dell'ambiente circostante e di rispondere a tali stimoli con risposte e movimenti ben precisi. Infatti, le piante presentano una elaborata percezione della gravità (gravitropismo o geotropismo), e rispondono a questo stimolo segnalando alla radice la corretta direzione di crescita, seguendo la traiettoria del vettore gravitazionale terrestre. Tuttavia, come effettivamente le piante possano percepire la corretta direzione di crescita non è ancora ben chiaro.

Uno dei principali quesiti scientifici e pratici riguardanti la fattibilità delle missioni spaziali di media/lunga durata è quello di capire e contrastare l'effetto sugli organismi biologici delle radiazioni spaziali. La seconda parte di questo lavoro sarà dedicata quindi allo studio di una delle componenti principali dall'ampio spettro di radiazioni che caratterizza l'ambiente spaziale: i neutroni. Tali particelle sono interessanti tanto per l'astrobiologia, quanto per l'ingegneria aereospaziale, poiché estremamente difficili da schermare in quanto prive di carica elettrica. Inoltre, alcune stime indicano che i neutroni contribuiscono per un valore compreso tra il 14 ed il 60% alla dose totale equivalente di radiazioni misurate all'interno della Stazione Spaziale Internazionale (ISS). Quindi, i neutroni non solo hanno una certa facilità di penetrare attraverso le schermature dei vettori spaziali, come pure la materia biologica, ma, nello spazio, sono presenti in dosi elevate, almeno se paragonate con le altre componenti della radiazione spaziale.

Nella terza parte sarà affrontato un ultimo obiettivo di questa ricerca, ovvero quello di isolare e caratterizzare un nuovo mutante che presenti una riduzione della risposta gravitropica -il cui accrescimento radicale segua quindi solo parzialmente il vettore gravitazionale- e determinare se il fattore responsabile della mutazione sia o meno coinvolto nel metabolismo dell'auxina.

IV

Materiale e Metodi

4.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Nel corso degli esperimenti sono state utilizzate piante di 15 e 35 giorni, di *Arabidopsis thaliana*, i cui semi sono stati forniti dalla Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, UK). Sono stati utilizzati diversi ecotipi wilde-type: Colombia (*Col*), Landsberg (*Ler*) e Wassilewskija (*Ws*); e mutanti auxinici: *aux1*, *eir1*, *arf1-3*, e *arf2-6*.

I semi, sono stati sterilizzati per 10 minuti in una soluzione contenente 50% di candeggina commerciale e SDS 0.01%; successivamente sono stati lavati quattro volte con acqua distillata sterile e seminati in capsule Petri, su terreno di coltura solido, costituito da agar 15%, saccarosio 1% e terreno basale MS 0.5X (Murashige e Skoog, Sigma-Aldrich, CA, USA), arricchito con vitamine Gamborg's (Sigma-Aldrich), portato a pH 5,7 con NaOH e sterilizzato in autoclave (25 minuti a 121°C).

Per sincronizzare la germinazione, le piastre sono state lasciate in camera fredda (4°C) per 2 giorni, prima di essere trasferite in una camera di crescita. Le piante sono state coltivate in un primo momento per 10-15 giorni su capsule Petri in camera di crescita per *Arabidopsis* (Percival Scientific, USA) con luce bianca fluorescente di intensità luminosa pari a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e alla temperatura 23/19°C giorno/notte. Per ottenere le piante adulte, le plantule di 15 giorni, poi sono state trasferite in vasi di 7 cm contenenti una miscela di terreno sterile costituito da: 40% di sabbia, 35% di torba e 25% di terra setacciata; coltivate in un primo momento a giorno breve (8/16 h di luce/buio, come fotoperiodo) per promuovere la crescita a rosetta, e dopo tre settimane a giorno lungo (16/8 h di luce/buio come fotoperiodo). L'umidità relativa nella camera di crescita è stata mantenuta ad un livello costante del 65%. I vasi sono stati annaffiati tre volte a settimana con acqua sterile e una volta con una soluzione nutriente (Mannalin-A 0,5 g/l).

4.2 Estrazione di RNA totale da pianta ad analisi RT-PCR

Per eseguire l'estrazione di RNA totale dai campioni raccolti, sono state utilizzate almeno 3 foglie da almeno tre piante diverse di 35 giorni. Per ogni estrazione da plantule di 15 giorni sono state utilizzate circa 100 campioni ciascuna. Tutte le estrazioni sono state condotte in triplicato. Circa 50 mg di materiale (foglie o plantule) è stato congelato con azoto liquido e macinato con mortaio e pestello fino ad ottenere una polvere molto fine. Tale polvere è stata quindi aggiunta un 1ml di TRIZOL[®] (Invitrogen, CA, USA), e l'RNA totale è stato estratto seguendo le istruzioni riportate nel manuale d'suo. Per la sintesi del cDNA sono stati utilizzati 2 µg di RNA totale estratto, il quale è stato quindi retrotrascritto usando la trascrittasi inversa Super Script III (Invitrogen).

Per l'analisi di RT-PCR, specifici geni bersaglio sono stati amplificati aggiungendo 1 u di DNA Taq Polimerasi *Platinum* Taq Polimerase (Invitrogen) ad una miscela di reazione contenente: 2 µg della miscela di cDNA, 1 µl di una miscela di dNTP 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP ciascuno 10 mM), 10X Buffer, 50 mM MgCl₂, e 0.2 uM di ciascuno dei due inneschi (senso e antisenso) usati per amplificare i geni bersaglio (Tabella 4.1). L'amplificazione del gene bersaglio è stata realizzata incubando la miscela di reazione secondo le seguenti modalità: 1 ciclo di 3 min a 95°C, seguito da 35 cicli di 30 sec a 94°C, 25 sec a 57°C, 45 sec a 72°C. La quantità di amplificato è stata determinata correndo ogni prodotto di RT-PCR su gel elettroforesi e fotografandone le bande risultanti.

4.3 Analisi quantitativa di *real time* qPCR

L'analisi quantitativa dei livelli di espressione trascrizionale dei geni bersaglio è stata realizzata mediante *real time* PCR (qPCR), usando un termociclatore Mx3000P® (Stratagene, CA, USA). La miscela di reazione qPCR era costituita da: 2 µl di 10X PCR Buffer (200 mM 2 TRIS-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 0.4 µl di 2 mM dNTP mix, 0.8 µl di 50 mM MgCl₂, 6 µl di 2 M D-(+)-trehalose deidrato (Fluka), 0.5 µl di formamide, 0.1 µl di 1:100 SYBR Green I (Molecular Probes, Invitrogen), diluito in dimetilsolfossido (Molecular Probes), 0.2 µl (1 U) of Taq DNA polimerase, recombinant (Invitrogen), e gli inneschi specifici per ogni gene (Tabella 4.1) (alla concentrazione finale 300 nM), 10 ng cDNA, e portato a volume con acqua MQ. Le reazioni di qPCR sono state effettuate sempre in triplice copia. Le condizioni di reazione usate sono: 1 ciclo di 10 min a 95°C, seguito da 30 cicli di 30 sec a 95°C, 45 sec a 57°C, 1.2 min a 72°C.

Tabella 4.1. Lista dei Primers usati per gli esperimenti di espressione genica sia negli esperimenti di bombardamento con neutroni e sia di migrazione simulata

Gene	Primer ID	Sequenza
<i>ARF1</i>	At-ARF1 Fw1	5'-ATGCCTGTGCTGGACCTCTTGTAAAC-3'
	At-ARF1 Bw1	5'-CCTCGGAAAATGTGCCTAAAATGCC-3'
<i>ARF2</i>	At-ARF2 Fw1	5'-CTCGTCGTCGGTATTCAAGCGTC-3'
	At-ARF2 Bw1	5'-ATCTGTTGTTCTGCCGCTGGTTCG-3'
<i>ARF19</i>	At-ARF19 Fw1	5'-CCTCCTGTGGGAAGTCTTGTGGTTTAC-3'
	At-ARF19 Bw1	5'-GCTCCAACCTGTGGTAAGCAAGTG-3'
<i>IAA3</i>	At-IAA3 Fw1	5'-AAACAGAGCTGAGGCTGGGATTA-3'
	At-IAA3 Bw1	5'-AGAAACCCGACAACCAAGCA-3'
<i>IAA6</i>	At-IAA6 Fw1	5'-TTCGATTGGGTCTTCCAGGAGATA-3'
	At-IAA6 Bw1	5'-ATCTTGCTGGAGACCAAAACCA-3'
<i>IAA7</i>	At-IAA7 Fw1	5'-AAGCAGTTGAGAGTCCTGCCAAAT-3'
	At-IAA7 Bw1	5'-CCGTCATATTGTTGATCATTGATGC-3'
<i>SAG12</i>	At-SAG12 Fw1	5'-GATGAAGGCAGTGGCACACCAACCG-3'
	At-SAG12 Bw1	5'-GACATCAATCCACACAAACATACACA-3'
<i>SAG13</i>	At-SAG13 Fw1	5'-CTGGTGGCTCTAAAGGCATCGGGTC-3'
	At-SAG13 Bw1	5'-CTTATGTTGTCGCTCGCCCATTCGC-3'
<i>CAB1</i>	At-CAB1 Fw1	5'-TGAAGGCTACAGAGTCGCAGGAA-3'
	At-CAB1 Bw1	5'-GCTCTCTTCTCCTCTCACACTCAC-3'
<i>RUB-1B</i>	At-RUB-1B Fw1	5'-CATCACAAAGCAATGGGGGAAGAG-3'
	At-RUB-1B Bw1	5'-AACCTTCAGTTTTTTCACCTTT-3'
<i>CAT1</i>	At-CAT1 Fw1	5'-CTGCTCTGGAAATCGTGAGAAGTGC-3'
	At-CAT1 Bw1	5'-AGAAACCAAACCGTAAGAGGAGCATA-3'
<i>CAT3</i>	At-CAT3 Fw1	5'-CACTCAGAGACATCGCCTTGGACCG-3'
	At-CAT3 Bw1	5'-CGTGGGTGAGACGTGGCTCCGATAG-3'
<i>FeSOD1</i>	At-FeSOD Fw1	5'-TCCAGAACCGAAGACCAGATTACAT-3'
	At-FeSOD Bw1	5'-CTTGACACACACAAAACGCACACAC-3'
<i>ACT8</i>	At-ACT8 Fw1	5'-ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-3'
	At-ACT8 Bw1	5'-TCCGAGTTTGAAGAGGCATC-3'
<i>18S</i>	At-18S Fw1	5'-CGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCAC-3'
	At-18S Bw1	5'-CACCCCTCCACACGAAATTCCACTC-3'
<i>TUA4</i>	At-TUA4 Fw1	5'-ACGCCCTTCGTCTTCTTCCCTGG-3'
	At-TUA4 Bw1	5'-CAATCTCTTCCCAATGGTGTAAATG-3'
<i>TUA6</i>	At-TUA6 Fw1	5'-AAACGCCCTTCGTCTTCTTCCCTGC-3'
	At-TUA6 Bw1	5'-CCAACAGTCTTGTACACAGGCATC-3'
<i>TUB2</i>	At-TUB2 Fw1	5'-CCCGAGGCTCGAAAAAACCTAAATC-3'
	At-TUB2 Bw1	5'-TCGATGCCGTGCTCGGCGC-3'

4.4 Set-up sperimentale per il trattamento con i neutroni

Le piante utilizzate negli esperimenti di esposizione ai neutroni sono state sia plantule di *Arabidopsis* di 15 giorni che piante adulte di 35 giorni (Ws, *Col*, *aux1*, *eir1*, *arf1-3* e *arf2-6*). I trattamenti sono stati realizzati presso i laboratori dell'Agenzia Nazionale per le Nuove tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA) di Frascati, utilizzando il Neutron Generator di Frascati (FNG). Questo strumento è capace di produrre neutroni utilizzando bersagli deuterati mediante la reazione di fusione $D(d,n)^3He$. Il generatore di neutroni utilizza un fascio di deutoni accelerato fino a 300 keV contro un bersaglio triziato per produrre una emissione semi-isotropa di neutroni da 14 MeV mediante la reazione di fusione $T(d,n)\alpha$. Il generatore è alloggiato all'interno di un grande bunker (11.5x12x9 m), ed il bersaglio da bombardare è posto a circa 4 m di distanza da pareti, pavimento e soffitto (figura 4.1). Un pannello di legno è stato posto perpendicolarmente rispetto alla direzione del tubo di accelerazione che produce i neutroni, in modo che la curva dell'iso-flusso possa raggiungere il pannello ed avere come centro il punto di intersezione tra il pannello stesso e l'asse orizzontale del tubo di accelerazione, con un fascio incidente di tipo conico, con al centro la dose più alta di neutroni. Le piante sono state disposte lungo tre circonferenze, ciascuna corrispondente a una dose diversa di neutroni totale: 30, 50 e 75 mGy. Durante ogni sessione di bombardamento l'ambiente è stato mantenuto al buio ad una temperatura di 23°C e con una umidità relativa del 60%, per un periodo ininterrotto di circa 3 ore a una velocità costante. Le dosi assorbite, in questa configurazione sperimentale, sono state calcolate utilizzando il Metodo Monte Carlo N-Particle codice di trasporto (MNCP). Le piante usate come controllo sono state alloggiate in una stanza, completamente protetta da ogni radiazioni di neutroni, e tenute alle stesse condizioni ambientali dei campioni irradiati. Dopo i trattamenti, tre campioni di cinque piante (controllo ed irradiati), per ciascun ecotipo, sono stati raccolti e conservati a -80°C per le successive analisi distruttive. Le foglie irradiate e di controllo sono state staccate dalla pianta e subito immerse in una soluzione RNALater (Sigma-Aldrich) e conservate per molecolari estrazione di acidi nucleici (RNA totale e DNA genomico). Per eseguire le indagini sugli effetti tardivi causati dai neutroni, sono state utilizzate piante di *Arabidopsis Col* e i mutanti *eir1*, *arf1-3* e *arf2-6* trasferite, dopo il trattamento, in camera di crescita, insieme ai corrispettivi controlli, per ulteriori 4 settimane. Dopo 20 giorni dal trattamento alcuni campioni di foglia di piante

irradiate e controlli sono stati raccolti e conservati a -80°C . Infine, al termine del periodo di recupero, sono state eseguite delle foto effettuate utilizzando una fotocamera digitale. Per ogni esperimento, i risultati che mostriamo rappresentano unicamente quelli ottenuti attraverso l'irradiazione di 50 mGy, perché non statisticamente differenti da quelli ottenuti dai campioni sottoposti a 30 e 75 mGy di neutroni.

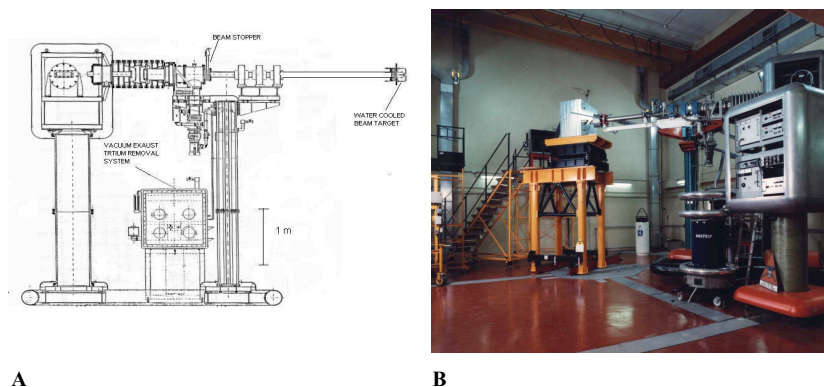


Figura 4.1. Sistema sperimentale utilizzato per bombardare le piante di *Arabidopsis* con neutroni. La distanza tra il Neutron Generator e le piante da trattare è stato calcolato per avere tre diverse dosi assorbite (~ 30 , 50, 76 mGy). Le piante sono state irradiate per ~ 3 ore al buio, alla temperatura di 23°C , e umidità relativa del 60%. Le piante usate come controllo sono alloggiate in una stanza separata, completamente protetta da radiazioni, tenute alle stesse condizioni sperimentali dei campioni irradiati. **A)** Schema rappresentativo del Frascati Neutron Generator (FNG). **B)** FNG è alloggiato all'interno di un grande bunker ($11.5 \times 12 \times 9 \text{ m}^3$) e il bersaglio da bombardare è posto a circa 4 m di distanza dalle pareti, pavimento e soffitto.

4.4.1 Misurazione della fluorescenza della clorofilla e misura della perossidazione lipidica di membrana (saggio TBARS)

Per valutare i danni all'apparato fotosintetico dopo il trattamento con i neutroni è stata misurata l'efficienza fotosintetica del Fotosistema II (PSII), utilizzando un fluorimetro portatile per la clorofilla MINI-PAM (Waltz, Effeltrich, Germania). La fluorescenza della clorofilla, è stata valutata come rapporto F_v/F_m . Le misure sono state effettuate su tutte le piante adulte di 35 giorni, prima e dopo l'irraggiamento neutronico, dopo 30 minuti di adattamento al buio.

La perossidazione dei lipidi di membrana è stata determinata misurando i contenuti delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (saggio TBARS), secondo il metodo

descritto da Heath e Packer (1968), basato sull'interazione della malonildialdeide (MDA) con l'acido tiobarbiturico (TBA) e il legame dei fosfolipidi di membrana danneggiati. Tre differenti repliche del saggio sono state effettuate utilizzando almeno tre piante per ciascun ecotipo wilde-type e mutante. Per ogni campione 100 mg di materiale fogliare è stato omogenizzato in 1.2 ml di acido tricloroacetico (TCA) 0,1% (w/v). Ogni campione omogenizzato è stato centrifugato a 12,000 rpm per 30 minuti. Dopo centrifuga, a 0.5 ml di supernatante è stato aggiunto 1 ml di TBA 0,5% (w/v) in 20% di TCA. La miscela è stata incubata in un bagno di acqua bollente (100°C) per 30 minuti, e poi rapidamente raffreddata in ghiaccio. Un'aliquota di ogni campione (trattati e rispettivi controlli) pari ad 1 ml è stato usato per effettuare le misure allo spettrofotometro. È stata misurata l'assorbanza a 532 nm, poi è stato sottratto il valore di assorbanza non-specifico a 600 nm. Per il calcolo del contenuto del complesso MDA-TBA è stato utilizzato il coefficiente di estinzione molare = 155,000.

4.5 Set-up sperimentale di microgravità simulata

Per gli esperimenti di microgravità simulata sono state utilizzate piante di *Arabidopsis* (vedere paragrafo 4.1). I trattamenti di microgravità simulata sono stati condotti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari dell'Università di Sassari, Italia. Tale Dipartimento è noto per possedere uno dei più moderni strumenti che simula l'assenza di gravità: la Random Positioning Machine (RPM) o clinostato tridimensionale (3D), utilizzato in questa tesi per la parte degli esperimenti riguardante la simulazione della microgravità. L'RPM è l'ultima generazione di clinostati, che segue il clinostato uni-assiale o bidimensionale, detto anche Fast Rotating Clinostat (FRC). Ciò che ha indotto la costruzione di dispositivi maggiormente idonei alla simulazione della microgravità è l'attendibilità dei clinostati uni-assiali a lenta e rapida rotazione, nel simulare l'assenza di peso. È stata così costruita l'RPM, perché capace di far variare la posizione del campione casualmente nelle tre dimensioni dello spazio.

L'RPM possiede due assi di rotazione perpendicolari tra loro. La rotazione ottenuta dai due motori è sotto il controllo di un programma appositamente realizzato e messo a punto dalla FOKKER SPACE. Il movimento sincronizzato dei due assi fa sì che la risultante dei vettori gravitazionali, cui è sottoposto il campione, tenda costantemente allo zero, annullando così gli effetti della gravità terrestre. L'RPM è costituita da due telai rotanti, indipendenti, e mossi da due cinghie collegate ai due motori fissati al telaio di supporto dell'apparecchiatura. Le capsule Petri nelle quali viene fatto crescere il materiale vegetale, sono inserite nel pannello di alloggio situato nel telaio interno che possiede dei fori, disposti a formare un quadrato, che permette di ancorare il materiale stesso, in modo tale che i campioni così sistemati siano più vicino al centro di rotazione del pannello, dove si raggiunge il massimo della microgravità. La velocità di rotazione dei telai è variabile da 30 a 360 rpm (60° s^{-1} , nel caso dei nostri esperimenti).

La validità del clinostato 3-D è stata valutata confrontando parametri strutturali riguardanti alcune fasi della crescita vegetativa di radici e rizomi di *Chara* dipendenti dal vettore gravità (morfogenetici) con quelli ottenuti in condizioni di reale microgravità. I parametri finora analizzati dimostrano che l'RPM è un valido strumento per simulare la microgravità che si aggira intorno a 10^{-3} - $10^{-2} g$.

4.5.1 *Analisi dei livelli di β -tubulina mediante Western-blot*

Le piantine sono state trasferite dalle piastre Petri in tubi eppendorf, lisate inizialmente per azione meccanica con mortaio e pestello in azoto liquido e in seguito mediante incubazione per 20 minuti a 4°C con appropriato buffer di lisi contenente Tris-HCl 30 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, PMSF Complete (Roche, inibitore proteasi) 1x (inibitore delle proteasi) 1 mM, NP40 0.1%, glicerolo 5%. Il lisato è stato centrifugato a 13,000 rpm per 15 minuti a 4°C e la concentrazione proteica del supernatante è stata valutata mediante il saggio Bradford.

Per ogni campione 10 μ g di estratto proteico è stato risospeso in Leammli sample buffer e bollito per 5 minuti prima di essere caricato su gel tris-glicina 12% in bis-acrilamide. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). La corsa elettroforetica è avvenuta a voltaggio costante con una precorsa a 100 V per 10 minuti al fine di favorire l'impaccamento delle bande nello stacking gel e poi a 170 V per circa 50 minuti allo scopo di indurre la separazione delle proteine nel running gel. Le proteine sono state trasferite a voltaggio costante di 90 V per 90 minuti su membrana di PVDF (Immobilon P Polyvinylidene Difluoride) la quale successivamente è stata incubata in tampone Phosphate-Buffered Saline (PBS) al 5% di Non-fat dry milk e 0.05% di Tween 20 O/N per bloccare i legami non specifici. Il giorno successivo la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario Monoclonal Anti- β -Tubulin Clone TUB 2.1 e Monoclonal Anti-GAPDH Clone 71.1 (SIGMA) per 1 h a temperatura ambiente rispettivamente alle diluizioni 1:400 e 1:20,000. Sono stati eseguiti 3 lavaggi sempre in tampone PBS al 5% di Non-fat dry milk e allo 0.05% di Tween-20 ed infine è stata incubata per un'ora con l'anticorpo secondario Anti-mouse coniugato con perossidasi (HRP) alla diluizione 1:2,000 (Invitrogen). Dopo i successivi 3 lavaggi in PBS e ddH₂O, le bande sono state evidenziate con metodo chemio luminescente, utilizzando ECL Chemiluminescent Reagent Kit (Invitrogen) ed esponendo la membrana ad una lastra fotografica Kodak® BioMax Light Film (Kodak). Per l'analisi densitometrica è stato utilizzato IMAGE J software. Pesi molecolari: 55 Kd β -TUBULINA, 37 Kd GAPDH.

4.5.2 *Saggio di vitalità cellulare in piante sottoposte a microgravità*

Per verificare i livelli di apoptosi delle cellule radicali di piante sottoposte alla microgravità simulata, è stato messo a punto un saggio colorimetrico, mediante l'uso di un

microscopio a fluorescenza, con lo ioduro di propidio. Lo ioduro di propidio è un colorante qui utilizzato per valutare la morte cellulare nelle radici primarie di *Arabidopsis*. Questo colorante è in grado di discriminare cellule morte da cellule vive all'interno del tessuto radicale di una plantula intera. Normalmente questo colorante è impermeabile alla membrana plasmatica e alla parete, ma se le cellule sono danneggiate, il colorante penetra all'interno generando una fluorescenza di colore rosso in seguito al legame con il nucleo (coniugazione PI-acido nucleico).

Plantule di 15 giorni di *Arabidopsis* (*Col*, *Ler*, *aux1* e *eir1*) sottoposte a microgravità simulata, per 3, 6 e 24 ore, insieme ai rispettivi controlli non trattati, sono state trasferite in una soluzione $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente per 2 minuti e rapidamente lavate in acqua sterile. Successivamente le piante sono trasferite su vetrini da microscopia e analizzate al microscopio a fluorescenza (ZEISS, Germania). Il PI ha una emissione $\text{Ex}_{\text{max}} = 536\text{-}617 \text{ nm}$.

4.6 Isolamento e caratterizzazione di un nuovo mutante parzialmente agravitropico: *rha1*

4.6.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita per gli esperimenti di caratterizzazione del mutante *rha1*

I semi mutagenizzati con T-DNA della collezione Feldmann-Du Pont come i semi di ecotipo Ws (Wassilewskija) e i mutanti *aux1-7*, *axr1-3*, *eir1*, e *axr2* sono stati forniti dalla Nottingham *Arabidopsis thaliana* Stock Centre (NASC, Nottingham, UK). I semi di *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ecotipo Ws e i mutanti *rgr1* e *wav6* sono stati forniti dal laboratorio del Dr D. Soll (Yale University, New Haven, CT, USA). La sterilizzazione, la semina in piastra e la crescita in terra sono state già descritte nel paragrafo 4.1.1.

4.6.2 Selezione dei mutanti

Quarantotto dei 49 pools delle 100 linee che costituiscono l'originale collezione T-DNA di Feldmann-Du Pont, per un totale di 20,758 individui, sono stati sottoposti a un primo screening. Questo ha comportato l'esame visivo della direzione di crescita della radice (slanting e gravitropismo). I semi sono germinati e coltivati in piastre Petri contenenti agar e Kanamicina (50 mg L⁻¹), posizionate in senso orizzontale. Le piastre sono state mantenute per 3 settimane inclinate di 60° rispetto al piano orizzontale per controllare sia il waving (andamento delle radice le quali durante la crescita descrivono delle onde, figura 4.2), sia per lo slanting (asse di crescita deviato dalla verticale), e qualsiasi altra deviazione rispetto alla verticale.

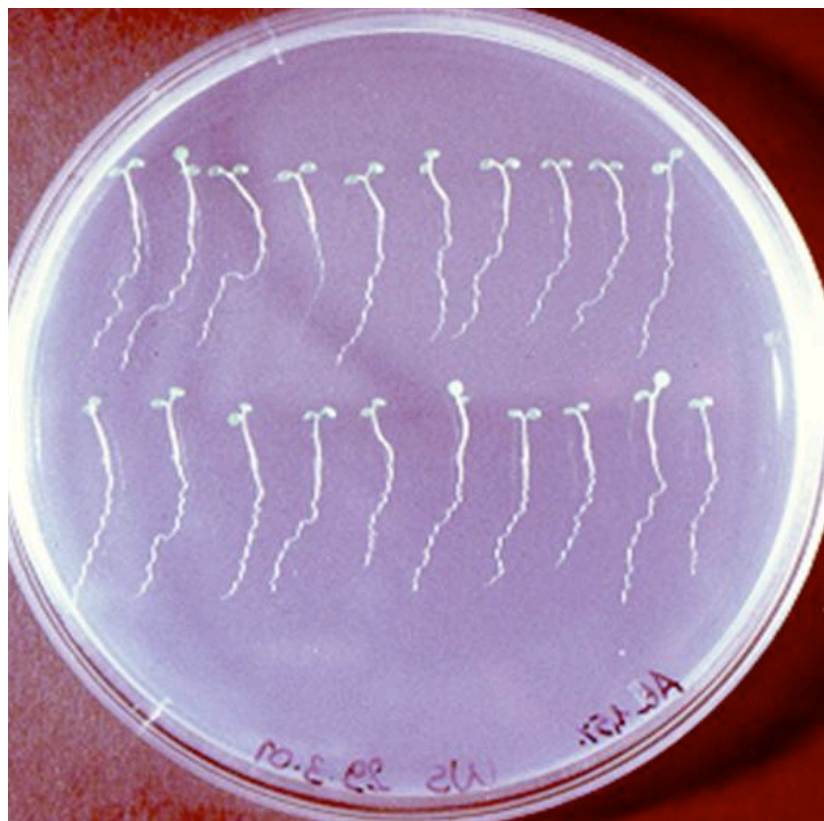


Figura 4.2. Piante di *Arabidopsis thaliana* wilde-type *Ws* di 15 giorni di età. Le plantule sono coltivate in piastre Petri contenenti agar 1.5%, saccarosio 1% e terreno basale MS 0.5 X, arricchito con vitamine Gamborg's (Sigma-Aldrich), portato a pH 5.7. Queste piante, cresciute inclinando la piastre di 60°, producono delle onde (waves) e uno slanting (andamento obliquo rispetto all'asse verticale) di tipo destrorso della radice in direzione del vettore gravità.

Le piante resistenti alla kanamicina, e che mostrano un anomalo modello di crescita della radice, sono state selezionate, e cresciute fino a raggiungere la maturità. La seconda generazione di piante è stata sottoposta ad un nuovo screening con la stessa procedura, crescendo però le piante su un terreno di cultura privo di kanamicina e gli individui risultanti sono stati confrontati con i wilde-type come controllo. Da questo screening sono comparsi dei mutanti che presentavano un'anomalia nella normale crescita ed allungamento della radice, per la caratteristica di esibire un ridotto o invertito slanting destrorso della radice.

4.6.3 Caratterizzazione dei mutanti

La caratterizzazione dei mutanti sono state eseguite con uno stereomicroscopio, attraverso la misurazione della lunghezza delle radici in piante di 6 giorni, numero delle

radici laterale in piante di 15 giorni, lunghezza dei cotiledoni in plantule di 8 giorni, lunghezza e distanza tra silique e gambo delle silique eseguito al momento della piena maturazione delle piante mutanti, e cioè a 35 giorni. Le piante sono state coltivate in una camera di crescita (come descritto nel paragrafo 4.1.1).

4.6.4 *Determinazione dello slanting e del gravitropismo*

Lo slanting delle radici è stato misurato su plantule coltivate su terreno MS 1.5% mantenendo, in un primo momento, la piastra Petri in verticale per 3 giorni e poi inclinando tali piastre per ulteriori 7 giorni a 60° rispetto la verticale, per indurre lo slanting (come descritto in Simmons *et al.* 1995). Lo slanting è stato valutato misurando la deviazione delle punte delle radici rispetto una linea verticale tracciata in modo parallelo al vettore gravitazionale. Per quantificare la risposta gravitropica delle radici, piante *rhal* sono state coltivate in piastre Petri, contenute agar all'1.5%, mantenute in posizione verticale per un periodo iniziale di 10 giorni; poi le piastre sono ruotate di 90° in senso antiorario, e mantenute in questa posizione per 24 ore. Durante queste 24 ore ogni due ore sono state scattate delle immagini digitali. Dalle fotografie scattate sono stati misurati gli angoli di deviazione della radice utilizzando il programma di analisi di immagini Scion (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

4.6.5 *Crescita delle piante su diversi substrati e analisi della risposta*

Per eseguire le analisi della risposta a diversi substrati durante la crescita delle piante, semi *Ws*, *rhal* e *rhal* complementato sono stati fatti germinare in senso verticale su piastre Petri per 5 giorni. Successivamente, piantine delle stesse dimensioni sono state trasferite su un nuovo terreno di coltura contenente differenti sostanze, e coltivate per altre 7 giorni al buio. L'allungamento della radice primaria è stato misurato alla fine di questi 7 giorni e le piantine sono state fotografate e quindi analizzate con il programma Scion, effettuando le misurazioni della crescita anche dei rispettivi controlli. I substrati utilizzando per verificare le differenze risposte di crescita sono: l'acido 3-indoloacetico (IAA); acido naftalenacetico (NAA); acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D); acido 2,3,5-tri-iodobenzoico (TIBA); e acido naftalenftalamico (NPA), somministrati al mezzo di coltura disciolti in una soluzione di alcol etilico. Infine, l'etilene è stato somministrato

come suo precursore, l'acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico (ACC), disciolto in acqua.

4.6.6 Clonaggio e sequenziamento del gene *RHA1* mediante TAIL-PCR

La tecnica TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) è stata utilizzata per clonare il gene *RHA1*. Questa tecnica è stata applicata secondo la metodologia usata da Liu *et al.* (1995). Sono stati utilizzati come primer (tabella 4.2), tre nested oligonucleotidi complementari alle sequenze del T-DNA left-border (TL-1, TL-2, e TL-3) e uno degenerato (DEG-2). Tutte le sequenze ottenute sono state sequenziate presso i laboratori Genelab (ENEA, Casaccia, Roma, Italia).

4.6.7 Estrazione dell'RNA totale e analisi RT-PCR

L'RNA totale, utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen), e la sintesi del cDNA, sono stati preparati come descritto nel paragrafo 4.1.3. Due microlitri di liquido di reazione sono stati utilizzati per ciascuna reazione di PCR. La PCR è stata effettuata in condizioni standard utilizzando 10 µM dei primers specifici per il gene (*Rha1F5* e *Rha1R3*) effettuando il seguente programma di 30 cicli di 95°C per 45 s, 50-62°C per 30 s, e 72°C per 30-60 s in un apparecchio GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). I prodotti di PCR sono separati su gel di agarosio all'1% e rivelato attraverso colorazione con etidio bromuro. I prodotti di RT-PCR sono stati sequenziati da GeneLab (ENEA-Casaccia, Roma, Italia). Ogni esperimento è stato eseguito sia su mutanti *rha1* che su wilde-type Ws. *Rha1R3* e *Rha1F5* sono stati utilizzati come primer per controllare l'espressione del gene *RHA1*. I livelli di espressione di RT-PCR sono stati normalizzati con quelli del gene actina 8 (*ACT8*), usando i primer senso AtACT8-Fw (5'-ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-3') e antisenso AtACT8-Bw (5'-TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC-3'). La determinazione della intensità ottica della bande corrispondi all'espressione genica è stata calcolata mediante Kodak Digital Science 1D software (Kodak), corrisponde al rapporto tra l'intensità media di ogni banda rispetto all'intensità media della banda corrispondente a quella dell'actina 8. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato.

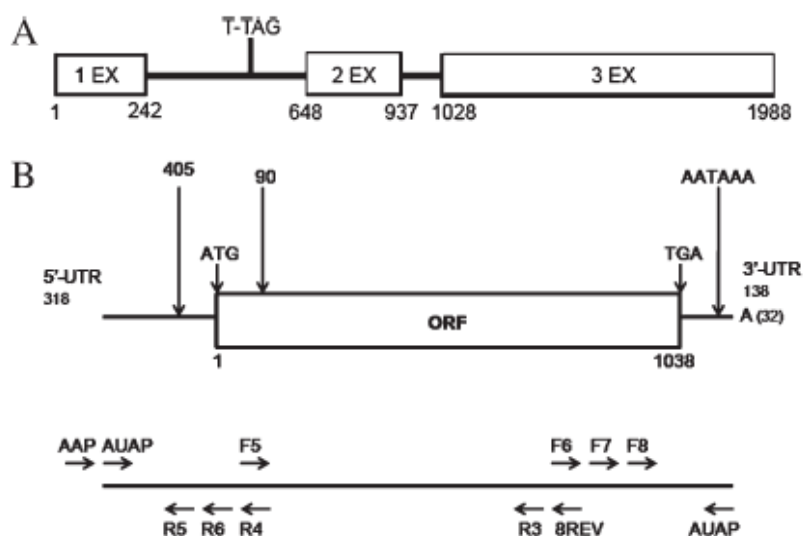


Figura 4.3. Illustrazione della mutazione *rha1* causata dall'inserimento nel primo introne di un T-DNA. A) Struttura del gene *RHA1*. I rettangoli bianchi indicano gli esoni, le linee continue gli introni. Viene inoltre indicata la posizione del tag T-DNA. **B)** Struttura del mRNA del gene *RHA1*. Le frecce lunghe verticali indicano le posizioni degli introni. Le frecce orizzontali indicano la posizione dei primers utilizzati nel sequenziamento del mRNA. In basso confronto tra il cDNA con il DNA del gene che ha evidenziato che il primo esone è trascritto, ma non tradotto.

Tabella 4.2. Lista dei Primers usati per gli esperimenti di espressione genica per gli esperimenti di caratterizzazione del mutante *rha1*

Nome Primer	Sequenza
AAP	5'-GGCCACAGCGTCGACTAGTACT-3'
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
DEG-2	5'-(AGCT)TCGA(GC)T(AT)(GC)G(AT)GTT-3'
TL-1	5'-CAGCCAATTTTAGACAAGTATCA-3'
TL-2	5'-AACTGTAATGACTCCGCGCAATA-3'
TL-3	5'-TCTGGGAATGGCGTAACAAAGGC-3'
AtRHA1 F1	5'-AGCTTGAATGGAGGCAGCTCAAGA-3'
AtRHA1 F3	5'-AGCTTTGAGACTACATAATGCATATC-3'
AtRHA1 F5	5'-TAATGGAGGTTCAAGCTCACTTCC-3'
AtRHA1 F7	5'-GCGTTAACGATGACTTTTGGAAC-3'
AtRHA1 R1	5'-AAGCATCAAGAAGCACTCGTCGCA-3'
AtRHA1 R2	5'-CCATGGGTTGTGTCTAAAAGACGG-3'
AtRHA1 R3	5'-TCCCAAACGTTAGCGAAGATTC-3'
AtRHA1 R4	5'-ACCTTAACCACTTCGAATCCAAG-3'
AtRHA1 R5	5'-TGAACCTCCATTATTTTCATCCA-3'
AtRHA1 R6	5'-GGTCTCTTGAAAACCTCTGCTGGAT-3'

4.6.8 Estrazione DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico da pianta è stato effettuato seguendo il protocollo modificato Shure *et al.* 1986. 2 g di tessuto per campione sono stati congelati in azoto liquido e macinati con mortaio e pestello fino ad ottenere una polvere molto fine, che è stata trasferita in un tubo da centrifuga sterile contenente 6 ml di buffer di estrazione con urea (84 g di urea, 12.5 ml di NaCl 5M, 10 ml di Tris-HCl 1M pH 8.0, 8 ml di EDTA 0.5 M pH 8.0, 10 ml di N-Sarcosina al 20%). È stato poi aggiunto un isovolume di fenolo:cloroformio 1:1, agitato e lasciato in incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo aver centrifugato il campione a 8,000 rpm per 10 minuti a 4°C, è stata recuperata la fase superiore contenente DNA, che è stato precipitato con l'aggiunta di 6 ml di isopropanolo. Per facilitare la precipitazione del DNA il campione è stato incubato 10 minuti a -20°C. Infine, il campione è stato centrifugato a 10,000 rpm per 20 minuti a 4°C, ed il pellet è stato quindi lavato con etanolo al 70% ed essicato. Infine, il DNA è stato risospeso in Tris-EDTA 1x sterile.

4.6.9 Complementazione del mutante rha1

Un frammento di 4836 bp corrispondente al gene *RHA1* e al suo promotore è stato amplificato mediante PCR, usando il DNA genomico di *Arabidopsis thaliana* come template, utilizzando come inneschi gli oligonucleotidi RHA1 F1 e RHA1 R1, e la polimerasi ad alta fedeltà rTth DNA polimerasi XL (Perkin Elmer). Il frammento così ottenuto è stato clonato in pGEM-T Easy Vector (Promega) e sequenziato. L'inserto è stato recuperato, effettuando una digestione del vettore con gli Enzimi di restrizione *ApaI-SacI*, e clonato in un vettore binario pCAMBIA1300 che a sua volta è stato precedentemente digerito con *SmaI*.

Il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) trasformato con il vettore pCAMBIA1300::At*RHA1* è stato cresciuto fino a fase stazionaria (lettura spettrofotometro di $OD_{600} \geq 2$) in un terreno di coltura liquido a 28°C, in agitazione a 200 rpm in LB (10 g triptone, 5 g di estratto di lievito, 5 g NaCl) con aggiunta di kanamicina (50 mg l⁻¹), rifampicina (50 mg l⁻¹), e solfato di gentamicina (25 mg l⁻¹). Raggiunta tale concentrazione, la coltura è stata centrifugata a 5,000 rpm per 10 minuti ed i batteri risospesi in 1 l di liquido di infiltrazione (20 g Lennox L Broth Base, SIGMA, 50 g di Saccarosio, 1 mg ml⁻¹ benzilaminopurina, pH soluzione 5.7), in modo da ottenere una concentrazione finale di

cellule di $OD_{600} = 0.8$. Piante *rha1* sono state rovesciate ed immerse in questo terreno di cultura liquido contenente i batteri, facendo attenzione a non immergere la rosetta. L'inoculazione è stata effettuata in condizioni di vuoto applicato per 8 minuti ad una pressione di 600 mmHg, per permettere alla sospensione batterica di penetrare efficacemente nella pianta. Dopo l'inoculazione, le piante sono state lasciate in camera di crescita a bassa luce, coperte con plastica trasparente per mantenere alto il livello di umidità. Poi, la plastica è stata rimossa, e le piante sono state riportate alle normali condizioni di crescita. Per selezionare le piante trasformate, i semi (generazione T0) sono stati sterilizzati e seminati in piastre contenente terreno contenente igromicina B (24 mg l⁻¹). Le silique delle piante trasformate sono state raccolte individualmente in tubi da 2 ml. La selezione è stata ripetuta fino ad ottenere una generazione trasformata T4, le cui piante sono state utilizzate per gli esperimenti di questo lavoro.

4.6.10 Saggio istochimico GUS

Il saggio GUS (Saggio di attività β -glucuronidasi) è una tecnica utile per indagare l'attività di un promotore in termini di espressione di un gene sotto il controllo del suo promotore, permettendo inoltre di localizzare l'attività del gene tramite una colorazione differenziale. Il costrutto di *pRHA1::GUS* è stato realizzato amplificando mediante PCR (primer AtRHA1 F3 e R2) un frammento di 1164 bp dal DNA genomico di *Arabidopsis thaliana*, contenente la regione del promotore di *RHA1*. Il DNA è stato clonato tra i siti *HindIII* ed *NcoI* del pGEMT-Easy Vector, e successivamente subclonato nel sito *HindIII* e *NcoI* del vettore binario pCAMBIA3301. Il vettore è stato poi introdotto nel ceppo di *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) mediante elettroporazione. Le piante selvatiche di *Arabidopsis* ecotipo Wassilewskija, sono state trasformate per infiltrazione sotto vuoto (Bechthold *et al.*, 1998), come descritto nel paragrafo 4.6.9. Le piante omozigoti, della generazione T3, sono state identificate tramite analisi di segregazione e queste ultime piante sono state utilizzate per la colorazione GUS. Per tutti gli esperimenti, quattro linee indipendenti trasformate sono state utilizzate. Le piantine contenenti il costrutto *pRHA1::GUS* sono state coltivate su piastre di agar 1.5%, per 3 giorni in camera di crescita. Quattro piastre contenenti le piantine sono state ruotate di 90° in senso antiorario rispetto alla verticale e fatte crescere per ulteriori 3 giorni (per produrre una gravistimolazione); altre quattro piastre sono state poste su di un clinostato 2-D per 6 ore a

60 s⁻¹; ulteriori quattro piastre sono state preparate con un terreno contenente auxine (IAA, NAA, o 2,4-D) e ACC ad una concentrazione di 10⁻⁵ M, e cresciute per ulteriori 3 giorni. Dopo tali trattamenti le piante sono state trasferite in piastre MultiWell™ da 24 pozzetti, nei quali è stato aggiunto 1 ml di soluzione X-gluc (0.1 M tampone NaPO₄ pH 7.0, 0.5 mM ferrocianuro di potassio, 0.5 mM ferricianuro di potassio 10 mM NaEDTA pH 8.0, e 1 mg ml⁻¹ X-glucuronide), e incubate al buio a 37°C O/N. Successivamente, le piante sono state lavate con etanolo al 70%, fino a completa decolorazione e fuoriuscita della clorofilla. Le plantule sono state risospese, al momento dell'analisi al microscopio, in glicerolo al 50% e quindi trasferite singolarmente su vetrini ed osservate al microscopio.

L'analisi microscopia è stato eseguita con uno stereomicroscopio Zeiss (Jena, Germania). Le immagini sono state acquisite utilizzando un apparecchio digitale Kodak Science, e trasferite ad un computer in formato TIFF ed elaborate con il programma Adobe Photoshop 8.0 CS2 (Mountain View, CA, USA). Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte, con risultati simili.

SECONDA PARTE

V

Simulazione dell'ambiente spaziale: effetto della radiazione neutronica

Nell'ampio spettro delle radiazioni presenti nello spazio, i neutroni, per la loro natura di particelle prive di carica elettrica, rappresentano un serio problema sia per la salute degli astronauti che per ogni altro organismo, a causa della facilità con la quale essi attraversano le barriere e le schermature producendo infine una vasta gamma di effetti negativi. Tuttavia, finora nessun significativo sistema di protezione è stato trovato per schermare i neutroni (Benton & Benton 2001; Vanhavere *et al.* 2008).

In letteratura viene riportato come le piante esposte alle radiazioni ionizzanti presentano alterazioni in alcuni processi fisiologici quali la respirazione, l'emissione di etilene, l'accumulo di saccarosio e la fotosintesi (Wada *et al.* 1998; Cho *et al.* 2000; Kim *et al.* 2005; Nagata *et al.* 2005). Viceversa, poco è noto sull'effetto delle radiazioni non-ionizzanti (Todd, 2001; Tim *et al.* 2007). In particolare, riguardo alla letteratura scientifica sulla specie vegetale *Arabidopsis thaliana*, è stata riportata una serie di analisi su larga scala sulla variazione dell'espressione genica dopo irraggiamento con agenti ionizzanti (Kranz *et al.* 1994; Nagata *et al.* 2005; Sahr *et al.* 2005). In questi esperimenti è stato dimostrato che la maggior parte dei geni con alterata espressione erano coinvolti nella crescita e divisione cellulare, nello sviluppo, nella trasduzione del segnale, come nelle risposte a condizioni di stress. In aggiunta, è stato mostrato come alte dosi di radiazioni inducano sia l'attivazione di geni coinvolti nella biosintesi di enzimi responsabili del

bilanciamento tra detossificazione e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Miller *et al.* 1985; Nagata *et al.* 1999), che a loro volta causano un incremento della perossidazione di proteine e lipidi di membrana (Landry *et al.* 1995; Mittler 2002, 2004; Kim *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2006), come anche specifici cambiamenti morfologici nella pianta (Hectors *et al.* 2007). Sulla base dei dati attualmente disponibili, possiamo aspettarci che lo studio dell'effetto delle radiazioni sulle piante ci conduca ad una migliore conoscenza dei meccanismi che inducono stress (Wang *et al.* 2003), come sull'adozione delle corrette contromisure.

In questo lavoro, l'attenzione è stata concentrata sullo studio dell'effetto della radiazione neutronica su quei geni attivati dal fitormone auxina, che controlla in larga misura i processi morfogenetici nelle piante (Woodward & Bartel 2005), e, allo stesso tempo, sui geni coinvolti nell'attivazione dei sistemi di difesa da stress e della senescenza. Per superare uno stress le piante hanno evoluto sistemi di difesa altamente efficienti, coinvolgendo risposte sia enzimatiche che non-enzimatiche. Sebbene antiossidanti lipofili (tocoferolo e carotenoidi) siano attivi nelle membrane cellulari, nel percorso enzimatico di detossificazione delle ROS la superossido dismutasi (SOD) converte O_2^- direttamente in perossido di idrogeno (H_2O_2), mentre enzimi come le catalasi (CAT) detossificano l'eccesso di H_2O_2 in acqua ed ossigeno (O_2) (Corpas *et al.* 1999; Zimmermann *et al.* 2006; Du *et al.* 2008). Il ruolo delle ROS nella biologia nei fenomeni di stress è di complessa spiegazione, ma appaiono essere coinvolti nel danno ossidativo, nonché potrebbero funzionare come secondo messaggero (Miller 2008). In generale, lo stato ossidativo delle cellule vegetali è elevato durante la senescenza: il livello delle ROS è oltre la soglia di tossicità, l'attività di molti enzimi antiossidanti è ridotta (Zimmermann *et al.* 2006), ed il livello di perossidazione dei lipidi di membrana è elevato (Vanacker *et al.* 2006). Quale sia l'effetto della radiazione neutronica, somministrata a tre differenti dosi, sul metabolismo dell'auxina, sulla senescenza e sulle performances fisiologiche di piante di *Arabidopsis*, sarà argomento trattato nei successivi paragrafi di questo capitolo. Gli esperimenti di bombardamento con neutroni sono stati eseguiti utilizzando il Neutron Generator di Frascati (NGF, figura 5.1, descritto in materiali e metodi).

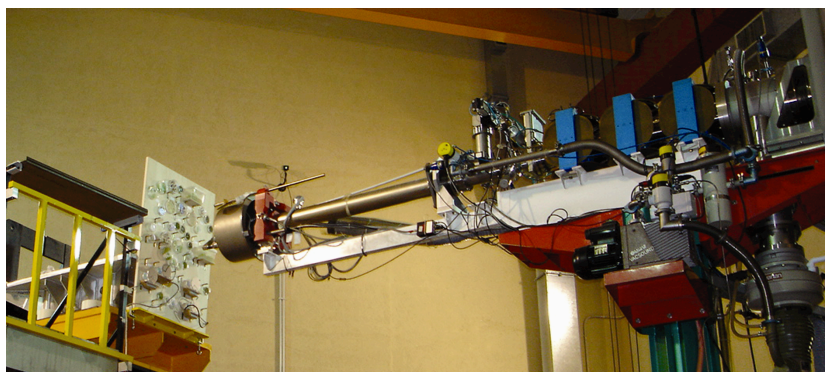


Figura 5.1. Sistema sperimentale utilizzato per l'esposizione delle piante di *Arabidopsis* ai neutroni. La distanza tra il Neutron Generator di Frascati (NGF) e le piante da trattare è stato calcolato per avere tre diverse dosi assorbite (~30, 50, 76 mGy). Le piante sono state irradiate per ~3 ore al buio, alla temperatura di 23°C, alla umidità relativa del 60%. Le piante usate come controllo sono alloggiate in una stanza separata, completamente protetta da radiazioni, tenute alle stesse condizioni sperimentali dei campioni irradiati. FNG è alloggiato all'interno di un grande bunker (11.5 x 12 x 9 m) e il bersaglio da bombardare è posto a circa 4 m di distanza dalle pareti, pavimento e soffitto.

5.1 Effetto rapido dell'esposizione alla radiazione neutronica di piante di *Arabidopsis thaliana* wild-type e mutate nel trasporto auxinico

L'effetto dei neutroni sulla senescenza in pianta è stato studiato sottoponendo plantule (di 15 giorni) e piante mature (di 35 giorni) di due ecotipi selvatici (*Col* e *Ws*), e due mutanti del trasporto auxinico (*aux1* e *eir1*) di *Arabidopsis thaliana* al bombardamento con dosi differenti di radiazione neutronica: 30, 50 e 75 mGy presso il Generatore di Neutroni di Frascati (FNG), Frascati, Roma, Italia, per tre ore. Il trattamento è stato replicato, con le stesse condizioni sperimentali, cinque volte, in date differenti (per maggiori dettagli vedere materiali e metodi). In primo luogo, è stato studiato l'effetto precoce dei neutroni, in particolare sull'espressione di specifici geni. Il profilo di espressione dei geni analizzati (di cui riportiamo solo l'effetto alla dose di 50 mGy, in quanto i trattamenti con le altre due dosi utilizzate hanno mostrato gli stessi risultati) possono essere suddivisi in quattro gruppi: I) geni connessi all'auxina, quali *ARF1*, *ARF2*, *ARF19*, *AUX/IAA3*, *AUX/IAA6*, *AUX/IAA7*, *AUX1*, *EIR1/PIN2*; II) geni connessi alla senescenza come *SAG12*, *SAG13*; III) geni relativi alla risposta a stress ossidativo come *CAT1*, *CAT3*, *FeSOD1*; IV) connessi all'apparato foto-sintetico quali *CAB1* e *RUB-1B*.

5.1.1 Effetto dei neutroni sui geni coinvolti nel metabolismo dell'auxina

La scelta di focalizzare lo studio degli effetti provocati da neutroni sui geni connessi all'auxina è stata fatta in considerazione del fondamentale ruolo giocato da questo ormone nella morfogenesi, quanto nel metabolismo delle piante (Wilmoth *et al.* 2005). Tre geni *ARF* sono stati scelti tra i più significativi i geni *ARF1*, *ARF2*, e *ARF19*. Recenti studi hanno rivelato il loro coinvolgimento in vari aspetti dello sviluppo e della fisiologia delle piante (Liscum & Reed 2002; Okushima *et al.* 2005a; b). Sono stati scelti anche tre dei più significativi geni *AUX/IAA* cioè *AUX/IAA3*, *AUX/IAA6* e *AUX/IAA7* (Dharmashiri & Estelle 2004), i cui mutanti sono rispettivamente *shy1* e *shy2*, per short hypocotyl 1 e 2 (Tian & Reed 1999), e *axr2*, per auxin resistant 2 (Nagpal *et al.* 2000).

Dopo trattamento con neutroni, è stata osservata una inibizione dell'espressione genica dei fattori di risposta all'auxina *ARF1*, *ARF2* e *ARF19*, nel wild-type (figura 5.2a), come anche per i geni attivati dall'auxina *AUX/IAA3*, *AUX/IAA6*, con l'eccezione di *AUX/IAA7* che mostrava una forte induzione (figura 5.2b).

Al contrario, una diversa risposta è stata osservata nel mutante *aux1*, il cui gene mutato è stato dimostrato codificare per un trasportatore di ingresso dell'auxina nelle cellule (Bennet *et al.* 1996; Marchant *et al.* 1999). Infatti, in *aux1* tutti i fattori di risposta dell'auxina analizzati (*ARF1*, *ARF2* e *ARF19*) venivano indotti dai neutroni (figura 5.2c), mentre per quanto riguarda i geni *AUX/IAA*, solo *AUX/IAA7* era chiaramente indotto dopo il trattamento (figura 5.2d). Il secondo mutante di *Arabidopsis* sul quale è stato studiato l'effetto della radiazione neutronica è *eir1/pin2/agr1/wav6*. Questo è considerato un mutante di un trasportatore in efflusso dell'auxina dalle cellule (Müller *et al.* 1998). Analogamente ad *aux1*, il mutante *eir1* ha mostrato una induzione dei fattori di risposta dell'auxina *ARF1*, *ARF2* e *ARF19* (figura 5.2e), mentre *AUX/IAA7* mostrava una inibizione dopo trattamento con neutroni (figura 5.2f).

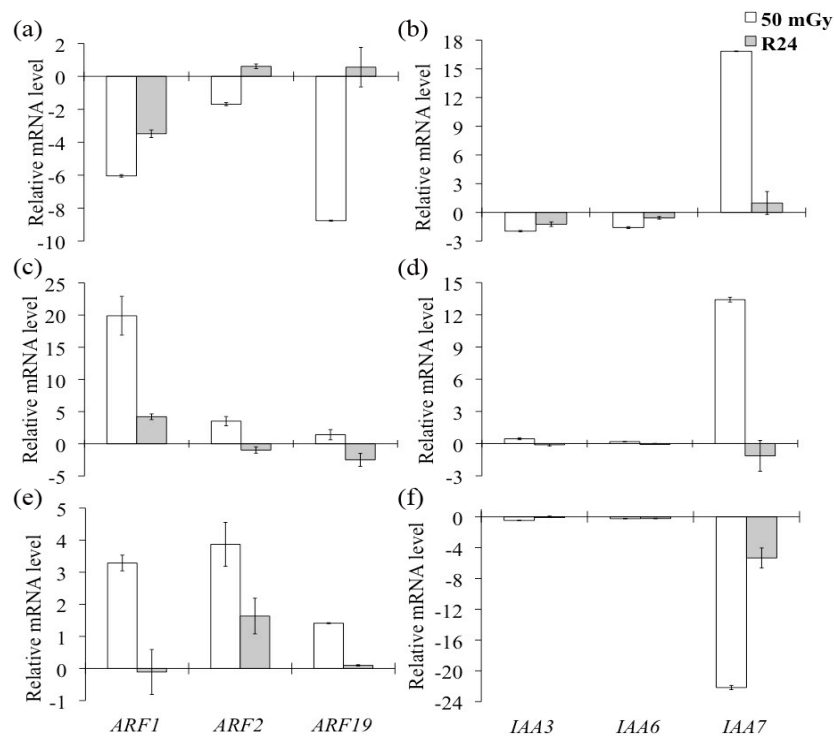


Figura 5.2. Effetto dei neutroni sui geni coinvolti nel metabolismo dell'auxina.

Profilo di espressione dei geni che codificano i fattori di risposta all'auxina (*ARF1*, 3, 19), e dei geni attivati dall'auxina (*AUX/IAA3*, 6, 7); (a) e (b) piante di 35 giorni wild-type Col; piante mutate nel trasporto auxinico: *aux1* (c) e (d), *eir1* (e) e (f). L'analisi di espressione è stata effettuata tramite real time qPCR, dopo 1 ora dal trattamento a tre differenti dosi: 30, 50 e 75 mGy, e dopo 24 ore di recupero. Qui sono riportati solo i dati ottenuti a 50 mGy. I relativi livelli di messaggero sono espressi in Log₂, normalizzati rispetto al gene dell'actina 8 (ACT8) e calibrati rispetto alle piante controllo non trattate (= 0). Le barre rappresentano medie ± SD (n = 4-7). Note: **50** = 50 mGy di neutroni; **R24** = 24 ore di recupero dopo il trattamento.

5.1.2 Risposta dei geni coinvolti nella senescenza e nella difesa contro gli stress ossidativi

I geni *SAG12* e *SAG13* ritenuti coinvolti nel processo di senescenza fogliare, erano significativamente sovra-espressi a livello trascrizionale dopo trattamento con neutroni nelle piante wild-type (figura 5.3a), mentre nel mutante *aux1* erano sotto-regolati (specialmente il gene *SAG13*) (figura 5.3b). Tuttavia, nel mutante *eir1* il gene *SAG13* era sovra-regolato, rispetto al proprio controllo NT (figura 5.3c). Questa ricerca è stata poi estesa ai geni coinvolti nella risposta agli stress ossidativi: *CAT1*, *CAT3* e *FeSOD1*, che mostravano una notevole sovra-espressione, rispetto al NT, nel wild-type (figura 5.3d) e nel mutante *eir1* (figura 5.3f). Al contrario nel mutante *aux1* tutti i geni considerati sono stati inibiti dal trattamento con neutroni (figura 5.3e).

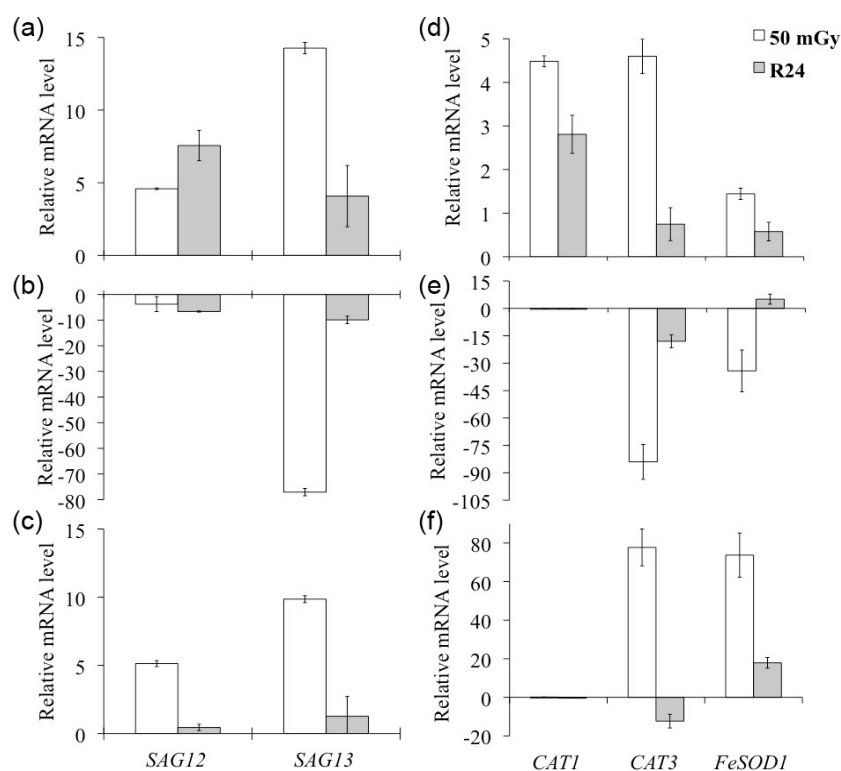


Figura 5.3. Effetto dei neutroni sui geni coinvolti nello stress ossidativo e attivati da senescenza. Profilo di espressione dei geni attivati da senescenza (*SAG12* e *SAG13*) in piante di *Arabidopsis* mature sottoposte a bombardamento con neutroni, wild-type Col (a), *aux1* (b), e *eir1* (c) e dei geni legati allo stress ossidativo (*CAT1*, *CAT3* e *FeSOD1*) in piante wild-type Col (d), *aux1* (e), e *eir1* (f). L'analisi di espressione è stata effettuata tramite real time qPCR, dopo 1 ora dal trattamento a tre differenti dosi: 30, 50 e 76 mGy, e dopo 24 ore di recupero (barre grigie). In figura sono riportati solo i dati ottenuti a 50 mGy (barre bianche). I relativi livelli di messaggero sono espressi come in figura 6.2. Note: **50** = 50 mGy di neutroni; **R24** = 24 ore di recupero dopo il trattamento.

5.1.3 Controllo dello stato fisiologico e biochimico delle piante dopo trattamento con neutroni

Per studiare l'effetto delle radiazioni neutroniche, in aggiunta all'analisi di espressione dell'mRNA trascritto, sul processo generale di senescenza, sono stati messi a punto differenti saggi biochimici su foglie di piante mature wild-type *Col*. In particolare, sono stati indagati: lo stato dei lipidi di membrana, attraverso la misura del livello delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (saggio TBARS); e l'efficienza del fotosistema II (PSII). Piante wild-type mostravano un incremento dei livelli di TBARS dopo il trattamento con una dose di 50 mGy di neutroni, rispetto ai controlli NT (figura 5.3a). D'altra parte, misurazioni della fluorescenza della clorofilla (data come rapporto Fv/Fm), su foglie wild-type mostrava una significativa riduzione (ca 15%), se comparato con quello osservato nei controlli (figura 5.4b). In aggiunta, un'alterazione dell'apparato fotosintetico neutroni-indotto è anche supportata dall'inibizione trascrizionale dei geni *CAB1* e *RUB-1B* (figura 5.4c). Le misure di questi parametri effettuate dopo 24 ore di recupero in camera di crescita hanno evidenziato una sostanziale ripresa, almeno a livello fisiologico, dall'esposizione a 50 mGy di neutroni (figura 5.4a,b,c). Questi risultati suggeriscono che piante wild-type di *Arabidopsis* sono colpite negativamente dalla radiazione neutronica, sia a livello biochimico che fisiologico, e che i neutroni sono in grado di indurre danni anche a dosi relativamente basse.

Un'analisi dello stato fisiologico dopo trattamento con neutroni è stato effettuato anche su due mutanti nel trasporto auxinico, *aux1* ed *eir1*. Il dato più interessante che ne emerge è sicuramente la chiara differenza di risposta tra i due mutanti, almeno nei parametri misurati. Infatti, il mutante *eir1* mostrava un significativo incremento dei livelli di TBARS, dopo irraggiamento con 50 mGy di neutroni, come anche una forte riduzione del rapporto Fv/Fm, ed infine una sotto-regolazione dell'espressione trascrizionale dei geni *CAB1* e *RUB-1B*, mostrando una risposta del tutto simile a quella osservata in piante wild-type *Col*. Tuttavia, il mutante *aux1* mostrava una risposta fisiologica ai neutroni decisamente differente, se paragonata a quella non solo del wild-type, ma anche di quella dell'altro mutante nel trasporto auxinico (*eir1*). I neutroni non inducevano infatti, in *aux1*, alterazioni significative nei livelli di TBARS (figura 5.4a) oppure della fluorescenza della clorofilla (figura 5.4b), mostrando, comunque, una certa induzione (e non inibizione come

osservato in wild-type *Col* ed *eir1*) dei livelli trascrizionali del gene *CAB1*, e solo parziale di *RUB-1B* (figura 5.5c).

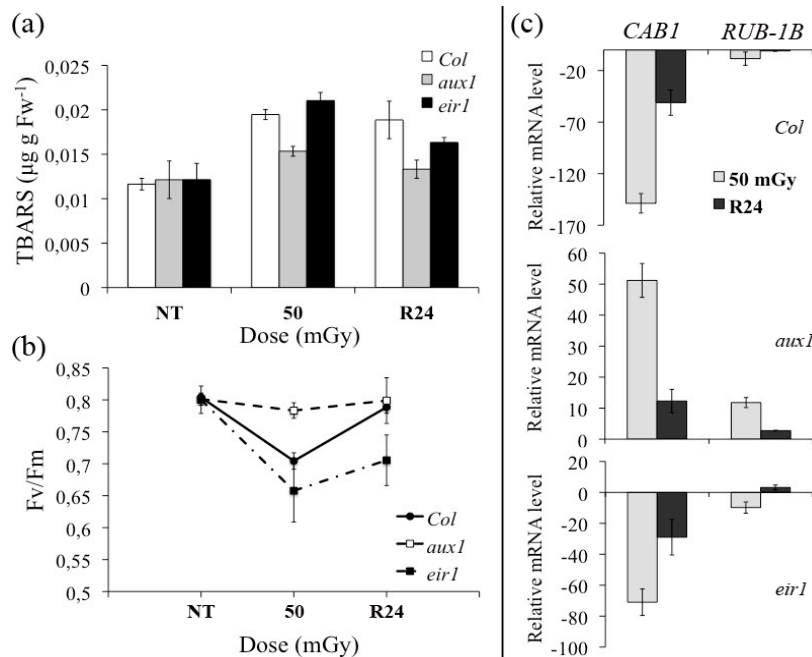


Figura 5.4. I neutroni inducono alterazioni fisiologiche in pianta. a) Contenuto delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) in wild-type *Col* (barre bianche), *aux1* (barre grigie), ed *eir1* (barre nere); **b)** fluorescenza della clorofilla (Fv/Fm) misurata in piante wild-type *Col* (cerchi neri), *aux1* (quadrati bianchi), ed *eir1* (quadrati neri); **c)** Livelli di espressione dei geni coinvolti nell'apparato fotosintetico *CAB1* e *RUB-1B* dopo irraggiamento con neutroni alla dose di 50 mGy, e dopo 24 ore dal trattamento. L'analisi di espressione è stata effettuata tramite real time qPCR, dopo 1 ora dal trattamento a tre differenti dosi: 30, 50 e 76 mGy, e dopo 24 ore di recupero. In figura sono riportati solo i dati ottenuti a 50 mGy. I relativi livelli di messaggero sono espressi in Log₂, normalizzati rispetto al gene *ACTIN8* (*ACT8*) e calibrati rispetto alle piante controllo non trattate (= 0). I simboli (barre e punti) rappresentano medie $\pm$ SD n = 4-7. NT = piante non trattate; 50 = 50 mGy di neutroni; R24 = 24 ore di recupero dopo il trattamento.

5.1.4 Recupero a breve termine degli effetti della radiazione neutronica

La possibilità che piante di *Arabidopsis* recuperino dagli effetti immediati della radiazione neutronica è stata studiata sia in piante wild-type (*Col*), che nei due mutanti del trasporto auxinico *aux1* ed *eir1*, a 12 e 24 ore dal trattamento. I risultati ottenuti mostravano un consistente recupero dei livelli di espressione pre-trattamento di tutti i geni considerati (figure 5.2, 5.3, 5.4). Tuttavia, tale recupero era più evidente nel wild-type, per quanto riguarda i geni *ARF1*, *ARF19*, *AUX/IAA7*, *SAG13*, *CAT3*, e *CAB1*; nel mutante

aux1 per i geni *ARF1*, *AUX/IAA7*, *SAG13*, *CAT3*, *FeSOD1*, e *CAB1*. Nel mutante *eir1* il maggior recupero si osservava per *ARF1*, *ARF2*, *ARF19*, *AUX/IAA7*, *CAT3*, *FeSOD1* e *CAB1*. Comunque, l'effetto recupero sembrava essere graduale, più visibile dopo 24 ore che non dopo 12 (dati non mostrati). Questo sembra indicare che i meccanismi di recupero, anche dopo un'esposizione a 50 mGy di neutroni per circa 3 ore, siano ancora attivi.

5.2 Effetti tardivi dei neutroni

Per studiare gli effetti tardivi dell'irraggiamento con neutroni, sia piante wild-type *Col*, che i mutanti auxinici *eir1*, *arf1-3* e *arf2-6* sono state irradiate con una dose di 50 mGy di neutroni e lasciate crescere per 20 giorni dappima, e poi per ulteriori 4 settimane, in camera di crescita insieme con i rispettivi controlli. Alla fine dei primi 20 giorni di recupero, le piante sono state analizzate a livello molecolare attraverso l'analisi dell'espressione dei geni attivati da senescenza *SAG12* e *SAG13*, e parallelamente, sono stati misurati alcuni parametri per monitorare le condizioni fisiologiche delle piante. In particolare, è stato determinato lo stato di perossidazione dei lipidi di membrana, attraverso la quantificazione dei TBARS. Dopo 20 giorni di recupero, le piante esposte ai neutroni non hanno mostrato alcuna apparente alterazione fenotipica, anche se i parametri biochimici e molecolari suggerivano un aumento dello stress ossidativo ed un'induzione dei meccanismi di senescenza. Infatti, dopo 20 giorni dal trattamento, *SAG12* e *SAG13* erano significativamente indotti, a livello trascrizionale, rispetto alle piante di controllo della stessa età (figura 5.5a). Questo stato di alterazione si osservava soprattutto nelle piante selvatiche, e molto meno nei mutanti *eir1* (in questo caso solo per quanto riguarda *SAG13*), e *arf1-3*. Interessante, il mutante *arf2-6* dopo 20 giorni di recupero mostrava non solo una mancanza di induzione trascrizionale, quanto una sotto-regolazione consistente di entrambi i geni attivati dalla senescenza *SAG12* e *SAG13* (figura 5.5a).

D'altra parte, la misura dei livelli di perossidazione lipidica evidenziava solo un esiguo aumento sia nel wild-type che nel mutante *arf1-3*, del contenuto di TBARS neutroni-indotto, mentre nelle piante *eir1* tale livello era fortemente incrementato, rispetto a quello misurato nei controlli. In aggiunta, come evidenziato dall'espressione dei geni *SAG12* e *SAG13*, ma come anche riscontrato per gli effetti immediati dei neutroni, anche in questo caso differenti mutanti auxinici mostrano differenti comportamenti in risposta alla radiazione neutronica. Nello specifico, il mutante *arf2-6* a differenza non solo del wild-type, ma anche dei due mutanti auxinici *eir1* ed *arf1-3*, pur avendo valori elevati in condizioni di pre-stress, mostrava una riduzione dei livelli di TBARS dopo 20 giorni di recupero dal trattamento (figura 5.5b).

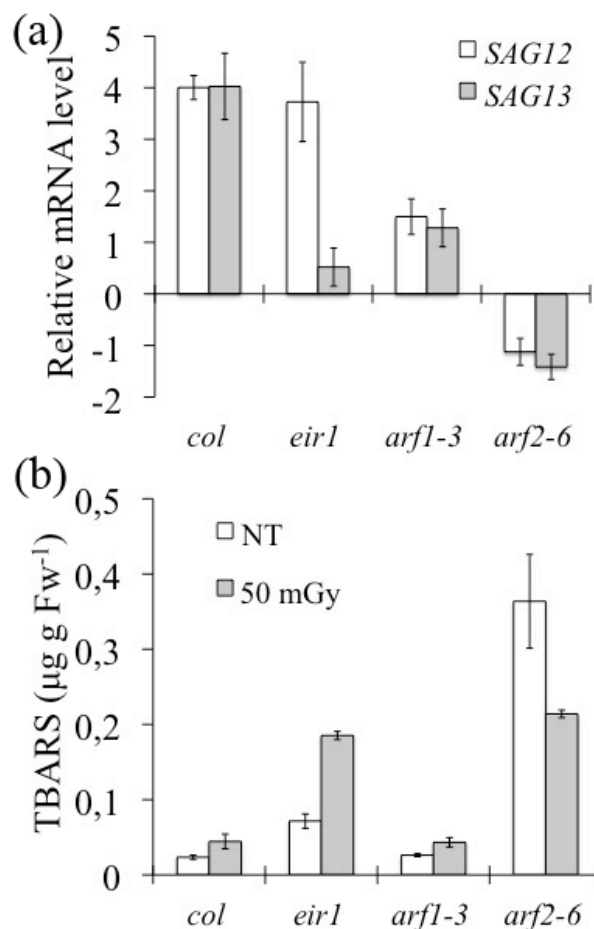


Figura 5.5. Effetto tardivo dei neutroni sulle piante di *Arabidopsis*, attivazione dei meccanismi legati alla senescenza. Determinazione dell'effetto tardivo su piante di *Arabidopsis* wild-type *Col*, mutanti nel trasporto auxinico *aux1* ed *eir1*, e mutanti nei fattori di risposta all'auxina *arf1-3* ed *arf2-6*. **a)** Analisi quantitativa dei livelli di espressione dei geni attivati da senescenza (*SAG12* e *SAG13*) dopo irraggiamento con neutroni alla dose di 50 mGy. **b)** Contenuto delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) in wild-type *Col*, *eir1* e mutanti *arf1-3* ed *arf2-6*. L'analisi di espressione è stata effettuata tramite real time qPCR, dopo 20 giorni di recupero dal trattamento. Qui sono riportati solo i dati ottenuti a 50 mGy di neutroni. I relativi livelli di messaggero sono espressi in Log₂, normalizzati rispetto al gene dell'actina8 (ACT8) e calibrati rispetto alle piante controllo non trattate (= 0) (error bars $\pm$ SD n = 4-7). NT = piante non trattate; 50 = 50 mGy di neutroni.

Comunque, dopo 4 settimane di recupero, tutte le piante irradiate hanno mostrato degli effetti fenotipici legati all'irraggiamento con neutroni (figura 5.6). Tali effetti si evidenziano dall'accelerata senescenza, mostrata dalla fioritura precoce e dalla formazione di silique e semi nelle piante trattate rispetto ai controlli. L'unica eccezione era rappresentata dal mutante *arf2-6*, che permaneva in uno stato vegetativo forzato,

mostrando ancora formazione di foglie della rosetta, mentre le rispettive piante di controllo della stessa età già andavano in fioritura, mostrando quindi un ulteriore incremento del ritardo nella senescenza che già il mutante ha in condizioni di non-stress (figura 5.6).

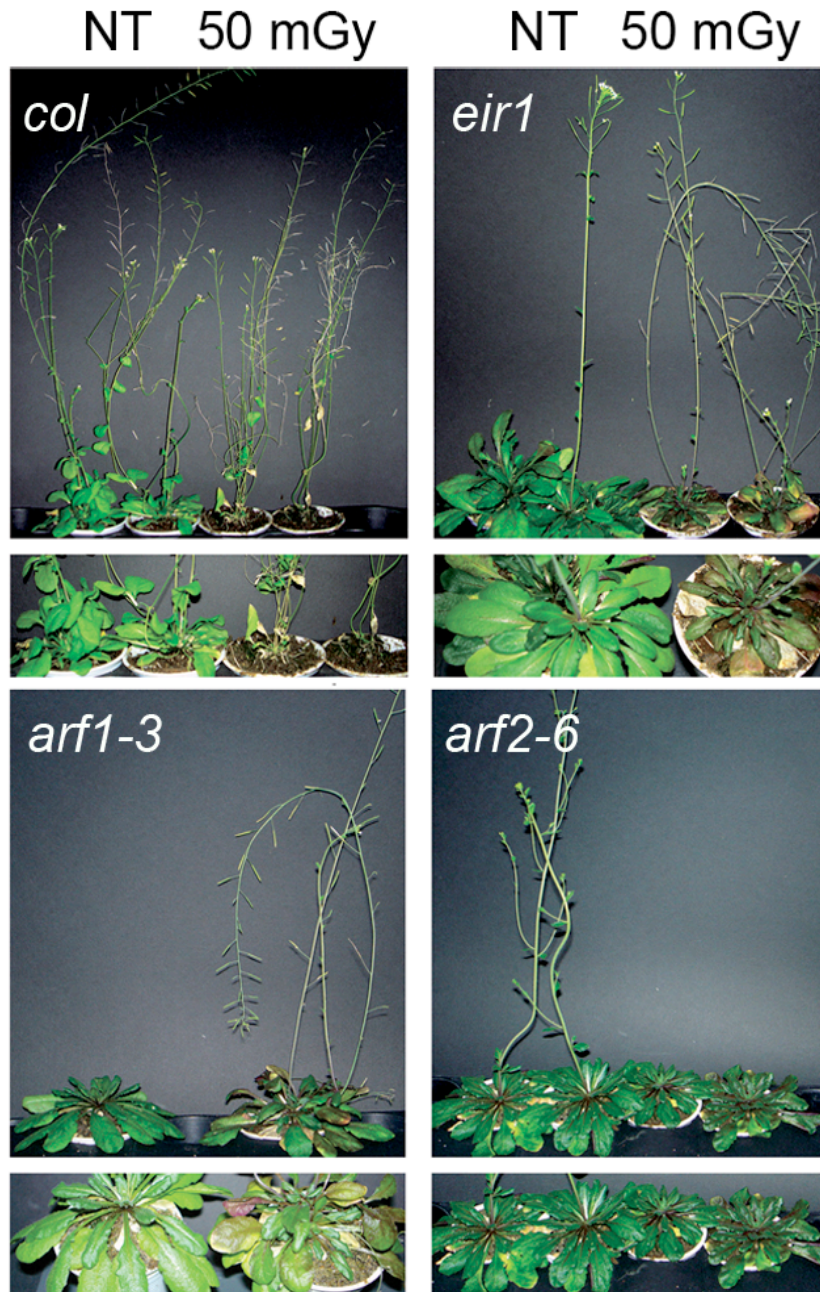


Figura 5.6. Effetto tardivo dei neutroni su piante dopo 4 settimane di recupero.

Le piante wilde-type *Col* e i mutanti *eir1*, *arf1-3* e *arf2-6* sono state trasferite in camera di crescita, insieme ai controlli, per 4 settimane dal bombardamento con 50 mGy di neutroni. Le immagini fotografiche evidenziano l'entità del danno provocato dai neutroni anche dopo un lungo periodo di recupero, mostrando anche il particolare della rosetta. NT = piante non trattate; 50 = 50 mGy di neutroni.

5.4 Discussione

Il profilo di espressione, dopo 3 ore di irraggiamento con neutroni, dei geni selezionati appartenenti alla famiglia *ARF* (*ARF1*, *ARF2* e *ARF19*), noti per controllare aspetti significativi della morfogenesi e dello sviluppo della pianta (Hagen & Guilfoyle 1985; Ulmasov *et al.* 1997; Gray *et al.* 2001; Dharmasiri & Estelle 2004), hanno mostrato una inibizione rispetto ai propri controlli non trattati, mentre i geni della famiglia *AUX/IAA* (*AUX/IAA3*, *AUX/IAA6*, *AUX/IAA7*), considerati essere coinvolti in molti dei processi cellulari (Hagen & Guilfoyle 1985; Liscum & Reed 2002; Dharmasiri *et al.* 2005), solo *AUX/IAA7* era chiaramente indotto dai neutroni. Questo effetto, appare negativo in piante selvatiche, in quanto l'induzione di *AUX/IAA7*, insieme ad una inibizione dei geni *ARF* può portare alla riduzione del pool di proteine ARF e di conseguenza all'inibizione di significativi processi che tali proteine controllano. Infatti, quando le proteine ARF, note per essere fattori di trascrizione, si trovano legate alle proteine AUX/IAA, formano un dimero che blocca la funzione di ARF, con il risultato della mancata attivazione di quei geni noti per essere attivati dall'auxina (Ulmasov *et al.* 1997, Tiwari *et al.* 2003; Kepinski & Leyser 2005; Guilfoyle & Hagen 2007). Lo stesso gruppo di geni, elencati sopra, sono stati studiati nei due mutanti di trasporto dell'auxina *aux1* e *eir1*. Il risultato di tale indagine ci ha mostrato una situazione completamente diversa rispetto al wild-type. Per tali mutanti, infatti, l'effetto è stato spesso invertito, considerando che nei mutanti auxinici i geni *ARF* erano sovra-regolati, mentre *AUX/IAA7* era indotto in *aux1*, ma inibito in *eir1*. È noto che *AUX/IAA7*, che caratterizza il mutante *axr2*, è un gene connesso all'azione dell'auxina, e la sua mutazione induce una dominante forte modificazione pleiotropica dello sviluppo della pianta, che si presenta di dimensioni ridotte, con alterato gravitropismo sia nei germogli che nelle radici, fiori anomali e piccoli, e con un ciclo vitale più esteso (Nagpal *et al.* 2000). D'altra parte, *AUX/IAA3* e *AUX/IAA6*, caratterizzano i mutanti *shy1* e *shy2*, rispettivamente, dei quali il carattere più significativo è la soppressione della mutazione in *shy2*, che induce ipocotili allungati alla luce bianca e rossa (Kim *et al.* 1996; Soh *et al.* 1999; Tian & Reed 1999). Questi due geni, comunque, non hanno mostrato variazioni significative a livello trascrizionale, sia nel wild-type che nei mutanti auxinici. Inoltre, non è mostrato alcun particolare fenotipo da *ARF1*, che è stato il primo gene della famiglia *ARF* ad essere dettagliatamente descritto a livello fenotipico (Ulmasov *et al.* 1997), anche

se la sua azione sembra particolarmente legata a quella del gene *ARF2* (Ellis *et al.* 2005). Questo ultimo gene, ha molte funzioni, una di queste è il controllo della senescenza (Schruff *et al.* 2005). Infatti la mutazione in *ARF2* conferisce un aspetto giovanile alle piante, ovvero un allungamento del ciclo di vitale (Ellis *et al.* 2005; Schruff *et al.* 2005). *ARF19* è un gene che è stato collegato all'azione sia dell'auxina che dell'etilene (Li *et al.* 2006), che complementa *ARF7/NPH4*, coinvolto nel fototropismo, il quale risulta sotto-regolato in piante wild-type, ma sovra-regolato nel mutante *eir1* (Wilmoth *et al.* 2005; Li *et al.* 2006). Il trattamento con neutroni ha indotto un aumento del trascritto di *ARF19* nel wilde-type, e una sua diminuzione nei mutanti auxinici *aux1* ed *eir1*. Questo risultato indica che il gene *ARF19* potrebbe essere coinvolto nel controllo del trasporto auxinico e nella risposta a condizioni di stress promosso da etilene. Quindi, ciò che appare evidente, è che i disturbi nel trasporto auxinico inducono variazioni significative nell'espressione dei geni *ARF* ed *AUX/IAA7* in entrambi i mutanti auxinici *aux1* ed *eir1*.

Un obiettivo specifico della mia ricerca è stato, di conseguenza, l'analisi di espressione di geni target della senescenza in piante irradiate con neutroni, considerando anche il fatto che è già ben noto che la microgravità e le condizioni ambientali spaziali in generale, inducono un'attivazione precoce della senescenza, così come un aumento dei processi ossidativi sia negli animali che nell'uomo (Serova 2001; Biolo *et al.* 2003). In questa parte della ricerca è stato osservato che i geni specificatamente coinvolti nella senescenza *SAG12* e *SAG13* (Navabpour *et al.* 2003; Wagstaff *et al.* 2009) erano sovra-regolati nel wild-type. Comunque, anche in questo caso, come in quello riguardante i geni attivati dall'auxina, è stato osservato un andamento invertito nel mutante *aux1*, in cui entrambi i geni *SAG12* e *SAG13*, erano sotto-regolati, mentre in *eir1* l'effetto era simile a quello riscontrato nel wilde-type.

Questo risultato suggerisce un coinvolgimento del trasporto dell'auxina nell'accelerazione della senescenza, come mostrato nel wilde-type. Inoltre, nelle piante selvatiche, i geni responsabili della sintesi delle catalasi *CAT1* e *CAT3* e Fe-superossido dismutasi 1 *FeSOD1*, noti per il loro coinvolgimento nella rimozione dei radicali liberi, mostrano un aumento dei livelli di espressione dopo trattamento con radiazioni neutroniche. Questo risultato è coerente con l'accelerazione dei processi di senescenza e stress indotti dalle radiazioni (Zimmermann *et al.* 2006). Tuttavia, i geni che controllano i processi ossidativi erano inibiti nei mutanti *aux1* e *eir1*, considerando che le piante con una

bassa attività delle catalasi mostrano sintomi di stress meno gravi (Rizhsky *et al.* 2002). Da questi dati emerge ancora una volta una netta differenza tra il wilde-type e i due mutanti auxinici (ed in modo particolare *aux1*). Considerando che i due mutanti mostrano solo modesti difetti, apparentemente non gravi per la vita della pianta, questo ci porta a pensare che potrebbero essere coltivati nello spazio con maggiore successo rispetto alle piante selvatiche, ed inoltre risulta che un difetto nel trasporto dell'auxina nelle radici, in alcuni casi, comporta dei vantaggi.

In aggiunta, un aumento di TBARS (figura 5.4a) rivelava, in particolare nel wilde-type, danni alla membrana plasmatica, fenomeno, questo, legato alla senescenza. L'efficienza massima fotochimica del fotosistema II (PSII), era significativamente più bassa dopo trattamento con neutroni, sia nel wild-type che in *eir1* (figura 5.4b). Ciò indica possibili danni al processo fotosintetico che avviene nei cloroplasti e suggerisce che i neutroni inducono perossidazione lipidica associata al danno e degradazione del PSII. Infatti, la misura dei livelli di espressione dei geni connessi all'apparato fotosintetico, *CAB1* e *RUB-1B*, scelti per osservare l'effetto generale della radiazione neutronica sul processo fotosintetico, mostrava nel caso di *CAB1*, sia nel wild-type come in *eir1*, una generale inibizione della trascrizione, mentre è stata osservata una induzione trascrizionale in *aux1*. Questo indica ancora che in *aux1* i neutroni hanno un effetto opposto rispetto a quello osservato nel wild-type, e spesso, anche rispetto ad *eir1*. Comunque, al contrario non è stata osservata nessuna consistente variazione nei livelli trascrizionali nel caso di *RUB-1B*.

Riguardo il recupero a breve termine, come menzionato in precedenza, le piante hanno mostrato un significativo ritorno allo stato pre-stress di tutti i geni studiati (figure 5.2, 5.3 e 5.4), sebbene nel caso del recupero a lungo termine (4 settimane dal trattamento), alcuni effetti della radiazione neutronica persistano. Infatti, dopo 20 giorni dal trattamento, entrambi i geni *SAG12* e *SAG13* mostravano ancora una consistente sovra-espressione in piante wild-type, mentre nei mutanti *arf1-3* ed *eir1* (specialmente per *SAG13*) i loro livelli trascrizionali erano bassi, pur rimanendo significativamente più alti di quelli misurati nei rispettivi controlli. Il caso più estremo, e forse il più interessante, è tuttavia rappresentato dal mutante *arf2-6*, in cui i geni attivati dalla senescenza erano chiaramente sotto-regolati, mostrando in aggiunta, un forzato stato giovanile della pianta irradiata. Comunque, i dati relativi ai livelli di TBARS (figura 5.5) mostravano valori particolarmente alti dopo

irraggiamento con neutroni, sebbene fossero ancora minori di quelli misurati nelle piante di controllo della stessa età (figura 5.5B). Questo dato indica un perdurare degli effetti dei neutroni a livello fisiologico e biochimico ed una accelerazione dell'attivazione del meccanismo di senescenza in pianta, particolarmente evidente per mutanti nei fattori di risposta all'auxina (vedi *arf1-3*), ed ritardato nel mutante *arf2-6* (figura 5.5 e 5.6).

I dati raccolti dopo 4 settimane dall'irradiazione, suggeriscono effettivamente un'accelerazione della senescenza, sia in piante selvatiche che in differenti mutanti auxinici (come *eir1* ed *arf1-3*). Tuttavia, caso interessante è quello di *arf2-6*, in cui i neutroni sembrano forzare il mantenimento della pianta in uno stato giovanile vegetativo, pur considerando la già tardiva senescenza di questo mutante. Il gene *ARF2* è controllato dall'auxina nella sua attività ed è noto che la sua mutazione innesca un ritardo dell'invecchiamento della pianta, probabilmente come conseguenza del fatto che sembra controllare il passaggio tra differenti e progressivi stadi morfologici nelle piante (Ellis *et al.* 2005; Schruff *et al.* 2005; Wilmoth *et al.* 2005). I risultati ottenuti suggeriscono quindi un forte contributo del fattore ARF2 nella risposta della pianta alle particolari condizioni dell'ambiente spaziale, quantomeno nel caso della radiazione neutronica e della microgravità. Ulteriori indagini di manipolazione di questo gene potrebbero quindi rivelarsi utili nella produzione di piante adatte ai voli spaziali.

VI

Simulazione dell'ambiente spaziale: effetto della microgravità

Le piante, che si sono evolute sotto la forza gravitazionale terrestre (1 g), hanno acquisito la capacità di sfruttare lo stimolo gravitropico per regolare sia la crescita che lo sviluppo di organi e tessuti. Le radici delle piante si accrescono parallelamente al vettore gravità, seguendone la stessa direzione, determinando una risposta gravitropica risultante in un allungamento cellulare differenziato.

Mentre il complesso sistema a cascata della trasduzione del segnale gravitropico che regola l'allungamento cellulare differenziato, che determina la risposta gravitropica della radice, rimane ad oggi ignoto, un possibile ruolo dell'auxina nei movimenti tropici della pianta è stato proposto nell'ipotesi di Cholodny-Went, secondo la quale una ridistribuzione differenziale dell'auxina tra i lati opposti di un organo causa l'allungamento cellulare differenziale (Went, 1974).

Recentemente, è stato dimostrato un caratteristico movimento polare asimmetrico dell'auxina regolato dalla gravità nelle fasi precoci di crescita di epicotili eziolati, suggerendo anche un attivo ruolo di diverse proteine coinvolte nel metabolismo e trasporto dell'auxina, quali PIN1, PIN2 e PIN3 considerati trasportatori in efflusso dell'auxina (Hoshino *et al.* 2003; DeMason & Chawla 2004). Un ulteriore contributo alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della risposta gravitropica delle piante è venuto dall'uso delle condizioni di microgravità presenti nello spazio, che hanno

dimostrato come la gravità possa indurre modificazioni della morfologia delle piante (Halstead & Dutcher, 1987; Kiss *et al.* 1989; Musgrave *et al.* 1997; Kiss, 2000).

Simili comportamenti di crescita e sviluppo delle plantule ottenuti nello spazio, sono stati osservati in esperimenti condotti a terra, nei quali piante sono state costantemente ruotate su un clinostato tridimensionale (3D-clinostat, o Random Positioning Machine, RPM) (Kraft *et al.* 2000), supportando l'idea che questo strumento sia un mezzo efficace nel simulare validamente le condizioni di microgravità, ottenendo effetti simili a quelli osservati nello spazio (Kraft *et al.* 2000). Ad oggi, non solo sono disponibili diversi centri di ricerca in cui applicare la microgravità simulata, ma anche numerosi mutanti (in particolare di *Arabidopsis thaliana*) alterati nel metabolismo e/o trasporto dell'auxina, di primaria importanza per investigare al meglio il ruolo di specifici geni e proteine connessi con l'auxina nella risposta della pianta a condizioni di microgravità simulata.

Obiettivo del corso di dottorato era quello di investigare l'effetto della microgravità simulata su differenti geni coinvolti nel trasporto e nella risposta all'auxina, e nel mantenimento del bilanciamento tra polimerizzazione e depolimerizzazione delle componenti di microtubuli e microfilamenti presenti nel citoscheletro cellulare. Per conseguire tale scopo, sono stati effettuati esperimenti di microgravità simulata utilizzando il clinostato 3D (figura 6.1, descritto in materiali e metodi) presente presso il Dipartimento di Biologia Cellulare e Fisiologia Umana dell'Università di Sassari, Italia. Sono state utilizzate piante wild-type di diversi ecotipi (Ws, Col, Ler) e mutanti alterati nel trasporto polare dell'auxina, con un fenotipo agravitropico: *aux1* (Maher & Martindale, 1980) ed *eir1/pin2/agr1* (Müller *et al.* 1998).

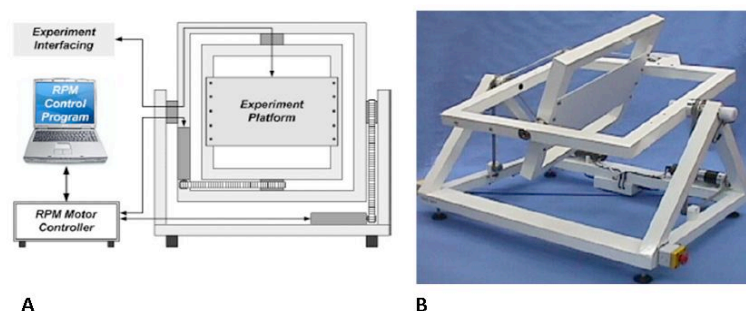


Figura 6.1. Sistema sperimentale utilizzato per simulare la microgravità su piante di Arabidopsis. Le piante sono state trattate per 3, 6, e 24 ore. La rotazione dei telai per questo esperimento varia ogni 60° s^{-1} . Le piante usate come controllo sono mantenute ad 1 g. **A)** Schema esemplificativo della Random Positioning Machine (RPM). **B)** fotografia dell'apparato RPM utilizzato per gli esperimenti di questo lavoro. Nota: l'RPM è alloggiata all'interno di una stanza mantenuta alla temperatura di 23°C , con una intensità luminosa di $\sim 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e con umidità relativa del 60%.

6.1 Effetto della microgravità sui componenti del citoscheletro

È noto che i microtubuli (MT), principali componenti del citoscheletro, siano strutture dinamiche, soggetti ad una continua polimerizzazione e depolimerizzazione spontanea dei dimeri di α - e β -tubulina che li compongono alle loro estremità. Inoltre, si pensa che esista un equilibrio tra il pool di unità libere di α - e β -tubulina nella cellula. Queste proteine sono anche un eccellente esempio di ottimizzazione evolutiva nel regno degli eucarioti, mantenendo un altissimo grado di conservazione di sequenza (McKean *et al.* 2001; Buschmann & Lloyd 2008). Esperimenti di genetica inversa, condotti su piante di *Arabidopsis*, hanno dimostrato che l'inibizione dell'espressione del gene dell' α -tubulina 6 (*TUA6*), causa difetti sia nello sviluppo della radice, dei peli radicali, che nella risposta gravitropica (Bao *et al.* 2001).

In questo studio, sono stati analizzati i livelli trascrizionali dei geni che codificano le α -tubulina 4 e 6 (*TUA4*, *TUA6*) e la β -tubulina 2 (*TUB2*) e dell'actina 8 (*ACT8*), soffermandoci sull'effetto della microgravità sul processo di sintesi della β -tubulina. Inoltre, è stato indagato il rapporto tra microgravità simulata e senescenza, andando a misurare specifici marker molecolari dell'invecchiamento e il livello di induzione della morte cellulare programmata causato dal trattamento in microgravità. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su plantule di *Arabidopsis* di 15 giorni esponendole rispettivamente per 3, 6, e 24 ore, al clinostato 3D.

6.1.1 Espressione dei geni che codificano le subunità della tubulina

I risultati ottenuti dall'analisi quantitativa dei livelli di mRNA trascritto hanno rivelato una variazione della normale espressione dei geni coinvolti nella formazione dei MT in piante wilde-type, in particolare dei geni responsabili della sintesi delle isoforme 4 e 6 dell' α -tubulina (figura 6.2a), già dopo 3 ore di RPM. I mutanti *aux1* ed *eir1* mostrano effetti simili dopo trattamento con microgravità a quelli osservati per piante wilde-type, sebbene l'incremento trascrizionale dei geni *TUA4* e *TUA6* sia ritardato (solo dopo 6 ore di RPM, figura 6.2a). Interessante notare che, sebbene in piante wilde-type la microgravità induca un lieve aumento dei livelli dell'isoforma 8 dell'actina (*ACT8*), dopo solo 3 ore di trattamento, ciò non è stato osservato in entrambi i mutanti del trasporto auxinico testati (figura 6.2b).

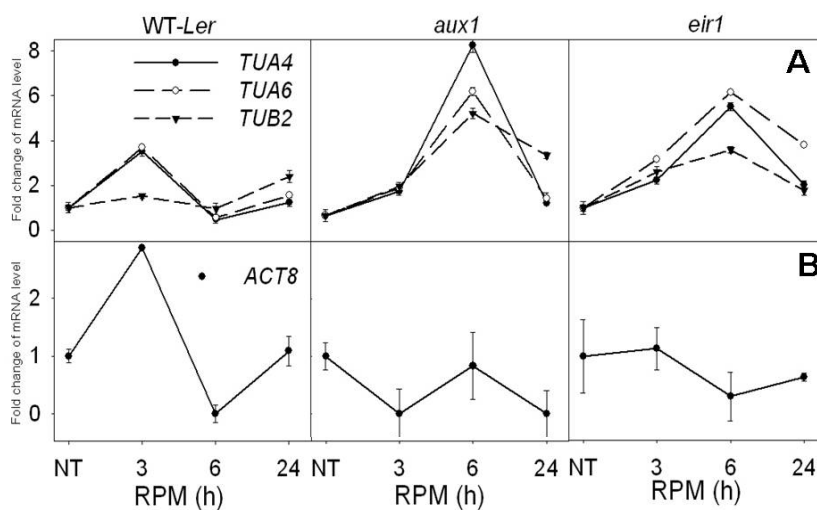


Figura 6.2. Effetto della microgravità sull'espressione genica di piante di *Arabidopsis*. L'effetto della microgravità sull'espressione genica in piante di *Arabidopsis* è stato indagato applicando plantule di 15 giorni su RPM per 3, 6, e 24 ore. In particolare sono state usate piante di *Arabidopsis* wild-type *Ler*, e i due mutanti nel trasporto auxinico *aux1* ed *eir1*. L'analisi quantitativa dei livelli di espressione è stata effettuata per **A)** i geni coinvolti nella formazione del citoscheletro *TUA4*, *TUA6*, e *TUB2*; **B)** dell'isoforma 8 dell'actina (*ACT8*). I livelli di messaggero sono stati normalizzati rispetto ai livelli di espressione della subunità 18S dell'rRNA e calibrati rispetto ai valori ottenuti nelle piante di controllo (non trattate) (= 1). Nota: **NT** = piante non trattate; **RPM** = piante trattate su Random Positioning Machine.

6.1.2 Regolazione della sintesi della β -tubulina in condizioni di microgravità

Il citoscheletro microtubulare, come discusso sopra, si ritiene avere delle funzioni essenziali nello sviluppo degli organi vegetali. Tuttavia, i MT sembrano anche essere coinvolti nella risposta gravitropica della radice (Baluska & Hasenstein 1997; Bao *et al.* 2001; Blancaflor 2002). Per determinare l'effetto della microgravità sulla sintesi della β -tubulina, dai campioni ottenuti dopo trattamento su clinostato 3D di piante wild-type e di due mutanti auxinici *aux1* ed *eir1*, sono stati analizzati i livelli di espressione dell'mRNA trascritto e del contenuto proteico di TUB2 dopo rispettivamente 6 e 24 ore di RPM.

I risultati mostrano che, a livello trascrizionale, *TUB2* è indotto da microgravità solo dopo 24 ore di RPM nel wild-type, mentre già dopo 6 ore in entrambi i mutanti auxinici (figura 6.3a). A livello proteico, l'analisi Western-blot della proteina TUB2 ha evidenziato un'induzione da microgravità-indotta, già dopo 6 ore di trattamento, sia nei mutanti *aux1* ed *eir1*, che nel wild-type, sebbene l'incremento maggiore sia stato

osservato proprio nel wt. Questo dato potrebbe indicare una maggiore sintesi di TUB in mutanti del trasporto auxinico già in condizioni di controllo, livelli ai quali piante wilde-type arrivano solo dopo una prolungata esposizione a condizioni di microgravità (figura 6.3b,c).

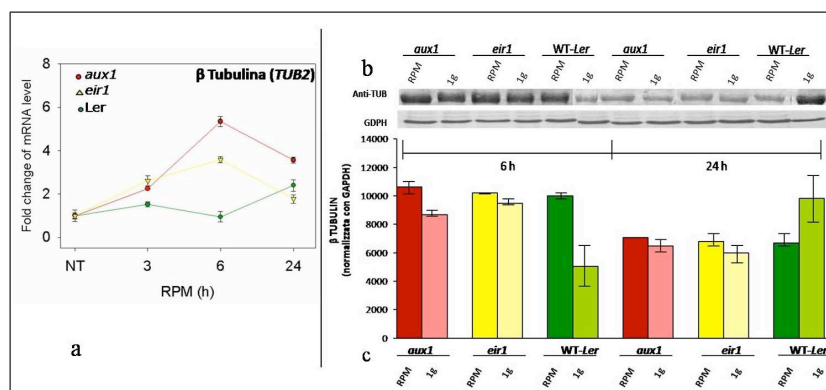


Figura 6.3. Regolazione della sintesi di β -tubulina in condizioni di microgravità.

a) Analisi quantitativa dei livelli di espressione del gene *TUB2* dopo 3, 6 e 24 ore di RPM in piante wilde-type *Ler* (cerchi verdi), *aux1* (cerchi rossi) e *eir1* (triangoli gialli). **b)** Analisi Western-blot della β -tubulina mediante l'uso di un anticorpo anti-TUB (SIGMA) in piante WT-*Ler*, *aux1* e *eir1*. **c)** Quantificazione dei livelli di β -tubulina mediante calcolo dell'intensità ottica relativa delle bande ottenute per Western-blot e normalizzati per i livelli della GAPDH. Il grafico mostra i livelli relativi di β -tubulina in piante WT-*Ler* (barre verdi), *aux1* (barre rosse) e *eir1* (barre gialle), rispettivamente dopo 6 e 24 ore di microgravità simulata. Nota: NT = piante non trattate; 1 g = piante mantenute alla gravità terrestre; RPM = Random Positioning Machine.

6.2 Risposta dei geni coinvolti nella senescenza e agli stress ossidativi

Da recenti studi è emerso che l'alterata forza gravitazionale (clinoratazione e ipergravità) altera il normale profilo delle proteine solubili (Barjaktarovic *et al.* 2007, 2009) e l'espressione di molti geni (Moseyko *et al.* 2002; Martzivanou & Hampp 2003; Kimbrough *et al.* 2004; Babbick *et al.* 2007). Infine, cellule in coltura di *Arabidopsis*, già dopo 30 minuti in microgravità simulata (RPM), presentano una alterazione delle proteine legate allo stress ossidativo (Barjaktarović *et al.* 2009).

La maggior parte dei dati raccolti fino ad ora sono per lo più su cellule in coltura di *Arabidopsis*, perciò ci siamo chiesti quale possa essere la risposta dell'intera pianta alle condizioni spaziali simulate, come la microgravità. Lo studio della risposta di un organismo completo, quindi costituito da ogni suo tessuto che svolge attivamente la propria funzione, può fornire indicazioni più complete dei processi che la pianta attiva per difendersi dallo stress abiotico. Inoltre, Joo *et al.* (2001), hanno dimostrato che la gravità insieme alla ridistribuzione asimmetrica dell'auxina, genera la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in radici di *Zea mais*, e che l'applicazione laterale di H₂O₂ (uno dei principali ROS) alle radici stimola la loro curvatura. D'altra parte, l'applicazione di antiossidanti inibisce il gravitropismo radicale, indicando che la generazione dei ROS svolge un ruolo importante nella risposta gravitropica della radice, quali possibili molecole segnale (Joo *et al.* 2001; Potters 2007). Infine, il bilanciamento tra produzione e detossificazione dei ROS è importante per il mantenimento delle funzioni cellulari (Apel & Hirt 2004).

Con l'intento di indagare questo aspetto, è stata effettuata un'analisi quantitativa dell'espressione dei geni che codificano per la Fe-superoossido dismutasi 1 (FeSOD1) e la catalasi 3 (CAT3), il primo coinvolto nella dismutazione dello ione superossido in perossido di idrogeno, il secondo detossifica l'H₂O₂. Tale indagine ha evidenziato che il wilde-type *Ler* mostra una lieve induzione microgravità-indotta della FeSOD1, mentre la CAT3 non sembra essere alterata, neanche dopo 24 ore dal trattamento (figura 6.4c). Nessuna alterazione significativa di tali geni è stata tuttavia osservata per mutanti del trasporto auxinico *aux1* e *eir1*.

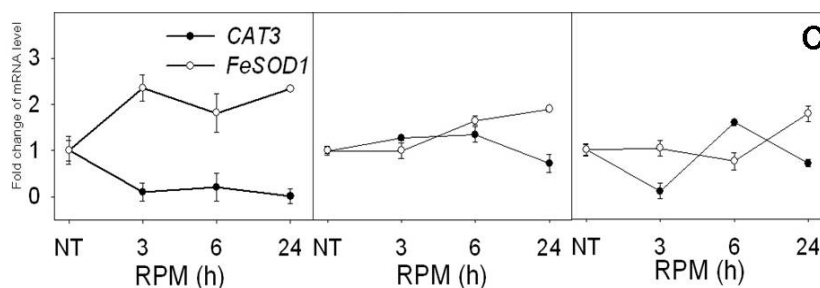


Figura 6.4. Effetto della microgravità sui geni legati agli stress ossidativi. L'effetto della microgravità è stato indagato applicando plantule di 15 giorni di *Arabidopsis* su RPM per 3, 6, e 24 ore. In particolare sono state usate piante wild-type *Ler* (pannello a sinistra), e i due mutanti nel trasporto auxinico *aux1* (pannello centrale) ed *eir1* (pannello a destra). Analisi quantitativa dei livelli di espressione dei geni relativi allo stress ossidativo (*CAT3*, *FeSOD1*). I livelli di messaggero sono stati normalizzati rispetto ai livelli di espressione della subunità 18S dell'rRNA e calibrati rispetto ai valori ottenuti nelle piante di controllo (non trattate) (= 1). Nota: **NT** = piante non trattate; **RPM** = piante trattate su Random Positioning Machine.

Infine, per valutare l'effetto della microgravità sulla senescenza della pianta, è stata seguita la variazione dei livelli trascrizionali del gene attivato da senescenza *SAG12* (Gan & Amsino 1995). Diversi studi avevano in precedenza indicato che l'espressione di questo gene è collegato direttamente alla senescenza causata da stress (Buchanan-Wollaston *et al.* 2003) e codifica per una cisteina proteasi (Lohman *et al.* 1994). I nostri risultati mostrano che la microgravità induce, in piante WT-Ler, un aumento dei livelli di espressione di *SAG12* già dopo 6 ore di RPM (figura 6.5); mentre è stata osservata una induzione tardiva nei due mutanti auxinici *eir1* ed *aux1* (solo dopo 24 ore di RPM, figura 6.5).

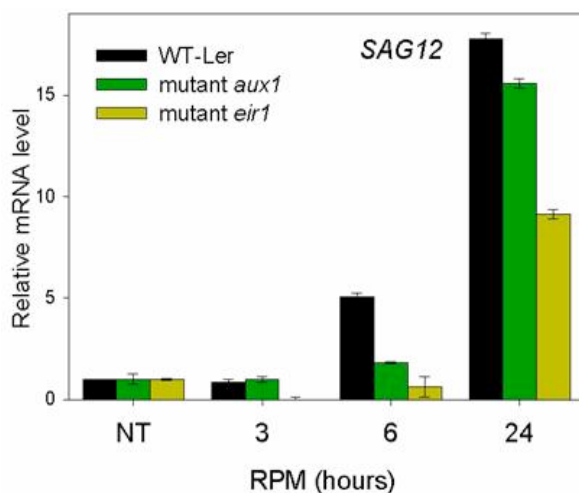


Figura 6.5. Effetto della microgravità sulla senescenza.

Analisi quantitativa dei livelli di espressione del gene attivato dalla senescenza 12 (*SAG12*) in condizioni di microgravità simulata, effettuata per 3, 6 e 24 ore, su piante wild-type Ler (WT-Ler, barre verde scuro) e su due mutanti auxinici *aux1* (barre verdi chiaro) ed *eir1* (barre verdi oliva). I livelli di mRNA sono stati normalizzati rispetto a quelli della subunità 18S dell'rRNA e calibrati rispetto ai valori normalizzati delle piante di controllo non trattate, NT (= 1). Nota: NT = piante non trattate; RPM = Random Positioning Machine. Le barre rappresentano le medie $\pm$ SD con $P < 0.05$ (n = 3-7).

6.3 L'esposizione alla microgravità simulata causa danni alle radici primarie di *Arabidopsis thaliana*

La radice è l'organo maggiormente imputato alla risposta gravitropica (Feldman, 1985). Il Gravitropismo è essenziale per la corretta crescita della pianta, non solo perché modula i segnali tipici di crescita di ogni pianta, ma innesca anche i segnali di trasduzione del segnale che riguardano la ridistribuzione dell'auxina (Kiss, 2000; Boonsirichai *et al.* 2003). Considerando che l'ormone auxina gioca un ruolo chiave nella crescita e sviluppo delle piante (Teale *et al.* 2006), sono stati misurati, utilizzando tecniche di microscopia a fluorescenza, eventuali danni cellulari e tissutali della radice primaria di piante di 15 giorni che presentano un alterato trasporto auxinico (mutanti *aux1* e *eir1*) dopo microgravità simulata (RPM).

Le piante sono state sottoposte ad alterata gravità per 3, 6 e 24 ore, mentre i rispettivi controlli sono stati mantenuti alla gravità terrestre (1 g) ed analizzate dopo colorazione con ioduro di propidio (PI) quale marker di apoptosi e dello stato di alterazione delle membrane cellulari. La colorazione con PI (figura 6.6) ha evidenziato dei danni a livello delle cellule della radice primaria, solo dopo 24 ore di esposizione alla microgravità simulata; nessun danno significativo è stato osservato a 3 e 6 ore di trattamento (dati non mostrati). L'alterazione maggiore è stata osservata nella zona di divisione cellulare della radice primaria (figura 6.6, pannelli centrali) rispetto alla zona di allungamento della radice (figura 6.6, pannelli superiori). In aggiunta, la microgravità sembra alterare lo stato ossidativo delle cellule dell'apice radicale di mutanti del trasporto auxinico, rispetto all'alterazione osservata negli apici di piante wild-type, in cui la differenza con i rispettivi controlli non trattati è molto ridotta.

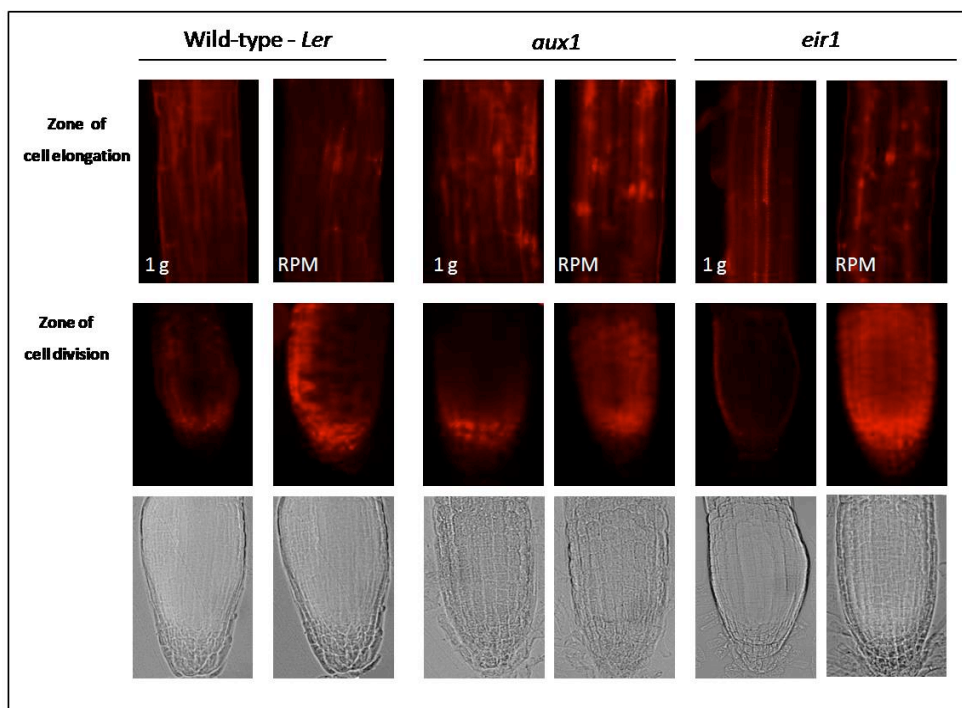


Figura 6.6. Stato delle radici primarie di plantule di *Arabidopsis* sottoposte a condizioni di microgravità. Plantule di 15 giorni wilde-type *Ler* e piante mutate nel trasporto auxinico *aux1* e *eir1* sono state mantenute in clinorotazione (RPM) per 24 ore e successivamente trattate con Ioduro di Propidio (PI) (l'ingresso di PI nelle cellule è evidenziato dal colore rosso). Le fotografie riprese al microscopio a fluorescenza di radici trattate con ingrandimento 40 X, rappresentano le immagine della radice primaria. Nei pannelli superiori è rappresentata la zona di allungamento; in quelli centrali l'apice radicale dove è presente la zona delle cellule in divisione; nei pannelli in basso sono rappresentati gli stessi apici radicali fotografati senza fluorescenza. Note: 1 g = piante non trattate mantenute alla gravità terrestre; RPM = Random Positioning Machine.

6.4 Discussione

L'auxina svolge un ruolo fondamentale in molti processi fisiologici della cellula vegetale e, come proposto nell'ipotesi di Cholodny-Went, essa esercita soprattutto una funzione regolativa nella flessione di diversi organi e quindi contribuisce alla regolazione dei tropismi. Alcuni ricercatori propongono che l'assetto stesso dei microtubuli (MT), come anche di tutto il citoscheletro, possa intervenire nel movimento della radice e nella risposta gravitropica da parte delle piante (Baluska & Hasenstein 1997; Bao *et al.* 2001; Blancaflor, 2002; Yamamoto & Kiss 2002; Hou *et al.* 2003). È ipotizzato infatti che il cambiamento dell'orientamento dei MT corticali (Himmelspace *et al.* 1999) e delle microfibrille della parete cellulare (Folsom & Brown 1987) in coleottili risponda ai cambiamenti gravitropici. In aggiunta, è stato riportato che le radici di mais in fase di accrescimento si riorientano in risposta alla gravità, mostrando che nelle cellule della zona di allungamento i MT si orientano in modo parallelo all'asse di crescita della radice, mentre altri fasci di MT si orientano trasversalmente nella zona immediatamente successiva al meristema apicale. Questo provoca una differenziale espansione cellulare all'interno della zona di allungamento, riorientando la crescita in direzione del vettore gravità (Blancaflor & Hasenstein 1993). Inoltre, l'auxina potrebbe intervenire nel controllo dell'organizzazione microtubulare (Baluska *et al.* 1996a), come indicato dal riorientamento dei MT nel corso della risposta gravitropica (Bao *et al.* 2001). Tuttavia, la cascata di trasduzione del segnale che regola tale fenomeno rimane ancora sconosciuta.

Per chiarire l'effetto del vettore gravità sulla ridistribuzione dell'auxina e le conseguenze che questo provoca nella risposta gravitropica della pianta, sono stati effettuati esperimenti di microgravità simulata. Tale condizione, necessaria per mimare parzialmente l'assenza di gravità nello spazio, è stata raggiunta grazie all'impiego di un clinostato tridimensionale, o random positioning machine (RPM), strumento già noto per causare effetti simili a quelli osservati durante le fasi sperimentali delle diverse missioni spaziali (Hoson *et al.* 1992; 1997; Stankovic *et al.* 1998b; Kraft *et al.* 2000; Shimazu *et al.* 2001; Piconese *et al.* 2003; Miyamoto *et al.* 2005; Hosino *et al.* 2007; Matia *et al.* 2009). Tali esperimenti sono stati condotti su differenti mutanti di *Arabidopsis thaliana* per il trasporto auxinico, quali *aux1* ed *eir1*, e su ecotipi selvatici come *Ler*. Sono stati indagati in questo lavoro differenti aspetti dell'effetto che provoca la microgravità sulle piante,

ponendo particolare attenzione sulle possibili alterazioni microgravità-indotte a livello cellulare, sulla struttura del citoscheletro e dei suoi componenti principali, verificando la possibilità di una difettiva -o tardiva- risposta a tale condizione dei mutanti auxinici testati, anche tenendo conto che piante wilde-type in condizioni di microgravità reale hanno evidenziato un aspetto più allungato, con un'alterata produzione di ribosomi e una conseguente alterazione di molte delle funzioni cellulari essenziali (Matia *et al.* 2009). È noto che i microtubuli (MT), costituenti principali del citoscheletro, hanno un importante ruolo funzionale nella cellula, principalmente nel contribuire alla corretta crescita della radice (Baskin *et al.* 1994; Bao *et al.* 2001). I risultati dell'analisi quantitativa dei livelli di espressione di diversi geni deputati alla sintesi delle diverse unità costituenti i MT hanno evidenziato un'attivazione trascrizionale sia di α - e β -tubulina (*TUA4*, *TUA6*, *TUB2*) che della isoforma 8 dell'actina (*ACT8*) dopo sole tre ore di microgravità nelle piante WT ed un ritardo di tale attivazione nei due mutanti per il trasporto auxinico (induzione trascrizionale solo dopo 6 ore di trattamento). Questo risultato suggerisce una risposta tardiva a condizioni di microgravità simulata in piante con un difettivo trasporto dell'auxina, quantomeno nella regolazione del bilanciamento tra polimerizzazione e depolimerizzazione dei MT. In aggiunta, la microgravità induce un forte incremento dei livelli di β -tubulina in piante selvatiche dopo sei ore di RPM, mentre nei mutanti *aux1* ed *eir1* tale induzione è solo minima, già partendo, in condizioni di controllo, da valori più alti rispetto a quelli misurati nel WT-Ler. Questo dato, evidenziando un maggiore stato di alterazione, quantomeno a livello molecolare, del citoscheletro, avvalora ulteriormente l'idea che un difettivo trasporto dell'auxina possa, a livello cellulare, innescare stati di alterazione o di stress ed una tardiva risposta agli effetti della microgravità. Anche l'analisi trascrizionale di due geni coinvolti nella risposta a stress ossidativo supporta tale ipotesi. I geni catalasi 3 (*CAT3*) e Fe-superossido dismutasi 1 (*FeSOD1*), sono indotti da microgravità simulata già dopo tre ore, in piante WT-Ler, mentre nei due mutanti auxinici non si osserva alcuna induzione di tali geni. Anche questo risultato è coerente con un ritardo nella risposta allo stress osservato nei mutanti *aux1* ed *eir1* rispetto al wild-type. A ciò si aggiunge anche la tardiva induzione, osservata nei mutanti auxinici, del gene indotto da senescenza *SAG12*, la cui attività è legata all'innescare della senescenza. Inoltre, misurazioni effettuate al microscopio a fluorescenza sulle radici primarie delle piante sottoposte a RPM hanno chiaramente evidenziato che, sebbene la microgravità induca uno

stato di apoptosi, sia nella zona di allungamento che di divisione, in tutti gli ecotipi trattati, tale condizione di stress ossidativo è fortemente più marcato nelle radici di *aux1* ed *eir1* che non in quelle di piante WT, in particolare negli apici radicali. Recentemente, è stato suggerito un ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), generate in conseguenza di uno stress ossidativo, come molecole segnale durante la risposta gravitropica e controllate dal trasporto polare asimmetrico dell'auxina (Joo *et al.* 2001). È quindi ipotizzabile che la tardiva e ridotta attivazione dei meccanismi di risposta allo stress ossidativo, indotto dalla microgravità, osservata nei mutanti *aux1* ed *eir1* sia, almeno in parte, dovuta al difettivo trasporto nelle cellule della radice dell'auxina. L'analisi effettuata mediante tecniche di microscopia a fluorescenza ha evidenziato che l'apice radicale è la zona della radice a subire i danni cellulari maggiori dalla microgravità, probabilmente in quanto organo maggiormente coinvolto nella risposta gravitropica (Feldman, 1985; Kordyum, 1997). Dopo 24 ore di RPM gli apici delle radici primarie dei mutanti auxinici mostrano un forte stress ossidativo, come evidenziato dall'alto numero di cellule in apoptosi, sia rispetto ai rispettivi controlli non trattati, che al WT-*Ler*. In particolare, l'area più sensibile agli effetti della microgravità sembra essere la columella e la cuffia radicale (figura 6.6), nota per la sensibilità al gravitropismo (Kordyum, 1997), e più precisamente la zona delle cellule quiescenti. È noto che, in *Arabidopsis thaliana*, la rimozione delle cellule gravipercettive, che si trovano proprio nella columella, provoca una ridotta capacità di flessione nella zona di allungamento distale (Massa & Gilroy 2003). I risultati ottenuti confermano che le cellule della columella hanno una sensibilità maggiore alla gravità; ed è probabile che la perdita dello stimolo gravitropico da parte della radice, possa provocare un'alterazione dei meccanismi di segnalazione, alterandone così la risposta e generando una condizione di stress. Inoltre, è noto che le cellule nella zona quiescente hanno un elevato contenuto di auxina, e vengono anche definite cellule iniziali del trasporto auxinico (Marchant *et al.* 1999). La sovrapposizione della putativa sede della percezione gravitropica con quella iniziale del trasporto auxinico, è coerente con i risultati da noi ottenuti, per i quali una risposta tardiva alla microgravità simulata si osserva nei mutanti per il trasporto auxinico; ed è proprio nelle radici primarie di questi mutanti che le cellule della columella mostrano il danno cellulare maggiore microgravità-indotto. La sensibilità alle variazioni dello stimolo gravitropico da parte di questa zona della radice è coerente anche con l'ipotesi di

un coinvolgimento diretto dell'auxina nella risposta e/o nell'adattamento alla forza di gravità.

In conclusione, se un'alterazione del vettore gravità è in grado di generare una reale condizione di stress ossidativo, in particolare nell'apparato radicale, l'auxina sembra essere coinvolta nella risposta a tale condizione di stress abiotico. Un difetto nel trasporto polare, sia in influsso che in outflusso, di tale ormone, è infatti sufficiente ad inibire fortemente e ritardare la corretta attivazione dei meccanismi difensivi della pianta in risposta alla microgravità. In particolare, abbiamo dimostrato come un difetto nel trasporto dell'auxina si rifletta in un'alterazione della riorganizzazione delle fibre microtubulari del citoscheletro delle cellule soggette a microgravità, a suggerire un ruolo più ampio dell'auxina nella regolazione dei meccanismi di risposta alla gravità. Infine, i nostri risultati supportano l'idea che il gruppo di cellule della columella sia deputato ad essere sede della gravipercezione come anche del trasporto auxinico iniziale.

VII

Isolamento e caratterizzazione di un nuovo mutante di *Arabidopsis thaliana* parzialmente agravitropico: *rha1*

In linea generale, è noto che le radici primarie di *Arabidopsis thaliana* cresciute su piastre di agar inclinate in senso verticale (figura 7.1a) descrivono, durante l'allungamento, delle onde (waves) di tipo elicoidale obliquo, le quali si dirigono verso destra (slanting destrorso) o verso sinistra (slanting sinistrorso), rispetto al vettore gravità. In particolare, l'ecotipo *Wassilewskja* (Ws) presenta una tipica crescita elicoidale obliqua destrorsa. Okada e Shimura (1990), interpretarono questo fenomeno come la conseguenza di un'interazione tra tigmotropismo e gravitropismo positivo.

Lo slanting destrorso è stato riportato inizialmente da Simmons *et al.* (1995). Più recentemente è stato descritto da Migliaccio e Piconese (2001) come fenomeno generato da una interazione tra circumnutazione destrorsa, gravitropismo positivo e tigmotropismo negativo.

7.1 Isolamento del mutante *rha1* e analisi genetica

Il mutante *rha1* (*root handedness 1*) è stato isolato analizzando la collezione di mutanti di *Arabidopsis* T-DNA-tagged di Feldmann-Du Pont. Per l'identificazione del clone è stata utilizzata una procedura di screening volta a selezionare linee di piante che presentassero una alterazione nella capacità di effettuare slanting obliquo di tipo destrorso della radice primaria (come definito in Migliaccio & Piconese, 2001) (per maggiori dettagli vedere materiale e metodi).

La radice del mutante *rha1* cresce principalmente parallela al vettore gravitazionale, anche se cresciuta su piastre di agar inclinate di 60°, con un leggero slanting sinistrorso o destrorso (figura 7.1c). *Rha1* mostra una riduzione della dimensione dei germogli (- 17%), delle radici primarie (- 8%), delle radici laterale (- 39,8%), delle siliques e della lunghezza dello stelo, rispetto al wild-type Ws (tabella 7.1).

Per studiare la mutazione sono state eseguite auto-impollinazioni di *rha1* e selezionate su kanamicina (kan) le generazioni F₁ e F₂ (tabella 7.2). I risultati dell'indagine delle linee parentali provenienti dall'incrocio del mutante *rha1* con il wild-type ha prodotto in F₁, 82 individui wild-type kan resistenti, e in F₂, 60 individui wild-type kan resistenti, 26 individui wild-type kan sensibili, 25 individui *rha1* kan resistenti, e zero individui *rha1* kan sensibili, corrispondente ad un rapporto di 2:1:1 ($\chi^2 = 0.75$, $P = 0.95$). Dai risultati di questi incroci, e dal fatto che non è mai stato osservato un mutante *rha1* kan sensibile, si è ipotizzato che, il gene che causa la mutazione, con molta probabilità, si trova taggato per un singolo inserto di T-DNA. La presenza di un tag di T-DNA nel mutante è stato anche dimostrato attraverso l'analisi Southern, effettuata con un T-DNA (dati non mostrati), e parallelamente mediante RT-PCR, dimostrando che il gene *RHA1* è espresso nel wild-type, ma non nel mutante *rha1* (figura 7.2).

Il gene *RHA1* è stato isolato ed amplificato tramite PCR utilizzando inneschi specifici su DNA genomico di *Arabidopsis* come template. Il gene è stato clonato in un vettore binario e trasformato in piante *rha1* per verificare che i fenotipi osservati fossero dovuti esclusivamente all'inattivazione del gene *RHA1* (i dettagli della costruzione e della selezione del complementato sono riportati in materiale e metodi). Questo esperimento ha confermato l'effettiva complementazione del gene *RHA1*, dall'inserimento di una copia

funzionale del gene, il quale è stato in grado di ripristinare il normale slanting della radice (figura 7.1b).

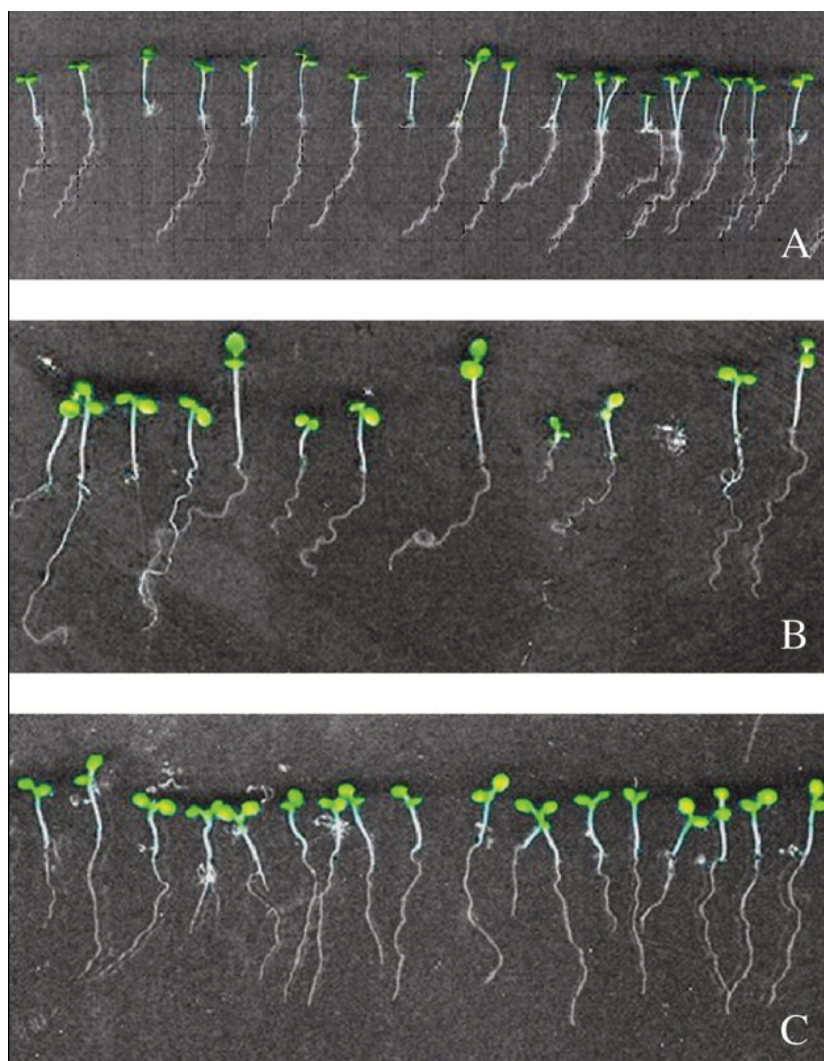


Figura 7.1. Piante di 15 giorni cresciute su piastre di agar inclinate di 60°. Il wild-type *Wssilelrwsija* (A); il mutante *rha1* complementato (B); *rha1* (C).

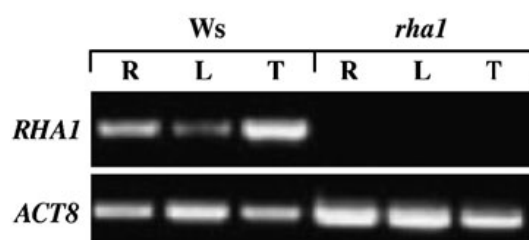


Figura 7.2. Analisi per PCR semiquantitativa dell'espressione di *RHA1*. Espressione del gene *RHA1* e del gene *ACTIN8* (*ACT8*), usato come normalizzatore, in radici di piante wild-type e nel mutante *rha1*. (R = radici; L = foglie; T = tutti i tessuti).

Tabella 7.1 Caratteristiche del mutante *rha1*

	WtWs	<i>rha1</i>
Germoglio (mm)	4.28 ± 0.32 n = 104	3.55 ± 0.12 n = 135
Lunghezza Radice (mm)	14.89 ± 0.19 n = 44	13.58 ± 0.22 n = 48
Lunghezza Radici laterali (mm)	8.67 ± 0.33 n = 64	5.22 ± 1.42 n = 63
Siliques (mm)	13.00 ± 0.17 n = 60	8.52 ± 0.26 n = 53
Spazio tra le siliques (mm)	11.07 ± 0.64 n = 50	9.56 ± 0.46 n = 78
Cotiledoni (mm)	1.31 ± 0.03 n = 85	1.03 ± 0.02 n = 85

La lunghezza dei germogli e delle radici sono state misurate su piante di 6 giorni, le radici laterali su piante di 15 giorni, i cotiledoni su piante di 8 giorni, le siliques e lo spazio fra di esse su piante di 35 giorni.

Tabella 7.2 Caratteri di *rha1* con *T-DNA linkage*

Incrocio	Generazione	Fenotipo	Individui ^a
Wilde-type x <i>rha1</i>	F ₂	wt kan ^R	60
	F ₂	<i>rha1</i> kan ^R	25
	F ₂	wt kan ^S	26
	F ₂	<i>rha1</i> kan ^S	0

$$\chi^2 \quad 0.75^c P = 0.95$$

Le plantule sono cresciute in terreno solido privo di antibiotico per 3 giorni. Successivamente sono trasferite in terreno contenente 50 mg l⁻¹ di kanamicina (kan). In F₁ tutte le plantule le piante sono state wilde-type (wt) e kanamicina resistenti (kan^R).

(^a Totale *n* = 111; ^c 2:1:1).

7.2. Caratterizzazione fisiologica di *rha1*

Allo scopo di comprendere meglio la funzione del gene *RHA1* è stata testata la sensibilità delle radici primarie del mutante *rha1* ad alcune auxine sintetiche come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D); l'acido 3-indolacetico (IAA); e l'acido naftalenacetico (NAA); ed alcuni inibitori del trasporto auxinico: acido 3,4,5-triiodobenzoico (TIBA), acido 1-naftilftalamico (NPA). Infine è stata studiata la risposta al precursore dell'etilene, l'acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC). Tutte queste sostanze sono note per alterare la risposta gravitropica. La misura dello slanting della radice primaria, ha evidenziato che *rha1*, mostra un andamento destrorso, tipico del wild-type, chiaramente ridotto e quasi casuale (figura 7.3).

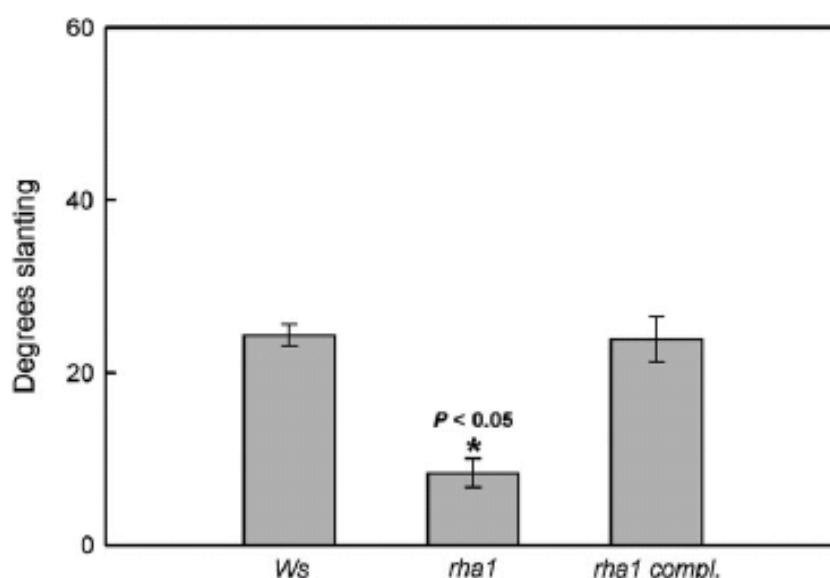


Figura 7.3. Analisi dello slanting delle radici primarie di *rha1*. Lo slanting è valutato tenendo come riferimento una linea verticale parallela al vettore gravità. Gli slanting sinistrorsi sono contrassegnati come valori negati. Sono state utilizzate per le misure piante di 10 giorni. Le barre rappresentano medie $\pm$ SE. Nota: per le misure sono state usate 49 plantule Ws, 95 *rha1*, e 25 mutanti *rha1* complementati (*rha1 compl.*). L'asterisco (*) rappresenta un valore statisticamente differente con $P < 0.05$.

La misura della curvatura gravitropica (figura 7.4) ha mostrato che le radici hanno una significativa riduzione della risposta gravitropica, pari a circa il 20% rispetto a quella osservata sia nel wild-type che nei mutanti complementati.

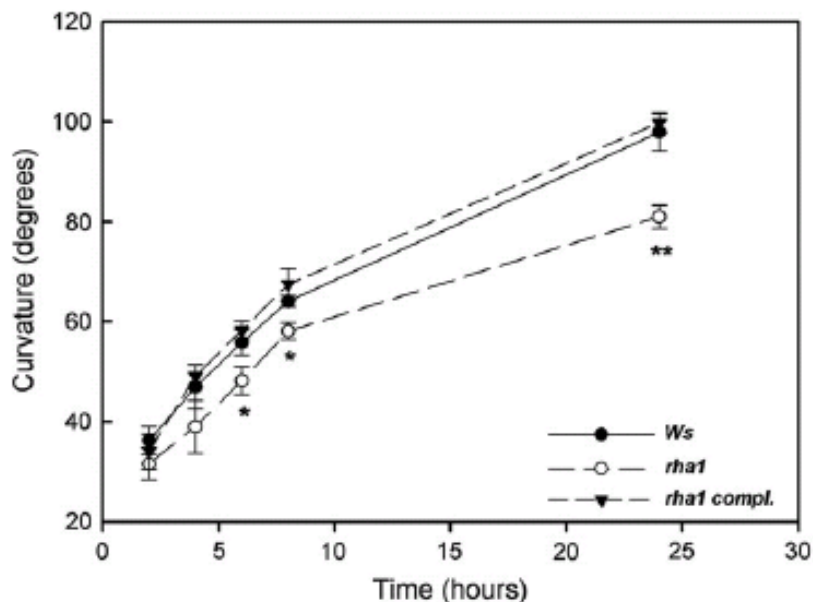


Figura 7.4. Analisi della risposta gravitropica delle radici primarie di *rha1*.

La curvatura gravitropica (in gradi) della radice primaria è stata misurata attraverso degli scatti fotografici sequenziali effettuati a precisi intervalli di tempo (2, 4, 6, 8 e 24 ore) ed elaborati mediante l'utilizzo del programma Scion Image. Per l'esperimento sono state utilizzate piante di 10 giorni wild-type Ws (cerchi neri), *rha1* (cerchi bianchi) e mutanti *rha1* complementati (triangoli neri). Ogni punto rappresenta la media $\pm$ SE. Nota: le misure sono state effettuate su $n = 27$ wild-type (Ws); 27 *rha1*, e 18 complementati *rha1* (*rha1 compl.*). Gli asterischi (* o **) rappresentano una differenza statistica tra il mutante *rha1* ed il wild-type Ws rispettivamente con $P < 0.05$ oppure con $P < 0.001$.

L'analisi della risposta del mutante ad alcune auxine sintetiche ha rivelato che le radici di *rha1* hanno una sensibilità, ridotta al 2,4-D, TIBA, NPA, e all'etilene, e simile ad IAA e NAA, rispetto a quella di piante *Ws* (figura 7.5).

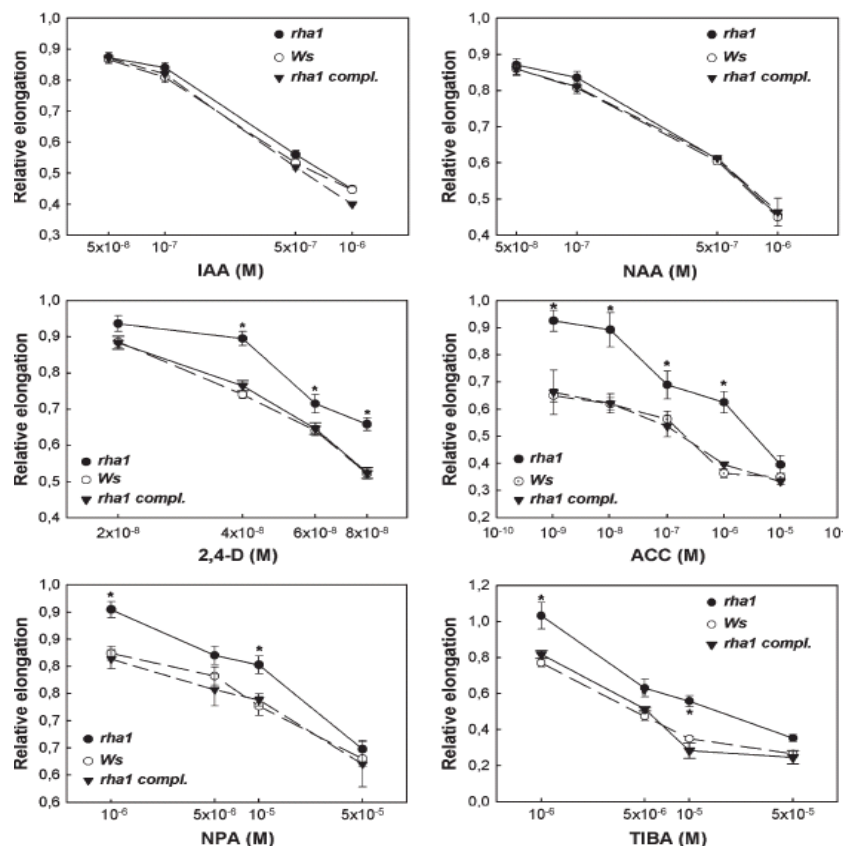


Figura 7.5. Sensibilità della radice primaria di *rha1* agli ormoni vegetali e loro inibitori. Sono stati misurati gli allungamenti delle radici primarie del mutante *rha1* (cerchi neri), del wild-type *Ws* (cerchi bianchi) e del mutante *rha1* complementato (triangoli neri), per quantificare la loro sensibilità a: auxine sintetiche quali acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), acido 3-indolacetico (IAA), acido naftalenacetico (NAA); inibitori del trasporto auxinico quali acido 3,4,5-triidobenzoico (TIBA) e acido 1-naftilftalamico (NPA); infine al precursore dell'etilene, l'acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC). I germogli sono cresciuti per 5 giorni su terreno MS, poi sono stati trasferiti su terreno contenente differenti concentrazioni delle sostanze (i controlli sono stati trasferiti su piastre con terreno privo di ormoni), e conservati al buio. La loro crescita dopo il trasferimento è stata misurata dopo ulteriori 7 giorni. Nei grafici è riportato l'allungamento della radice primaria di plantule cresciute su ormone rispetto ai controlli. Ogni punto rappresenta la media $\pm$ SD ($n = 30$). Gli esperimenti sono stati replicati almeno tre volte con risultati simili. Gli asterischi (*) rappresentano una differenza statisticamente significativa con $P < 0.05$.

Il mutante *rha1* può essere quindi considerato un nuovo mutante alterato nello slanting e nel gravitropismo, appartenente alla categoria dei mutanti sensibili al 2,4-D, dal momento che, come tesi descritto più avanti, il gene *RHA1* codifica per una proteina HSF, per i quali ad oggi non era stato ancora trovato un coinvolgimento nella risposta gravitropica.

7.3 Analisi dell'espressione del gene *RHA1* in risposta all'auxina

I livelli di attività trascrizionale del gene *RHA1* misurati in risposta a differenti condizioni ambientali sono fortemente indotti dall'alta temperatura (37°C) già dopo 30 min, per rimanere costanti anche dopo 24 ore di trattamento (figura 8.6a); come anche dalle basse temperature (4°C), mostrando però un incremento graduale nelle 24 ore di trattamento (figura 7.6b).

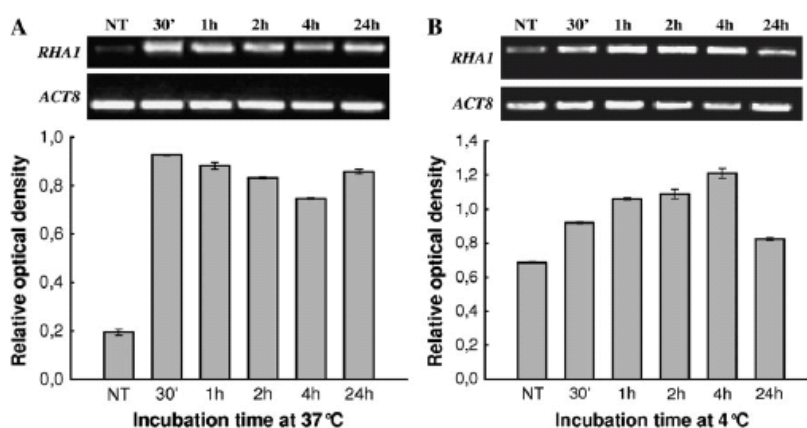


Figura 7.6. Espressione di *RHA1* in differenti condizioni ambientali. Analisi di espressione trascrizionale del gene *RHA1* su plantule di *Arabidopsis* wild-type Ws in risposta a differenti stress ambientali. **A)** Effetto dell'alta temperatura (37°C); **B)** stress da freddo a 4°C. I trattamenti sono stati fatti su piante incubate alle due diverse temperature per 24 ore e campionate rispettivamente dopo 30 min, 1, 2, 4 e 24 ore dall'inizio dell'esperimento. NT = piante non trattate. Gli esperimenti sono stati condotti su plantule di 7 giorni. Nota: i pannelli superiori mostrano la foto del gel elettroforesi del gene *RHA1* e *ACT8* (usato come normalizzatore). I pannelli inferiori mostrano i livelli di densità ottica relativa dell'espressione del gene normalizzata. Le barre grigie rappresentano medie $\pm$ SD ($n = 30$). Gli esperimenti sono stati replicati almeno tre volte con risultati simili. I valori medi dopo trattamento hanno una differenza statistica con quelli NT con $P < 0.05$.

L'analisi di espressione del gene *RHA1* nelle piante wild-type cresciute in presenza di auxina (2,4-D, IAA o NAA), alla concentrazione di 10^{-5} M, ha evidenziato un consistente incremento dei livelli trascrizionali di *RHA1* indotta dal 2,4-D (figura 7.7), mentre per le auxine IAA e NAA non si è avuta alcuna alterazione trascrizionale rispetto al controllo (NT). Questi dati, confermano la sensibilità della radice primaria del mutante *rha1* cresciuta su terreno contenente 2,4-D (figura 7.5).

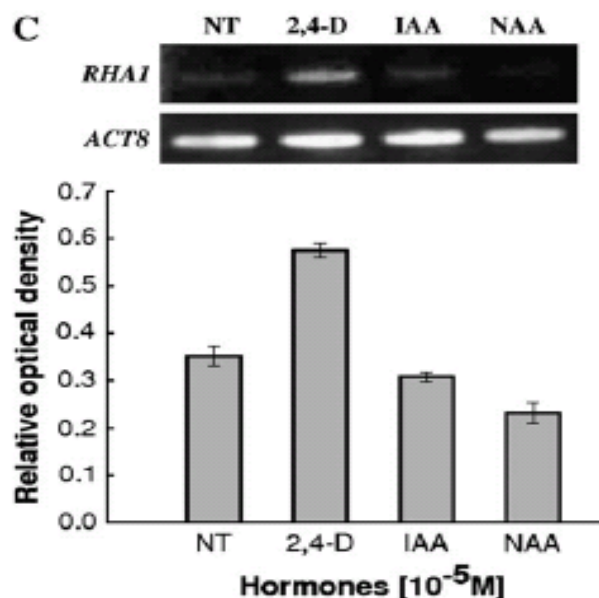
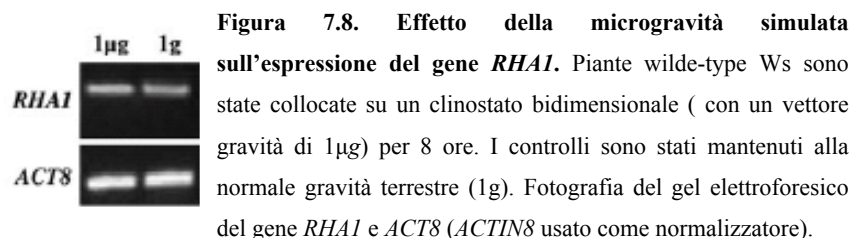


Figura 7.7. Analisi di espressione del gene *RHA1* in piante cresciute in presenza di auxina. Risposta del gene *RHA1* a diverse auxine sintetiche (2,4-D, IAA o NAA), date alla concentrazione di 10^{-5} M. Gli esperimenti sono stati condotti su plantule di 10 giorni. Nota: il pannello superiore mostra la foto del gel elettroforesico del gene *RHA1* e *ACT8* (*ACTIN8* usato come normalizzatore). Il pannello inferiore mostra i livelli di densità ottica relativa dell'espressione del gene normalizzata. Le barre rappresentano le medie $\pm$ SD ($n = 30$). Gli esperimenti sono stati replicati almeno tre volte con risultati simili. NT = pianta non trattata.

Per meglio investigare il possibile coinvolgimento del gene *RHA1* nella risposta gravitropica, piante wild-type (Ws) sono sottoposte a condizioni di microgravità simulata, mediante il loro posizionamento su un clinostato bidimensionale, in grado di ridurre il vettore gravità da 1g a $1\mu\text{g}$, per 8 ore. La microgravità simulata ($1\mu\text{g}$) induceva solo un lieve incremento dei livelli trascrizionali di *RHA1* (figura 7.8).



7.4 Localizzazione dell'attività trascrizionale del gene *RHA1*

Per localizzare il gene *RHA1*, piante wild-type Ws sono state trasformate con il gene reporter *GUS* sotto il controllo del suo promotore basale, per generare piante *pRHA1::GUS*. Le piante trasformate *pRHA1::GUS* sono state fatte germinare e crescere verticalmente (figura 7.9b). Successivamente, alcune piastre sono state: a) sottoposte a stimolazione gravitropica, ruotandole di 90° rispetto alla verticale (figura 7.9c); b) messe in condizioni di microgravità simulata, alloggiandole su clinostato bidimensionale (figura 7.9d); c) trasferite su terreno solido contenente 10^{-5} M di diverse auxine sintetiche (2,4-D, IAA e NAA) (figura 7.8e,f,g rispettivamente) e cresciute per tre giorni.

Il gene *RHA1* è espresso in maniera basale nella zona di allungamento della radice primaria e nella regione del colletto (figura 7.9b). Una notevole estensione dell'attività trascrizionale di tale gene sembra essere indotta dallo stimolo gravitropico, per tutta la lunghezza della radice (figura 7.9c), come dalla microgravità (figura 7.9d), tranne per l'apice radicale, in cui, per entrambi i trattamenti, non è stata osservata alcuna attività del promotore di *RHA1*. La crescita delle piante *pRHA1::GUS* su terreno contenente auxine sintetiche ha evidenziato una localizzazione dell'espressione di *RHA1* simile a quella ottenuta con gli stimoli gravitropici, evidenziando comunque un aumento di tale espressione nelle plantule cresciute su piastre contenenti 2,4-D (figura 7.9e). In particolare, i risultati ottenuti mostrano che le piante trattate con IAA presentano una colorazione debole e solo lungo la regione del colletto e lungo la zona matura della radice primaria (figura 7.9f). Le piante trattate con NAA non evidenziano alcuna colorazione nella regione matura degli internodi e negli apici, sia della radice primaria, che di quelle secondarie come anche osservato per plantule trattate con IAA (figura 7.9g,h). Il promotore *pRHA1* non sembra essere espresso nella zona di allungamento della radice, nei meristemi apicali, e nella cuffia radicale (figura 7.9i). Infine, non è stata osservata alcuna colorazione nei primordi delle radici laterali (figura 7.9j, freccia bianca).

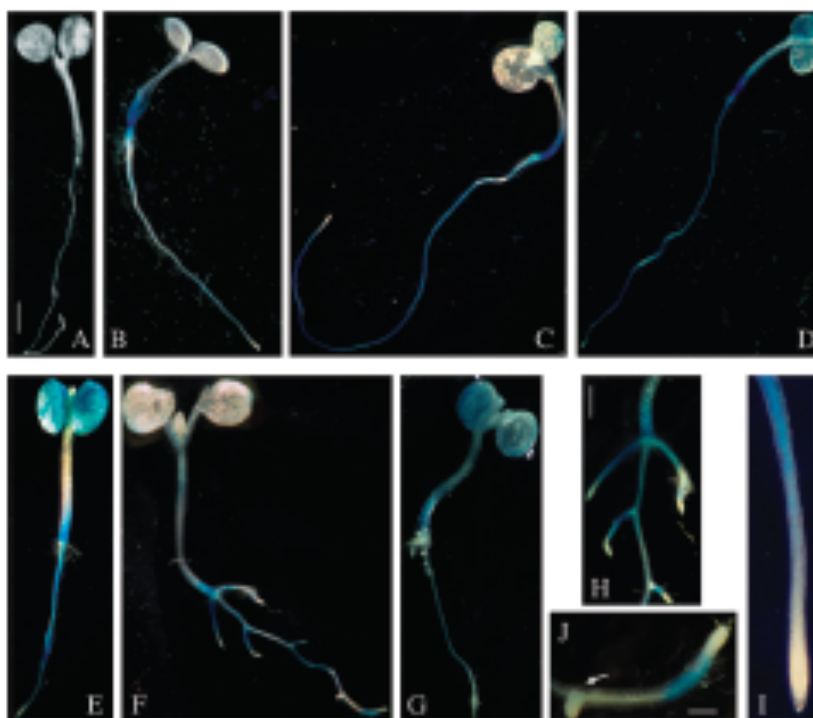


Figura 7.9. Attività trascrizionale del gene *RHA1*. Piante Ws sono state trasformate per esprimere la proteina GUS sotto il controllo del promotore del gene *RHA1*, per generare plantule omozigoti *pRHA1::GUS*. A) Piante wild-type Ws cresciute verticalmente. Saggio istochimico GUS è stato effettuato su piante *pRHA1::GUS* cresciute in diverse condizioni: B) verticalmente; C) inclinate di 90° rispetto alla verticale; D) sottoposte a microgravità simulata; (E-G) trattate con auxine sintetiche, quali E) 2,4-D; F) IAA; G) NAA. H) particolare delle radici laterali di piante *pRHA1::GUS* trattate con IAA; I) particolare dell'apice e della zona di allungamento radicale di una pianta non trattata; J) primordio di una radice laterale. Nota: tutti gli ormoni sono stati addizionati al terreno di coltura alla concentrazione di 10^{-5} M. Scala: A-G = 2 mm; H = 1000 μ m; I = 600 μ m; J = 500 μ m.

7.5 Discussione

Dai risultati ottenuti, *rha1* può essere considerato un mutante alterato nello slanting destrorso (Fortunati *et al.* 2008a). Dal momento che il gene *RHA1*, responsabile della mutazione, è stato dimostrato codificare per un HSF, è stata investigata la risposta del mutante *rha1* a diverse condizioni ambientali, note per indurre l'attivazione di tali fattori. In particolare, attraverso esperimenti di espressione trascrizionale, è stato mostrato come il gene *RHA1* sia indotto rapidamente da shock termico (37°C) e, seppur in modo più graduale, anche dalle basse temperature (4°C). Inoltre, è ipotizzabile che tale gene sia coinvolto nel normale sviluppo e accrescimento della radice primaria, considerando il fatto che *rha1* mostra una forte riduzione dello slanting della radice primaria e che la complementazione del mutante, mediante trasformazione di piante *rha1* con il gene *RHA1*, ripristina completamente il fenotipo wild-type.

È ipotizzato che la funzione degli heat shock factors sia l'attivazione di HSP, attraverso un meccanismo solo in parte conosciuto. Questo meccanismo prevede la formazione di dimeri e/o trimeri di HSF, capaci di riconoscere e legarsi specifiche sequenze di DNA presenti nei promotori di geni bersaglio, quali le HSP, denominate elementi di risposta allo shock termico (heat shock elements, HSE) (Morimoto, 1998). Se fosse questa l'unica funzione del HSF, sarebbe difficile spiegare il coinvolgimento di *RHA1* nella simmetria della radice, ridotto nella risposta al gravitropismo, o nella resistenza della radice ad alcuni ormoni e ad alcuni dei loro inibitori. Oggi, tuttavia, nuove funzioni sono state ipotizzate per gli HSF, in particolare come fattori di trascrizione chiave in molti processi biologici. In *Drosophila* è stato dimostrato che alcuni HSF sono necessari per l'ovogenesi e la prima parte dello sviluppo larvale (Jedlicka *et al.* 1997); in lievito, Gallo *et al.* (1993) hanno dimostrato che gli HSF sono necessari, nella risposta agli shock termici, come per la crescita e la fissione cellulare a temperatura normale. Studiando tabacco e la canna da zucchero, Harrington *et al.* (1994) hanno evidenziato che le HSP (attivate da specifici HSF) sono coinvolti nel processo di fosforilazione delle proteine e che interagiscono con le calmoduline. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che le HSF e le HSP inibiscono l'espressione genica di quei caratteri che altrimenti inciderebbero sul fenotipo di diversi organismi (Pigliucci, 2002; Queitsch *et al.* 2002). In particolare, *RHA1* sembra essere coinvolto nei processi connessi all'azione e trasporto dell'auxina. Gli

esperimenti effettuati sul mutante *rha1* (tabella 7.1, 7.2) indicano un'alterata capacità gravitropica, ed inoltre una ridotta lunghezza dei germogli, della radice primaria, una diminuita distanza tra i nodi del fusto, una riduzione delle infiorescenze e del numero delle radici secondarie. Tali caratteristiche sono simili a quelle riscontrate in altri mutanti sia nel trasporto che nel metabolismo dell'auxina, in particolare, nei mutanti *aux1* e *axr4* (Yamamoto & Yamamoto 1998; Dharmasiri *et al.* 2006; Hobbie *et al.* 2006), le cui radici, però, sono resistenti all'IAA, e non all'NAA. L'ipotesi è che *axr4* e *aux1* sono mutanti per dei fattori coinvolti nel trasporto attivo dell'auxina (quali IAA e 2,4-D) all'interno delle cellule, mentre l'NAA diffonde passivamente. Lo stesso ragionamento non può essere applicato a *rha1*, perché le sue radici non sono resistenti all'IAA, che sembra anche entrare nelle cellule passivamente, sulla base della teoria chemiosmotica. Questa osservazione sul mutante *rha1* sembra indicare che le differenze nella resistenza della radice a diversi tipi di auxina, in alcuni mutanti, possa essere causata non solo da differenze di permeabilità della parete cellulare, ma anche da un'eventuale differenza nella struttura molecolare dei recettori per l'auxina. Questa diversificazione nella sensibilità alle auxine è già stata descritta per *pin2*, che mostra una maggiore o minore sensibilità alle diverse auxine nell'ordine NAA > IAA > 2,4-D (Muller *et al.* 1998).

Inoltre, le radici di *rha1* sono resistenti agli inibitori del trasporto dell'auxina (NPA e TIBA), ed anche al precursore del etilene, l'ACC. Si tratta di sostanze che, almeno in parte, sono considerate essere trasportate attivamente all'interno delle cellule. In particolare, la resistenza delle radici di *rha1* all'NPA, appare simile a quella osservata per il mutante *rcn1*, che codifica una subunità della fosfatasi 2A, coinvolta nel controllo del trasporto auxinico (Garbers *et al.* 1996; Muday & De Long 2001). Poiché l'HSF2 umano è stato dimostrato interagire con la fosfatasi 2A, sostituendosi con la subunità C della proteina (Hong & Sarge 1999), si ipotizza che il fattore RHA1, un heat-shock factor coinvolto nel controllo del trasporto auxinico, possa avere, in pianta, un ruolo simile (Fortunati *et al.* 2008b). Comunque, il gene *RHA1* viene attivato da condizioni di stress da alta e bassa temperatura (figura 7.5a,b), supportando l'ipotesi di un suo ruolo anche come fattore di difesa.

La rotazione di plantule wild-type sul clinostato bidimensionale è risultata tuttavia inefficace, relativamente all'espressione del gene *RHA1*, mentre, viceversa, l'espressione del gene reporter *GUS* indica chiaramente un'induzione dell'attività trascrizionale di *RHA1*

da parte sia della gravistimolazione che della clino-rotazione. Questo dato può essere spiegato ipotizzando che stimoli gravitropici non inducono tanto un incremento dei livelli trascrizionali del gene *RHA1*, quanto la sua redistribuzione nei tessuti della radice. In aggiunta, l'espressione di *pRHA1::GUS* evidenzia che *RHA1* è attivo nei tessuti maturi delle plantule sia nel fusto che nelle radici, ma non significativamente nella zona di allungamento e nei meristemi. *RHA1* non è probabilmente coinvolto nel controllo diretto della redistribuzione dell'auxina nel meristema apicale, ma indirettamente nel gravitropismo e nell'aspetto chirale della circumnutazione, come mostrato dalla riduzione dello slanting di *rha1* (figura 7.3).

Come è noto, l'auxina sembra essere coinvolta anche nella circumnutazione, sebbene non ci siano prove dirette se le cicliche variazioni della crescita della radice, che producono l'allungamento elicoidale, possano essere ascritte ad una forma di redistribuzione di tale ormone, oppure, come sembra probabile, se siano coinvolti altri fattori e se sia necessario il trasporto attivo dell'auxina. Il mutante *rha1* non sembra essere disturbato nella circumnutazione in se, quanto nei suoi aspetti chirali (lo slanting), come anche nel gravitropismo (Fortunati *et al.* 2008b). Questo dato ci porta a pensare che i due processi possano avere una base comune, come suggerito da Darwin (1880). Tale possibilità, in linea con l'ipotesi di un coinvolgimento del gravitropismo nella circumnutazione (Johnsson, 1997), è stata recentemente supportata in due differenti articoli (Kitazawa *et al.* 2005; Kiss, 2006) in cui sono stati studiati la circumnutazione ed il gravitropismo nel fusto. Gli autori suggeriscono che sia la percezione della gravità ad essere necessaria per entrambi i processi, poiché in mutanti che non mostrano circumnutazione e che non rispondono al gravitropismo nel fusto, l'endoderme, considerato il sito di percezione della gravità, è assente.

.

VIII

Conclusioni e Prospettive Future

La scelta di studiare l'effetto delle basse dosi di neutroni e della microgravità simulata sulle piante, è stata presa in considerazione del fatto che, ancora oggi, vi sono ampie lacune sui meccanismi di adattamento e risposta degli organismi vegetali alle differenti componenti dell'ambiente spaziale. In particolare, le conoscenze sugli effetti che tali condizioni hanno su specifici geni e sui meccanismi fisiologici alla base di un'adeguata risposta agli stress indotti da tali condizioni, sono relativamente scarse, ed un approfondimento su quali fattori ne siano maggiormente coinvolti risulta tanto necessario quanto interessante. In aggiunta, come rilevato da studi precedenti e dai risultati riportati in questo lavoro, sembra alquanto probabile un coinvolgimento di differenti componenti, ed in particolare del fitormone auxina, nella corretta risposta delle piante alle diverse cause dello stress ambientale (e nello specifico quello spaziale).

Delle numerose componenti l'ambiente spaziale ho focalizzato l'attenzione sulla radiazione neutronica e sulla microgravità. Visto il notevole interesse verso gli effetti dei neutroni, per la caratteristica assenza di carica che li rende non solo difficili da rilevare, ma anche da schermare (Benton & Benton 2001; Gustafson, 2006), piante di *Arabidopsis thaliana* wilde-type e mutate sia nel trasporto polare dell'auxina (*aux1* e *eir1*) che nel metabolismo dell'auxina (*arf1-3* e *arf2-6*), sono state sottoposte a bombardamento con differenti dosi di neutroni. I risultati ottenuti evidenziano un generale stato di alterazione fisiologica e molecolare neutroni-indotto, risaltando notevoli differenze nella risposta tra

piante wild-type e mutanti nel trasporto e/o metabolismo dell'auxina. Tale alterazione risulta ancor più evidente nell'analisi dei fattori di regolazione della senescenza, chiaramente indotta ed accelerata dai neutroni. Caso interessante è sicuramente stato quello del mutante *arf2-6*, il quale, in risposta ai neutroni, ha mostrato una decelerazione del meccanismo di senescenza, mantenendo un forzato stato vegetativo. I risultati mostrati in questo lavoro indicano quindi, con una certa chiarezza, la probabilità che l'auxina sia attivamente coinvolta nella regolazione della corretta risposta della pianta alla radiazione neutronica, ed permettono di speculare sul possibile ruolo che i fattori di risposta all'auxina, come ARF2, possano giocare un ruolo chiave nell'attivazione delle pathway metabolici di difesa contro condizioni di stress ambientale.

È noto che l'ambiente spaziale in generale e la microgravità in particolare inducano un'induzione precoce della senescenza, incrementando i processi metabolici ossidativi tanto nell'uomo quanto negli animali (Serova, 2001). Tale fenomeno è stato anche osservato in pianta, sebbene con effetti differenti in differenti background genetici. In effetti, mutanti per il trasporto polare dell'auxina, come *aux1* ed *eir1*, hanno mostrato un comportamento diverso da quello registrato nel wild-type; condizioni di microgravità simulata danneggiano tali mutanti in modo molto meno evidente, rispetto a piante selvatiche. Considerando che i due mutanti *aux1* ed *eir1* mostrano solo modesti difetti fisiologici, apparentemente non irreversibili, è quantomeno plausibile che i fattori responsabili di tali mutazioni (AUX1 ed EIR1/PIN2) possano essere coinvolti nella risposta della pianta alla microgravità, regolando il corretto flusso di auxina attraverso la radice. Possiamo quindi speculare che tali mutanti rappresentino buoni candidati per essere coltivati su vettori spaziali o stazioni orbitanti con maggiore probabilità di successo rispetto a quelle di piante selvatiche. In aggiunta, dai dati mostrati emerge l'idea che un difetto nel trasporto dell'auxina nelle radici, in alcuni casi, comporti dei vantaggi.

Sulla base dei dati attualmente disponibili, e dalle ricerche effettuate durante il dottorato di ricerca che ho svolto, emerge la necessità di effettuare ulteriori test per confermare che la mutazione e/o la sovra-espressione del gene *ARF2* incide positivamente sulla fitness della pianta a condizioni ambientali spaziali. Da ciò si evince che la manipolazione del fattore ARF2 possa diventare un'utile tecnica da applicare per la produzione di piante adatte ai voli spaziali. Inoltre, saranno necessarie future indagini sui due mutanti coinvolti nel trasporto auxinico, e particolarmente *aux1*, in considerazione

della risposta atipica ad una delle principali componenti della radiazione spaziale, i neutroni.

L'ambiente spaziale si contraddistingue da quello terrestre soprattutto per l'assenza di gravità. Per affrontare questo aspetto sono stati eseguiti esperimenti di microgravità simulata sulle piante, ponendo particolare attenzione sulle possibili alterazioni microgravità-indotte a livello cellulare, sulla struttura del citoscheletro e dei suoi componenti principali, verificando la possibilità di una difettiva -o tardiva- risposta a tale condizione. In particolare, è stato studiato il ruolo dell'auxina, considerato il fatto che questo fitormone probabilmente interviene anche nel controllo dell'organizzazione microtubulare (Baluska *et al.* 1996a). I risultati ottenuti suggeriscono una risposta tardiva alle condizioni di microgravità simulata in piante con un difettivo trasporto dell'auxina, quantomeno nella regolazione del bilanciamento tra polimerizzazione e depolimerizzazione dei MT. In aggiunta, la microgravità induce un forte incremento dei livelli di β -tubulina in piante selvatiche, mentre nei mutanti *aux1* ed *eir1* tale induzione è solo minima, sebbene in condizioni di controllo tali mutanti partano da valori più alti rispetto a quelli misurati nelle piante selvatiche. Questo dato avvalorava ulteriormente l'idea che un difettivo trasporto dell'auxina possa, a livello cellulare, innescare stati di alterazione o di stress ed una tardiva risposta agli effetti della microgravità. A ciò si aggiunge anche la tardiva induzione, nei mutanti auxinici, del gene attivato da senescenza *SAG12*, la cui attività è legata all'innescamento della senescenza indotta da stress (Buchanan-Wollaston *et al.* 2003). Anche le indagini biochimico-cellulari evidenziato mostrano chiaramente che, sebbene la microgravità induca un diffuso stato di apoptosi, sia nella zona di allungamento che di divisione cellulare della radice in tutti gli ecotipi trattati, tale condizione è fortemente più marcata nelle radici di *aux1* ed *eir1* che non in quelle di piante selvatiche. In particolare, la zona dove è più evidente tale condizione è rappresentata dall'apice radicale, probabilmente in quanto organo maggiormente imputato alla risposta gravitropica (Feldman, 1985; Kordyum, 1997). In aggiunta, l'area più sensibile agli effetti della microgravità sembra essere la columella e la cuffia radicale, nota per la sensibilità allo stimolo gravitropico (Kordyum, 1997) e più precisamente la zona delle cellule quiescenti. I risultati ottenuti confermano che le cellule della columella hanno una sensibilità maggiore alla gravità; ed è probabile che la perdita dello stimolo gravitropico da parte della radice possa provocare un'alterazione dei meccanismi di segnalazione, alterandone così la

risposta e generando una condizione di stress. Inoltre, è noto che le cellule nella zona quiescente hanno un elevato contenuto di auxina, e vengono anche definite cellule iniziali del trasporto auxinico (Marchant *et al.* 1999). La sovrapposizione della putativa sede della percezione gravitropica con quella iniziale del trasporto auxinico, è coerente con i risultati qui riportati, ovvero una risposta tardiva alla microgravità simulata si osserva nei mutanti per il trasporto auxinico; ed è proprio nelle radici primarie di questi mutanti che le cellule della columella mostrano il danno cellulare maggiore microgravità-indotto. La sensibilità alle variazioni dello stimolo gravitropico da parte di questa zona della radice è inoltre coerente con l'ipotesi di un coinvolgimento diretto dell'auxina nella risposta e/o nell'adattamento ridotto alla forza di gravità.

In conclusione, possiamo ipotizzare che se un'alterazione del vettore gravità è in grado di generare una reale condizione di stress ossidativo, in particolare nell'apparato radicale, l'auxina sembra essere coinvolta nella risposta a tale condizione di stress abiotico. In particolare, abbiamo dimostrato come un difetto nel trasporto dell'auxina si rifletta in un'alterazione della riorganizzazione delle fibre microtubulari del citoscheletro delle cellule soggette a microgravità, a suggerire un ruolo più ampio dell'auxina nella regolazione dei meccanismi di risposta alla gravità.

In futuro sarà interessante chiarire come, a livello molecolare, intervengono le specie reattive dell'ossigeno, generate in conseguenza a stress ossidativo, come molecole segnale durante la risposta gravitropica ed infine controllare attraverso l'utilizzo di auxina marcata il suo trasporto polare asimmetrico per stabilire se la tardiva e ridotta attivazione dei meccanismi di risposta allo stress ossidativo, indotto dalla microgravità, osservata nei mutanti *aux1* ed *eir1* sia, almeno in parte, dovuta al difettivo trasporto nelle cellule della radice dell'auxina.

Per ampliare le conoscenze sul fenomeno del gravitropismo delle piante abbiamo infine identificato e caratterizzato un nuovo mutante di *Arabidopsis* che presenta una riduzione della risposta gravitropica da parte delle radici: il mutante *rha1*. Esso può essere considerato un mutante alterato nello slanting destrorso, ed è stato dimostrato codificare per un HSF. Interessante, RHA1 rappresenta, ad oggi, l'unico HSF la cui mutazione risulta in un parziale difetto nella risposta gravitropica. In particolare, attraverso esperimenti di espressione trascrizionale, è stato mostrato come il gene *RHA1* sia indotto da shock termico (37°C) e da freddo (4°C). Inoltre, è ipotizzabile che tale gene sia coinvolto nel

normale sviluppo e accrescimento della radice primaria. In particolare, *RHAI* sembra essere coinvolto nei processi connessi all'azione e trasporto dell'auxina. La rotazione di plantule wild-type sul clinostato bidimensionale è risultata tuttavia inefficace, relativamente all'espressione del gene *RHAI*, mentre, viceversa, l'espressione del gene reporter *GUS* indica chiaramente un'induzione dell'attività trascrizionale di *RHAI* da parte sia della gravistimolazione che della clino-rotazione. Questo dato può essere spiegato ipotizzando che stimoli gravitropici non inducono tanto un incremento dei livelli trascrizionali del gene *RHAI*, quanto la sua ridistribuzione nei tessuti della radice. In aggiunta, l'espressione del gene reporter *GUS* sotto il controllo del promotore *pRHAI* evidenzia che *RHAI* è attivo nei tessuti maturi delle plantule sia nel fusto che nelle radici, ma non significativamente nella zona di allungamento e nei meristemi (sia apicale che radicale). *RHAI* non è probabilmente coinvolto tanto nel controllo diretto della ridistribuzione dell'auxina nel meristema apicale, quanto indirettamente nel gravitropismo e nell'aspetto chirale della circumnutazione, come mostrato dalla riduzione dello slanting di *rha1*. Come è noto, l'auxina sembra essere coinvolta anche nella circumnutazione, sebbene non ci siano prove dirette se le cicliche variazioni della crescita della radice che producono l'allungamento elicoidale possano essere ascritte ad una forma di ridistribuzione di tale ormone, oppure, come sembra più probabile, se siano coinvolti altri fattori e se e quanto sia necessario il trasporto attivo dell'auxina. Il mutante *rha1* non sembra essere disturbato nella circumnutazione in se, quanto nei suoi aspetti chirali (lo slanting), come nel gravitropismo. Questo dato ci porta a pensare che i due processi possano avere una base comune, come suggerito da Darwin (1880). Tale possibilità, in linea con l'ipotesi di un coinvolgimento del gravitropismo nella circumnutazione (Johnsson, 1997), è stata recentemente supportata in due differenti studi (Kitazawa *et al.* 2005; Kiss, 2006) in cui sono state indagate la circumnutazione ed il gravitropismo nel fusto.

Proseguire questo tipo di ricerca, oltre ad avere come obbiettivo futuro quello di portare in modo stabile le piante su vettori spaziali, quale componente primaria dei sistemi di supporto alla vita, permetterà di migliorare la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della risposta agli stress e del gravitropismo.

Letteratura citata

- Abel S & Theologis A** (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiology* **111**: 9–17.
- Anken RH** (2006). On the role of the central nervous system in regulating the mineralisation of inner ear otoliths of fish. *Protoplasma*, **229**: 205-208.
- Apel K, Hirt H** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373-399.
- Armstrong TW & Colborn BL** (1998). *Science Applications of International Corporations Report*, No. SAIC-TN-9528.
- Babbick M, Dijkstra C, Larkin OJ, Anthony P, Davey MR, Power JB, Lowe KC, Cogoli-Greuter M & Hampp R.** (2007). Expression of transcription factors after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures to hypergravity and simulated microgravity (2-D/3-D clinorotation, magnetic levitation). *Advances in Space Research*, **39**: 1182-1189.
- Badhwar GD & Cucinotta FA** (1998). Depth dependence of absorbed dose, dose equivalent and linear energy transfer spectra of galactic and trapped particles in polyethylene and comparison with calculations of models. *Radiations Research*, **149**: 209-218.
- Badhwar GD, Keith JE & Cleghorn TF** (2001). Neutron measurements onboard the space shuttle. *Radiations Measurements*, **33**: 235.
- Baluska F & Hasenstein KH** (1997). Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. *Planta*, **203**: S69-S78.

- Baluska F, Hauskrecht M, Barlow PW & Sievers A** (1996). Gravitropism of the primary root of maize: a complex pattern of differential cellular growth in the cortex independent of the microtubular cytoskeleton. *Planta*, **198**: 310-318.
- Bao Y, Kost B & Chua NH** (2001). Reduced expression of alpha-tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant Journal*, **28**: 145-57.
- Barjaktarović 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**: 4357-4363.
- Barjaktarović Z, Schütz W, Madlung J, Fladerer C & Nordheim AR.** (2009). Changes in the effective gravitational field strength affect the state of phosphorylation of stress-related proteins in callus cultures of Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, **3**: 779-789.
- Baskin TI, Wilson JE, Cork A & Williamson RE** (1994). Morphology and microtubule organization in Arabidopsis roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiology*, **35**: 935-942.
- Bäuerle A, Anken R, Hilbig R & Rahmann H** (2003). Histology of the utricle in kinetically swimming fish: a parabolic aircraft flight study. *Acta Otolaryngologica*, **124**: 19-22.
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP & Millner PA** (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **16**: 948-950.
- Benton ER & Benton EV** (2001). Space radiation dosimetry in low-Earth orbit and beyond. *Nuclear Instruments & Methods in Physical Research B*, **184**: 25-294.
- Biolo G, Heer M, Narici M & Strollo F** (2003). Microgravity as a model of aging. *Current Opinions in Clinical Nutrition & Metabolism*, **6**: 31-40.
- Blancaflor EB** (2002). The cytoskeleton and gravitropism in higher plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, **21**: 120-136.
- Blancaflor EB, Fasano JM & Gilroy S** (1998). Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiology*, **116**: 213-222.

- Blancaflor EB & Hasenstein KH** (1993). Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots. *Planta*, **191**: 231-237.
- Blancaflor EB & Masson PH** (2003). Plant gravitropism: unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiology*, **133**: 1677-1690.
- Boonsirichai K, Sedbrook JC, Chen R., Gilroy S & Masson PH** (2003). Altered response to gravity is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalinization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell*, **15**: 2612-2625.
- Braam J, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P & Johnson KA** (1997). Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. *Planta*, **203**: S35-S41.
- Brinckmann E** (2005). ESA hardware for plant research on the International Space Station. *Advances in Space Research*, **36**: 1162-1166.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T & Pink D** (2003). The molecular analysis of leaf senescence – a genomic approach. *Plant Biotechnology Journal*, **1**: 3-22.
- Buschmann H & Lloyd CW** (2008). *Arabidopsis* mutants and the network of microtubule-associated functions. *Molecular Plant*, **1**: 888-898.
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T & Masson PH** (1998). The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of National Academy of Science*, **95**: 15112-15117.
- Cho HS, Lee HS & Pai HS** (2000). Expression patterns of diverse genes in response to gamma-irradiation in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Biology*, **43**: 82-87.
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Lopez-Huertas E, Romero-Puertas C & Barroso JB** (1999). Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radical Research*, **31**: S235-241.
- Cougnat C, Crosby NB, Foullon C, Heynderickx D, Eckersley S, Guarnieri V, et al.** (2005). Radiation exposure and mission strategies for interplanetary manned missions (REMSIM). *Earth, Moon, & Planets*, **94**: 279-285.
- Cowles J, LeMay R & Jahns G** (1994). Seedling growth and development on space shuttle. *Advances in Space Research*, **14**: 3-12.

- Cucinotta FA** (1998). Proceeding of Workshop, Predictions and Measurements of Secondary Neutrons in Space. *Houston, TX*, 28-30 September.
- Dai ZQ, Wang R, Ling SK, Wan YM & Li YH** (2007). Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, **40**: 671-84.
- De Micco V & Aronne G** (2008). Biometric anatomy of seedlings developed onboard of Foton-M2 in an automatic system supporting growth. *Acta Astronautica*, **62**: 505-513.
- De Micco V, Aronne G & De Pascale S** (2006). Effect of simulated microgravity on seedling development and vascular differentiation of soy. *Acta Astronautica*, **58**: 139-148.
- DeMason DA & Chawla R** (2004). Roles for auxin during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). *Planta*, **218**: 435-48.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S & Estelle M** (2005). The F-Box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**: 441-445.
- Dharmasiri N & Estelle M** (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science*, **9**: 302-308.
- Dharmasiri S, Swarup R, Mockaitis K, Dharmasiri SK, Kowalchuk M, Marchant A, Marchant S, Sandberg G, Bennett MJ & Estelle M** (2006). AXR4 Is Required for Localization of the Auxin Influx Facilitator AUX1. *Science*, **26**: 312.
- Driss-Ecole D, Jeune B, Prouteau M, Julianus P & Perbal G** (2000). Lentil root statoliths reach a stable state in microgravity. *Planta*, **211**: 396-405.
- 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.
- Drwin C** (1880). *The Power of Movement in Plants*. eds. John Murray, London.
- Du YY, Wang PC, Chen J & Song CP** (2008). Comprehensive functional analysis of Catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**: 1318-1326.
- Dudkin VE, Potapov YV, Akapova AB, Melkumyan LV, Benton EV & Frank AL** (1990). *Nuclear Tracks & Radiation Measurements*, **17**: 87.

- Dutcher FR, Hess EL & Halstead TW** (1994). Progress in plant research in space. *Advances in Space Research*, **14**: 159-171.
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ & Reed JW** (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **132**: 4563-4574.
- Esmon CA, Pedmale UV & Liscum E** (2005). Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *International Journal of Developmental Biology*, **49**: 665-674.
- Evans ML** (1991). Gravitropism: Interaction of Sensitivity Modulation and Effector Redistribution. *Plant Physiology*, **95**: 1-5.
- Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao TH & Gilroy S** (2001). Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. *Plant Cell*, **13**: 907-921.
- Feldman LJ** (1985). Root gravitropism. *Physiolgia Plantarum*, **65**: 341-344.
- Ferl R, Wheeler R, Levine HG & Paul AL** (2002). Plants in space. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 258-263.
- Folsom DB & Brown JRM** (1987). Changes in cellulose microfibril orientation during differential growth in oat coleoptiles. In: Physiology of Cell Expansion During Plant Growth. Rockville, USA: *American Society of Plant Physiology*, 58-73.
- Fortunati A, Piconese S, Tassone P, Ferrari S & Migliaccio F** (2008a). A new mutant of *Arabidopsis* disturbed in its roots, right-handed slanting, and gravitropism defines a gene that encodes a heat-shock factor. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 1363-1374.
- Fortunati A, Piconese S, Tassone P, Ferrari S & Migliaccio F** (2008b). Rha1, a new mutant of *Arabidopsis* disturbed in root slanting, gravitropism and auxin physiology. *Plant Signaling & Behavior*, **3**: 989-990.
- Freed LE & Vunjak-Novakovic G** (2002). Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. *Advances in Space Biological Medicine*, **8**: 177-195.
- Friml J** (2003). Auxin transport: shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 7-12.

- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K & Palme K** (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**: 806-809.
- Frohnmeier H & Staiger D** (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology*, **133**: 1420-1428.
- Fukaki H, Wysocka-Diller J, Kato T, Fujisawa H, Benfey PN & Tasaka M** (1998). Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **14**: 425-430.
- Fukuda H** (2004). Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, **5**: 379-91.
- Gallo GJ, Pretice H & Kingston RE** (1993). Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cell Biology*, **13**: 749-761.
- Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A & Palme K** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**: 2226-2230.
- Gan S & Amasino RM** (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **22**: 1986-1988.
- Garbers C, De Long A, Deruère J, Bernasconi P & Soll D** (1996). A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, **15**: 2115-2124.
- Geldner N, Friml J, Stierhof Y-D, Jurgens G & Palme K** (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**: 425-428.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshar MF, Yariv I, Dor C & Bassani M** (2003). Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant Journal*, **36**: 629-642.
- Gray WM, Kempiski S, Rouse D, Leyser O & Estelle M** (2001). Auxin regulates SCF (TIR1) dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**: 271-276.
- Guilfoyle TJ, Hagen G** (2001). Auxin response factors. *Journal of Plant Growth Regulation*, **10**: 281-291.
- Guilfoyle TJ & Hagen G** (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 453-460.

- Gustafson SJ & Sigal IM** (2006). *Mathematical concepts of quantum mechanics* eds Springer.
- Hagen G & Guilfoyle TJ** (1985). Rapid induction of selective transcription by auxin. *Molecular Cell Biology*, **5**: 1197-1203.
- Halstead TW & Dutcher FR** (1997). Plants in space. *Annual Review of Plant Physiology* **38**: 317-345.
- Hammond TG, Benes E, O'Reilly KC, Wolf DA, Linnehan RM, Taher A, Kaysen JH, Allen PL & Goodwin TJ** (2000). Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiological Genomics*, **3**: 163-173.
- Hampp R, Hoffmann E, Schonherr K, Johann P & De Filippis L** (1997). Fusion and metabolism of plant cells as affected by microgravity. *Planta*, **203**: 42-53.
- Harrington HM, Dash S, Dharmasiri N & Dharmasiri S** (1994). Heat-shock proteins: a search for functions. *Australian Journal of Plant Physiology*, **21**: 843-855.
- Heath RL & Packer L** (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **125**: 189-198.
- Hectors K, Prinsen E, De Coen W, Jansen MAK & Guisez Y** (2007). *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist*, **175**: 255-270.
- Henninger D** (2002). Advanced life support: Environmental sentinals. (<http://advtech.jsc.nasa.gov/EnviroSent2002/henninger/main.htm>).
- Hilbig R, Anken R & Rahmann H** (2003). On the origin of susceptibility to kinetotic swimming behaviour in fish: a parabolic aircraft flight study. *Journal of Vestibular Research*, **12**: 185-189.
- Himmelspach R, Wymer CLL, Ioyd CW & Nick P** (1999). Gravity-induced reorientation of cortical microtubules observed in vivo. *Plant Journal*, **18**: 449-453.
- Hirai H & Kitaya Y** (2009). Effects of gravity on transpiration of plant leaves. *Annals of New York Academy of Sciences*, **1161**: 166-172.
- Hobbie J** (2006). Auxin and cell polarity: the emergence of AXR4. *Trends in Plant Science*, **11**: 517-518.

- Hong SB, Sexton R & Tucker ML** (2000). Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiology*, **123**: 869-881.
- Hong Y & Sarg KD** (1999). Regulation of protein phosphatase 2A activity by heat shock transcription factor 2. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 12967-12970.
- Hoshino T, Hitotsubashi R, Miyamoto K, Tanimoto E & Ueda J** (2003). Expression of PIN and AUX1 genes encoding putative carrier proteins for auxin polar transport in etiolated pea epicotyls [correction of epicotyles] under simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat. *Biological Science Space*, **17**: 175-176.
- Hou G, Mohamalawari DR & Blancaflor EB** (2003). Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiology*, **131**: 1360-1373.
- Jedlicka P, Mortin MA & Wu C** (1997). Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO Journal* **16**: 2452-2462.
- Johnsson A** (1997). Circumnutations: results from recent experiments on earth and in space. *Planta*, **203**: S147-S158.
- Johnsson A, Solheim BGB & Iversen TH** (2009). Gravity amplifies and microgravity decreases circumnutations in *Arabidopsis thaliana* stems: results from a space experiment. *New Phytologist*, **182**: 621-629.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS** (2001). Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol*, **126**: 1055-1060.
- Kato T, Morita MT, Fukaki H, Yamauchi Y, Uehara M, Niihama M & Tasaka M** (2002). SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**: 33-46.
- Kepinski S & Leyser O** (2005). The *Arabidopsis* F-Box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**: 446-451.
- Kim BC, Soh MS, Hong SH, Furuya M & Nam HG** (1996). Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor of mutation of hy2. *The Plant Journal*, **9**: 441-456.
- Kim JH, Chung BY, Kim JS & Wi SG** (2005). Effect of in plant gamma irradiation on growth, photosynthesis and antioxidative capacity in red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of Plant Biology*, **48**: 47-56.

- Kimbrough JM, Salinas-Mondragon R, Boss WF, Brown CS & Sederoff HW** (2004). The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiology*, **136**: 2790-2805.
- Kiss JZ** (2000). Mechanisms of early phases of plant gravitropism. *Critical Review of Plant Science*, **19**: 551-573.
- Kiss JZ** (2006). Up, down, and all around: how plants sense and respond to environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**: 829-830.
- Kiss JZ, Edelmann RE & Wood PC** (1999). Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient *Arabidopsis* seedlings in spaceflight studies. *Planta*, **209**: 96-103.
- Kiss JZ, Hertel R & Sack FD** (1989). Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **177**: 198-206.
- Kitaya Y, Kawai M, Tsuruyama J, Takahashi H, Tani A, Goto E, Saito T & Kiyota M** (2003). The effect of gravity on surface temperatures of plant leaves. *Plant, Cell & Environment*, **4**: 497-503.
- Kitazawa D, Hatakeda Y, Kamada M, et al.** (2005). Shoot circumnutation and winding movements require gravisensing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**: 18742-18747.
- Kordyum EL** (1997). Biology of plant cells in microgravity and under clinostating. *International Review of Cytology*, **171**: 1-78.
- Kraft TFB, van Loon JJWA & Kiss JZ.** (2000) Plastid position in *Arabidopsis* columella cells is similar in microgravity and on a random-position machine. *Planta*, **211**: 415-422.
- Kranz AR** (1994). Heavy ion and cosmic radiation effects in different targets of the *Arabidopsis* seed. *Acta Astronautica*, **33**: 201-210.
- Krikorian AD** (1999). Somatic embryos of daylily in space. *Advances in Space Research*, **23**: 1987-1997.
- Krikorian AD, Levine HG, Kann RP & O'Connor SA** (1992). Effects of spaceflight on growth and cell division in higher plants. *Advances in Space Biological Medicine*, **2**: 181-209.
- Krikorian AD & O'Conner SA** (1984). Experiments on plants grown in space: karyological observations. *Annals of Botany*, **54**: 49-63.

- Landry LG, Chapple CC & Last RL** (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology*, **109**: 1159-66.
- Larson KC** (2000). Circumnutation behavior of an exotic honeysuckle vine and its native congener: influence on clonal mobility. *American Journal of Botany*, **87**: 533-538.
- Legue V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D & Gilroy S** (1997). Cytoplasmic free Ca^{2+} in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiology*, **114**: 789-800.
- Leitz G, Kang BH, Schoenwaelder MEA & Staehelin LA** (2009). Statolith Sedimentation Kinetics and Force Transduction to the Cortical Endoplasmic Reticulum in Gravity-Sensing *Arabidopsis* Columella Cells. *Plant Cell*, **21**: 843-860.
- Letlaw J** (1997). Radiation Biology. In *Fundamentals of Space Life Sciences, Volume 1*.
- Levine HG & Krikorian AD** (1992). Shoot growth in aseptically cultivated daylily and haplopappus plantlets after a 5-day spaceflight. *Physiologia Plantarum*, **86**: 349-359.
- Levine HG & Krikorian AD** (1996). Enhanced root production in *Haplopappus gracilis* grown under spaceflight conditions. *Journal of Gravitational Physiology*, **3**: 17-27.
- Levine LH, Heyenga AG, Levine HG, Choi J-W, Davin LB, Krikorian AD & Lewis NG** (2001). Cell-wall architecture and lignin composition of wheat developed in a microgravity environment. *Phytochemistry*, **57**: 835-846.
- Li H, Johnson P, Stepanova A, Alonso JM & Ecker JR** (2004). Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, **7**: 193-204.
- Li J, Dai X & Zhao Y** (2006). A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **140**: 899-908.
- Lim PO, Woo HR & Nam HG** (2003). Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, **8**: 272-278.
- Link BM, Durst SJ, Zhou W & Stankovic B** (2003). Seed-to-seed growth of *Arabidopsis thaliana* on the international space station. *Advances in Space Research*, **31**: 2237-2243.

- Liscum E & Reed J** (2002). Genetics of AUX/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology*, **49**: 387-400.
- Lohman KN, Gan S, John MC & Amasino RM** (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **92**: 322-328.
- Lomax TL, Muday GK & Rubery PH** (1995). Auxin transport. *Plant Hormones*, 509-530.
- Maher EP & Martindale SJB** (1980). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochemical Genetics*, **18**: 1041-1053.
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C & Bennett M** (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal*, **18**: 2066-2073.
- Martzivanou M & Hampp R** (2003). Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome. *Physiologia Plantarum*, **118**: 221-231.
- Massa G & Gilroy S** (2003). Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **33**: 435-445.
- Matía I, González-Camacho F, Herranz R, Kiss JZ, Gasset G, van Loon JJ, Marco R & Medina JF** (2009). Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *Journal of Plant Physiology*, **26**: 184-193.
- McKean PG, Vaughan S & Gull K** (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cellular Science*, **114**: 2723-2733.
- Merkys A & Darginaviciene J** (1997). Plant gravitropic response. *Advances in Space Biological Medicine*, **6**: 213-230.
- Meyerowitz EM** (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology*, **1**: 15-19.
- Migliaccio F, Fortunati A & Tassone P** (2009). *Arabidopsis* root growth movements and their symmetry, Progress and problems arising from recent work. *Plant Signaling & Behavior*, **4**: 183-190.
- Migliaccio F & Piconese S** (2001). Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends in Plant Science*, **6**: 561-565.
- Miller MW** (1987). Radiation hormesis in plants. *Health Physics*, **2**: 607-616.
- Mittler R** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405-410.

- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M & Van Breusegem F** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **10**: 490-498.
- Monje O, Stutte GW, Goins GD, Porterfield DM & Bingham GE** (2003). Farming in space: environmental and biophysical concerns. *Advance in Space Research*, **31**: 151-167.
- Monshausen GB & Sievers A** (2002). Basipetal propagation of gravityinduced surface pH changes along primary roots of *Lepidium sativum* L. *Planta*, **215**: 980-988.
- Morimoto RI** (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes and Development*, **12**: 3788-3796.
- Morita MT, Kato T, Nagafusa K, Saito C, Ueda T, Nakano A & Tasaka M** (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**: 47-56.
- Morita MT** (2008). Sensing of the Direction of Gravity in Gravitropism. *Annual Review of Plant Biology*, **16**.
- Moseyko N, Zhu T, Chang HS, Wang X & Feldman LJ** (2002). Transcription profiling of the early gravitropic response in *Arabidopsis* using high density oligonucleotide probe microarrays. *Plant Physiology*, **130**: 720-728.
- Muday GK & De Long A** (2001). Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science*, **6**: 535-542.
- Müller A, Guan C, Galweiler L, Tanzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E & Palme K** (1998). AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal*, **17**: 6903-6911.
- Musgrave ME, Kuang A & Matthews SW** (1997). Plant reproduction during spaceflight: importance of the gaseous environment. *Planta*, **203**: S177-S184.
- Musgrave ME, Kuang A, Xiao Y, Stout SC, Bingham GE, Briarty LG, Levenskikh MA, Sychev VN & Podolski IG** (2000). Gravity independence of seed-to-seed cycling in *Brassica rapa*. *Planta*, **210**: 400-406.
- Nagata T, Hiamada H, Du Z, Todoriki S & Kikuchi S** (2005). Microarrays analysis of genes that respond to gamma irradiation in *Arabidopsis*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **53**: 1022-1030.

- Nagata T, Todoriki S, Hayashi Y, Shibata M & Mori H** (1999). Gamma-radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **120**: 113-119.
- Nagpal P, Walker LM, Joung JC, Sonawala A, Timppte C, Estelle M & Reed JW** (2000). AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiology*, **123**: 563-574.
- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, A-H-Mackerness S & Buchanan-Wollaston V** (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 2285-2292.
- 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*, **424**: 999-1002.
- Noh, YS & Amasino RM** (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology*, **41**: 181-194.
- Ohnishi T, Tsuji K, Ohmura T, Matsumoto H, Wang X, Takahashi A, Nagaoka S, Takabayashi A & Takahashi A** (1998). Accumulation of stress protein 72 (HSP72) in muscle and spleen of goldfish taken into space. *Advances in Space Research*, **21**: 1077-1080.
- Okada K & Shimura Y** (1990).. Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science*, **250**: 274-276.
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A & Nguyen D** (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell*, **17**: 444-463.
- Paponov I, Teale WD, Trebar M, Blilou I & Palme K** (2005) The PINauxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science*, **10**: 170-177.
- Parry G & Estelle M** (2006). Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, **18**: 152-156.
- Paul AL, Daugherty CJ, Bihn EA, Chapman DK, Norwood KLL & Ferl RJ** (2001). Transgene expression patterns indicate that spaceflight affects stress signal perception and transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**: 613-621.

- Paul AL, Popp MP, Gurley WB, Guy C, Norwood KL & Ferl RJ** (2005). *Arabidopsis* gene expression patterns are altered during spaceflight. *Advances in Space Research*, **36**: 1175-1181.
- Perbal G** (2001). The role of gravity in plant development, A World Without Gravity, European Space Agency SP-1251: 121-136.
- Perbal G & Driss-Ecole D** (2007). Development and gravitropism of lentil seedling roots grown in microgravity. *Biology in Space and Life on Earth*. eds Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 71-121.
- Perbal G, Driss-Ecole D, Tewinkel M & Volkman D** (1997). Statocyte polarity and gravisensitivity in seedling roots grown in microgravity. *Planta*, **203**: S57-S62.
- Petrov V, Akatov Y, Koslova S, Markelov V, Nesterov V, Redlo V, Smirenniy L, Khortsev A & Tchernykh I** (1975). The study of the radiation environment in near-earth space. *Space Research*, **13**: 129-134.
- Piconese S, Tronelli G, Pippia P & Migliaccio F** (2003). Chiral and non-chiral nutations in *Arabidopsis* roots grown on the random positioning machine. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 1909-1918.
- Pigliucci M** (2002). Buffer zone. *Nature*, **417**: 598-599.
- Plieth C & Trewavas AJ** (2002). Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. *Plant Physiology*, **129**: 786-796.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ & Jansen MAK** (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, **12**: 98-105.
- Queitsch C, Sangster TA & Lindquist S** (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, **417**: 618-624.
- Rasmussen O, Bondar RL, Baggerud C & Iversen TH** (1994). Development of plant protoplasts during the IML-1 mission. *Advances in Space Research*, **14**: 189-196.
- Reddy AS, McFadden JJ, Friedmann M & Poovaiah BW** (1987). Signal transduction in plants: evidence for the involvement of calcium and turnover of inositol phospholipids. *Biochemistry & Biophysics Research Community*, **149**: 334-339.
- Rizhsky L, Liang H & Mittler R** (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*, **130**: 1143-1151.

- Roos W** (2000). Ion mapping in plant cells: methods and applications in signal transduction research. *Planta*, **210**: 347-370.
- Sack FD** (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta*, **203**: S63-S68.
- Sahr T, Voigt G, Scimmack W, Paretzke HG & Ernst D** (2005). Low level radiocesium exposure alters gene expression in roots of Arabidopsis. *New Phytologist*, **168**: 141-148.
- Salisbury FB** (1991). Lunar farming: Achieving maximum yield for the exploration of space. *HortScience*, **26**: 827-833.
- Sato F, Takeda S, Matsushima H & Yamada Y** (1999). Cell growth and organ differentiation in cultured tobacco cells under spaceflight condition. *Biological Science Space*, **13**: 18-24.
- Schruff MC, Spielmann M, Tiwari S, Adams S, Fenby N & Scott RJ** (2005). The AUXIN RESPONSE FACTOR2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development*, **133**: 251-261.
- Sedbrook JC, Chen R & Masson PH** (1999). ARG1 (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. *Proceedings of National Academy of Science*, **96**: 1140-1145.
- Serova LV** (2001). Microgravity and aging in animals. *Journal of Gravitational Physiology*, **8**: P137-138.
- Sheen J** (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science*, **274**: 1900-1902.
- Shurshakov VA, Kartashov DA, Kolomenskii AV, Petrov VM, Red'ko VI, Abramov IP, Letkova LI & Tikhomirov EP** (2006). Radiation protective quality of spacesuit "Orlan-M" during extravehicular activities on the International Space Station. *Aviakosmonauta Ekologia Medica* **40**: 56-61.
- Simmons C, Migliaccio F, Masson P, Caspar T & Soll D** (1995). A novel root gravitropism mutant of Arabidopsis thaliana exhibiting altered auxin physiology. *Physiologia Plantarum*, **93**: 790-798.
- Simpson JA** (1983). Composition and Origin of Cosmic Rays. eds NATO ASI Series C: Mathematical and Physical sciences, Vol **107**.
- Sinclair W & Trewavas A** (1997). Calcium in gravitropism: a re-examination. *Planta*, **203**: S85-S90.

- Solheim BG, Johnsson A & Iversen TH** (2009). Ultradian rhythms in *Arabidopsis thaliana* leaves in microgravity. *New Phytologist*, **183**: 1043-1052.
- Soo MS et al.** (1999) Regulation of both light and auxin-mediated development by the *Arabidopsis* IAA3/SHY2 gene. *Journal of Plant Biology*, **42**: 239-246.
- Stankovic B** (2001) a plant space odyssey. *Trends in Plant Science*, **6**: 591-593.
- Staves MP** (1997). Cytoplasmic streaming and gravity sensing in *Chara* internodal cells. *Planta*, **203**: S79-S84.
- Taga M, Yamauchi K, Odle J, Furian L, Sundaresan A, Ramesh GT, Pellis NR, Andrassy RJ & Kulkarni AD** (2006). Melanoma growth and tumorigenicity in models of microgravity. *Aviation, Space & Environmental Medicine*, **77**: 1113-1116.
- Tasaka M, Kato T & Fukaki H** (1999). The endodermis and shoot gravitropism. *Trends in Plant Science*, **4**: 103-107.
- Teale WD, Paponov IA & Palme K** (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *National Review of Molecular Cell Biology*, **7**: 847-859.
- Tian Q & Reed JW** (1999). Control of auxin regulated root development by *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development*, **126**: 711-721.
- Tim JH, Moon YR, Kim JS & Lee JW** (2007). Transcriptomic profile of *Arabidopsis* rosette leaves during the reproductive stage after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research*, **168**: 267-280.
- Tiwari SB, Hagen G & Guilfoyle TJ** (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*, **15**: 533-543.
- Tiwari SB, Hagen G & Guilfoyle TJ** (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell*, **16**: 533-543.
- Tiwari SB, Wang X-J, Hagen G & Guilfoyle TJ** (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, **13**: 2809-2822.
- Todd P** (2001). Overview of the spaceflight radiation environment and its impact on cell biology experiments. *Journal of Gravitational Physiology*, **11**: 11-16.
- Tsugeki R, Olson ML & Fedoroff NV** (1998). Transposon tagging and the study of root development in *Arabidopsis*. *Gravitational Space Biology Bulletin*, **11**: 79-87.

- Tsurumi S & Ohwaki Y** (1978). Transport of ¹⁴C-labelled indoleacetic acid in *Vicia* root segments. *Plant Cell Physiology*, **19**: 1195-1206.
- Tucker ML, Whitelaw CA, Lyssenko NN & Nath P** (2002). Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors. *Plant Physiology*, **130**: 1487-1496.
- Ulmasov T, Hagen G & Guilfoyle TJ** (1997a). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, **20**: 1865-1868.
- Ulmasov T, Hagen G & Guilfoyle TJ** (1999a). Activation and repression of transcription by auxin response factors. *Proceeding of National Academy of Science USA*, **96**: 5844-5849.
- Ulmasov T, Hagen G & Guilfoyle TJ** (1999b). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant Journal*, **19**: 309-319.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G & Guilfoyle TJ** (1997b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**: 1963-1971.
- Vanacker H, Sandalio L, Jiménez A, Palma JM, Corpas FJ, Meseguer V, Gómez M, Sevilla F, Leterrier M, Foyer CH & del Río LA** (2006). Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 1735-1745.
- Vanhavere F, Genicot JL, O'Sullivan D, Zhou D, Spurny F, Jadrníčková I, Sawakuchi GO & Yukihiro EG** (2008). DOSimetry of BIological EXperiments in SPace (DOBIES) with luminescence (OSL and TL) and track etch detectors. *Radiation Measurements*, **43**: 694-697.
- Volkman D & Sievers A** (1979). *Graviperception in multicellular organs*. In Encyclopedia of Plant Physiology - Physiology of Movements, 573-600.
- Vorobyov YI & Kovaloyov YY** (1983). Radiation Safety of Crews of Flying Vehicles, Energoatomizdat, Moscow.
- Wada H, Koshiba T, Matsui TM & Sato M** (1998). Involvement of peroxidases in differential sensitivity to gamma-radiation in seedlings of two *Nicotiana* species. *Plant Science*, **132**: 109-119.

- Wagstaff C, Yang TJ, Stead AD, Buchanan-Wollaston V & Roberts JA** (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant Journal*, **57**: 690-705.
- Wang S, Tiwari SB, Hagen G & Guilfoyle TJ** (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR7 restores the expression of auxin-responsive genes in mutant *Arabidopsis* leaf mesophyll protoplasts. *Plant Cell*, **17**: 1979-1993.
- Wang W, Vinocur B & Altman A** (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**: 1-14.
- Weise SE & Kiss JZ** (1999). Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *International Journal of Plant Science*, **160**: 521-527.
- Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR & Reed JW** (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant Journal*, **43**: 118-130.
- Woodward AW & Bartel B** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, **95**: 707-735.
- Yamakuchi M, Higuchi I, Masuda S, Ohira Y, Kubo T, Kato Y, Maruyama I & Kitajima I** (2000). Type I muscle atrophy caused by microgravity-induced decrease of myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) protein expression. *FEBS Letters*, **477**: 135-140.
- Yamamoto K & Kiss JZ** (2002). Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **128**: 669-681.
- Yamamoto M & Yamamoto K** (1998). Differential effects of 1-naphtalenacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxinresistant mutant of *Arabidopsis*, aux1. *Plant & Cell Physiology*, **39**: 660-664.
- Yannarelli GG, Noriega GO, Batlle A & Tomaro ML** (2006). Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta*, **224**: 1154-1162.

- Yano D, Sato M, Saito C, Sato MH, Morita MT & Tasaka M** (2003). A SNARE complex containin SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism. *Proceedings of National Academy of Science*, **100**: 8589-8594.
- Yasuda H** (2009). Effective dose measured with a life size human phantomin a low Earth orbit mission. *Journal of Radiation Research*, **50**: 89-96.
- Yoder TL, Zheng HQ, Todd P & Staehelin LA** (2001). Amyloplast sedimentation dynamics in maize columella cells support a new model for the gravity-sensing apparatus of roots. *Plant Physiology*, **125**: 1045-1060.
- Young LM, Evans ML & Hertel R** (1990). Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiology*, **92**: 792-796.
- Zheng HQ & Staehelin LA** (2001). Nodal endoplasmic reticulum, a specialized form of endoplasmic reticulum found in gravity-sensing root tip columella cells. *Plant Physiology*, **125**: 252-265.
- Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G & Zentgraf U** (2006). Senescence specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell & Environment*, **29**: 1049-1060.

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento è sicuramente rivolto al Dr. Fernando Migliaccio per avermi dato la possibilità di svolgere le ricerche del mio Dottorato presso il suo laboratorio. Lo ringrazio per l'esperienza che mi ha permesso di acquisire tra pubblicazioni scientifiche, congressi nazionali ed internazionali e contatti con diversi ricercatori di tutto il mondo che lavorano nell'ambito della biologia spaziale, argomento che mi ha insegnato ad amare. Desidero inoltre ringraziare il Prof. Silvano Onofri, mio Tutor per questo progetto di ricerca, il Prof. Proto Pippia, la Prof.ssa Maria Antonietta Meloni e la Dr.ssa Maria Teresa Giardi per le loro interessanti discussioni scientifiche. Un ringraziamento particolare è rivolto al Dr. Alessio F., con il quale, in questi tre anni, ho condiviso ed affrontato, a stretto contatto, ogni genere di discussione, da quelle lavorative alle lunghe discussioni scientifiche, durante le quali ero molto spesso "l'ascoltatore", fino a quelle più ludiche, durante le quali combattevo per non essere solo "l'ascoltatore". Vorrei ringraziare tutte le persone che ho incontrato durante questo comune cammino scientifico: Angela S., Giuseppe P., Emanuele P., Valentina I. e Lucia, per la grandissima disponibilità. Un grazie va anche a Silvia I., per la sua amicizia, per i consigli scientifici, con la quale ho potuto anche avere discussioni tutte al femminile, e per i piacevoli viaggi in treno verso casa! Naturalmente non può mancare un grazie e una citazione particolare al *neo* Direttore IBAF-CNR, Dr. Enrico Brugnoli, con il quale spero di poter in futuro collaborare così da poter dimostrare tutto il mio valore scientifico. Non posso non ringraziare, anche se ormai naviga per altri lidi, il *neo* Direttore IPP-CNR, Dr. Francesco Loreto per i consigli

scientifici e di vita. Un grazie va anche ai Ricercatori IBAF Carlo C., Mauro C., Isabel N. e Violeta V. Come dimenticare tutti i ricercatori dell'IBBA, Donato G, Giulio T, Adelaide, Giovanna F., Giovanni M., per la loro grande disponibilità. Il ringraziamento finale, ma non meno importante, è rivolto a mio marito, alla mie sorelle, perché mi hanno supportato e sopportato ed ai miei genitori e mia nonna per il sostegno e la fiducia che mi hanno sempre dimostrato.

