

EFFECTO CONJUNTO DE LA GRAVEDAD Y LA LUZ EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DEL MERISTEMO RADICULAR DE *BRASSICA OLERACEA*

Víctor Vázquez Vilriales

TRABAJO DE FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica: María Del Carmen Portillo Guisado, Doctora en Biología y Microbiología Molecular, Depto. Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili, carmen.portillo@urv.cat

En cooperación con: Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) - Consejo de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB), Madrid

Tutor profesional: Francisco Javier Medina Diaz, Doctor en Ciencias Biológicas, Depto. Biotecnología Microbiana y de Plantas, fjmedina@cib.csic.es

Dirigido por: Aránzazu Manzano Pérez, Doctora en Biología, Depto. Biotecnología Microbiana y de Plantas, aranzazu@cib.csic.es

Junio 2022

Yo, Víctor Vázquez Vilriales, con DNI 02316069S, soy conecedor de la guía de prevención del plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como a plagio por la URV.

Tarragona, 07 de junio de 2022

(firma)



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Javier Medina por la oportunidad de poder realizar las prácticas y el trabajo de final de grado en su grupo de investigación del Nucleolo, Proliferación Celular y Microgravedad en Madrid, el cual hizo posible uno de mis sueños desde pequeño, poder trabajar en el campo de la biología espacial y que desde el primer día me ha aportado su gran ilusión y conocimiento y lo admiro por ello.

También me gustaría agradecer la oportunidad de haber podido viajar a Universidad Paul Sabatier, Francia y haber vivido la experiencia de participar en un proyecto internacional de la ESA sobre biología espacial.

Me gustaría dar las gracias a Raúl Herranz por también hacer posible mi estancia y por toda la atención y disponibilidad que me ha mostrado durante todo mi periodo de prácticas así como toda su experiencia.

De igual forma, agradecer a Aránzazu Manzano, no solo por la gran dirección y ayuda con el trabajo de final de grado, sino como gran compañera de laboratorio que ha confiado en mí y me ha enseñado a trabajar hábilmente y ha depositado toda su paciencia y destreza en resolver todas mis dudas.

Por último, alabar a la tutora Carmen Portillo por la buena atención y asesoramiento a la hora de llevar a cabo mi trabajo de final de grado.

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	5
RESUMEN + palabras clave / ABSTRACT + keywords	6
INTRODUCCIÓN	8
1. Efecto de la gravedad y la luz en el crecimiento y desarrollo de las plantas ..	8
2. Gravitropismo y fototropismo	9
2.1. Detección del vector gravedad	9
2.2. Percepción de la luz	10
2.3. Transducción de la señal gravitrópica y fototrópica	11
3. Proliferación y crecimiento celular en el tejido meristemático	12
3.1. Crecimiento celular (nucléolo y biogénesis de ribosomas)	13
3.2. Ciclo celular	13
3.3. Estructura de la raíz primaria	14
4. Biología de plantas en niveles alterados de gravedad	15
4.1. Microgravedad simulada	16
4.2. Gravedad parcial simulada	17
4.3. Hipergravedad simulada.....	18
4.4. Efectos de la microgravedad, gravedad parcial e hipergravedad en la raíz... 19	
HIPÓTESIS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Material biológico	23
2. Proyecto ROOTROPS	23
2.1. Dispositivo ROOTROPS.....	23
2.2. Montaje unidad interna	25
3. Experimento clinostato inclinado	26
4. Procesamiento de las muestras	28
4.1. Fijación de las muestras.....	28
4.2. Microscopía confocal.....	28
5. Análisis estadístico	30

6. Técnicas transcriptómicas (RNAseq)	31
6.1. Extracción del ARN	31
6.2. Secuenciación de las muestras	32
RESULTADOS	34
1. Proyecto ROOTROPS	34
1.1. Proliferación celular	34
1.2. Purificación y calidad del ARN extraído	35
2. Experimento clinostato inclinado	37
2.1. Análisis cualitativo del crecimiento de las plántulas	37
2.2. Inmunofluorescencia anti-fibrilarina	38
DISCUSIÓN	40
1. Proyecto ROOTROPS (proliferación celular)	40
2. Experimento clinostato inclinado (análisis cualitativo dirección de crecimiento)	41
CONCLUSIONES	42
FUTUROS ASPECTOS	43
AUTOEVALUACIÓN	44
BIBLOGRAFÍA	45
ANEXOS	51
ANEXO 1: Fotografías utilizadas en la cuantificación de la proliferación celular	51
ANEXO 2: Protocolo de extracción del ARN de la planta.....	52

DATOS DEL CENTRO

Este trabajo se basa en la estancia de prácticas en el grupo de investigación Nucleolo, Proliferación Celular y Microgravedad en el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB), una institución del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ubicada en Madrid.

El grupo forma parte del Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas y es pionero en la investigación biológica espacial, tanto a nivel nacional como mundial con proyectos de cooperación internacional de la NASA o la ESA.

Hay actualmente dos líneas de investigación sobre la biología espacial en plantas, una centrada más en las alteraciones celulares y moleculares producidos por la exposición a vuelos espaciales, liderada por Javier Medina Diaz y la otra más enfocada en microgravedad simulada, liderada por Raúl Herranz Barranco. La distribución metodológica también está dividida, siendo la parte de biología celular por técnicas de microscopia liderada por Javier Medina y sobre la biología molecular mediante técnicas transcriptómicas por Raúl Herranz.

Por último mencionar a Aránzazu Manzano Pérez, antigua FPI y actual contratada posdoctoral del grupo que ha dirigido mi trabajo de final de grado.

RESUMEN

En las misiones espaciales de larga duración, el uso de las plantas comestibles será clave para el reciclaje y producción de los elementos básicos para la vida, como nutrientes o el oxígeno en lo que se conoce como sistemas de soporte vital. Las plantas en sus primeros estadios del desarrollo experimenta estrés en entornos de gravedad alterada y se ha visto que gracias a una fotoestimulación se pueden paliar estas alteraciones.

Por ello, este trabajo se basa en la continuación del actual proyecto llamado ROOTROPS donde se estudia la interacción entre gravitropismo y fototropismo en la especie *Brassica oleracea*. En concreto, se estudia el efecto en condiciones de microgravedad y gravedad parcial (μg , 0,17g, 0,37g), de hipergravedad (5g, 10g, 15g y 20g) junto con una fotoestimulación lateral con luz blanca y oscuridad en la competencia meristemática de la raíz por técnicas microscópicas y transcriptómicas. En el presente estudio se ha demostrado que el estrés generado en μg respecto al 1g en oscuridad por un aumento de la proliferación celular es contrarrestado por la iluminación del meristemo radicular con luz blanca.

Palabras clave: microgravedad, gravedad parcial, hipergravedad, gravitropismo, fototropismo, luz blanca, proliferación celular, *Brassica oleracea*.

ABSTRACT

In long duration space missions, the use of edible plants will be key for the recycling and production of basic elements for life, such as nutrients or oxygen in what are known as life support systems. Plants in their early stages of development experience stress in environments of altered gravity and it has been seen that thanks to photostimulation these alterations can be alleviated.

Therefore, this work is based on the continuation of the current project called ROOTROPS where the interaction between gravitropism and phototropism in *Brassica oleracea* is studied. Specifically, the effect under microgravity and partial gravity (μg , 0.17g, 0.37g), hypergravity (5g, 10g, 15g and 20g) conditions together with lateral photostimulation with white light and darkness on root meristematic competence is studied by microscopic and transcriptomic techniques. In the present study, it has been demonstrated that the stress generated in μg with respect to 1g in darkness by an increase in cell proliferation is counteracted by illumination of the root meristem with white light.

Key words: microgravity, partial gravity, hypergravity, gravitropism, phototropism, white light, cell proliferation, *Brassica oleracea*.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales la humanidad ha tendido a mirar hacia arriba, hacia el vasto universo guiándose por las estrellas. Con el ritmo actual del avance tecnológico, cada vez se hace más real la idea de tener asentamientos humanos en nuestros astros más cercanos. El proyecto actual *Artemis*, de la NASA, planea llevar astronautas a la Luna y ser una catapulta para el desarrollo de futuras colonias espaciales, con el punto de mira en Marte. Por ello, serán necesarios sistemas de soporte vital o BLSS (*Bioregenerative Life Support System*) para la producción de elementos básicos para la vida, entre ellos los vegetales, los productores primarios de la cadena trófica y del oxígeno.

Las plantas en el espacio experimentarán por primera vez en su historia evolutiva, una gravedad diferente a la terrestre, incluidos niveles que abarcan desde microgravedad, niveles de gravedad parcial y entornos de hipergravedad. Estos ambientes gravitacionales modifican la dinámica de fluidos y de pequeñas partículas de las plantas, al igual que su respuesta gravitrópica. Experimentos efectuados en el Sistema de Producción Vegetal (*Veggie*) abordo de la Estación Espacial Internacional (ISS) o por simuladores en tierra, corroboraron el hecho de que es posible crecer una planta en el espacio, pero con cambios morfológicos y genéticos significantes (De Micco et al., 2014). Por ello, es esencial entender el efecto de estos nuevos ambientes.

1. Efecto de la gravedad y la luz en el crecimiento y desarrollo de las plantas

Las plantas al ser organismos sésiles han desarrollado a lo largo de su evolución diversos mecanismos adaptativos a diferentes condiciones ambientales desfavorables. La percepción de estos factores cambiantes del exterior se efectúa mediante sensores distribuidos por los diversos tejidos de la planta para finalmente, guiar su crecimiento y desarrollo hacia regiones más favorables evitando así el estrés. El crecimiento direccional como respuesta a un estímulo se denomina tropismo. De manera que se produce un tropismo positivo cuando el crecimiento se orienta hacia el estímulo y un tropismo negativo, cuando se aleja.

La luz (fototropismo) y la gravedad (gravitropismo) son los dos principales estímulos que determinan la dirección de crecimiento de los distintos órganos de las plantas. Existen otros estímulos que también influyen en el crecimiento de éstas como son el agua (hidrotropismo), la concentración de nutrientes (quimiotropismo) o por contacto (tigmotropismo) (Kiss, 2007) como se muestra en la Figura 1. La gravedad es un estímulo que ha permanecido constante en la superficie terrestre (dirección y magnitud, con una aceleración de $9,81 \text{ m/s}^2$) durante toda la historia evolutiva de las plantas. Les ha proporcionado información espacial del ambiente que

las rodea, de manera que los tallos crecen en contra de la dirección del vector gravedad (gravitropismo negativo) y las raíces crecen en la misma dirección del vector gravedad (gravitropismo positivo). La luz al ser la única fuente de energía, a través de la fotosíntesis, modula la dirección de crecimiento de las plantas. Los tallos crecen hacia la luz (fototropismo positivo) para maximizar la captación de ésta y las raíces crecen en dirección opuesta a la fuente de luz (fototropismo negativo) penetrando en el suelo, y así, anclarse y absorber agua y nutrientes.

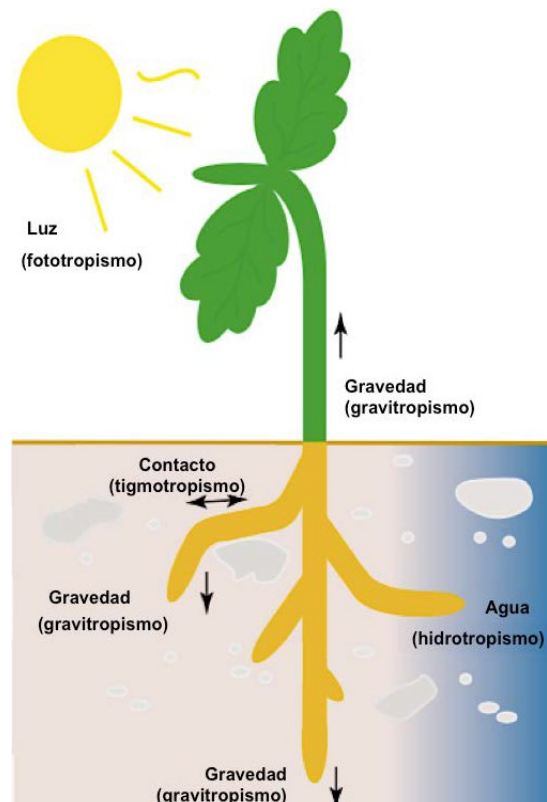


Figura 1. Principales estímulos ambientales que dirigen el desarrollo y crecimiento de la planta (tropismos). Adaptado de (Manzano Pérez, 2019).

2. Gravitropismo y fototropismo

2.1. Detección del vector gravedad

Desde la germinación de la semilla, las raíces se aferran al suelo y crecen hacia el sustrato mediante la detección del vector gravedad. Este es principal efector de la direccionalidad del crecimiento de la raíz (Sato et al., 2015). La punta de la raíz es el lugar de mayor percepción de la gravedad de las plantas. La captación y respuesta del gravitropismo en este órgano se puede clasificar en: 1) detección de la gravedad en células especializadas, 2) transmisión de la señal bioquímica desde las células receptoras de la gravedad a la zona de elongación y 3)

respuesta de crecimiento en la zona de elongación (Vandenbrink & Kiss, 2019). Para comprender la percepción de este estímulo, se estudia la curvatura de las raíces y tallos ocasionados por un cambio en la orientación del vector gravedad. Hay dos modelos que explican su detección y que se describirán resumidamente a continuación.

2.1.1. Modelo almidón-estanolito

Este modelo se basa en la detección de la señal gravitrópica mediante la sedimentación de amiloplastos, llamados estanolitos, presentes en células específicas, los estanolitos. Los estanolitos están localizados en la columela (en la punta de la raíz) o en las células endodérmicas de los tallos (Sack, 1997; Vandenbrink & Kiss, 2019). Estos orgánulos, cuando sedimentan, desencadenan una transducción de la señal gravitatoria a la zona de elongación, generando respuesta de flexión mediante un crecimiento diferencial hacia el vector gravedad (Zhang et al., 2019).

2.1.2. Modelo presión del protoplasto

En este modelo, el incremento y detección de la señal gravitrópica es provocado por unos cambios en la presión ejercidos por el movimiento del citoplasma según la dirección del vector gravedad sobre unos receptores unidos a la membrana plasmática. Estos receptores son capaces de transducir la señal gravitrópica (Staves, 1997).

2.2. Percepción de la luz

Junto al gravitropismo, el fototropismo es uno de los tropismos más importantes que determinan la orientación de crecimiento de la planta hacia condiciones lumínicas más favorables. Es necesario para una correcta absorción de luz en los tejidos fotosintéticos de la planta. Las plantas pueden captar un amplio espectro lumínico, desde los rayos ultravioleta B (~280nm) hasta el rojo lejano (800 nm) (Galvão & Fankhauser, 2015). Para su detección, la planta posee diferentes clases de fotorreceptores que absorben estas diferentes longitudes de onda con gran precisión gracias a los cromóforos, los cuales son capaces de transducirlas en señales bioquímicas (Kong & Okajima, 2016). Los principales responsables de captar la luz en las plantas son:

2.2.1. Fitocromos

Los fitocromos (phy) son fotorreceptores capaces de detectar la luz roja /roja lejana (RL). En *Arabidopsis thaliana*, hay cinco miembros bien definidos (phyA-phyE). phyA es el responsable de la detección de la luz RL mientras que phyA-E detectan la luz roja (Lymperopoulos et al., 2018). Estos fotorreceptores regulan el gravitropismo y la fotomorfogénesis así como la germinación de la semilla, la desetiología, el tiempo de floración y el reloj circadiano (Paik & Huq, 2019).

2.2.2. Criptocromos

Los criptocromos (cry) son fotorreceptores capaces de detectar el espectro de luz azul y UV-A (entre 320–500 nm). En *A. thaliana* constan tres criptocromos, cry1-cry3. Contienen un dinucleótido de flavina adenina (FAD) como cromóforo. Regulan la fotomorfogénesis, el tiempo de floración y el reloj circadiano (Paik & Huq, 2019).

2.2.3. Fototropinas

Las fototropinas (phot) son otros fotorreceptores de la luz azul. En las plantas superiores, tiene dos isoformas independientes, phot1 y phot2. El primero, actúa como sensor del fototropismo de la luz azul en un amplio rango de luminosidad, el segundo, se excita tras un flujo alto de luz azul en las plántulas etioladas. Median la respuesta fototrópica de raíz y tallo, la foto-relocalización del cloroplasto y la apertura de los estomas en bajo el estímulo de luz azul (Okajima, 2016).

Se sabe que en la tierra, el fototropismo negativo en la raíz es mediado en gran medida por las fototropinas phot1, phot2 y con menos fuerza, phyA y cry1/cry2 todas dependientes de la luz azul y blanca. Además, luz roja inhibe la elongación radicular y está controlado por fitocromos (Zhao et al., 2020).

2.3. Transducción de la señal gravitropica y fototrópica

Una vez detectado el estímulo lumínico o un cambio en la dirección del vector gravedad, la transducción de la señal debe tener lugar para inducir el crecimiento en las zonas de elongación. La fitohormona auxina, implicada en el desarrollo embrionario y en la división, elongación y diferenciación celular, es la responsable de transducir dicha señal.

La teoría clásica de Cholodny-Went (Went y Thimann, 1937), postula que este proceso se produce por una distribución asimétrica de esta fitohormona (Figura 2). En el caso del estímulo gravitrópico, esta hormona se acumula en la parte inferior de la raíz y tallo, y en el caso del estímulo lumínico se acumula en la zona opuesta a la iluminada. Esta distribución asimétrica, en la raíz inhibe la proliferación en las células en la zona de acumulación mientras que el tallo la activa, lo que hace que la raíz se curve hacia el vector gravedad y lejos de la luz y el tallo se curve hacia la luz y en contra del nuevo vector gravedad.

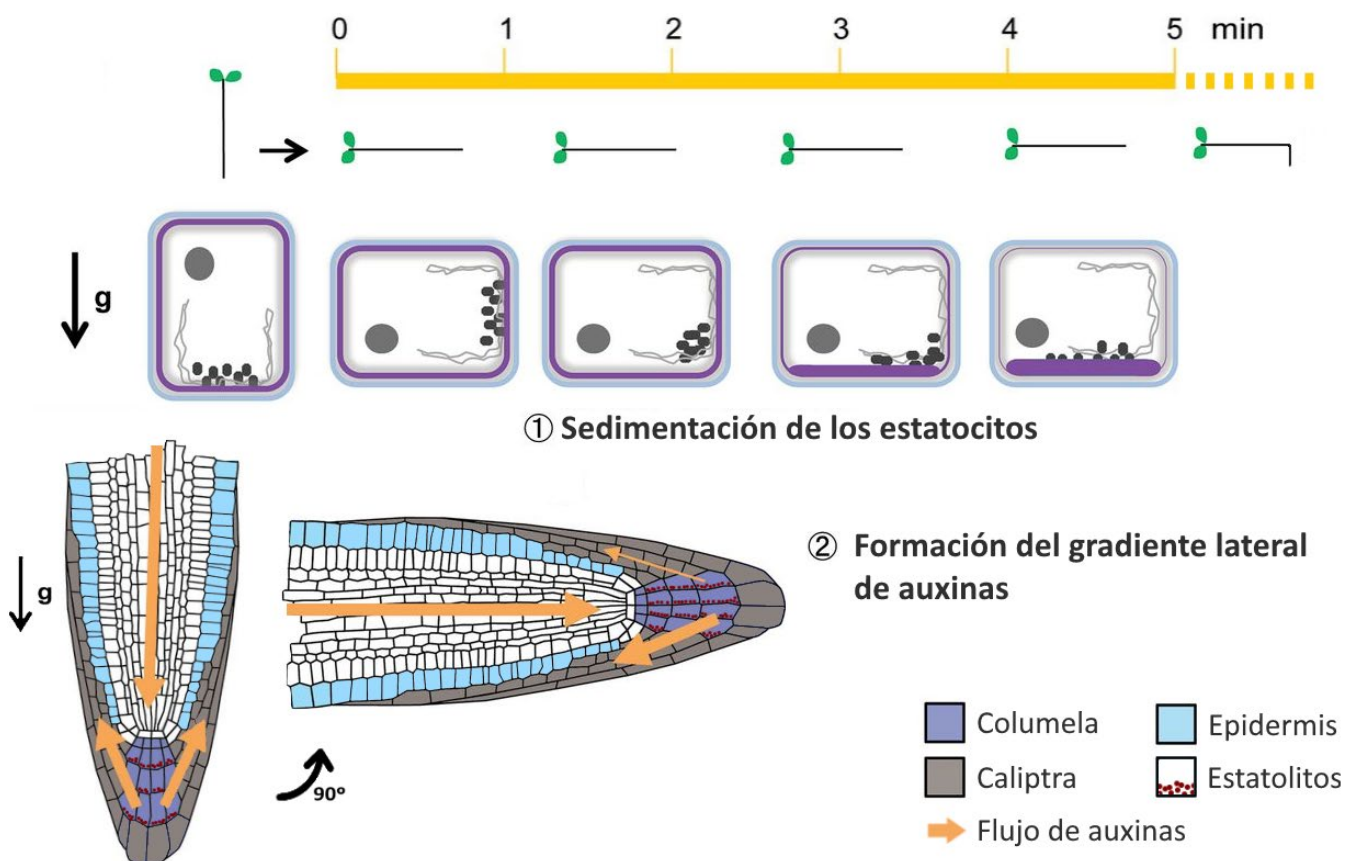


Figura 2. Percepción y respuesta gravitatoria en *A. thaliana*. 1) Sedimentación de los estatocitos: Cuando la planta es girada 90°, los estatolitos tardan hasta 5 minutos en redistribuirse uniformemente por el nuevo fondo. Esto genera una transducción de la señal por la presión ejercida en el retículo endoplasmático. 2) Formación del gradiente lateral de auxinas: Una vez detectado el estímulo gravitacional (percepción en 2 minutos), se genera un gradiente lateral de auxinas asimétrico a ambos lados de la raíz. (el grosor de la flecha naranja indica el flujo de auxinas generado). Adaptado de (Vandenbrink et al., 2014).

3. Proliferación y crecimiento celular en el tejido meristemático

La morfogénesis y anisotropía (dirección) de la planta está determinado por los procesos celulares de crecimiento, proliferación y diferenciación. En concreto, las células meristemáticas son las responsables de dicho suceso. Estas son

capaces de dividirse indefinidamente sin llegar a diferenciarse y su regulación está determinada por factores de crecimiento. La tasa de crecimiento y proliferación en estas células deben estar en completa sintonía, recibiendo el nombre de competencia meristemática. Si estos se desajustan, generan un estrés a la planta impidiendo su correcto desarrollo. Por ende, los promotores de crecimiento determinan el desarrollo de los distintos órganos en las plantas mediante la regulación de su ciclo celular según las condiciones que se enfrente la planta. Cuando estos promotores permanecen activos, mantienen el balance del crecimiento y proliferación celular en los meristemas. En cambio, cuando estos se reprimen, se pierde la competencia meristemática, provocando un desacople en la tasa de crecimiento y proliferación celular, activándose la diferenciación celular (Desvoves et al., 2021).

3.1. Crecimiento celular (nucléolo y biogénesis de ribosomas)

El crecimiento de las células meristemáticas depende de la síntesis de proteínas para llegar al tamaño crítico e iniciar la división celular. Las proteínas se sintetizan en los ribosomas, y por tanto el crecimiento celular, está directamente relacionado con la biogénesis de estos orgánulos. Este proceso de biogénesis tiene lugar en el nucléolo y comienza con la transcripción del pre-ARN ribosómico (pre-ARNr) seguido de su procesamiento hasta dar lugar a las subunidades maduras ribosomales, las cuales son exportadas al citoplasma para su ensamblaje. El procesamiento del pre-ARNr está regulado por proteínas que no forman parte de los ribosomas maduros denominadas proteínas nucleolares, ubicadas en el nucleolo. Entre estas proteínas, la fibrilarina es una de las más abundantes y conservada en todo el reino eucariota implicada en las primeras etapas del procesamiento del pre-ARNr (Barneche et al., 2000; Pereira-Santana et al., 2020). Por ello, esta proteína puede ser utilizada para cuantificar el área del nucléolo, y en consecuencia, ser un indicador del crecimiento celular (Villacampa et al., 2021).

3.2. Ciclo celular

La proliferación celular está íntimamente ligada al ciclo celular, siendo este, el conjunto de procesos secuenciales y unidireccionales que ocurren desde la formación de una célula, hasta su división en dos células hijas. El ciclo celular consta de cuatro etapas: fase G1 (*gap1*) donde la célula crece en tamaño,

duplica los orgánulos y fabrica demás componentes para la síntesis del ADN. En la fase S, ocurre la replicación del genoma. La fase G2 (*gap2*), es la segunda etapa de crecimiento de la célula, más corta que la fase G1 y con el material genético duplicado, donde la célula sintetiza nuevos componentes necesarios para la siguiente etapa. La fase M (mitosis), es donde ocurre el reparto de cromosomas y la división celular, compuesta por la profase, metafase, anafase, telofase y termina en la citocinesis. El ciclo celular completo resulta en el origen de células hijas conteniendo material genético idéntico. Estas nuevas células entran de nuevo a la fase G1 o se quedan en estado quiescente o fase G0. La fase G0 es una etapa reversible importante para la homeostasis celular. Regula la proliferación celular mediante señales que inducen a parar el ciclo celular o iniciarlo (Qi y Zhang, 2019). La progresión y regulación del ciclo celular está fuertemente controlada por una serie de puntos de control entre sus diferentes etapas controlados por promotores del crecimiento. Los puntos de control o *checkpoints* más importantes se encuentran al comienzo de la fase S, llamado G1-S, al comienzo de la mitosis, llamado G2-M y un control en la mitosis, entre la metafase y la anafase (Harashima et al., 2013). La luz promueve la proliferación celular en el meristemo apical de *A. thaliana*, al permitir la progresión del ciclo celular en las células arrestadas en las fases G1 y G2 previamente mantenidas en oscuridad cuando perciben la señal lumínica. Esta señal también regula indirectamente la proliferación celular mediante los azúcares sintetizados vía fotosíntesis (Manzano et al., 2021).

3.3. Estructura de la raíz primaria

La raíz primaria se compone de varias zonas (Figura 3). La punta de la raíz, la cual perfora el sustrato y se ancla al suelo, está compuesta de la caliptra y la columela. En el núcleo meristemático (meristemo) se ubica el centro quiescente (CQ) y las células iniciales. Las células del CQ son una pequeña población de células madre pluripotentes, reabastecidas y mantenidas por un reservorio de células inactivas, que poseen un ciclo celular lento para asegurar la fidelidad de la replicación del ADN y el linaje celular. Las células iniciales, altamente proliferativas, originan los diferentes tejidos de la raíz (Velappan et al., 2017). Estos están conformados por el meristemo radicular formado por tres capas de células (cilindro cortical), la epidermis (capa más externa), córtex (capa

intermedia) y endodermis (capa interna) y el cilindro central formado por el periciclo y la estela (tejido vascular). Las células que componen el cilindro cortical poseen una alta tasa de proliferación celular y determinan la zona meristemática (ZM). En la zona de elongación (ZE) la proliferación se detiene pero las células siguen creciendo en tamaño, alargándose. En la zona de diferenciación (ZD), las células se diferencian y adquieren su estado final (Desvoyes et al., 2021). También puede describirse una zona intermedia, la zona de transición, entre las ZE y ZD, aunque no está bien delimitada, en ellas las células se encuentran muy activas y receptivas a fitohormonas y señales exógenas, como las auxinas, que provocarían que la célula pase de una fase de replicación constante a la expansión de la célula (Kong et al., 2018).

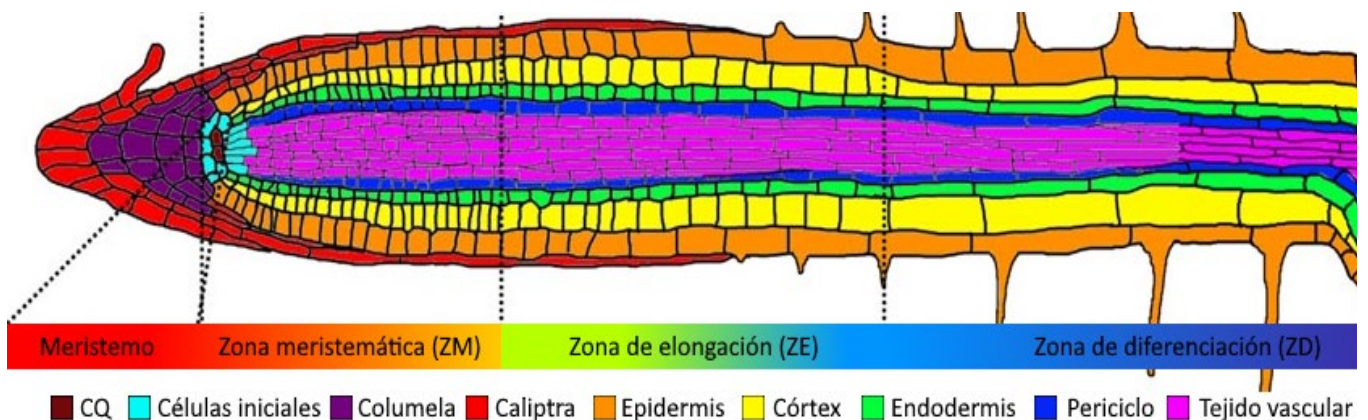


Figura 3. Esquema representativo de las diferentes poblaciones celulares y tejidos en la raíz primaria de las plantas. Adaptado de (Somssich et al., 2016).

4. Biología de plantas en niveles alterados de gravedad

Como ya se ha mencionado anteriormente, la gravedad es un estímulo que se ha mantenido constante desde el origen de la vida en nuestro planeta. De manera que si su magnitud cambia, todos los organismos, incluidas las plantas, deberán adaptarse a este nuevo ambiente. Se define como microgravedad a la reducción en la fuerza gravitatoria percibida por un el organismo por debajo del umbral de detección (típicamente es suficiente con $10^{-3}g$, estrictamente 10^{-5} - $10^{-6} g$ (Herranz et al., 2013)). Solo se puede hablar de microgravedad real, desde el punto de vista físico, en el espacio exterior, fuera del efecto de atracción de la Tierra u otros cuerpos celestes. En biología, el efecto de “microgravedad” que se da en la Estación Espacial Internacional (ISS), se considera próximo a la ingravidez, debido a que orbita la Tierra en una caída libre constante. Estos

niveles de ingravidez en la Tierra, se puede obtener mediante torres de caída libre, cohetes sónicos o en los vuelos parabólicos. La desventaja de estos métodos es el limitado tiempo de exposición de ingravidez y los periodos de hipergravedad que las muestras experimentan interfiriendo en los resultados. La ISS proporciona un ambiente de microgravedad real, pero también tiene limitaciones como son: es el coste que supone incluir las muestras, la limitación en cuanto a los equipos disponibles, el peso máximo y el tamaño muestral para la experimentación (Kiss et al., 2019). Para solventar este problema, se han desarrollado diferentes dispositivos capaces de simular diferentes niveles de gravedad en tierra, disponibles en instalaciones llamadas GBFs (*Ground Based Facilities*) (Herranz et al., 2013) (Figura 4).

4.1. Microgravedad simulada

Hay al menos dos tipos de simuladores de microgravedad en las GBFs, los mecánicos y los magnéticos. Los primeros, no reducen la magnitud de la fuerza g , sino que cambian constantemente su dirección. Su versión más simple, corresponden a los clinostatos-2D (bidimensionales) (Figura 4a), los cuales mantienen la muestra en una rotación continua sobre un eje longitudinal y horizontal (perpendicular al vector gravedad). Se descubrió que a una tasa de rotación baja (de 1 a 4 rpm) y en posición vertical, se minimizaba el recorrido de sedimentación de los estatolitos, correspondiendo a una mayor aleatorización y por ello, una mejor simulación (Villacampa et al., 2021).

Una versión más sofisticada son los clinostatos-3D (tridimensionales) y las RPMs (*Random Positioning Machines*) (Figura 4b). Ambos mantienen una rotación aleatoria sobre los ejes espaciales x e y . La principal diferencia es que en los clinostatos-3D, ambos ejes giran a la misma velocidad, en cambio, en las RPMs (la versión más moderna), la velocidad de rotación se aleatoriza en cada eje (Calvaruso et al., 2021). Hace años que se corroboró mediante la posición de los estatolitos que estos dispositivos tridimensionales imitaban mejor la microgravedad (Kraft et al., 2000).

Por otra parte, los simuladores magnéticos (Figura 4c) no rotan, sino que aprovechan el principio físico de la levitación magnética para anular el efecto de la gravedad de las muestras mediante la aplicación de un campo magnético

opuesto. Estos son capaces de simular otros niveles gravitatorios según la disposición de la muestra. La principal desventaja es el coste energético que supone generar este campo magnético artificial y el estrés que experimentan las muestras a tales cantidades de energía (Anil-Inevi et al., 2018). Los resultados obtenidos en los simuladores terrestres se deberán corroborar y validar con experimentos a bordo de la ISS por su entorno de casi ingravidez real (Kiss et al., 2019; Kozeko et al., 2018).

4.2. Gravedad parcial simulada

En las futuras misiones espaciales, las plantas no solo tendrán que adaptarse a la microgravedad, sino a diferentes niveles de ella. Se entiende por gravedad parcial, una fuerza gravitatoria reducida a la terrestre, 9.81 ms^{-2} ($1g$), como la que se experimentará en futuras colonias lunares ($0,17g$) o en Marte ($0,37g$). Para disminuir la magnitud de la fuerza g , la única opción es cambiando de cuerpo celeste, el cual posea una menor masa, o bien, aplicando una fuerza centrífuga en un entorno de microgravedad o de caída libre. Se han efectuado diversos experimentos mediante una centrífuga de velocidad variable en la ISS instalado en el EMCS (*European Modular Cultivation System*) con este propósito (Correll et al., 2013; Kiss et al., 2012; Vandenbrink et al., 2016).

Como se comentó anteriormente, enviar muestras al espacio es una difícil tarea, por ello, se han desarrollado en los GBFs, diferentes dispositivos capaces de simular diferentes niveles de gravedad. Primeramente, se propusieron diversas variantes a los clinostatos-2D, los cuales, simulaban una gravedad parcial mediante una fuerza g residual ejercida. Por ejemplo, la construcción de centrífuga de gran diámetro equipada con clinostatos en su interior, en clinostatos a altas revoluciones por minuto (rpm) donde dependiendo la posición de la radial de la muestra respecto al centro se experimenta un nivel gravitatorio u otro o efectuando una inclinación sobre el eje de rotación horizontal (Herranz et al., 2022). Esta última técnica, llamado clinostato inclinado, fue descrita teóricamente en 1978 por A. H. Brown y D. K. Chapman el cual plantea generar gravedad parcial en clinostatos-2D mediante la fuerza g residual ejercida por el vector gravedad cuando este posee un ángulo de inclinación determinado a bajas rpm (Brown & Chapman, 1978).

Recientemente, se ha generado una versión más sofisticada de los RPMs, los cuales son capaces no solo de simular con mayor precisión la microgravedad, sino diferentes niveles parciales de ella. Se han generado dos variantes llamadas RPM software (RPM^{SW}) y la RPM hardware (RPM^{HW}) (Figura 4b, d). La primera, simula con mayor precisión niveles de gravedad comprendidos entre 0,05g – 0,4g, siendo óptimos para el estudio de la microgravedad hasta la gravedad lunar. El segundo, simula mejor niveles de gravedad superiores a 0,3g, como la gravedad marciana o para controles 1g (Manzano et al., 2018).

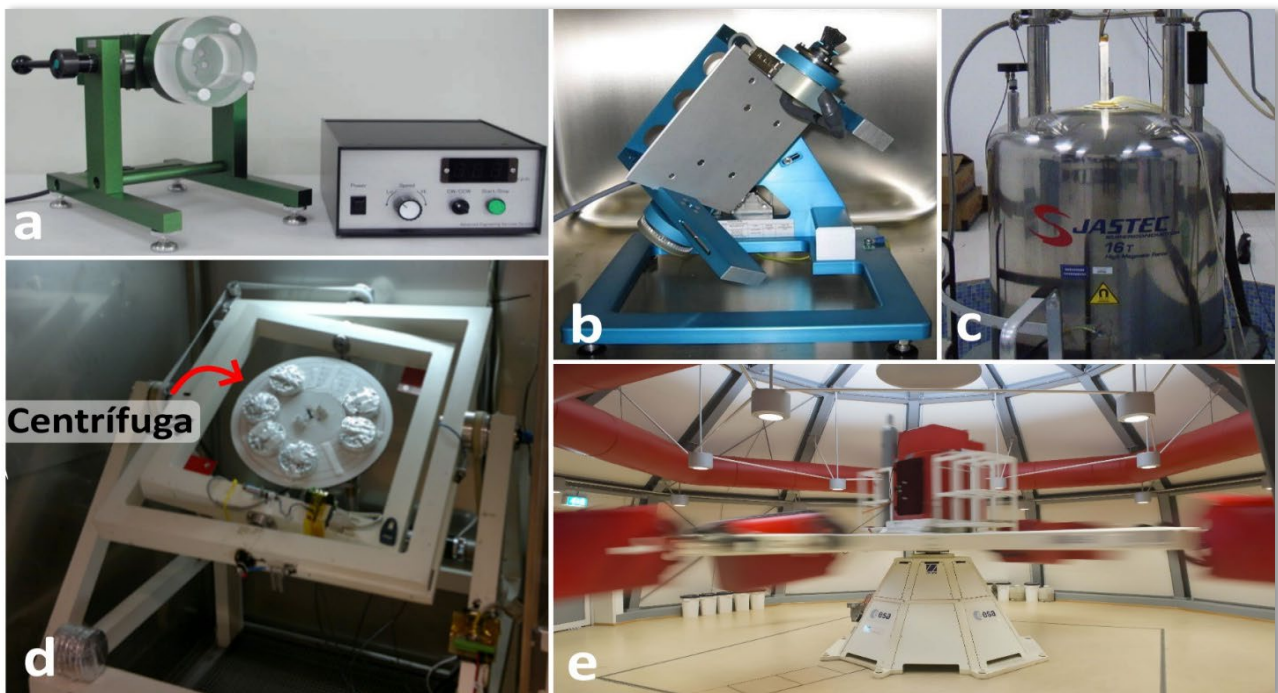


Figura 4. Ejemplos de diferentes simuladores de gravedad alterada en tierra (GFBs). a, clinostato-2D ZGIP. Adaptado de (United Nations Office for Outer Space affairs, 2013). b, RPM portátil utilizada para simular microgravedad y gravedad reducida mediante software específico. Adaptado de (Kopp, 2011) c, Levitador magnético. Adaptado de (Lu et al., 2015). d, Simulador de gravedad parcial (RPM hardware, RPM^{HW}). Consiste en una RPM de gran tamaño con una centrífuga acoplada, capaz de simular diferentes niveles de gravedad reducida. Adaptado de (Manzano et al., 2018). e, Centrífuga de gran diámetro ubicada en ESTEC (ESA / A. Le Floc'h CC BY-SA 3.0 IGO (2019)).

4.3. Hipergravedad simulada

Experimentar la hipergravedad real es mucho más sencillo que respecto la gravedad parcial en microgravedad. Esto es debido a que no se precisa simuladores para generar el efecto, con una centrífuga es más que suficiente para efectuar unos niveles de gravedad aumentados. Cuanto mayor la fuerza centrífuga, mayor será la fuerza g experimentada. Por ejemplo, en las LDCs

(*Large Diameter Centrifuge*) (Figura 4e) permiten experimentar con gran cantidad de tamaño muestral y además disponer de un diámetro grande (más de 10 metros) disminuyendo las fuerzas laterales (*shearing forces*) que pueden comprometer la simulación en centrifugas de tamaño más habitual. Pueden estar ubicadas dentro de un incubadores controlando así parámetros ambientales.

4.4. Efectos de la microgravedad, gravedad parcial e hipergravedad en la raíz

En las raíces, la respuesta gravitrópica enmascara el resto de los estímulos, siendo esta la predominante en la superficie terrestre. Un supuesto orden en cuanto la fuerza relativa de los tropismos en las raíces sería: gravitropismo > fototropismo negativo inducido por luz azul > fototropismo positivo inducido por la luz roja (Kiss et al., 2003). De hecho, se ha podido verificar dicho orden ya que en condiciones de microgravedad (ausencia de la señal gravitatoria), se han detectado nuevas respuestas fototrópicas, como un fototropismo positivo mediante irradiación directa de luz azul en las raíces a microgravedad. Este efecto positivo se vio muy reducido a 0,1g y se perdió a partir de 0,3g. También se vio que el efecto débil de fototropismo positivo a la iluminación roja directa está coordinado por la magnitud gravitatoria, teniendo un efecto de competencia. Cuanto menor es la fuerza gravitatoria experimentada, mayor es el ángulo de flexión hacia el origen del estímulo lumínico (Vandenbrink et al., 2016).

El meristemo radicular es un tejido clave para entender las interacciones de ambos tropismos ya que posee mecanismos específicos para su detección y respuesta. La competencia meristemática es un claro indicador de estrés biológico en este tejido cuando la proliferación y crecimiento celular están desincronizados (Manzano et al., 2021).

En anteriores experimentos se ha demostrado que a gravedad alterada, las células meristemáticas radiculares experimentan un cambio en la relación de crecimiento y proliferación celular. En el experimento ROOT efectuado en microgravedad real a bordo de la ISS y experimentos complementarios en microgravedad simulada mediante RPM y levitador magnético demostraron que en un entorno de oscuridad el meristemo radicular sufre un desacople de la competencia meristemática por un aumento en la proliferación celular y una

disminución del crecimiento celular en *A. thaliana* (Boucheron-Dubuisson et al., 2016; A. I. Manzano et al., 2013; Matía et al., 2010). En posteriores experimentos utilizando la RPM^{HW} y RPM^{SW} para simular condiciones de gravedad reducida, se observó la misma tendencia en la gravedad de la Luna (0,17g) y un mismo resultado en microgravedad, corroborando lo visto anteriormente. En cambio, en gravedad de Marte (0,37g) los resultados fueron parecidos a los vistos en el control 1g sugiriendo que el umbral de estrés asociado al desacople de la competencia meristemática está situado en torno al 0,17g y 0,37g en *A. thaliana* (Manzano et al., 2018). Un estudio efectuado a niveles de hipergravedad simulados mediante el uso de una centrifuga, describió que la disparidad fue inversa por una disminución de la proliferación y un aumento en el crecimiento celular (Manzano et al., 2012).

Se ha visto que una medida para paliar los efectos de estrés generados por la exposición de las plantas en estos ambientes de gravedad reducida es mediante una estimulación fototrópica en las raíces. Se observó mediante un análisis de crecimiento y proliferación en el meristemo radicular que en ambientes de gravedad reducida, la luz roja es capaz de compensar los efectos negativos del estrés gravitacional en las raíces de las plántulas de *A. thaliana*, induciendo a una restauración de la competencia meristemática (Valbuena et al., 2018). También se ha observado que una exposición lumínica unidireccional en las raíces reduce el efecto de estrés tanto visto en microgravedad como en gravedad reducida tanto en la ISS como simuladores en tierra (Valbuena et al., 2018; Herranz et al., 2019). En otro estudio, mediante análisis transcripcionales concluyeron que las plantas en microgravedad utilizan el estímulo luminoso para reducir parte de la respuesta al estrés ocasionado por la falta del gravitropismo. Sin embargo, aplicar luz azul con una gravedad reducida de 0,1g en las raíces disparó el estrés de forma muy destacada sugiriendo un conflicto real entre los tropismos a ese nivel (Herranz et al., 2019).

Por todo esto, entender la respuesta de estas células meristemáticas al estrés producido por distintos niveles gravitacionales es esencial para poder encontrar un contra efecto que lo amortigüe, como el observado al irradiar luz a las raíces, obteniendo posibles aplicaciones agronómicas para la mejora de futuros cultivos espaciales.

HIPÓTESIS

Como se ha descrito en la introducción, unos niveles de gravedad alterados suponen un estrés para las plantas, siendo un posible obstáculo para los futuros cultivos espaciales.

Por ello, el proyecto ROOTROPS en el cual se enmarca este trabajo, tiene el objetivo de estudiar la interacción entre fototropismo y gravitropismo a diferentes niveles de gravedad y calidades de luz en la raíz de la especie *B. oleracea*. Además, de analizar mediante un enfoque multidisciplinar (celular y molecular) el *estatus* del crecimiento y proliferación celular en el meristemo radicular (competencia meristemática), y así tener una completa descripción del desarrollo temprano de la raíz.

La especie seleccionada en este proyecto fue *Brassica oleracea* (brócoli) por la marcada respuesta fototrópica de sus raíces a gravedad terrestre, su cercanía genética con *Arabidopsis thaliana* (ambas son de la familia Brassicaceae) y por ser una especie comestible. Por lo que su uso como especie modelo en este proyecto es un primer gran paso para lograr el cultivo de plantas que darán soporte a los futuros asentamientos humanos y misiones espaciales.

La ejecución de este proyecto comenzó en enero de 2020 y los primeros resultados obtenidos tras medir la curvatura de la raíz mostraron que la iluminación con luz blanca y azul producía un fototropismo negativo independientemente del nivel de gravedad, mientras que las raíces de plantas iluminadas con luz roja y mantenidas en oscuridad presentaban un débil giro hacia la luz en microgravedad, pero no en hipergravedad (Izzo et al., 2022). La similar respuesta a la luz blanca y azul por un lado, y la luz roja y oscuridad por otro, hace que la hipótesis de este trabajo sea conocer en qué medida la iluminación con luz blanca (abarca todo el espectro, incluida la luz azul) es capaz de compensar las alteraciones producidas en el crecimiento y proliferación de las células meristemáticas de la raíz, descritas previamente en oscuridad y niveles alterados de gravedad (microgravedad e hipergravedad).

Para ello, los objetivos concretos planteados son:

- Conocer el estatus de proliferación celular en el meristemo radicular mediante el análisis comparativo del parámetro número células/mm entre los diferentes niveles de gravedad para los dos regímenes de iluminación (luz blanca y oscuridad).
- Estudiar cambios en la expresión génica inducidas por las condiciones experimentales mediante un estudio transcriptómico a nivel de genoma completo o RNAseq.

Paralelamente, a estos objetivos principales también se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

- Buscar un método alternativo para reproducir las condiciones de gravedad parciales obtenidas en la RPM usando el clinostato-2D.
- Optimización del protocolo de inmunofluorescencia *in toto* anti-fibrilarina utilizado previamente en la especie modelo *A. thaliana*, para poder cuantificar el crecimiento celular en la especie objeto del presente estudio, *B. oleracea*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

Semillas de *B. oleracea* suministradas por Bavicchi S.p.A., Italia (lote nº 181.654).

2. Proyecto ROOTROPS

2.1. Dispositivo ROOTROPS

Para poder estudiar la interacción fototropismo-gravitropismo de las raíces de *B. oleracea* en los distintos simuladores de gravedad alterada o GBFs (RPM estándar, RPM^{SW-HW} y LDC), ubicados en el Centro Europeo de Investigación y Tecnología Espacial (ESTEC) de la ESA en Noordwijk, Países Bajos, se ha diseñado un dispositivo específico que consta de dos unidades: la unidad interna, donde se sitúan las plántulas en un soporte específicamente diseñado para mantenerlas inmóviles durante todo el experimento (Figura 5a, b), y la unidad externa, la cual posee unos compartimentos donde se sitúan las placas Petri y en el lateral, unos LEDs (Diodo Emisor de Luz) regulables que iluminan a las plántulas de manera perpendicular respecto del vector gravedad (Figura 5c). Cada unidad experimental (UE) consta de 5 placas Petri cada una con 5 plántulas. La LDC puede albergar cuatro UE por góndola (dos góndolas por cada nivel de hipergravedad fueron utilizadas), en la RPM^{HW} dos UE mientras que la RPM^{SW} y RPM estándar solo una.

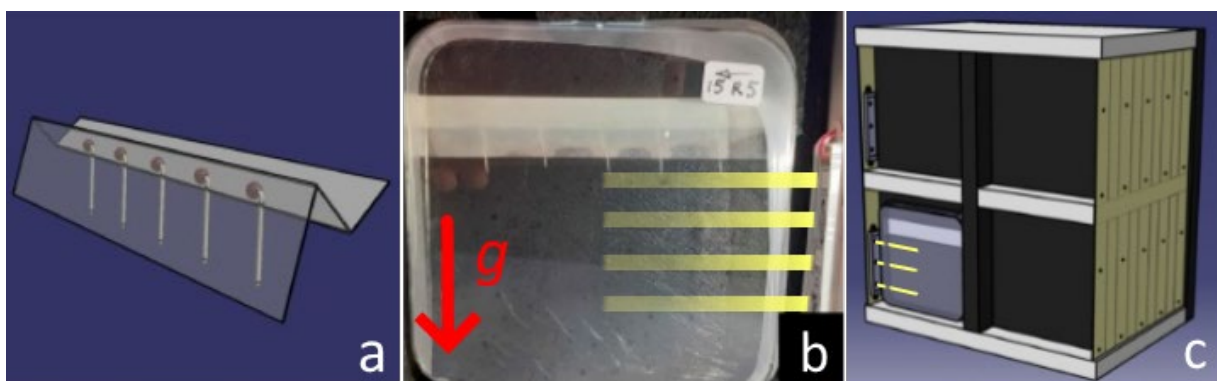


Figura 5. Diagrama del dispositivo ROOTROPS. a, Tira de celulosa donde se disponen las plántulas germinadas, parte del dispositivo interno. b, Ejemplo del dispositivo interno con la tira de celulosa y el papel absorbente en la tapa y sujetado con Parafilm. La disposición de los focos LEDs están ortogonales al vector gravedad. c, Dispositivo externo para la LDC con cuatro compartimentos capaces de albergar cuatro UEs y cuatro condiciones lumínicas diferentes mediante LEDs regulables en el lateral que iluminan unidireccionalmente a las raíces. Adaptado de (Aronne et al., 2022).

El proyecto ROOTROPS consta de tres etapas o *RUNs*. En las *RUN1* y *RUN2* (realizadas en febrero de 2020) se simularon 4 niveles de hipergravedad (5g, 10g, 15g, y 20g) en las góndolas de la LDC y microgravedad en la RPM estándar con 4 tratamientos de luz (blanca, azul, roja y en oscuridad). En la *RUN3* (llevada a cabo en marzo de 2022), fueron simulados niveles parciales de gravedad (0,17g, 0,37g) con dos condiciones de iluminación, luz blanca y oscuridad. Cada una de la *RUNs* consta de su correspondiente control terrestre o 1g estático, situado al lado de cada simulador para que las plantas crezcan en las condiciones ambientales a excepción de la gravedad alterada (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones en las que se han efectuado las diferentes *RUNs* con diferentes niveles de gravedad e iluminación en los diferentes equipos de simulación. *Los controles 1g, estáticos, se dispusieron en la misma sala/cámara junto a los simuladores manteniendo así las mismas condiciones ambientales.

	Nivel gravedad	GBFs	Condiciones lumínicas
RUN 1/2	20g	LDC	Luz azul, luz roja, luz blanca y oscuridad
	15g		
	10g		
	5g		
	μg	RPM estándar	
	*Control 1g estático	Debajo de la LDC	
RUN 3	0,37g	RPM HW	Luz blanca y oscuridad
	0,17g	RPM HW	
	0,17g	RPM SW	
	μg	RPM estándar	
	*Control 1g estático	Al lado de las RPMs	

Tras la finalización de cada etapa, en la *RUN1* y *RUN2*, se decidió que por cada condición (50 plántulas), 20 plántulas fueran congeladas en RNAlater® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) para estudios transcriptómicos. 15

plántulas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% v/v (EMS #15710) y las 15 restantes se fijaron en glutaraldehído 3% v/v + PFA 1% v/v para el estudio de parámetros celulares por técnicas de microscopía. En el caso de la *RUN3*, se obtuvieron 25 plántulas por condición y de estas, 20 se congelaron en RNAlater® y 20 se fijaron en PFA al 4%. Por último, las muestras fueron transportadas al laboratorio (CIB-CSIC) en nieve carbónica en el caso de las congeladas y a 4°C en el caso de las muestras fijadas químicamente.

2.2. Montaje unidad interna

Las semillas de *B. oleracea* (aproximadamente 200 semillas/*RUN*) se esterilizaron con 30mL de hipoclorito de sodio 3% v/v durante 3 minutos sin parar de agitar. Posteriormente se efectuaron tres lavados de 30mL con agua doble destilada (H₂O_{dd}) en continua agitación. Para su germinación, se colocó papel absorbente 12x12cm estéril en placas Petri 12x12cm y se humedeció con 8mL de H₂O_{dd} por placa. Se seleccionaron las semillas más viables y se colocaron en una disposición de 7x7 sobre el papel absorbente. Se incubaron en un soporte con ángulo de 45° para un crecimiento óptimo de las raíces en con luz a 37°C 24h Figura 5. Al día siguiente, se dispuso a colocar las plántulas en la unidad interna, en un soporte diseñado para el experimento.

Por ello, anteriormente se preparó el soporte y se esterilizó. Para su montaje, se prepararon las tiras de papel de celulosa 14,5 x 4 cm, se hizo dos dobleces y se hicieron 5 agujeros a 3,25 cm de los extremos y 2 cm entre ellos. Se seleccionaron las plántulas con la raíz recta, que no sobrepasasen los 2 cm ni desarrollasen raíces secundarias prominentes ni grandes cotiledones y se colocaron en los agujeros de la tira mediante pinzas estériles. Se utilizó papel absorbente 12x12cm estéril, se colocó en la tapa de la placa Petri y se humedeció con 8mL de H₂O_{dd} estéril. Se dispuso la tira con las plántulas de tal manera que al cerrar la placa Petri, los extremos de la tira quedasen atrapados. Se selló con Parafilm para evitar que se secase el medio y sujetar bien el dispositivo interno. Se incubó a 22°C en oscuridad 24h en disposición vertical (90°) para una adaptación de las plántulas al medio y al soporte.

Se procedió a colocar las placas Petri en los dispositivos externos, y se colocaron en los RPM o fuera en el caso del control, 1g según la (Tabla 2). Se programó el

tipo de iluminación (luz blanca/oscuridad), el nivel de gravedad y se inició la simulación durante 24h a 22°C. Pasadas las 24h, se pararon los simuladores y rápidamente se procedió a fijar las muestras con PFA 4% v/v para técnicas de microscopia o con RNAlater® para transcriptómica.

Tabla 2. Condiciones de iluminación y nivel de gravedad aplicadas en los simuladores (RPM^{SW} y RPM^{HW}) y las unidades experimentales utilizadas en cada uno de ellos. * Los controles 1g, estáticos, se dispusieron junto a los simuladores en el mismo incubador.

	Unidad experimental (UE)	Simulador	Nivel gravedad	Iluminación
RUN 3.1	1	RPM software	0,17 g (Luna)	Oscuridad
	1	RPM hardware	0,37 g (Marte)	Oscuridad
	1	RPM hardware	0,37 g (Marte)	Luz blanca
	1	*Fuera	1 g (Control)	Oscuridad
RUN 3.2	1	RPM software	0,17 g (Luna)	Luz blanca
	1	RPM hardware	0,17 g (Luna)	Oscuridad
	1	RPM hardware	0,17 g (Luna)	Luz blanca
	1	*Fuera	1 g (Control)	Luz blanca

3. Experimento clinostato inclinado

Este experimento ha consistido en simular los mismos niveles de gravedad que los realizados durante la *RUN3* del proyecto ROOTROPS, pero utilizando los clinostatos-2D disponibles en el laboratorio, basándose en que, en éstos, teóricamente es posible simular niveles parciales de gravedad (y no solo microgravedad) mediante la inclinación del eje de rotación a un ángulo determinado a bajas rpm (Tabla 3).

Para ello, se llevaron a cabo dos *RUNs* (*RUN-Tilted1* y *RUN-Tilted2*) en los simuladores con 4 variables: μg , 0,17g, 0,37g y 0,75g (control “1g” interno) con dos tratamientos de luz (blanca y oscuridad) con los respectivos controles estáticos 1g fuera del simulador en un ángulo de 90°. Cada clinostato-2D tiene capacidad máxima de 4 placas, y por cada placa, 5 plántulas, por lo que se obtuvieron 10 plántulas por condición y un total de 100 muestras. En este experimento se siguió el mismo procedimiento que en ROOTROPS, menos que

luz blanca era ambiental y no unilateral (perpendicular al vector gravedad en simulación), ubicada en el incubador, fuera de los simuladores. Una vez transcurridas 24h de simulación, los clinostatos se pararon y a la menor brevedad posible, se cortaron las raíces y se fijaron en PFA al 5% v/v durante 3h a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. En concreto, el 50% se utilizaron para el estudio de la proliferación celular y 50% restante se utilizaron para la optimización de la inmunofluorescente anti-fibrilarina.

Desafortunadamente durante mi estancia en el laboratorio no pude procesar ni hacer una estimación de la proliferación celular de las muestras del clinostato inclinado. Las muestras no usadas se mantuvieron refrigerados a -20°C hasta su futuro procesamiento.

Tabla 3. Tabla adaptada de (Herranz et al., 2022) donde se muestra la aplicación del resultado teórico de la fuerza g residual dependiendo el ángulo de inclinación del clinostato a 1 rpm. Se han efectuado dos RUNs (*RUN-Tilted1* y *RUN-Tilted2*) con las diferentes condiciones (nivel gravitatorio y luz/oscuridad) con un ángulo de inclinación establecido.* Se ha observado que a niveles cercanos al 1g, la respuesta de la planta en el meristemo es similar a la experimentada a nivel de la tierra, por ello decidió utilizar un ángulo menor para que no interfiriera el contacto con el papel y experimentara las mismas condiciones como vibraciones y un continuo movimiento rotatorio (Herranz et al., 2019). ** Está ubicado al lado de los simuladores, con la mismas condiciones de temperatura y luz, con una inclinación de 90° sobre la superficie.

Clinostato inclinado (velocidad: 1rpm)				
	Fuerza residual (g)	Angulo de inclinación (grados)	Iluminación	N.º muestras
RUN-Tilted1	μg	0°	Luz	10
			Oscuridad	10
	0,17g (Luna)	5,5°	Luz	10
			Oscuridad	10
	1g (Control)	**90° fuera	Luz	10
RUN-Tilted2	0,37g (Marte)	22°	Luz	10
			Oscuridad	10
	*0,75g (Control interno)	48,5°	Luz	10
			Oscuridad	10
	1g (Control)	**90° fuera	Oscuridad	10

4. Procesamiento de las muestras

4.1. Fijación de las muestras

Las plántulas destinadas al estudio por microscopía, tras ser cosechadas, se les cortaron las raíces con un bisturí y el resto se desechó. Se introdujeron en eppendorfs de 2 mL con 2mL de PFA 4% v/v en PBS (Solución salina tamponada con fosfato) 1X 3h a temperatura ambiente y se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento en nuestro laboratorio del CIB, Madrid.

Las plántulas para la secuenciación transcriptómica se embebieron enteras en RNAlater® y se mantuvieron a -80°C hasta su posterior procesamiento en el CIB.

4.2. Microscopía confocal

4.2.1. Tinción membrana celular con Renaissance.

Primeramente, se procedió hacer tres lavados de 10min con 2 mL de PBS 1X a temperatura ambiente para eliminar los rastros del PFA. Después, se procedió a digerir las raíces con el coctel de enzimas compuesto de: 1% p/v pectinasa (Sigma #17389), 0,5% p/v macerozima (#28302; Serva, Heidelberg, Alemania) y 0,4% p/v manitol (#105983, Merck); con glicerol 10% v/v (Merck#1.04094.1000) y Triton X-100 al 0,2% v/v (Sigma #T9284) en los 2ml de PBS 1X durante 60 min a 37°C. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10min con 2mL de PBS 1X + glicerol 10% v/v + Triton 100-X 0,2% v/v a temperatura ambiente. Se cortaron los meristemas y se desechó le resto de la raíz gracias a una lupa y un bisturí y se colocaron en los pocillos del portaobjetos (EMS #63422-06) impregnados con poly-L-lisina (Sigma #P8920). Se deshidrataron los meristemas con una gota de metanol 100% v/v (Merck#1.06009.2500) por pocillo y se guardaron a -20°C 12h. A continuación, se colocaron los portaobjetos en una cámara húmeda y se rehidrataron con dos lavados de 5 min por pocillo añadiendo una gota de la solución de PBS 1X con detergentes NP40 1% v/v (Sigma #D67509) y DOC 0,5% v/v (Sigma #I3021). Posteriormente se procedió a la tinción fluorescente de la pared celular de las muestras con la solución de tinción en PBS 1X + NP40 1% v/v + DOC 0,5% v/v compuesto por: Renaissance al 2% v/v (#SCRI 2200; Renchem, North Duffield, Selby, Reino Unido) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 4% v/v (#81802, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); durante 2h en oscuridad a temperatura ambiente añadiendo una gota por pocillo. Después se hicieron dos lavados de PBS 1X de 5min a temperatura ambiente en oscuridad y se añadió

una gota de DABCO (agente *anti-fading*; Sigma #290734) Por último, se colocó cuidadosamente los cubreobjetos encima y se selló con laca de uñas. Se mantuvo en oscuridad, refrigerado a 4°C hasta su visualización en el microscopio confocal (Leica TCS SP5) y la toma de imágenes En las imágenes tomadas para cada raíz se seleccionó un corte “z” central en el que las células meristemáticas de la epidermis fueran visibles y se cuantificó en esta capa, con el software FIJI (<https://imagej.net/Fiji>) el número de células por milímetro (células/mm), también llamado proporción local de producción celular, como parámetro indicador de la proliferación celular para el análisis comparativo entre condiciones experimentales. En concreto, esta cuantificación se efectuó desde la primera célula meristemática, ubicada contigua a las células del centro quiescente (CQ) hasta la primera célula ensanchada donde empezaría la zona de elongación (ZE) (Figura 6). Véase el ANEXO 1.

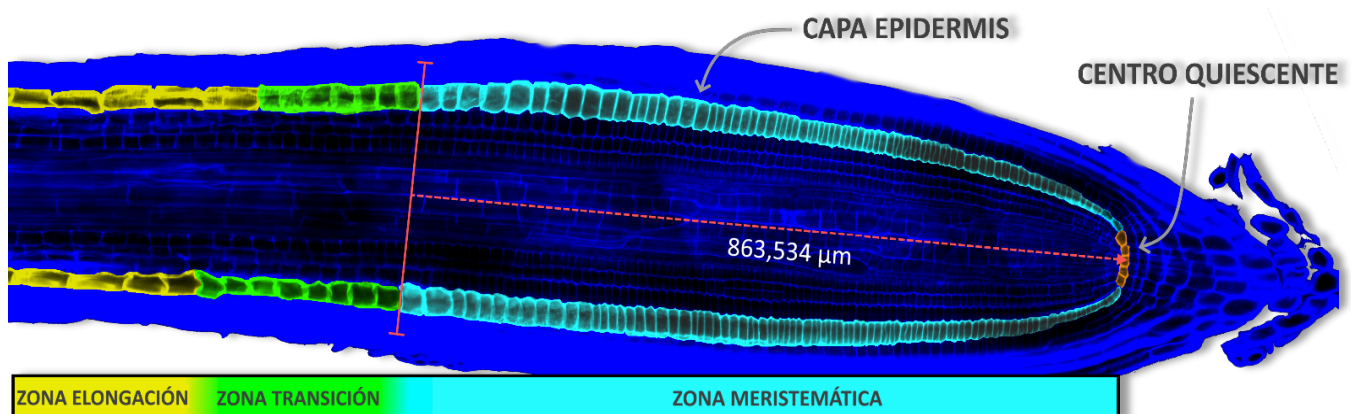


Figura 6. Diagrama sobre la delimitación de zona meristemática (ZM) de un meristemo radicular teñido con Renaissance y observado mediante el microscopio confocal Leica TCS SP5. Muestra: RPM^{HW} en gravedad lunar (0,17g) y oscuridad. El color cian muestra la delimitación efectuada para el recuento de células/milímetro. Se corresponde a la epidermis de las células meristemáticas de la raíz.

4.2.2. Inmunofluorescencia *in toto*

Como ya se ha comentado, la fibrilarina es una proteína clave en regulación de la biogénesis de ribosomas localizada de manera abundante en el nucléolo. Por ello, para la cuantificación del tamaño del nucléolo (parámetro indicador crecimiento celular), se puede utilizar una tinción inmunofluorescente con anticuerpos anti-fibrilarina y así, en conjunto con la proliferación celular, obtener información sobre la competencia meristemática del tejido meristemático de la raíz.

Las muestras para la inmunofluorescencia fueron preparadas como se ha descrito en el apartado anterior a excepción del cóctel de digestión de las paredes celulares, que en este caso fue: 2% p/v de celulasa (Sigma #1794), 1% p/v de pectinasa, 0,005% p/v de macerozima, 0,4% p/v de manitol, 10% v/v de glicerol y 0,2% v/v Triton-X100 en PBS. Una vez se dispusieron los meristemos radiculares en los pocillos del portaobjetos, se añadió una gota por pocillo de solución de bloqueo compuesto de BSA (albúmina de suero bovino) al 2% p/v + Tween al 0,05% v/v (Sigma#P1379) en PBS; durante 30min a temperatura ambiente. Se preparó una dilución 1:1000 en solución de bloqueo con el anticuerpo primario anticuerpo monoclonal de ratón anti-fibrilarina 38F3 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), se añadió una gota por pocillo y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se hicieron tres lavados de 5min en los pocillos con una gota de PBS 1X + NP40 1% v/v + DOC 0,5% v/v a temperatura ambiente y se añadió una gota de la dilución 1:100 del anticuerpo secundario anti-mouse IgG-Alexa 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en solución de bloqueo durante 3h a 37°C en oscuridad. Se lavaron los pocillos con una gota de PBS 1X + NP40 1% v/v + DOC 0,5% v/v tres veces durante 5min a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadió una gota de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 5X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durante 5 min en oscuridad (tiñe fluorescentemente el ADN celular, utilizado para dar un mayor contraste). Se lavaron dos veces los pocillos con una gota de PBS 1X a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente, otros dos lavados de 5 min con una gota de H₂O a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadió una gota de DABCO por pocillo y se colocó el cubre encima. Se selló con laca de uñas y se guardó en oscuridad a 4°C hasta su visualización en el microscopio confocal (Leica TCS SP5).

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó mediante el software SPSS v26.0 (IBM, Armonk, NY, USA) con la ayuda de Microsoft Excel. Se compararon los diferentes grupos entre sí (todos los meristemos a diferentes niveles gravitatorios y lumínicos) para ver cambios estadísticamente significativos. Por ello, primeramente se hizo una comprobación de la normalidad. El tamaño muestral era $n > 20$ por lo que se procedió a utilizar el análisis de Kolmogorov-Smirnov (K-

S). Las muestras normales ($p > 0,05$) se comprobó su homocedasticidad mediante la prueba de Levene. La comparación de medias en las muestras independientes (distribución normal con varianzas semejantes) se efectuó mediante una prueba ANOVA de una vía, mientras que, en las muestras con distribución no normal se compararon las medias mediante la prueba de Kruskal Wallis. Para determinar que medias con diferencias significativas diferían entre ellas, se efectuó las pruebas de rango post hoc juntamente con ANOVA en muestras independientes con la prueba de Scheffé o mediante la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney-Wilcoxon en las muestras no normales.

Para determinar cuantitativamente diferencias en la proliferación celular entre las diferentes condiciones, se obtuvo los valores de media y desviación estándar de los diferentes meristemas de cada grupo. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$)

6. Técnicas transcriptómicas (RNAseq)

6.1. Extracción del ARN

Las muestras se empaquetaron con hielo seco (CO_2 en fase sólida, a $-78,5^\circ\text{C}$) en un contenedor isotérmico en el laboratorio de ESTEC y fueron enviadas al laboratorio del CIB donde se mantuvieron a -80°C en un congelador hasta su procesamiento.

Las plántulas se sacaron del recipiente con RNAlater® y se procedió a diseccionar las plántulas por cada condición mediante un bisturí con ayuda de una lupa. Se cortaron en 5 partes: meristemo radicular, resto de la raíz, tallo, hojas y meristemo caulinar (yema apical). Se juntaron las partes en diversos grupos generando diversas réplicas: tres réplicas para en el meristemo radicular y caulinar y cuatro réplicas para el resto de raíz, tallo y hojas.

Se utilizó un kit específico para la extracción del ARN en plantas (NucleoSpin® RNA Plant, MACHEREY-NAGEL). El kit incluía un tratamiento para la digestión de ADN, mediante la incubación de rADNasa (*Recombinant DNase*) en columna durante 15min a temperatura ambiente para la eliminación de trazas de ADN. Protocolo de la purificación del ARN y digestión del ADN en el ANEXO 2.

Se efectuó un análisis espectrofotométrico Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260nm para obtener la Absorbancia (A) de las muestras

y mediante la ley de Beer-Lambert, determinar su concentración. También mediante espectrofotometría, se obtuvo la pureza del ARN extraído gracias a la proporción de la Absorbancia a 260nm/280nm ($A_{260/280}$) y a 260nm/230nm ($A_{260/230}$). Para el ARN "puro", la relación $A_{260/280}$ es de 2,0 mientras que la relación $A_{260/230}$ es de 2,0-2,2. Para verificar que las muestras eran viables para su secuenciación RNAseq, se comprobó la estabilidad y la posible presencia de degradación del ARN. Se determinó mediante unos indicadores de calidad, obtenidos por el número RQN (*RNA Quantity Number*) obtenidos mediante el dispositivo Bioanalyzer 2100 expert Plant RNA nano (Agilent).

En la *RUN3* solo se pudo analizar las muestras hasta el Nanodrop 2000, las cuales están siendo procesadas para determinar su concentración y pureza.

Por ello, los siguientes pasos se efectuarán con las muestras del *RUN1* y *RUN2*. En ellas, se descartó enviar las partes diseccionadas del meristemo caulinar y de las hojas y se decidió secuenciar solo las partes del meristemo radicular, raíz y tallo ya que tenían un RQN > 7.

6.2. Secuenciación de las muestras

Las muestras con un RQN > 7 fueron enviadas a secuenciar a la Unidad del Centro de Regulación Genómica (CRG core facilities, España). La secuenciación se efectuó mediante el secuenciador Illumina HiSeq2500. Se especificó una longitud de lectura de 50 pb para hebras de ARN. Se utilizó TruSeq RNA Library Preparation Kit (Illumina, USA) para la generación de las librerías de secuenciación de las muestras. A continuación, las muestras se dividieron en dos grupos, cada uno con proporciones equimolares. Se utilizaron dos carriles de una celda de flujo para cada grupo. La secuenciación se llevó a cabo hasta que cada muestra tuvo un total de 25 millones de lecturas.

Se utilizó la herramienta bioinformática Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) para el procesamiento de las muestras RNAseq. La calidad de su lectura fue validada mediante FASTQC.

Desafortunadamente por falta de tiempo pude procesar las muestras del *RUN1* y *RUN2* hasta este paso. A continuación explicaré brevemente la metodología a seguir.

Posteriormente los fragmentos deberán ser filtrados para eliminar artefactos y fragmentos no deseados mediante una herramienta de *trimming*, como el Trim Galore! y hacer un alineamiento de la lectura al genoma de *B. oleracea* utilizando, por ejemplo, RNA STAR. Después se tendrá que efectuar un conteo de genes, que se podría obtener mediante FeatureCounts.

Posteriormente, se procederá a efectuarse un análisis funcional para ver la expresión diferencial de genes. Se compararán las muestras entre ellas para ver su dispersión de las diferentes muestras obteniendo el Fold Change (FC) (medida que describe la diferencia de cantidad entre dos muestras). Para determinar los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre las diferentes condiciones, se deberá elegir un FC y un p-valor-p y p-valor corregido. Se podrá utilizar los diagramas de Venn para identificar los genes repetidos y únicos por varias comparaciones para ver cuales coinciden. Para saber que procesos biológicos están envueltos los DEGs se podrá utilizar la herramienta GO enrichment análisis (GeneOntology).

El protocolo de procesamiento de muestras para Secuenciación masiva propuesto por GeneLab es el que se utiliza por defecto en nuestro laboratorio (Overbey et al., 2021).

RESULTADOS

1. Proyecto ROOTROPS

1.1. Proliferación celular

Para el estudio de la proliferación celular, se utilizaron plántulas de *B. oleracea* de la *RUN1* y *RUN2* expuestas a niveles de μg , 1g (control) y 20g (mayor nivel de gravedad) y de la *RUN3* expuestas a 0,17g, 0,37g y 1g en condiciones de iluminación con luz blanca unilateral y oscuridad. La medición de el ratio local de producción celular (cel/mm) se centró en estos niveles de gravedad y regímenes de iluminación, descartándose los niveles 15g, 10g y 5g y la fotoestimulación con luz azul y roja, por la respuesta fototrópica observada en las raíces correspondientes a las *RUN1* y *RUN2* (Aronne et al., 2022). En concreto, por el hecho de que las raíces tratadas tanto con luz blanca como azul presentan un fototropismo positivo de misma magnitud (mismo ángulo de curvatura) independientemente del nivel de gravedad, y a que bajo luz roja y en oscuridad se produce un giro sutil únicamente en las plantas sometidas a microgravedad.

Los resultados obtenidos revelaron que en oscuridad sufrieron un aumento estadísticamente significativo las plántulas sometidas a microgravedad simulada en comparación con el control 1g.

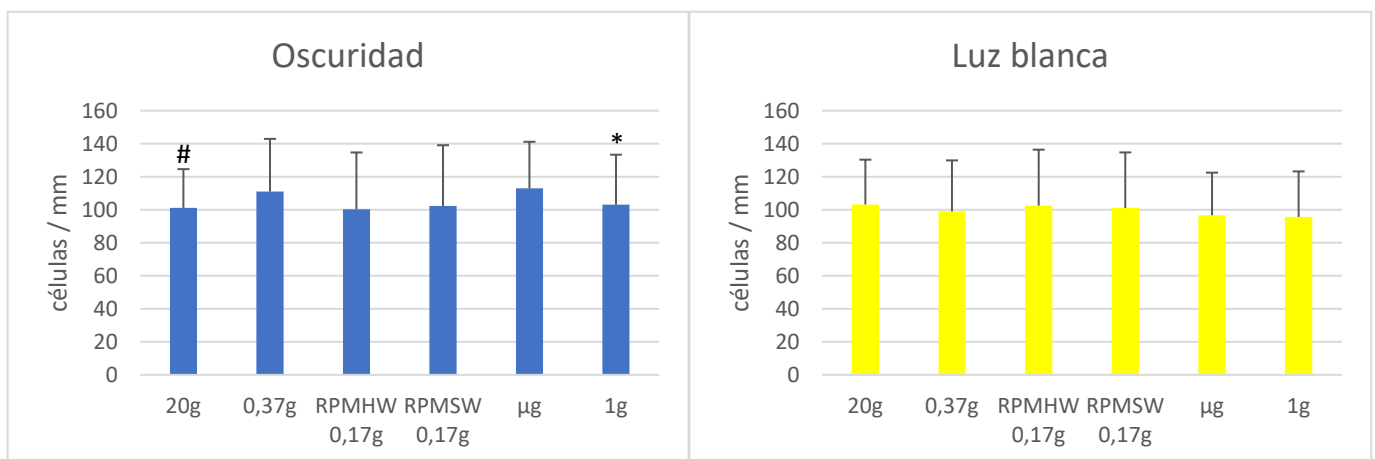


Figura 7. Tasa de proliferación celular expresada como el promedio de la cuantificación (células/mm) de los meristemos radiculares entre los diferentes niveles de gravedad (20g, 0,37g, RPM^{HW} 0,17g, RPM^{SW} 0,17g, μg y el control 1g) en condición de oscuridad y luz blanca. En los meristemos expuestos a luz blanca se observa una proliferación celular similar en todos los niveles gravitatorios mientras que en oscuridad parecen estar alterados. Se observa un incremento de proliferación celular en μg respecto al control 1g en oscuridad. * Diferencia estadísticamente significativa entre el control 1g y μg en oscuridad. # Diferencia estadísticamente significativa entre 20g y μg en oscuridad.

Además, en la condición de oscuridad, también se observó una disminución muy marcada de la tasa de proliferación celular entre el mayor nivel de gravedad simulado (20g) y el menor (μg). En cambio, cuando las plántulas son fotoestimuladas con luz blanca estos efectos fueron paliados, no existiendo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los distintos niveles de gravedad (Figura 7).

1.2. Purificación y calidad del ARN extraído

El análisis transcriptómico en estos momentos está incompleto por falta tiempo. Las muestras de la *RUN3* están siendo procesadas (purificación del ARN) para enviar a secuenciar. Las muestras del *RUN1* y *RUN2* fueron enviadas a la empresa de secuenciación y recientemente se han obtenido los datos brutos.

La primera etapa de un proceso de secuenciación masiva (RNAseq) es comprobar si el ARN de cada una de las muestras es de calidad y cantidad suficiente para obtener unos resultados buenos y fiables. Por ello, para conocer si la cantidad de ARN extraído de cada una de las muestras (3 réplicas: meristemo radicular y apical y 4 muestras: raíz, tallo y hojas) es suficiente (aproximadamente es necesario 1 μg) las muestras fueron medidas en el Nanodrop 2000. Los tejidos que tuvieron un menor rendimiento fueron los meristemas con un valor medio de $76,46 \pm 38,37$ ng/ μL , mientras que la concentración de RNA extraído del resto de tejidos (raíz, tallo y hoja) fue similar y mucho mayor, con un valor medio de $210,46 \pm 55,79$ ng/ μL . Además, la relación A260/280 y A260/230 dio unos valores de purificación del ARN muy buenos en todas las muestras, con A260/280: $2,21 \pm 0,01$ y A260/230: $2,27 \pm 0,11$. La comprobación de la calidad del ARN extraído fue medido en el Bioanalyzer 2100 expert Plant RNA nano, mediante el parámetro RQN, basado en el trazado electroforético completo de una muestra de ARN total determinada, incluyendo la relación de picos ribosómicos citosólicos vegetales, 18S y 25S, la separación entre estos picos y la presencia o ausencia de productos de degradación en la región rápida y su concentración.

El RQN tienen valores de 10 a 1, donde 10 indica la máxima calidad posible del ARN y 1 indica un ARN muy degradado. Está estandarizado descartar las muestras con un RQN < 7 , por ello, se decidió no secuenciar las muestras cuyo

valor estuviera comprendido entre 7 y 10. Todas las réplicas correspondientes a meristemo radicular, raíz, tallo y hoja tuvieron un RQN > 7, por lo que se procedió con su secuenciación, mientras que las réplicas correspondiente a meristemo apical tuvieron un RQN < 7, por lo que finalmente no fueron secuenciadas.

A continuación se mostrará un ejemplo de dos perfiles de separación del ARN obtenida por el software ProSize v3.0 (Agilent) de una réplica con un RQN perfecto y otra con un RQN bajo (Figura 8). En el eje-x de la gráfica está representado, el tamaño del genoma en nucleótidos (nt) y en el eje-y, la unidad relativa de fluorescencia (RFU), la cual determina la cantidad y tamaño mediante

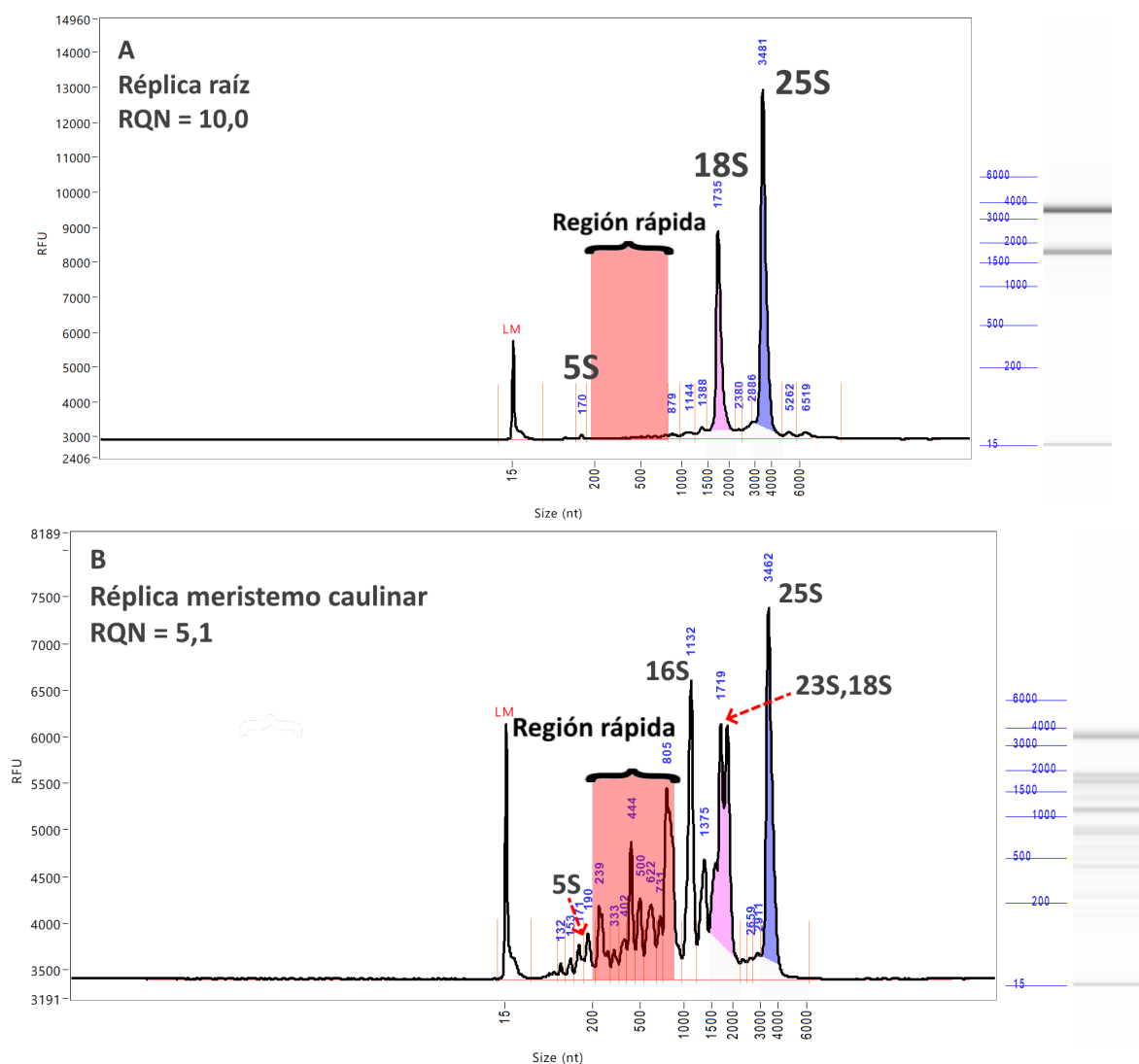


Figura 8. Ejemplo de dos perfiles de separación de ARN de las muestras analizadas mediante software ProSize v3.0 (Agilent). La gráfica de arriba es una réplica de la raíz, con un RQN = 10 (perfecto). La gráfica de abajo, de una réplica del meristemo apical caulinar, con un RQN = 5,1 (alta degradación). La región rápida es un parámetro del software para determinar la degradación de las muestras, delimitándose entre los picos del 5S y 16S.

el nivel de intensidad de las bandas electroforéticas (a la derecha de la gráfica). La gráfica superior (Figura 8A), muestra el perfil electroforético de una réplica de raíz en oscuridad con un RQN=10 (perfecto). La gráfica de abajo (Figura 8B) es el perfil de una réplica del meristemo apical caulinar en oscuridad con un RQN=5,1. En esta última, se aprecia mayor cantidad de picos que la primera, debido a que al ser un tejido fotosintético contiene un mayor material genético, correspondiente al ARNr de los cloroplastos (23S y 16S). El bajo valor de RQN es debido al “ruido” obtenido en la región rápida (contiene gran cantidad de picos), lo cual indica una degradación de la muestra.

2. Experimento clinostato inclinado

2.1. Análisis cualitativo del crecimiento de las plántulas

El resultado de la exposición de las plántulas a 24h en simulación se puede observar en las fotos en la Figura 9a-e. La parte aérea de las plántulas en condición de oscuridad crecen etioladas (falta de clorofila) observándose un hipocótilo más alargado. En cambio, se observa el desarrollo del tejido fotosintético en condiciones lumínicas, con cotiledones abiertos y verdes. La dirección de crecimiento de las raíces en el control interno (0,75g) y el control externo 1g en las dos tratamientos lumínico (luz blanca y oscuridad) es en la misma dirección que el vector gravedad (gravitropismo positivo). En cambio, en microgravedad simulada, la gravedad de la Luna (0,17g) y Marte (0,37g) y oscuridad las raíces muestran un crecimiento mucho más desorientado, creciendo algunas de ellas en dirección opuesta al vector gravedad. Esto no ocurre cuando las plantas son iluminadas con luz blanca ambiental, ya que el crecimiento de las raíces es mucho más ordenado y orientado en la misma dirección del vector gravedad. A cuanto mayor es la reducción en los niveles gravitatorios, más aleatorio es la dirección de crecimiento en la condición de oscuridad.

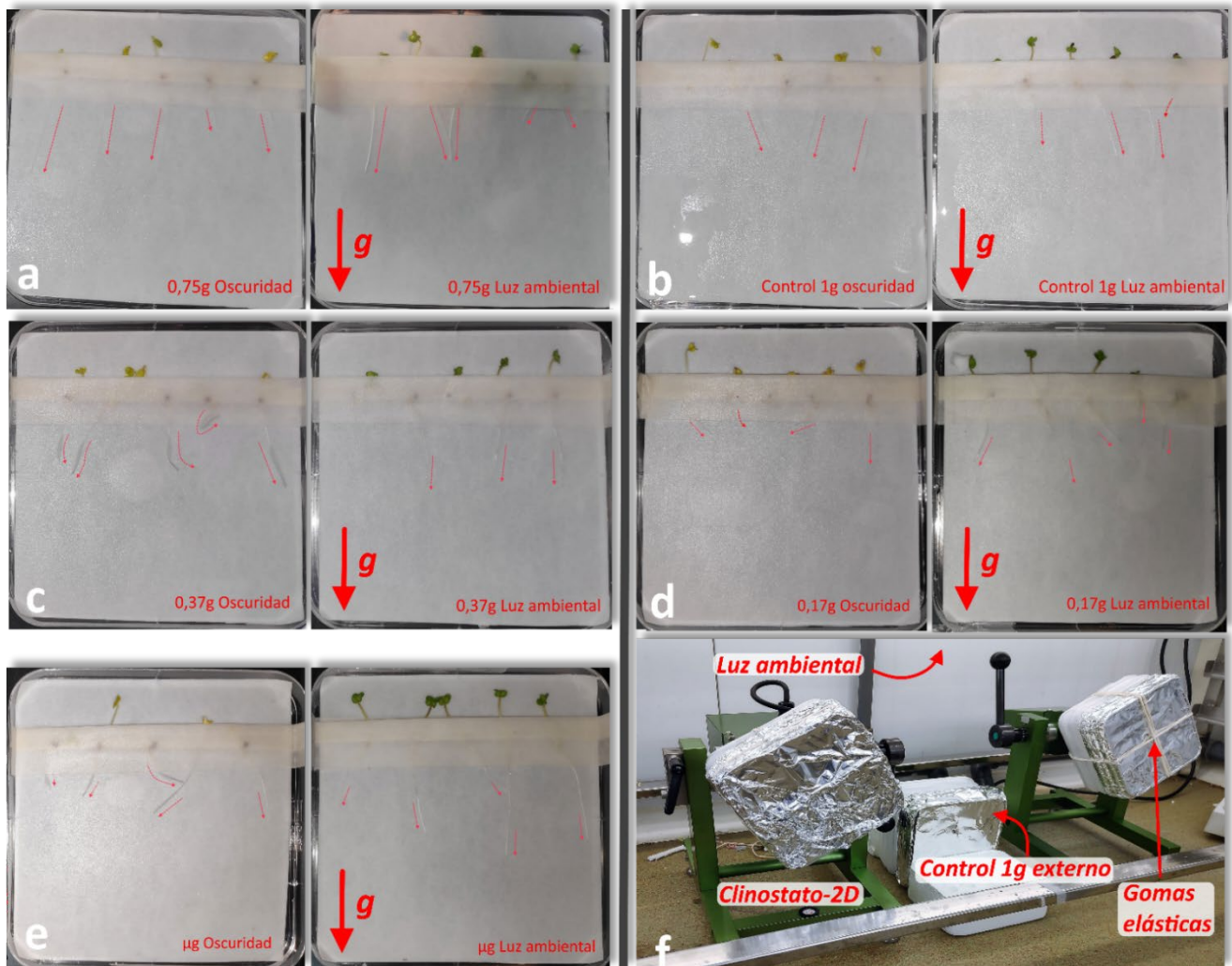


Figura 9. Fotografías de muestras obtenidas directamente después del periodo de simulación del experimento del clinostato inclinado en condición de oscuridad (izquierda) y luz ambiental simulando (derecha) en cada nivel gravitatorio. a, Control interno 0,75g. b, Control externo 1g. c, Gravedad de Marte (0,75g). d, Gravedad lunar (0,17g). e. Microgravedad (μ g). f, Disposición de los clinostatos-2D inclinados con las muestras en simulación sujetadas mediante gomas elásticas en el incubador a 22°C con luz ambiental (parte superior del incubador) y el control 1g externo estático a 90°.

2.2. Inmunofluorescencia anti-fibrilarina

Tras la realización de la inmunofluorescencia siguiendo el protocolo estandarizado para raíces de *A. thaliana*, como se puede observar en Figura 10, el anticuerpo primario se unió de manera específica a la proteína nucleolar fibrilarina de *B. oleracea*, pero se obtuvo una señal muy débil y con mucho ruido de fondo. Esto puede ser debido a que los anticuerpos no han penetrado bien posiblemente por el mayor grosor del meristemo radicular de esta especie en comparación con en *A. thaliana*. La tinción mediante DAPI, el cual tiñe el ADN

para dar un mejor contraste al nucleolo, tampoco penetró bien en las células vegetales.

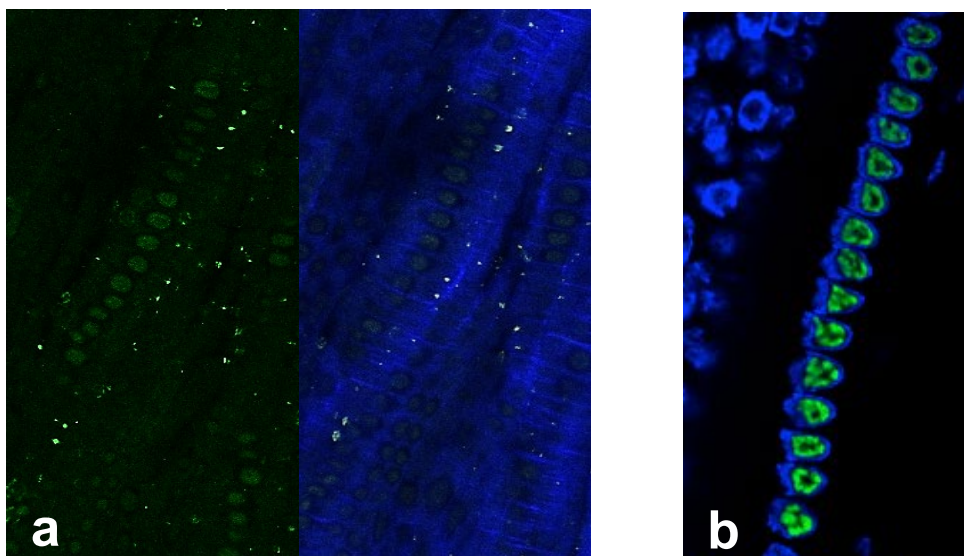


Figura 10. Evaluación del resultado de la inmunofluorescencia anti-fibrilarina utilizando un protocolo estándar para *A. thaliana* en *B. oleracea*. a, Fotografías del resultado de la inmunofluorescencia anti-fibrilarina. Puede observarse que el anticuerpo es específico a las proteínas fibrilarina (señal verde, fluorescencia del nucleolo) pero con alto ruido de fondo y poca intensidad. También puede verse una mala tinción del ADN mediante DAPI (señal azul). b, Ejemplo de una buena inmunofluorescencia anti-fibrilarina y la tinción de ADN nuclear mediante DAPI. Adaptado (Manzano Pérez, 2019).

Por lo tanto, para poder cuantificar el área del nucleolo y así conocer si existen cambios en el crecimiento celular en las condiciones experimentales, es necesario optimizar el protocolo. Para ello, se requerirá efectuar los siguientes ajustes al protocolo actual:

- Aumentar el tiempo de incubación con el coctel enzimático para digerir mejor la pared celular.
- Añadir una mayor concentración de enzimas o detergentes para permeabilizar las membranas mejor.
- Hacer cortes longitudinales de las raíces en fresco (vibratomo) para reducir el grosor de las muestras y hacer la inmunofluorescencia en esos cortes.

DISCUSIÓN

1. Proyecto ROOTROPS (proliferación celular)

El recuento de células/mm sufrió un aumento únicamente en las plántulas sometidas a microgravedad simulada en oscuridad, no produciéndose ningún cambio significativo en ninguna otra condición experimental respecto al control 1g. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en experimentos anteriores realizados en *A. thaliana* a microgravedad real y simulada, en los que se describió, por primera vez, que la ausencia de cualquier señal trópica (ausencia de luz y gravedad) causaba una marcada pérdida de la competencia meristemática por un aumento en el número de células en las capas del meristemo radicular (Boucheron-Dubuisson et al., 2016; Manzano et al., 2013; Matía et al., 2010).

La ausencia de cambios en este parámetro en niveles gravitatorios de la Luna (0,17g) mediante los simuladores RPM^{HW} y RPM^{SW} ni en el marciano (0,37g) comparados con el control 1g en oscuridad es un resultado sorprendente porque en un experimento anterior realizado con *A. thaliana* donde utilizaron las RPM^{HW} y RPM^{SW} para simular niveles parciales de gravedad se, observó que el umbral de estrés estaba entre 0,37g y 0,17g ya que a 0,37g no se preciaban cambios respecto al control 1g, pero en la gravedad lunar se producía un desacople de la competencia meristemática de la proliferación celular aún más marcado que a microgravedad simulada (Manzano et al., 2018). Además, experimentos llevados a cabo en LDC con la especie modelo *A. thaliana* en oscuridad concluyeron que niveles de hipergravedad de 2g y 6g producían el efecto contrario que la microgravedad en la proliferación celular, es decir, las plántulas sometidas a estos niveles de hipergravedad sufrían una disminución en este parámetro (A. Manzano et al., 2012). En cambio, este efecto tampoco es observable en las plantas de *B. oleracea* del proyecto ROOTROPS.

Por otra parte, los resultados obtenidos siguieron que una iluminación con luz blanca lateral es suficiente para paliar el efecto ocasionado por la falta de un estímulo gravitatorio al no verse diferencias estadísticamente significativas de la proliferación celular entre los grupos y producirse una nivelación entre los diferentes grupos o condiciones experimentales. Esto puede ser debido a que la

iluminación con luz blanca es un estímulo suficiente para el desarrollo correcto de la planta, al igual que ocurre en experimentos a microgravedad real y simulada en *A. thaliana* en lo que una iluminación con fotoperiodo y luz roja restaura la competencia del meristemo radicular (Manzano et al., 2021; Valbuena et al., 2018).

Todos estos resultados en su conjunto, indican que *B. oleracea* muestra una ventaja adaptativa a los ambientes de gravedad alterada en comparación con *A. thaliana*, al sufrir menos alteraciones en la proliferación celular, y por tanto, la respuesta a estos ambientes es específica de especie, como también indican los resultados de la curvatura de la raíz correspondiente a las *RUN1* y *RUN2*, que muestran que la interacción entre fototropismo y gravitropismo varía entre ambas especies (Izzo et al., 2022).

2. Experimento clinostato inclinado (análisis cualitativo dirección de crecimiento)

Se ha observado que en condición de oscuridad como con iluminación con luz blanca las plantas desarrollaron características morfológicas esperadas. Es decir, en oscuridad presentan una etiolación del tejido fotosintético y un alargamiento del hipocótilo y las expuestas a la luz muestran unos cotiledones abiertos y desarrollados con una fotosíntesis activa en toda la parte aérea (Armarego-Marriott et al., 2020).

Las plántulas correspondientes a al control externo (1g) y al control interno (0,75g) en ambos regímenes de iluminación (oscuridad y luz blanca) muestran un crecimiento ordenado de las raíces en la misma dirección que el vector gravedad (gravitropismo positivo). En cambio, las plántulas mantenidas en oscuridad y sometidas a μg , 0,17g y 0,37g muestran unas raíces con un crecimiento aleatorio. Esta desorientación en el crecimiento de las plantas al crecer en ausencia de los dos principales estímulos que rigen su crecimiento, también ha sido observada y descrita en experimentos realizado recientemente en el espacio (Paul et al., 2013) y en microgravedad simulada por clinorrotación es experimentos más antiguos (Hoson, 1994).

En cambio, en los tres niveles de gravedad alterada simulados, cuando las plantas son fotoestimuladas con luz blanca muestran un crecimiento de las

raíces orientadas de igual forma que en ambos controles, es decir, un gravitropismo positivo y un fototropismo negativo. Este resultado indica que la presencia de un estímulo lumínico ambiental es suficiente para orientar el crecimiento de la planta en ausencia de un estímulo gravitrópico. Este mismo comportamiento también ha sido observado en plantas de *A. thaliana* crecidas con luz blanca, tanto en la ISS como en simuladores de microgravedad (Manzano et al., 2021; Paul et al., 2013; Villacampa et al., 2021).

Estos resultados indican que el método de clinostato inclinado puede ser utilizado para simular microgravedad y niveles parciales de gravedad, no obstante la falta de tiempo para completar estos estudios ha impedido utilizar varias técnicas que permitieran su validación experimental y garantizar su reproducibilidad (gran ventaja de los simuladores frente a la investigación espacial).

CONCLUSIONES

1. En la especie *Brassica oleracea* la microgravedad simulada en condiciones de oscuridad produce un aumento en la proliferación celular del meristemo radicular que podría estar asociado a una pérdida de la competencia meristemática de estas células. Además, la exposición unidireccional con luz blanca en esta especie es capaz de compensar estos efectos.
2. La técnica del clinostato inclinado parece simular bien los niveles de gravedad parcial (0,37g y 0,17g) al darse unos resultados cualitativos de la morfología de la planta similares a los observados en otros simuladores.

FUTUROS ASPECTOS

Los resultados obtenidos en ROOTROPS puede ser un punto de partida para futuras aplicaciones agronómicas de mejora para el crecimiento de plantas de cultivo en el espacio.

Una vez optimizado el protocolo para la inmunofluorescencia anti-fibrilarina en *B. oleracea*, podrá ser cuantificado el crecimiento celular y así completar el estudio del estatus de la competencia meristemática en la punta de la raíz.

Los datos obtenidos en los estudios transcriptómicos podrán validar las observaciones efectuadas mediante los estudios de microscopía y en conjunto, ser un punto de apoyo para futuros experimentos con vegetales comestibles.

El estudio cualitativo morfológico preliminar es prometedor al verse los mismos resultados que en otros simuladores, pudiendo ser una técnica válida para la simulación de gravedades reducidas mediante el clinostato-2D.

Una vez se observe la proliferación celular en las muestras obtenidas en el clinostato inclinado, podrán compararse con los resultados obtenidos en ROOTROPS y en anteriores estudios y así validar este método de simulación.

AUTOEVALUACIÓN

La realización de las prácticas y el trabajo del final de grado en el grupo de investigación de Nucleolo, Proliferación Celular y Microgravedad me ha familiarizado con el mundo laboral y el trabajo que ejerce un investigador así como la dinámica de un grupo de laboratorio. He puesto en práctica los diferentes conceptos aprendidos en los diferentes años de mi carrera tanto teóricos como prácticos, como la cooperación y trabajo en equipo.

He podido aprender mucho gracias a las diferentes áreas en los que se centra el grupo de investigación entre los que destaca el procesamiento de las muestras biológicas y su análisis tanto celular como molecular.

Gracias al trabajo de final de grado he aprendido a realizar un experimento propio, desde su hipótesis inicial, su ejecución, la obtención de los resultados y su posterior análisis y conclusión, pasando por las diferentes dificultades e impedimentos que han ido apareciendo a lo largo del tiempo.

BIBLOGRAFÍA

- Anil-Inevi, M., Yaman, S., Yildiz, A. A., Mese, G., Yalcin-Ozuysal, O., Tekin, H. C., & Ozcivici, E. (2018). Biofabrication of in situ Self Assembled 3D Cell Cultures in a Weightlessness Environment Generated using Magnetic Levitation. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-25718-9>
- Armarego-Marriott, T., Sandoval-Ibañez, O., & Kowalewska, Ł. (2020). Beyond the darkness: recent lessons from etiolation and de-etiolation studies. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1215. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ496>
- Aronne, G., Wilhelminus, L., Muthert, F., Gennaro Izzo, L., Romano, L. E., Iovane, M., Capozzi, F., Manzano, A., Ciska, M., Herranz, R., Medina, F. J., Kiss, J. Z., & van Loon, J. J. W. A. (2022). A novel device to study altered gravity and light interactions in seedling tropisms. *Life Sciences in Space Research*, 32, 2214–5524. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2021.09.005>
- Barneche, F., Steinmetz, F., & Echeverria, M. (2000). Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27212–27220. <https://doi.org/10.1074/JBC.M002996200>
- Boucheron-Dubuisson, E., Manzano, A. I., le Disquet, I., Matía, I., Sáez-Vasquez, J., van Loon, J. J. W. A., Herranz, R., Carnero-Diaz, E., & Medina, F. J. (2016). Functional alterations of root meristematic cells of *Arabidopsis thaliana* induced by a simulated microgravity environment. *Journal of Plant Physiology*, 207, 30–41. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2016.09.011>
- Brown, A. H., & Chapman, D. K. (1978). G-FUNCTIONS OF PLANT BEHAVIOR IN SIMULATED HYPOGRAVITY. *Fluid Phase Equilibria*, 63–66. <https://doi.org/10.2514/6.1978-1612>
- Calvaruso, M., Militello, C., Minafra, L., la Regina, V., Torrisi, F., Pucci, G., Cammarata, F. P., Bravatà, V., Forte, G. I., & Russo, G. (2021). Biological and Mechanical Characterization of the Random Positioning Machine (RPM) for Microgravity Simulations. *Life*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/LIFE11111190>
- Correll, M. J., Pyle, T. P., Millar, K. D. L., Sun, Y., Yao, J., Edelman, R. E., & Kiss, J. Z. (2013). Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes. *Planta*, 238(3), 519–533. <https://doi.org/10.1007/S00425-013-1909-X>
- De Micco, V., de Pascale, S., Paradiso, R., & Aronne, G. (2014). Microgravity effects on different stages of higher plant life cycle and completion of the seed-to-seed cycle. *Plant Biology*, 16(SUPPL.1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/PLB.12098>

- Desvoves, B., Echevarría, C., & Gutierrez, C. (2021). A perspective on cell proliferation kinetics in the root apical meristem. *Journal of Experimental Botany*, 72(19), 6708–6715. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab303>
- Galvão, V. C., & Fankhauser, C. (2015). Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 46–53. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2015.01.013>
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23, 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>
- Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P. C. M., de Geest, M., Hauslage, J., Hilbig, R., Hill, R. J. A., Lebert, M., Javier Medina, F., Vagt, N., Ullrich, O., van Loon, J. J. W. A., & Hemmersbach, R. (2013). Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1089/AST.2012.0876>
- Herranz, R., Valbuena, M. A., Manzano, A., Kamal, K. Y., Villacampa, A., Ciska, M., van Loon, J. J. W. A., & Medina, F. J. (2022). Use of Reduced Gravity Simulators for Plant Biological Studies. *Methods in Molecular Biology*, 2368, 241–265. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1677-2_16
- Herranz, R., Vandenbrink, J. P., Villacampa, A., Manzano, A., Pehlman, W. L., Feltus, F. A., Kiss, J. Z., & Medina, F. J. (2019). RNAseq Analysis of the Response of *Arabidopsis thaliana* to Fractional Gravity Under Blue-Light Stimulation During Spaceflight. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01529/FULL>
- Hoson, T. (1994). Automorphogenesis of maize roots under simulated microgravity conditions. *Plant and Soil* 1994 165:2, 165(2), 309–314. <https://doi.org/10.1007/BF00008074>
- Kiss, J., Correll, M., Mullen, J., Hangarter, R., & Edelmann, R. (2003). Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form. *Gravitational and Space Biology Bulletin : Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 16, 55–60.
- Kiss, J. Z. (2007). Where's the water? Hydrotropism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4247–4248. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0700846104>
- Kiss, J. Z., Millar, K. D. L., & Edelmann, R. E. (2012). Phototropism of *Arabidopsis thaliana* in microgravity and fractional gravity on the International Space Station. *Planta*, 236(2), 635–645. <https://doi.org/10.1007/S00425-012-1633-Y>
- Kiss, J. Z., Wolverson, C., Wyatt, S. E., Hasenstein, K. H., & van Loon, J. J. W. A. (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>
- Kong, S. G., & Okajima, K. (2016). Diverse photoreceptors and light responses in plants. *Journal of Plant Research*, 129(2), 111–114.
<https://doi.org/10.1007/S10265-016-0792-5>
- Kong, X., Liu, G., Liu, J., & Ding, Z. (2018). The Root Transition Zone: A Hot Spot for Signal Crosstalk. *Trends in Plant Science*, 23(5), 403–409.
<https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2018.02.004>
- Kopp, Sascha (2011). Impact of gravity on the actin filament system of the macrophage cell line RAW 264.7. Bachelor's, University of Applied Sciences Bonn-Rhein-Sieg, Sankt Augustin.
- Kozeko, L. Y., Buy, D. D., Pirko, Y. v., Blume, Y. B., & Kordyum, E. L. (2018). Clinorotation Affects Induction of the Heat Shock Response in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Gravitational and Space Research*, 6(1), 2–9.
<https://doi.org/10.2478/GSR-2018-0001>
- Kraft, T. F. B., van Loon, J. J. W. A., & Kiss, J. Z. (2000). Plastid position in *Arabidopsis columella* cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine. *Planta*, 211(3), 415–422.
<https://doi.org/10.1007/S004250000302>
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Deng, X. W. (2011). Phytochrome Signaling Mechanisms. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9, e0148. <https://doi.org/10.1199/TAB.0148>
- Lu, Y., Ding, C., Wang, J., & Shang, P. (2015). An illuminated growth system for the study of *Arabidopsis thaliana* during diamagnetic levitation by a superconducting magnet. *Advances in Space Research*, 55(1), 525–533.
<https://doi.org/10.1016/J.ASR.2014.08.035>
- Lymperopoulos, P., Msanne, J., & Rabara, R. (2018). Phytochrome and Phytohormones: Working in Tandem for Plant Growth and Development. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01037>
- Manzano, A., Herranz, R., den Toom, L. A., te Slaa, S., Borst, G., Visser, M., Medina, F. J., & van Loon, J. J. W. A. (2018). Novel, Moon and Mars, partial gravity simulation paradigms and their effects on the balance between cell growth and cell proliferation during early plant development. *NPJ Microgravity*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1038/S41526-018-0041-4>
- Manzano, A. I., Larkin, O. J., Dijkstra, C. E., Anthony, P., Davey, M. R., Eaves, L., Hill, R. J. A., Herranz, R., & Medina, F. J. (2013). Meristematic cell proliferation and ribosome biogenesis are decoupled in diamagnetically levitated *Arabidopsis* seedlings. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-124/FIGURES/8>
- Manzano, A. I., Raúl Herranz, ·, Jack, ·, van Loon, J. W. A., Medina, · F Javier, Manzano, A. I., Herranz, · R, Medina, F. J., Herranz, R., & van Loon, J. J.

- W. A. (2012). A Hypergravity Environment Induced by Centrifugation Alters Plant Cell Proliferation and Growth in an Opposite Way to Microgravity. *Microgravity Sci. Technol*, 24, 373–381. <https://doi.org/10.1007/s12217-012-9301-1>
- Manzano, A., Pereda-Loth, V., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., Herranz, R., & Medina, F. J. (2021). Light signals counteract alterations caused by simulated microgravity in proliferating plant cells. *American Journal of Botany*, 108(9), 1775–1792. <https://doi.org/10.1002/AJB2.1728>
- Manzano Pérez, A. (2019). *Efecto sinérgico de la luz y la gravedad sobre el crecimiento y la proliferación celular en “Arabidopsis thaliana”* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/56714/>
- Matía, I., González-Camacho, F., Herranz, R., Kiss, J. Z., Gasset, G., van Loon, J. J. W. A., Marco, R., & Javier Medina, F. (2010). Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *Journal of Plant Physiology*, 167(3), 184–193. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2009.08.012>
- Okajima, K. (2016). Molecular mechanism of phototropin light signaling. *Journal of Plant Research*, 129(2), 149–157. <https://doi.org/10.1007/S10265-016-0783-6/FIGURES/3>
- Overbey, E. G., Saravia-Butler, A. M., Zhang, Z., Rathi, K. S., Fogle, H., da Silveira, W. A., Barker, R. J., Bass, J. J., Beheshti, A., Berrios, D. C., Blaber, E. A., Cekanaviciute, E., Costa, H. A., Davin, L. B., Fisch, K. M., Gebre, S. G., Geniza, M., Gilbert, R., Gilroy, S., ... Galazka, J. M. (2021). NASA GeneLab RNA-seq consensus pipeline: standardized processing of short-read RNA-seq data. *IScience*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102361>
- Paik, I., & Huq, E. (2019). Plant photoreceptors: multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, 114–121. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.03.007>
- Paul, A. L., Wheeler, R. M., Levine, H. G., & Fer, R. J. (2013). Fundamental plant biology enabled by the space shuttle. *American Journal of Botany*, 100(1), 226–234. <https://doi.org/10.3732/AJB.1200338>
- Pereira-Santana, A., Gamboa-Tuz, S. D., Zhao, T., Eric Schranz, M., Vinuesa, P., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castano, E. (2020). Fibrillarin evolution through the Tree of Life: Comparative genomics and microsynteny network analyses provide new insights into the evolutionary history of Fibrillarin. *PLoS Computational Biology*, 16(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008318>
- Qi, F., & Zhang, F. (2019). Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01765>

- Sack, F. D. (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta* 1997 203:1, 203(1), S63–S68. <https://doi.org/10.1007/PL00008116>
- Sato, E. M., Hijazi, H., Bennett, M. J., Vissenberg, K., & Swarup, R. (2015). New insights into root gravitropic signalling. *Journal of Experimental Botany*, 66(8), 2155–2165. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU515>
- Somssich, M., Khan, G. A., & Staffan, S. P. (2016). Cell wall heterogeneity in root development of arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7(AUG2016), 1242. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01242/BIBTEX>
- Staves, M. P. (1997). Cytoplasmic streaming and gravity sensing in Chara internodal cells. *Planta* 1997 203:1, 203(1), S79–S84. <https://doi.org/10.1007/PL00008119>
- United Nations Office for Outer Space affairs. (2013). *Teacher's Guide to Plant Experiments in Microgravity*.
- Valbuena, M. A., Manzano, A., Vandenbrink, J. P., Pereda-Loth, V., Carnero-Diaz, E., Edelmann, R. E., Kiss, J. Z., Herranz, R., & Medina, F. J. (2018). The combined effects of real or simulated microgravity and red-light photoactivation on plant root meristematic cells. *Planta*, 248(3), 691–704. <https://doi.org/10.1007/S00425-018-2930-X/TABLES/1>
- Vandenbrink, J. P., Herranz, R., Medina, F. J., Edelmann, R. E., & Kiss, J. Z. (2016). A novel blue-light phototropic response is revealed in roots of Arabidopsis thaliana in microgravity. *Planta*, 244(6), 1201–1215. <https://doi.org/10.1007/S00425-016-2581-8>
- Vandenbrink, J. P., & Kiss, J. Z. (2019). *Plant responses to gravity*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.011>
- Vandenbrink, J. P., Kiss, J. Z., Herranz, R., & Javier Medina, F. (2014). Light and gravity signals synergize in modulating plant development. *Frontiers in Plant Science*, 5(October). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00563>
- Velappan, Y., Signorelli, S., & Considine, M. J. (2017). Cell cycle arrest in plants: what distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Annals of Botany*, 120(4), 495. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCX082>
- Villacampa, A., Ciska, M., Manzano, A., Vandenbrink, J. P., Kiss, J. Z., Herranz, R., & Medina, F. J. (2021). From Spaceflight to Mars g-Levels: Adaptive Response of A. Thaliana Seedlings in a Reduced Gravity Environment Is Enhanced by Red-Light Photostimulation. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 899, 22(2), 899. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020899>
- Villacampa, A., Sora, L., Herranz, R., Medina, F. J., & Ciska, M. (2021). Analysis of graviresponse and biological effects of vertical and horizontal clinorotation in arabidopsis thaliana root tip. *Plants*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10040734/S1>

Went F. W. (Frits Warmolt), & Thimann Kenneth Vivian. (1937).
Phytohormones. New York, The Macmillan Company, 1937.
<https://www.biodiversitylibrary.org/item/26595>

Zhang, Y., He, P., Ma, X., Yang, Z., Pang, C., Yu, J., Wang, G., Friml, J., &
Xiao, G. (2019). Auxin-mediated statolith production for root gravitropism.
New Phytologist, 224(2), 761–774. <https://doi.org/10.1111/NPH.15932>

ANEXOS

ANEXO 1: Fotografías utilizadas en la cuantificación de la proliferación celular

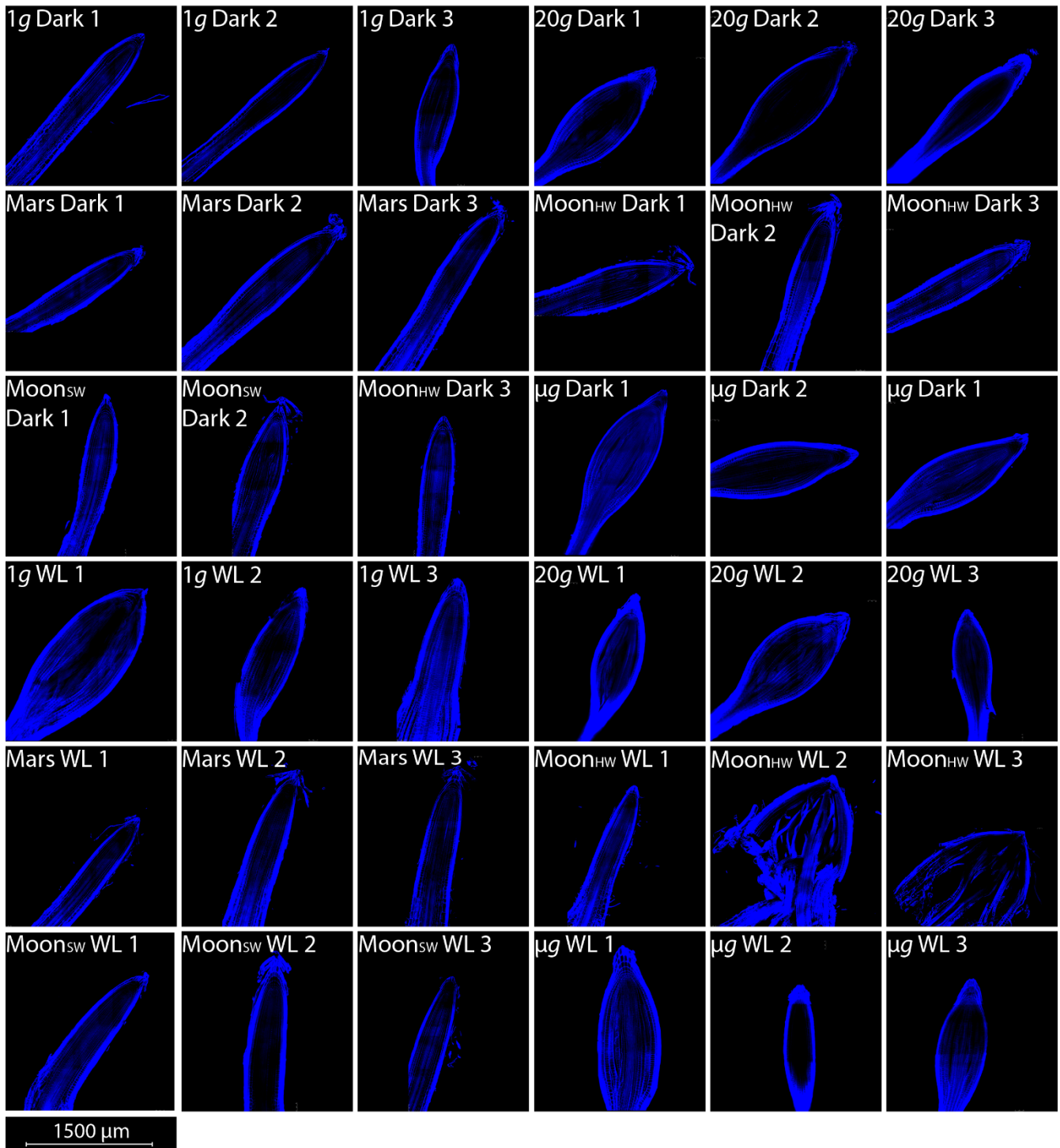













Figura 11. Parte de las fotografías utilizadas para la cuantificación de las células del meristemo radicular de *B. oleracea* para obtener la proliferación celular (células/mm) mediante la tinción de la pared celular con Renaissance. Observación efectuada con el microscopio confocal Leica TCS SP5 y utilización del software FIJI para el análisis de las imágenes biológicas. Muestras etiquetadas según su condición experimentada (Dark = oscuridad; WL = luz blanca; Mars = 0,37g; Moon_{HW} = 0,17g en la RPM^{HW}; Moon_{SW} = 0,17g en la RPM^{SW}).

ANEXO 2: Protocolo de extracción del ARN de la planta

Aislamiento del ARN de la planta:

NucleoSpin® RNA Plant and Fungi		
1 Homogenize and lyse sample	 	500 µL PFL 10–50 µL PFR Mix 56 °C, 5 min 14,000 x g, 1 min
2 Filtrate lysate	 	Load lysate 14,000 x g, 1 min
3 Adjust RNA binding conditions		500 µL PFB Mix RT, 5 min
4 Bind RNA	 	Load 650 µL sample 14,000 x g, 30 s Load residual sample 14,000 x g, 30 s
5 Wash silica membrane	 	1 st wash 500 µL PFW1 2 nd wash 500 µL PFW2 3 rd wash 500 µL PFW2 14,000 x g, 1 min after each washing step
6 Elute RNA	 	50 µL RNase-free H ₂ O RT, 1 min 14,000 x g, 1 min

Digestión del ADN en columna:

Reconstitution of rDNase

Add 4 mL Reaction Buffer for rDNase into a rDNase Vial Size F and dissolve the DNase.

On-column digestion into purification procedure

Follow the purification procedure according to section 5.1 until the column has been washed with 500 μ L Buffer PFW1 (in step 5).

Apply **95 μ L rDNase reaction mixture** directly onto the center of the silica membrane of the column.

Incubate at **room temperature** for **15 min**.

Continue the procedure 5.1, step 5, by adding 500 μ L Buffer PFW2 onto the column.

6.2 Troubleshooting

Problem	Possible cause and suggestion
Clogged NucleoSpin [®] RNA Plant and Fungi Filter	<p><i>Too much sample material</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Use less sample material and / or centrifuge for 3 min at 20,000 x <i>g</i>.
Poor RNA quality or yield	<p><i>Fruit tissue sample not cleared prior to heat incubation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Clear fruit tissue sample lysates and perform the heat incubation with the clear supernatant only.
	<p><i>Sample with high starch content was heat incubated</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Samples such as potato tubers, maize kernels, wheat kernels and similar should not be incubated at elevated temperatures during the RNA purification procedure However, banana fruit tissue of ripe fruits should be heat incubated in order to obtain high RNA yield.
Poor RNA purity and or colored silica membrane / eluate	<p><i>Washing steps not sufficient</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Perform an additional wash step with Buffer PFW2.

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Víctor Vázquez Vilriales

Nom i Cognoms del Tutor/a: Maria del Carmen Portillo Guisado

Data de la entrevista amb l'alumne: 24 de Mayo de 2022

Recomanacions durant el seguiment: Acortar la introducción, modificar y aclarar los objetivos. Acabar de presentar los resultados y su discusión con la bibliografía relevante. Faltan las conclusiones y la autoevaluación.

Observacions: El Trabajo es interesante y las partes presentadas tienen buena calidad de expresión escrita, la estructura es correcta y las figuras y tablas se encuentran en formato adecuado. Faltaría acortar la introducción y terminar los resultados y discusión. También faltan las conclusiones.

Observacions Darrera revisió:

Hemos quedado que revisaremos la versión más avanzada de la memoria escrita el 2 de Junio _____

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 25 de Mayo 2022