

# SIMBIOSIS ENTRE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y *PHASEOLUS VULGARIS* BAJO CONDICIONES DE MICROGRAVEDAD SIMULADA: EVALUACIÓN PRELIMINAR

María Nicole Gálvez Bailey<sup>1,2\*</sup>, Sara Nicole Velez Giraldo<sup>1,2†</sup>, Andrea Gabriela Monzón Cosillo<sup>1,2 ‡</sup>, Florence Bianchi Veliz<sup>1,3 §</sup>, Juan De Dios López De León<sup>1,3¶</sup>, Pietro Ernesto Ubico Ligorria<sup>1,3||</sup>, Patrizia Lupo, PhD<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Microbiología

<sup>2</sup>Estudiante de la Licenciatura en Bioquímica y Microbiología

<sup>3</sup>Estudiante de la Licenciatura en Biotecnología Molecular

Universidad del Valle de Guatemala

Recibido: 1/noviembre/2024

Aceptado: 28/noviembre/2024

DOI: <https://doi.org/10.5377/ce.v15i2.19633>

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la microgravedad simulada en la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y hongos micorrízicos arbusculares, enfocándose en el crecimiento vegetal, la colonización radicular y el contenido proteico. La relevancia de este estudio radica en comprender cómo las plantas podrían adaptarse a entornos espaciales, lo cual es esencial para el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles en misiones de larga duración. Las plantas fueron cultivadas por 27 días bajo condiciones de microgravedad simulada utilizando un clinostato 2D y gravedad terrestre, con y sin inoculación de hongos micorrízicos. A través de un análisis microscópico, se observó un aumento en la colonización micorrízica en condiciones de microgravedad simulada, con una mayor presencia de hifas y vesículas; lo que indicó un incremento en la actividad simbiótica. Asimismo, mediante el método de Bradford, se registró una disminución significativa en la concentración proteica de las raíces bajo microgravedad, posiblemente como una adaptación metabólica frente al estrés. Aunque no se observaron diferencias significativas en la longitud radicular entre los tratamientos, se identificó una tendencia a un menor crecimiento en condiciones de microgravedad, probablemente vinculada a alteraciones hormonales. Estos resultados destacan el potencial de optimizar la simbiosis micorrízica en condiciones de microgravedad simulada para mejorar el crecimiento de cultivos en diversos entornos, con aplicaciones tanto en la agricultura terrestre como espacial; lo que constituye el primer análisis de esta simbiosis en microgravedad simulada en Centroamérica.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, simbiosis micorrízica, microgravedad simulada, clinostato 2D.

\*Gal22868@uvg.edu.gt

†Vel22505@uvg.edu.gt

‡Mon22658@uvg.edu.gt

§Bia22040@uvg.edu.gt

¶Lop221175@uvg.edu.gt

||Ubi22068@uvg.edu.gt

\*\*plupo@uvg.edu.gt  <https://orcid.org/0000-0003-0896-6531>

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of simulated microgravity on the symbiosis between *Phaseolus vulgaris* and arbuscular mycorrhizal fungi, focusing on plant growth, root colonization, and protein content. The significance of this study lies in understanding how plants might adapt to space environments, which is essential for developing sustainable agricultural systems on long-duration missions. Plants were grown for 27 days under simulated microgravity conditions using a 2D clinostat and terrestrial gravity, with and without mycorrhizal fungi inoculation. Microscopic analysis revealed an increase in mycorrhizal colonization under simulated microgravity, with a greater presence of hyphae and vesicles, indicating enhanced symbiotic activity. Additionally, the Bradford method recorded a significant decrease in root protein concentration under microgravity, possibly as a metabolic adaptation to stress. Although no significant differences in root length were observed between treatments, a trend toward reduced growth in microgravity conditions was identified, potentially linked to hormonal alterations. These results highlight the potential for optimizing mycorrhizal symbiosis in simulated microgravity conditions to improve crop growth in various environments, with applications in both terrestrial and space agriculture. This study represents the first analysis of this symbiosis under simulated microgravity in Central America.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, mycorrhizal symbiosis, simulated microgravity, 2D clinostat.

## 1 Introducción

*Phaseolus vulgaris*, comúnmente conocido como frijol, es una leguminosa esencial tanto a nivel agrícola como nutricional debido a su alto contenido en proteínas, fibra, vitaminas y minerales; lo que lo convierte en un alimento fundamental en diversas dietas alrededor del mundo (Romero-Felix *et al.*, 2023; FIRA, 2022). Con un contenido proteico que oscila entre el 12-15 %, el frijol representa una fuente importante de nutrientes; especialmente en la dieta de los astronautas durante extensas misiones espaciales, ayudando a mitigar la pérdida de masa muscular y ósea provocada por la microgravedad (Erbersdobler *et al.*, 2017). En este contexto, explorar la viabilidad de cultivar *P. vulgaris* en entornos espaciales puede ayudar a desarrollar sistemas agrícolas autosostenibles durante misiones de larga duración.

En entornos espaciales, la microgravedad altera significativamente los procesos biológicos de las plantas; incluyendo la orientación del crecimiento, la absorción de agua y nutrientes, y el rendimiento general. Sin embargo, la interacción simbiótica con hongos micorrízicos arbusculares (AMF) ayuda a mejorar la absorción de nutrientes esenciales como fósforo y nitrógeno; y puede ser un componente fundamental para mitigar los efectos negativos de la microgravedad en el crecimiento vegetal (Baba *et al.*, 2022). Las AMF, que se encuentran en más del 80 % de las plantas vasculares, forman arbusculos y vesículas en las raíces; los cuales facilitan el intercambio de nutrientes y suele ser relevante en cultivos agrícolas como el frijol (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022; Honrubia, 2009).

Estudios previos han analizado cómo las condiciones de estrés, como la microgravedad, influyen en la dinámica de la simbiosis micorrízica y el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, en el estudio de Ruiz Sánchez *et al.* (2015) se observó que la colonización micorrízica sigue promoviendo el desarrollo vegetal, incluso en condiciones subóptimas como suelos inundados. Otras investigaciones, como la de Hayes *et al.* (2014), muestran que hongos como Piriformospora indica pueden incrementar el crecimiento radicular y mejorar la tolerancia al estrés abiótico bajo microgravedad simulada. Sin embargo, queda por investigar cómo estas interacciones simbióticas podrían optimizarse en condiciones espaciales para maximizar el crecimiento y productividad de plantas como el frijol.

En experimentos terrestres se utiliza un clinostato 2D como análogo de la microgravedad para sistemas biológicos (Eiermann *et al.*, 2013). Este tipo de rotación horizontal a través de vectores gravitacionales crea un cambio continuo en la orientación, lo que induce un estrés que se asemeja mucho al cambio constante de orientación que experimentan los organismos en condiciones de gravedad (Wang *et al.*, 2015). Al rotar las muestras a lo largo de dos ejes perpendiculares, el clinostato 2D minimiza el efecto de la gravedad terrestre, lo que proporciona un entorno simulado para estudiar las respuestas gravitacionales en diversos organismos y procesos biológicos (Eiermann *et al.*, 2013), en este caso la relación simbiótica entre hongos micorrízicos arbusculares y *Phaseolus vulgaris*.

La idea de este estudio surgió en el contexto de un curso de micología, con el objetivo de evaluar el impacto de la microgravedad simulada en la simbiosis entre *P. vulgaris* (frijol) y hongos micorrízicos arbusculares; y determinar su influencia en la colonización radicular. La comprensión de estas interacciones simbióticas en condiciones de microgravedad simulada es relevante para el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles en el espacio, además de ofrecer conocimientos aplicables a la agricultura en la Tierra; principalmente en suelos de baja fertilidad o en entornos adversos (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022). Este estudio busca contribuir a este campo emergente, proporcionando información que podría optimizar las estrategias agrícolas tanto en misiones espaciales como en aplicaciones terrestres.

## 2 Metodología

### 2.1 Selección de semillas

Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) comerciales y se colocaron en agua estéril por 5 min. Después de este tiempo, se descartaron las semillas que flotaron a la superficie del agua. Se seleccionaron 30 de las semillas que no fueron descartadas y sometieron a un proceso de desinfección. Para ello, se sumergieron en una solución de cloro al 0.4% durante 2 minutos, seguido de varios lavados con agua estéril para eliminar cualquier residuo de cloro (Hayes *et al.*, 2014; Dazart *et al.*, 2016).

### 2.2 Pregerminación de semillas

Luego, las semillas previamente desinfectadas se colocaron en algodón húmedo dentro de un recipiente transparente, evitando la saturación del mismo. El recipiente se situó en un invernadero durante 7 días, proporcionando una temperatura cálida y luz indirecta. Durante este período, se regaron las semillas una vez al día para asegurar una humedad constante.

### 2.3 Recuento de esporas

Se utilizó una solución stock de esporas micorrízicas que contenía una mezcla de diversas especies, predominando principalmente *Glomus intraradices* marca Itapollina (*Aegis irriga*). Después de homogenizar esta solución stock, se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  y se colocó en una cámara de Neubauer. Posteriormente se observó en un microscopio y se realizó el recuento de esporas (Arkhipov, 2016). En el recuento se identificó una concentración inicial de esporas de  $2.57 \times 10^7$  /mL. Se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución stock y se diluyó en 49 mL de agua desmineralizada estéril, para alcanzar una concentración final de  $5.14 \times 10^5$  esporas/mL.

### 2.4 Inoculación de plantas

Una vez finalizados los 7 días de pregerminación, las raíces de 10 plántulas se sumergieron rápidamente en agua oxigenada para su desinfección. Posteriormente, se remojaron en 100  $\mu\text{L}$  de la solución final de

esporas (~51400 esporas) por 5 horas dentro de una campana de flujo laminar (Hayes *et al.*, 2014; Dazart *et al.*, 2016). Tanto las plantas inoculadas, como las no inoculadas, se transfirieron a tubos Falcon estériles con 20 mL de medio MS; dejando las tapas ligeramente abiertas para permitir el intercambio gaseoso.

## 2.5 Condiciones de crecimiento

Para evitar la contaminación y permitir la entrada de luz, se preparó un ambiente estéril utilizando una caja cubierta con plástico transparente. Posteriormente, para simular condiciones de microgravedad, siete tubos Falcon (tres controles y cuatro inoculados con esporas micorrízicas) se colocaron en un clinostato 2D (VERNE) para simular condiciones de microgravedad y reducir la influencia de la gravedad terrestre. Dicho clinostato se operó a una velocidad de 10 rpm durante 27 días. Simultáneamente, otros siete tubos (tres controles y cuatro inoculados) se colocaron en el costado del simulador para asegurar que las muestras estuvieran expuestas a condiciones de vibración similares (Figura 1). Se monitoreó el crecimiento de las raíces durante este periodo, y se registraron las mediciones de longitud inicial y final mediante el software *Tracker Video Analysis and Modeling Tool*.

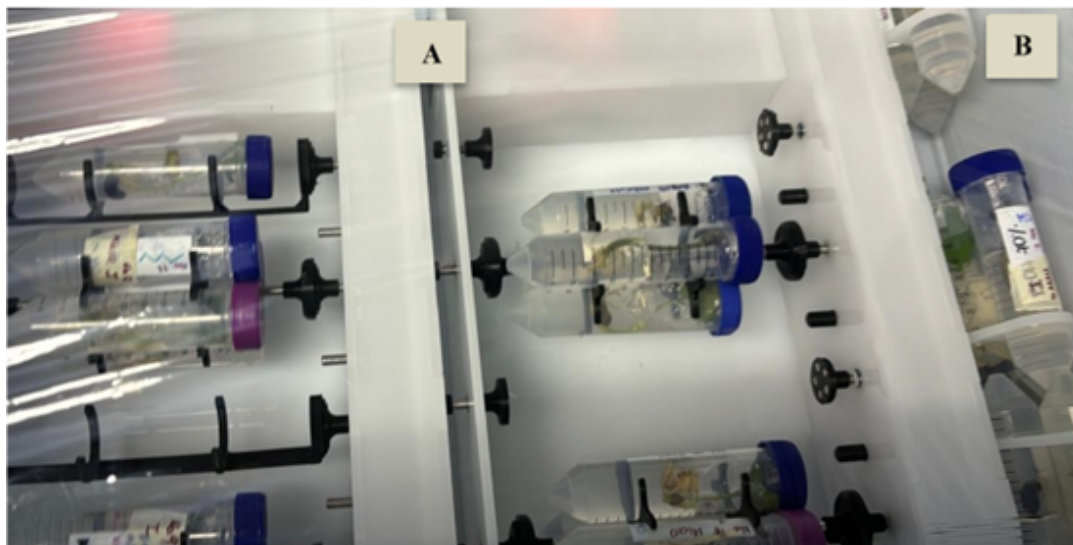


Figura 1: Configuración experimental del clinostato 2D y controles. (A) Tubos Falcon con muestras en el simulador de microgravedad. (B) Tubos de control adyacentes al simulador para mantener condiciones similares de vibración.

## 2.6 Análisis microscópico

Pasados los 27 días, se extrajeron las raíces de todas las plantas. Se cortaron en segmentos de 3-5 cm, se colocaron en una solución de KOH (10% p/v) y se calentaron durante 5 min, asegurándose de evitar la ebullición. Después de lavar las raíces con agua desmineralizada estéril, para eliminar el KOH, se sumergieron en una solución que contenía azul de lactofenol (5% v/v) y ácido acético (5% v/v); calentando los segmentos nuevamente durante 3 min. Se dejaron enfriar y se destiñeron con agua desmineralizada y unas gotas de la solución de ácido acético. Las raíces teñidas se cortaron en segmentos de aproximadamente 0.5 mm y se colocaron sobre un portaobjetos con unas gotas de agua. Finalmente, las muestras se observaron al microscopio óptico (LW Scientific) a 40X y 100X, para identificar las estructuras micorrízicas.

## 2.7 Cuantificación mediante el método de Bradford

Para la extracción de proteínas, se colocaron las raíces de las plántulas en un mortero frío, al que se le añadieron 50 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 1 mM). El tejido se maceró junto con el buffer hasta obtener una mezcla homogénea. Después, se transfirieron 40 mL del extracto a tubos Falcon de 50 mL, asegurando que los tubos estuvieran equilibrados en peso. Las muestras fueron centrifugadas a 24.000 g durante 20 minutos a 4°C, utilizando una centrifugadora Eppendorf 5804R. Tras la centrifugación, se recolectaron 20 mL del sobrenadante en nuevos tubos Falcon y el extracto se mantuvo en hielo para conservar su integridad. Luego, se agregó gradualmente sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración final del 45 % (p/v), agitando durante 30 minutos para facilitar la precipitación de proteínas. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 24.000g durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 15 mL de buffer PBS (Isaacson *et al.*, 2006).

Posterior a la extracción de proteínas, se prepararon estándares de albúmina sérica bovina (BSA) utilizando el buffer PBS y el reactivo de Bradford 1X a diferentes concentraciones (0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL y 2 mg/mL). Por otra parte, las muestras se prepararon agregando 20 µL de la muestra a analizar y 1 mL de reactivo de Bradford 1X. Tanto los estándares como las muestras fueron incubados en condiciones de oscuridad durante cinco minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis marca UNICO (Gold Technologies, 2019).

## 2.8 Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos de este estudio exploratorio consistieron en el análisis de dos elementos principales, la longitud de la raíz y la concentración promedio de proteínas a partir de extracciones de las plántulas.

La investigación fue realizada con 3 y 4 repeticiones, de forma que se analizaron 3 muestras inoculadas en condiciones de microgravedad simulada, 4 muestras inoculadas en condiciones de gravedad terrestre, 3 muestras no inoculadas en condiciones de microgravedad simulada y 4 muestras no inoculadas en condiciones de gravedad terrestre. En cuanto a las pruebas empleadas, se utilizó la Prueba T de *Student*, realizando la distinción entre pareada y no pareada según el elemento evaluado. Para la comparación de la longitud de raíz antes y después del período de crecimiento, es decir 27 días, se utilizó la Prueba T pareada. Mientras tanto, la concentración promedio de proteínas en las muestras se analizó utilizando la Prueba T no pareada. En ambos casos se utilizó un nivel de confianza del 95 %. Para la manipulación y análisis de datos, se utilizó RStudio (versión 2024.09.0-375) como interfaz de desarrollo para R (versión 4.4.1, R Foundation for Statistical Computing, 2024).

## 3 Resultados

Se realizó un estudio previo al presente en donde se evaluó la longitud de las raíces inoculadas sometidas a efectos de gravedad terrestre (Tierra) y microgravedad simulada (MicroG) luego de los 10, 12 y 15 días de inoculación con esporas. A través de ello se demostró una disminución del largo de la raíz a lo largo de los días para las plantas sometidas a microgravedad simulada; mientras que aquellas sometidas a gravedad terrestre presentó una disminución a los 12 días y un incremento de longitud a los 15 días. Como control se determinó la longitud de la raíz de frijoles sometidos a ambas condiciones, pero sin inoculación de esporas.

Adicionalmente, también se le proporcionó un enfoque a la colonización micorrízica para ambas condiciones luego de los 15 días posterior a la inoculación. Se determinó a través de las micrografías (Figura 2C y 2D), un mayor desarrollo de estructuras micorrízicas como esporas e hifas en aquellas plantas sometidas a efectos de microgravedad, además de que bajo estos efectos se observaron estructuras micorrízicas no identificadas. En las micrografías recolectadas para las plantas sometidas a efectos de gravedad terrestre, se observó una baja proporción de esporas e hifas y una ausencia de estructuras micorrízicas.

En este estudio se evaluó la influencia de la microgravedad simulada y la gravedad terrestre sobre la colonización micorrízica de las raíces de *P. vulgaris*, enfocándose en tres aspectos: visualización de estructuras micorrízicas, concentración de proteínas y longitud de las raíces. Se analizaron las condiciones de microgravedad simulada y gravedad terrestre, cada una con y sin inoculación de esporas micorrízicas (I y SI, respectivamente). Estos parámetros permitieron evaluar la respuesta diferencial en la colonización y desarrollo radicular bajo estas condiciones contrastantes.

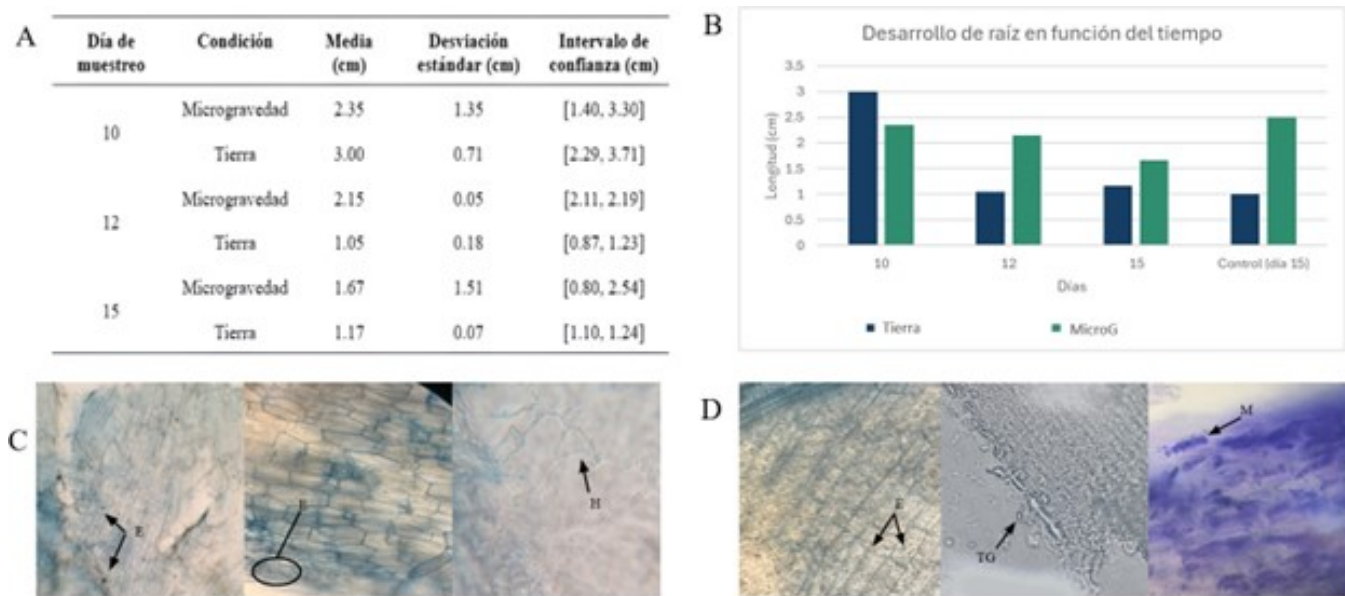


Figura 2: resultados preliminares de colonización micorrízica y longitud de raíz en condiciones de gravedad terrestre y microgravedad luego de 15 días de la inoculación. (A). Estadísticas descriptivas de la longitud de raíz del frijol bajo ambas condiciones en los días 10, 12 y 15 después de la inoculación con esporas (B). Representación gráfica del promedio de la longitud de la raíz de frijol bajo ambas condiciones luego de 10, 12, y 15 días después de la inoculación (C). Micrografías de raíces de frijol bajo efectos de gravedad terrestre a los 15 días (D). Micrografías de raíces de frijol bajo efectos de microgravedad simulada los 15 días. Las estructuras micorrízicas se marcan de la siguiente manera (C y D): esporas (E), hifas (H), estructuras micorrízicas no identificadas (M).

El crecimiento de *P. vulgaris* bajo condiciones de microgravedad simulada mostró diferencias significativas en varios parámetros morfológicos en comparación con el grupo control cultivado en gravedad terrestre. Las micrografías de las raíces de *P. vulgaris* (Figura 3) reflejan diferencias notables en la colonización micorrízica bajo condiciones de microgravedad simulada y gravedad terrestre. En las raíces sometidas a microgravedad simulada (Figura 3B), se observó una mayor abundancia de estructuras micorrízicas, con presencia de hifas y vesículas indicativas de una mayor actividad simbiótica en comparación con las raíces cultivadas bajo gravedad terrestre (Figura 3A). Las vesículas, estructuras fundamentales para el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, fueron prominentes bajo microgravedad simulada; mientras que no se identificaron bajo condiciones terrestres. Asimismo, las esporas y las hifas fueron más

visibles en las raíces expuestas a microgravedad simulada, lo que sugiere un incremento en la colonización micorrízica en estas condiciones.

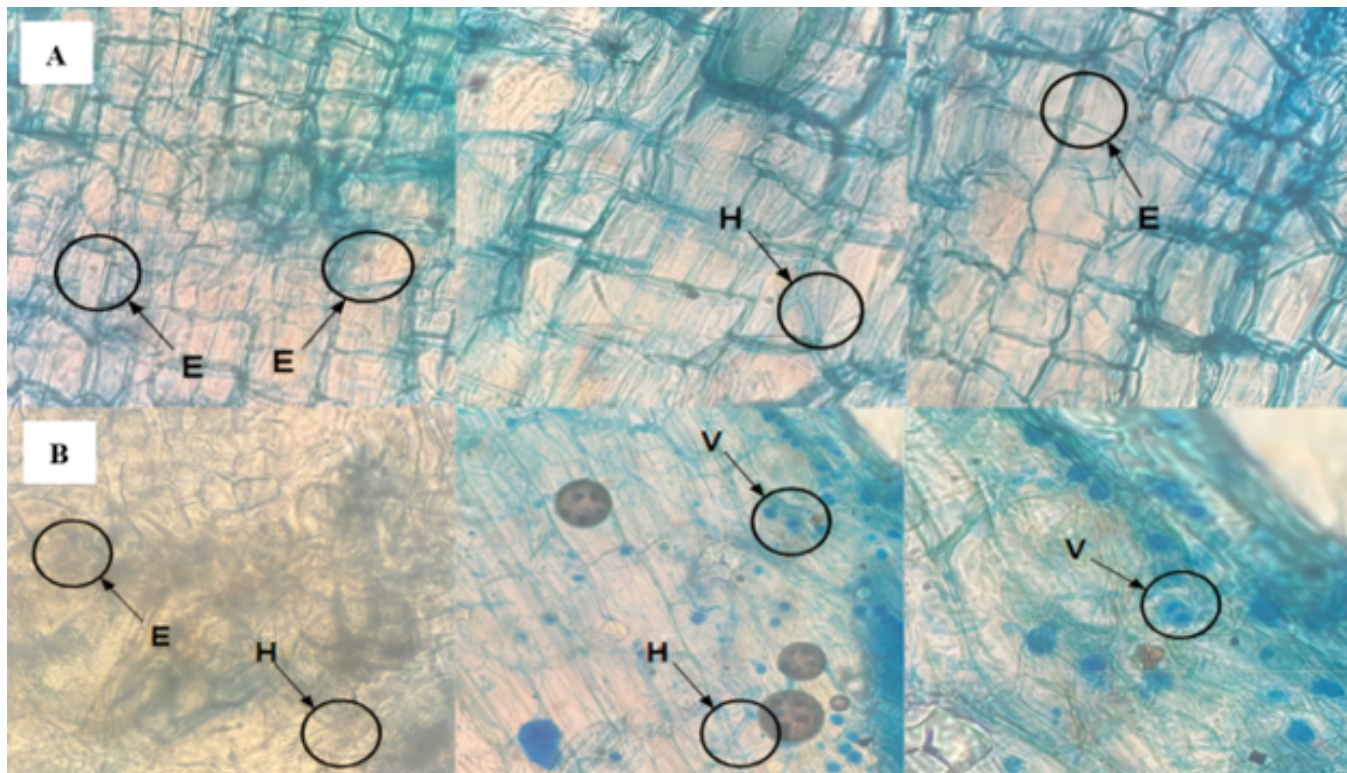


Figura 3: Colonización micorrízica de *P. vulgaris* en condiciones de microgravedad simulada y gravedad terrestre 27 días después de la inoculación. Las estructuras micorrízicas están marcadas de la siguiente manera: esporas (E), hifas (H) y Vesículas (V). (A) micrografía de la raíz inoculada de *P. vulgaris* bajo condiciones de gravedad terrestre. (B) micrografía de la raíz inoculada de *P. vulgaris* bajo condiciones de microgravedad simulada.

El análisis de la concentración de proteínas en las raíces de *P. vulgaris* bajo diferentes condiciones de gravedad (Figura 4A, Cuadro 1) muestra diferencias significativas entre los tratamientos. En particular, se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las condiciones de microgravedad simulada con inoculación (MicroG I) y sin inoculación (MicroG SI), así como entre las condiciones de gravedad terrestre con inoculación (Tierra I) y sin inoculación (Tierra SI). Además, también hubo una diferencia significativa entre las raíces bajo microgravedad simulada y gravedad terrestre.

## 4 Discusión

El principal objetivo de esta investigación era evaluar el efecto de la microgravedad simulada en la simbiosis entre la planta de frijol (*P. vulgaris*) y hongos micorrízicos arbusculares; comparando su crecimiento, colonización micorrízica y contenido proteico bajo condiciones de microgravedad simulada y gravedad terrestre.

### 4.1 Efecto de la microgravedad simulada en la colonización micorrízica de *P. vulgaris*

Se identificó que la simbiosis micorrízica en las plantas expuestas a microgravedad simulada presentó un desarrollo significativamente mayor en los 27 días de análisis en comparación con las plantas cultivadas

bajo condiciones de gravedad terrestre (Figura 3). Las micrografías revelan que las raíces de frijol cultivadas en gravedad terrestre presentan estructuras micorrízicas, como esporas e hifas, aunque en menor proporción que bajo microgravedad simulada. En condiciones de microgravedad, se observó una mayor densidad de esporas y distribución de hifas, junto con vesículas intracelulares ovaladas en las células corticales, lo que indica una adaptación favorable a la simbiosis micorrízica. Estas vesículas podrían facilitar la absorción de nutrientes, optimizando el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* en entornos de baja gravedad, como se ha sugerido en estudios previos (Urgiles Gómez *et al.*, 2016; Andrade-Torres, 2010).

De acuerdo con investigaciones previas, como la de Krzyzanski *et al.* (2021), bajo condiciones de gravedad terrestre las vesículas tienden a formarse en una etapa posterior al desarrollo de otras estructuras de almacenamiento de nutrientes, como los arbusculos; cuya vida media varía entre dos y doce días. Esto podría indicar que, en las plantas expuestas a microgravedad simulada, la presencia de estas vesículas se debe a una colonización completa y acelerada del hongo micorrízico en las raíces de frijol; lo cual, en condiciones de gravedad terrestre, suele tomar aproximadamente seis semanas (Buechel y Bloodnick, 2016). Esto sugiere que la microgravedad simulada favorece el desarrollo de las estructuras simbióticas de manera más rápida en comparación con la gravedad terrestre.

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con lo esperado, ya que las plantas suelen inducir la simbiosis micorrízica en respuesta a condiciones de estrés; como la microgravedad simulada. Esta condición gravitacional puede afectar la eficiencia de la simbiosis micorrízica al influir directamente en la biosíntesis y el transporte de estrigolactonas, compuestos involucrados en la señalización inicial de la simbiosis micorrízica y en la respuesta a estrés abiótico en plantas (Liu *et al.*, 2018; Borghi *et al.*, 2016). Además, se sabe que las estrigolactonas están positivamente reguladas por la vía de señalización de las auxinas, fitohormonas clave en el crecimiento vegetal (Saeed *et al.*, 2017). La literatura actual constata que la microgravedad tiene un efecto directo sobre la distribución y el transporte de auxinas en varias especies de plantas (Mazars *et al.*, 2014; Baba *et al.*, 2022); lo que sugiere que la microgravedad simulada podría influir indirectamente en la producción y movilidad de las estrigolactonas y facilitar la señalización involucrada en la formación de la simbiosis micorrízica.

Tabla 1: Estadísticas descriptivas de la concentración proteica de raíz.

Estadísticas	Micro G I mg/mL	Micro G SI mg/mL	Tierra I mg/mL	Tierra SI mg/mL
<b>Media aritmética</b>	0.0289 ± 0.00330	0.0482 ± 0.00625	0.403 ± 0.00324	0.335 ± 0.00722
<b>Desviación estándar</b>	0.00321	0.00556	0.00371	0.00490
<b>Intervalo de confianza</b>	[0.0228, 0.0349]	[0.0376, 0.0587]	[0.396, 0.410]	[0.326, 0.344]
<b>Coefficiente de variación</b>	11.1 %	11.5 %	0.919 %	1.46 %

En la tabla se muestran los resultados de la estadística descriptiva correspondientes a la concentración de proteínas en los extractos de raíz de *P. vulgaris* bajo diferentes condiciones experimentales. Se realizaron tres réplicas por cada muestra. Los datos incluyen los resultados de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (SI), tanto en condiciones de microgravedad simulada (MicroG) como en gravedad terrestre (Tierra). El límite de detección (LOD) fue 0.0193 mg/mL, y el límite de cuantificación (LOQ) fue 0.0642 mg/mL.

En el contexto de los resultados obtenidos, la alteración en la distribución de auxinas podría explicar el desarrollo de la simbiosis micorrízica observado en las plantas de frijol sometidas a microgravedad simulada. Es probable que este cambio haya optimizado la señalización entre las raíces y los hongos micorrízicos, acelerando el establecimiento de la simbiosis. Además, dado que las auxinas regulan diversos



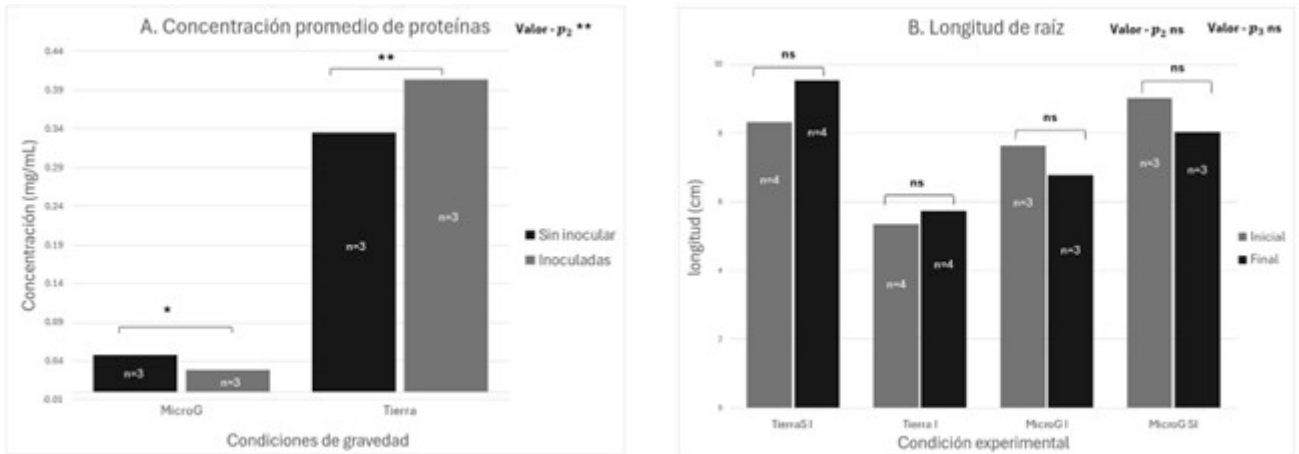


Figura 4: Efecto de la microgravedad simulada y la gravedad terrestre sobre la concentración de proteínas y la longitud de las raíces de *P. vulgaris*. (A) Concentraciones de proteínas en cuatro condiciones: microgravedad simulada (MicroG) y gravedad terrestre (Tierra), con y sin inoculación de esporas micorrízicas (I y SI, respectivamente). Las líneas con valores  $p$  indican el nivel de diferencia significativa entre las muestras: entre inoculadas y no inoculadas dentro de cada tipo de gravedad, y  $p_2$  entre las concentraciones de microgravedad simulada y gravedad terrestre. (B) Longitud inicial y final de las raíces en las cuatro condiciones experimentales. Las líneas representan a los valores  $p$  que comparan el crecimiento antes y después dentro de cada condición,  $p_2$  compara entre microgravedad simulada y gravedad terrestre al final de la experimentación, y  $p_3$  compara inoculadas y no inoculadas al final. El tamaño de muestra ( $n$ ) se representa en la gráfica. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ; ns:  $p > 0.05$ .

aspectos del crecimiento vegetal, su redistribución en microgravedad podría haber favorecido no solo la simbiosis; sino también la proliferación de estructuras micorrízicas, como vesículas e hifas. Esta hipótesis es coherente con las observaciones de las micrografías, donde las raíces en microgravedad muestran una mayor cantidad de esporas e hifas en comparación con las plantas bajo gravedad terrestre.

Es importante mencionar que, debido a la limitada cantidad de literatura existente sobre la simbiosis micorrízica en condiciones de microgravedad, las interpretaciones de este estudio se basan principalmente en los datos obtenidos y en comparaciones con estudios en gravedad terrestre. No obstante, los resultados presentados permiten establecer un punto de partida para futuras investigaciones que busquen explorar el impacto de la microgravedad en las interacciones planta-hongo y su potencial aplicación en la agricultura en el espacio.

En el estudio preliminar, a pesar de las diferencias metodológicas se obtuvo hallazgos similares entre este y el estudio actual. La duración del estudio preliminar fue un aspecto clave que varió significativamente: mientras que el estudio preliminar evaluó el crecimiento de las plantas durante un periodo de 15 días, el estudio actual extendió la observación a 27 días. Esta ampliación temporal permitió un análisis más detallado sobre las adaptaciones a largo plazo de *P. vulgaris* bajo condiciones de microgravedad simulada, aspecto esencial para comprender mejor el comportamiento simbiótico y las posibles aplicaciones de esta interacción en ambientes de estrés abiótico como el espacio.

La duración limitada en el estudio preliminar llevó a resultados parciales, ya que impidió la observación completa de la colonización micorrízica en las raíces de las plantas de frijol. A pesar de evidenciarse un incremento en la biomasa radicular y una mayor presencia de esporas bajo microgravedad simulada, estos resultados reflejaron una simbiosis incompleta, dada la falta de estructuras especializadas como vesículas y arbusculos, las cuales son indicativas de una simbiosis plenamente establecida.

## 4.2 Efecto de la microgravedad simulada en la concentración proteica de *P. vulgaris*

Los resultados obtenidos reflejan diferencias significativas en la concentración proteica de las raíces de *P. vulgaris* bajo condiciones de microgravedad simulada y gravedad terrestre, así como entre plantas inoculadas y no inoculadas (Figura 4A, Cuadro 1). Las plantas cultivadas bajo gravedad terrestre presentaron concentraciones proteicas más elevadas en comparación con aquellas expuestas a microgravedad simulada. Esto concuerda con investigaciones previas que sugieren que la microgravedad induce un estado de estrés abiótico que desvía los recursos metabólicos de las plantas hacia mecanismos de supervivencia, lo que afecta la síntesis de proteínas (Kumar *et al.*, 2021). Desde esta perspectiva, se resalta el impacto positivo de la inoculación micorrízica bajo condiciones óptimas de crecimiento.

La disminución en la concentración proteica en plantas cultivadas bajo condiciones de microgravedad, tanto inoculadas como no inoculadas, parece estar relacionada con alteraciones fisiológicas inducidas por este entorno. Investigaciones sugieren que la microgravedad impacta significativamente la distribución de nutrientes en las plantas, afectando procesos clave como la síntesis de proteínas y el metabolismo celular (McLoughlin *et al.*, 2020; Yemets *et al.*, 2024). En particular, se ha demostrado que en microgravedad se altera el tráfico de proteínas a través de las membranas, afectando la señalización hormonal y el transporte de nutrientes esenciales, como las auxinas, que también son cruciales para el desarrollo y la respuesta al estrés (Mazars *et al.*, 2014; Baba *et al.*, 2022).

Además, en condiciones de microgravedad, las plantas suelen activar mecanismos de autofagia como respuesta de supervivencia celular para degradar y reciclar proteínas y otras macromoléculas dañadas o innecesarias bajo condiciones de estrés (McLoughlin *et al.*, 2020; Yemets *et al.*, 2024). Este proceso de autofagia podría haber influido en la disminución de las concentraciones de proteínas observadas en las plantas expuestas a microgravedad simulada, ya que permite a las plantas reutilizar componentes moleculares críticos en un entorno con recursos limitados. Es probable que, ante la restricción de nutrientes, las plantas priorizaran la conservación de recursos esenciales mediante la degradación selectiva de estructuras, lo que las ayudaría a favorecer su supervivencia en el estrés inducido por la microgravedad simulada.

Por otra parte, algunos autores sugieren que la microgravedad puede provocar tanto efectos beneficiosos como perjudiciales, dependiendo de la respuesta fisiológica de la planta y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Maffei *et al.*, 2024). Aunque, en este caso, los bajos niveles de proteínas observados podrían sugerir que las condiciones de microgravedad simulada impusieron limitaciones metabólicas que afectaron negativamente la capacidad de la planta para realizar una síntesis proteica eficiente (Yemets *et al.*, 2024). Esto probablemente se incrementó por la escasez de nutrientes esenciales en el medio de cultivo (McLoughlin *et al.*, 2020). Diversos estudios han demostrado que un entorno enriquecido con nitrógeno puede contrarrestar estos efectos al mejorar significativamente la concentración de proteínas en los cultivos, incluso bajo condiciones de estrés abiótico como la microgravedad simulada (Farooq *et al.*, 2024). Por lo tanto, optimizar la disponibilidad de nutrientes, particularmente el nitrógeno, en el medio de cultivo podría ser una buena estrategia para mitigar las restricciones metabólicas impuestas por la microgravedad simulada.

Es importante destacar que el protocolo de extracción de proteínas empleado en este estudio solo permitió cuantificar las proteínas intracelulares, excluyendo una fracción significativa del contenido proteico total de las plantas; específicamente las proteínas de membrana y pared celular. Estas proteínas juegan un papel fundamental en la estructura y función celular, especialmente en la interacción de la planta con su entorno y en su adaptación a condiciones de estrés (Mazars *et al.*, 2014), como las generadas por la microgravedad. Estudios han demostrado que la microgravedad puede alterar la síntesis de estos componentes

celulares, lo que afecta su producción y estabilidad; y puede influir en la dinámica del crecimiento y la respuesta adaptativa de las plantas (Kordyum y Chapman, 2017). Por lo tanto, la falta de cuantificación de las proteínas de membrana y pared celular en este estudio podría haber sesgado los resultados finales, ya que no se incluyó una porción esencial del contenido proteico.

### 4.3 Efecto de la microgravedad simulada en el crecimiento de *P. vulgaris*

Se conoce que la microgravedad afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas al alterar procesos fisiológicos fundamentales, como la división celular y la señalización hormonal (Paul *et al.*, 2012). La regulación de auxinas, que también es importante en el desarrollo de las raíces y la formación de nódulos; se suele ver alterada en especies como *Medicago* y *Arabidopsis* (Wasson *et al.*, 2006). En investigaciones previas, se ha documentado una reducción en la división celular en las raíces bajo microgravedad, lo que provoca cambios en la morfología y afecta el crecimiento total de las plantas (Kiss *et al.*, 2019; Dautart *et al.*, 2016).

En este estudio, no se observaron diferencias significativas en la longitud radicular entre plantas cultivadas bajo microgravedad simulada y gravedad terrestre; lo que contrasta con investigaciones previas que reportan cambios notables en la longitud de las raíces en condiciones de microgravedad (Paul *et al.*, 2012; Dautart *et al.*, 2016). Sin embargo, la tendencia decreciente en la longitud final bajo condiciones de microgravedad simulada (Figura 3B) aunque no fue estadísticamente significativa, podría estar relacionada con la alteración en la distribución de auxinas, un fenómeno descrito en otras plantas expuestas a microgravedad (Kiss *et al.*, 2019).

Además, la tendencia observada en la gráfica también podría estar asociada con las condiciones experimentales. Este estudio se llevó a cabo en un laboratorio didáctico, en donde la contaminación cruzada con hongos y bacterias es común debido a la diversidad de experimentos realizados. En base a esto, es importante mencionar que se aisló e identificó al hongo *Fusarium spp.* como contaminante en las muestras inoculadas y a mohos ambientales en las no inoculadas; lo que pudo haber afectado negativamente el crecimiento de las plantas. En condiciones de microgravedad, se ha documentado que *Fusarium spp.* incrementa su virulencia (D'Agostino *et al.*, 2022; Totiline *et al.*, 2023); lo que podría haber provocado una infección en las plantas, causando pérdida de tejido vegetal y afectando el crecimiento radicular. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, la infección por *Fusarium* pudo interferir en la absorción de nutrientes y la división celular, afectando el desarrollo normal de las raíces. Esto podría explicar la disminución, aunque no significativa, en la longitud final de las raíces expuestas a microgravedad simulada.

Es fundamental realizar más estudios sobre los efectos de la microgravedad en la fisiología de las plantas, especialmente en *P. vulgaris*, para comprender mejor los mecanismos que están detrás de estas respuestas. También, se podría analizar si la alteración de la división celular, junto con los cambios hormonales, desempeña un rol más complejo en la adaptación de las plantas a condiciones espaciales. Asimismo, el control de patógenos como *Fusarium* es crucial en futuras investigaciones para evitar la interferencia en estudios que se enfocan principalmente en evaluar el impacto de la microgravedad simulada en el crecimiento vegetal.

Dada la necesidad de mejorar las condiciones experimentales para reducir la influencia de factores externos en el crecimiento, la absorción de nutrientes y la simbiosis micorrízica; es recomendable implementar un control con rotación vertical en futuros estudios. Este control ayudaría a discernir si el crecimiento observado en microgravedad es efecto de la redistribución de nutrientes o de la orientación de la luz, lo que podría sesgar los resultados de crecimiento radicular y micorrízico. Como se ha identificado previamente, la disposición espacial puede alterar significativamente la distribución de nutrientes en medios

cerrados (Dauzart *et al.*, 2016; Hayes *et al.*, 2014; Sathasivam *et al.*, 2021), lo que destaca la importancia de este control adicional en estudios de microgravedad simulada.

Además, sería útil investigar cómo las plantas cultivadas en microgravedad simulada se adaptan al ser reintroducidas en suelos terrestres, especialmente en contextos agrícolas con suelos de baja fertilidad o condiciones adversas. Estudios previos han demostrado que especies como *Arabidopsis thaliana*, después de ser cultivadas en microgravedad en la Estación Espacial Internacional, presentan adaptaciones significativas al ser expuestas nuevamente a la gravedad terrestre; lo cual afecta su orientación y respuesta hormonal (Medina *et al.*, 2021). Estas observaciones sugieren que el cultivo en condiciones de microgravedad simulada podría inducir adaptaciones que, al regresar a la Tierra, fortalezcan la eficiencia en su crecimiento y la simbiosis con hongos micorrízicos. Explorar estos efectos podría ofrecer estrategias novedosas para optimizar la producción agrícola en suelos con escasez de nutrientes, promoviendo una simbiosis micorrízica más efectiva.

En contraste al estudio preliminar en comparación del estudio actual permitió un análisis más exhaustivo y detallado de la simbiosis en condiciones de microgravedad simulada, logrando observar una colonización micorrízica más completa en las raíces de *P. vulgaris*. Se documentó la presencia de vesículas y otras estructuras simbióticas, las cuales sugieren una simbiosis funcional plena bajo dichas condiciones. Estas estructuras, además de facilitar el intercambio de nutrientes, podrían ofrecer una ventaja adaptativa para las plantas en condiciones de microgravedad, contribuyendo a la resiliencia de los cultivos en entornos espaciales.

## 5 Conclusiones

El estudio evaluó cómo la microgravedad simulada afecta la simbiosis entre *P. vulgaris* y hongos micorrízicos arbusculares; en donde se observó una mayor colonización micorrízica en las raíces, con estructuras hifales, esporas y vesículas que sugieren una simbiosis completa bajo esta condición. Estos resultados indican que la microgravedad simulada podría ofrecer ventajas adaptativas al cultivo de frijol, promoviendo su desarrollo bajo estrés ambiental. Asimismo, en las plantas cultivadas bajo microgravedad simulada se observó una menor concentración proteica en comparación con las cultivadas en gravedad terrestre, lo que sugiere la activación de mecanismos adaptativos para la conservación de recursos en condiciones de estrés. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la longitud radicular entre ambos tratamientos, se detectó una tendencia a la reducción en el crecimiento bajo microgravedad simulada, posiblemente debido a la presencia de contaminantes como *Fusarium spp.* que pudieron afectar el desarrollo de las plantas.

Esta investigación constituye el primer análisis en Guatemala y Centroamérica en emplear un clinostato bidimensional para simular condiciones de microgravedad y observar la colonización por hongos micorrízicos arbusculares en plantas de importancia agrícola. Por lo tanto, estos descubrimientos abren nuevas posibilidades para aplicar la simulación de microgravedad en la agricultura local, evaluando su efectividad en otros cultivos de importancia regional en zonas afectadas por estrés ambiental.

## 6 Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Patrizia Lupo por su constante acompañamiento y apoyo a lo largo de toda la investigación. También, le agradecemos a la Dra. Dalia Lau por proporcionarnos las esporas micorrízicas utilizadas en la experimentación y por su valioso asesoramiento durante el estudio. Igualmente, extendemos nuestro reconocimiento a la MSc. Christa Contreras y a la Lic. Katherinne Herrera por su apoyo

durante la fase de experimentación. Por último, agradecemos al Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala por la donación de reactivos y el acceso al equipo necesario para la experimentación, así como al Laboratorio de Protección Vegetal y al personal del invernadero de la misma institución por su apoyo.

## 7 Referencias

- Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*, 61(4):84–90.
- Arkhipov, S. (2016). Method for counting fungal spores. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1074.4560/1>.
- Baba, A., Mir, M., Riyazuddin, R., Cséplő, A., Rigó, G., y Fehér, A. (2022). Plants in Microgravity: Molecular and Technological Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810548>.
- Borghi, L., Liu, G. W., Emonet, A., Kretzschmar, T., y Martinoia, E. (2016). The importance of strigolactone transport regulation for symbiotic signaling and shoot branching. *Planta*, 246(6):1351–1360. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2503-9>.
- Buechel, T. y Bloodnick, E. (2016). Description of types, benefits and uses - Greenhouse Product News. <https://gpnmag.com/article/mycorrhizae-description-of-types-benefits-and-uses/>.
- Carrillo-Saucedo, S. M., Puente-Rivera, J., Montes-Recinas, S., y Ortega, R. C. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta Botanica Mexicana*, (129). <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1932>.
- Dauzart, A. J. C., Vandenbrink, J. P., y Kiss, J. Z. (2016). The Effects of Clinorotation on the Host Plant, *Medicago truncatula*, and Its Microbial Symbionts. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences*, 3. <https://doi.org/10.3389/fspas.2016.00003>.
- D'Agostino, M., Babin, A.-L., Zaffino, M., Frippiat, J.-P., Machouart, M., y Debourgogne, A. (2022). Simulated Microgravity Created Using a Random Positioning Machine Induces Changes in the Physiology of the *Fusarium solani* Species Complex. *Microorganisms*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112270>.
- Eiermann, P., Kopp, S., Hauslage, J., Hemmersbach, R., Gerzer, R., e Ivanova, K. (2013). Adaptation of a 2-D Clinostat for Simulated Microgravity Experiments with Adherent Cells. *Microgravity Sci. Technol.*, 25:153–159. <https://doi.org/10.1007/s12217-013-9341-1>.
- Erbersdobler, H., Barth, C., y Jahreis, G. (2017). Legumes in human nutrition nutrient content and protein quality of pulses. *Ernährungs Umschau*, 64:134 – 139. <https://doi.org/10.4455/eu.2017.034>.
- Farooq, M., Ali, S., Khan, M., Jang, Y.-H., Kim, E.-G., Zhao, D.-D., y Kim, K.-M. (2024). Investigating plant responses to microgravity and adaptations in gravisensitive environments. *Environmental Sciences Europe*, 36. <https://doi.org/10.1186/s12302-024-00851-7>.
- FIRA (2022). Panorama agroalimentario – frijol 2022. Technical report, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Recuperado de <https://sursureste.org.mx/wp-content/uploads/2023/01/Panorama-Agroalimentario-Frijol-2022.pdf>.

Gold Technologies (2019). Bradford Protein Assay: For protein Quantification. Technical report, Goldbio. Disponible en: <https://www.goldbio.com/documents/3604/BradfordProteinAssay.pdf>.

Hayes, M. W., Stutte, G. W., McKeon-Bennett, M., y Murray, P. G. (2014). Mutualism Within a Simulated Microgravity Environment - Promotes the Growth of *medicago truncatula*. *Gravitational and Space Research*, 2(2):21–33. <https://doi.org/10.2478/gsr-2014-0015>.

Honrubia, M. (2009). The Mycorrhizae: a plant-fungus relation that has existed for more than 400 million years. *Anales Del Jardín Botánico De Madrid*, 66(S1):133–144. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2226>.

Isaacson, T., Damasceno, C. M., Saravanan, R. S., He, Y., Catalá, C., Saladié, M., y Rose, J. K. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature protocols*, 1(2):769–774. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.102>.

Kiss, J. Z., Wolverton, C., Wyatt, S. E., Hasenstein, K. H., y Van Loon, J. J. (2019). Comparison of Microgravity Analogs to Spaceflight in Studies of Plant Growth and Development. *Frontiers In Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01577>.

Kordyum, E. L. y Chapman, D. K. (2017). Plants and microgravity: Patterns of microgravity effects at the cellular and molecular levels. *Cytology And Genetics*, 51(2):108–116. <https://doi.org/10.3103/s0095452717020049>.

Krzyzanski, H., Milaneze, M., y Carrenho, R. (2021). Arbuscular mycorrhizal and dark septate fungi are not common in roots of epiphytic pteridophytes of a transitional forest area in south brazil. *Acta Botanica Brasilia*, pp. 569–576. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0396>.

Kumar, V., Abbas, A. K., y Aster, J. C. (2021). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Elsevier Health Sciences.

Liu, G., Bollier, D., Gübeli, C., Peter, N., Arnold, P., Egli, M., y Borghi, L. (2018). Simulated microgravity and the antagonistic influence of strigolactone on plant nutrient uptake in low nutrient conditions. *NPJ Microgravity*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41526-018-0054-z>.

Maffei, M. E., Balestrini, R., Costantino, P., Lanfranco, L., Morgante, M., Battistelli, A., y Del Bianco, M. (2024). The physiology of plants in the context of space exploration. *Communications Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06989-7>.

Mazars, C., Brière, C., Grat, S., Pichereaux, C., Rossignol, M., Pereda-Loth, V., Eche, B., Boucheron-Dubuisson, E., Le Disquet, I., Medina, F. J., Graziana, A., y Carnero-Diaz, E. (2014). Microgravity Induces Changes in Microsome-Associated Proteins of Arabidopsis Seedlings Grown on Board the International Space Station. *PLOS ONE*, 9(3):1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091814>.

McLoughlin, F., Marshall, R. S., Ding, X., Chatt, E. C., Kirkpatrick, L. D., Augustine, R. C., Li, F., Otegui, M. S., y Vierstra, R. D. (2020). Autophagy Plays Prominent Roles in Amino Acid, Nucleotide, and Carbohydrate Metabolism during Fixed-Carbon Starvation in Maize. *The Plant Cell*, 32(9):2699–2724. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00226>.

Medina, F. J., Manzano, A., Villacampa, A., Ciska, M., y Herranz, R. (2021). Understanding Reduced Gravity Effects on Early Plant Development Before Attempting Life-Support Farming in the Moon and Mars. *Frontiers In Astronomy And Space Sciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fspas.2021.729154>.

- Paul, A., Amalfitano, C. E., y Ferl, R. J. (2012). Plant growth strategies are remodeled by spaceflight. *BMC Plant Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-232>.
- Romero-Felix, C. S., del Paso, D. F. P., Salas-Arellanes, J. A., Saucedo-Acosta, R., Buelna-Tarín, S., y López-Valenzuela, B. E. (2023). Bioestimulantes en el crecimiento y rendimiento de *P. vulgaris* L. en el Norte de Sinaloa. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(2).
- Ruiz Sánchez, M., Santana Baños, Y., Muñoz Hernández, Y., Martínez Robaina, A., y Vishnu Bharat, B. (2015). Simbiosis de micorrizas arbusculares en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de inundación y secano. *Acta Agronómica*, 64:227–233.
- Saeed, W., Naseem, S., y Ali, Z. (2017). Strigolactones Biosynthesis and Their Role in Abiotic Stress Resilience in Plants: A Critical Review. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01487>.
- Sathasivam, M., Hosamani, R., K Swamy, B., y Kumaran G, S. (2021). Plant responses to real and simulated microgravity. *Life Sciences in Space Research*, 28:74–86. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2020.10.001>.
- Totsline, N., Kniel, K. E., y Bais, H. P. (2023). Microgravity and evasion of plant innate immunity by human bacterial pathogens. *NPJ Microgravity*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41526-023-00323-x>.
- Urgiles Gómez, N., Haug, I., Setaro, S., y Aguirre, N. (2016). *Introduction to Mycorrhizas in the Tropics with Emphasis on the Montane Forest in Southern Ecuador*. EDILOJA. ISBN: 978-9978-355-32-9.
- Wang, H., Li, X., Krause, L., Görög, M., Schüller, O., Hauslage, J., Hemmersbach, R., Kircher, S., Lasok, H., Haser, T., Rapp, K., Schmidt, J., Yu, X., Pasternak, T., Aubry-Hivet, D., Tietz, O., Dovzhenko, A., Palme, K., y Ditengou, F. A. (2015). 2-D Clinostat for Simulated Microgravity Experiments with *Arabidopsis* Seedlings. *Microgravity Science And Technology*, 28(1):59–66. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9478-1>.
- Wasson, A. P., Pellerone, F. I., y Mathesius, U. (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *The Plant Cell*, 18(7):1617–1629. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038232>.
- Yemets, A., Shadrina, R., Blume, R., y Plokhovska, S. and Blume, Y. (2024). Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. *Npj Microgravity*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41526-024-00381-9>.