

Autores: Jimena Paredes Giménez, Fuensanta Mas Gómez y Rafael Moreno García
Tutores: Nieves Fernández, Enrique Olmos y Luis Martín

INTRODUCCIÓN

Las giberelinas son hormonas vegetales que están implicadas en diversos procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, como la germinación, elongación del tallo, desarrollo del fruto, etc.

Para el estudio del metabolismo de las giberelinas se utilizan diferentes compuestos químicos que inhiben su síntesis, como son el paclobutrazol, diaminozida, prohexadiona cálcica, etc. Sin embargo, el efecto celular de la prohexadiona cálcica ha sido poco estudiada en la bibliografía. El presente trabajo pretende ser una aproximación a su efecto celular en cultivo celulares de tabaco.

Nicotiana tabacum cv Xanthi es una planta herbácea perenne, de la familia de las solanáceas. Esta planta permite la obtención de cultivos celulares que sirve como sistema modelo en la investigación debido a que presentan un ciclo de vida corto (alrededor de 7 días) y presentan un crecimiento celular homogéneo. A partir de la planta silvestre (wt) y dos plantas transgénicas relacionadas con la síntesis de giberelinas (L5 y L45), obtenidas por el grupo de la Dra. Isabel López (IBMCP- Valencia) se obtuvieron cultivos celulares mediante cotiledones en el CEBAS. El mutante L5 presenta un fenotipo gigante, pues sobreexpresa la GA20ox. Mientras que el mutante L45 es una planta enana, ya que sobreexpresa el gen del catabolismo de las giberelinas GA2ox.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estos cultivos celulares se hicieron crecer tanto en ausencia (líneas celulares control) como en presencia de 75 μM de prohexadiona cálcica (PHD) y 50 μM de GA₃, tomándose muestras a 1, 4 y 6 días después de la aplicación de los diferentes tratamientos. Para comprobar el efecto de dichos tratamientos, se estudió la viabilidad celular mediante una tinción con Evans Blue y su observación con un microscopio óptico Olympus BHX43.

Para ello, las células se tiñeron *in vivo* durante 10 minutos a temperatura ambiente con el colorante Evans Blue, a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹ y posteriormente se realizaron tres lavados con medio de cultivo fresco para retirar el exceso del colorante. El colorante Evans Blue (Sigma-Aldrich) se caracteriza por ser un colorante vital que no es capaz de penetrar a través de membranas semipermeables intactas, por lo que solamente tiñe células muertas. La cuantificación de la viabilidad se llevó a cabo con un microscopio Olympus BX40 en campo claro equipado con una cámara digital ProgRes C12 plus con su correspondiente software.

Con esta técnica también se apreció la morfología celular. Para analizar el posible papel de la producción de ROS en la mitocondria como posible inductor de la muerte celular producida por los tratamientos, se realizó una tinción subcelular con el fluorocromo MitoSOX Red. Para ello las células fueron incubadas con 5 μM de MitoSOX Red durante 30 minutos, lavadas con tampón PBS y observadas con un microscopio de fluorescencia DM6 motorizado Leica.

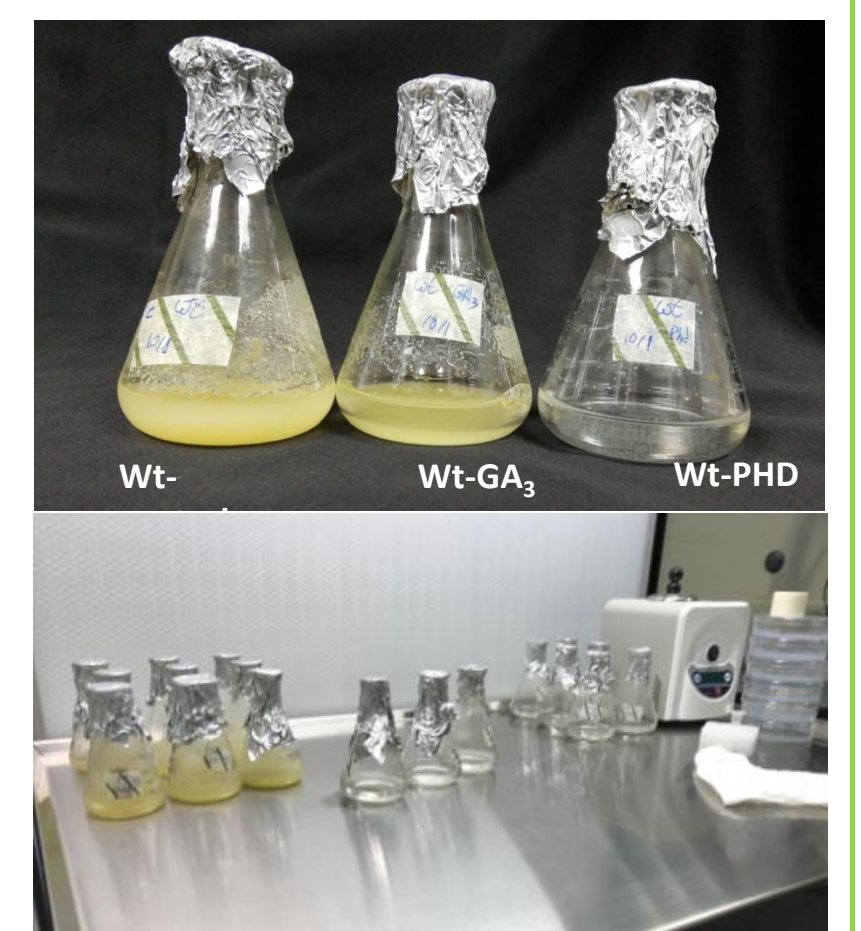


Figura 1. Cultivo celular wt crecido en tratamiento control, 50 μM de GA₃ y 75 μM de PHD.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

En la Figura 2 podemos ver imágenes del efecto de los distintos tratamientos en los diferentes cultivos celulares a los 4 días de la aplicación de dichos tratamientos. El análisis del efecto de la PHD en la viabilidad celular se muestra en la Figura 3. Como se puede observar, no hubo un efecto negativo en las líneas celulares L45 y L5. Sin embargo, el tratamiento de PHD indujo un fuerte descenso en la viabilidad celular de las células control.

Mediante el uso del MitoSOX Red observamos que las células de WT mostraban una mayor producción de ROS en la mitocondria en comparación con las líneas L45 y L5 (Figura 4).

Estos resultados parecen indicar que la PHD está induciendo un estrés oxidativo mitocondrial en las células WT que podría estar implicado en la muerte celular tan elevada que observamos en esta línea celular.

Dado que no observamos efecto significativo en las líneas L45 y L5 con el tratamiento PHD pero sí en WT, esto podría indicar que estas líneas celulares, L5 y L45, presentan mecanismos adicionales de defensa que les permite sobrevivir al tratamiento con PHD.

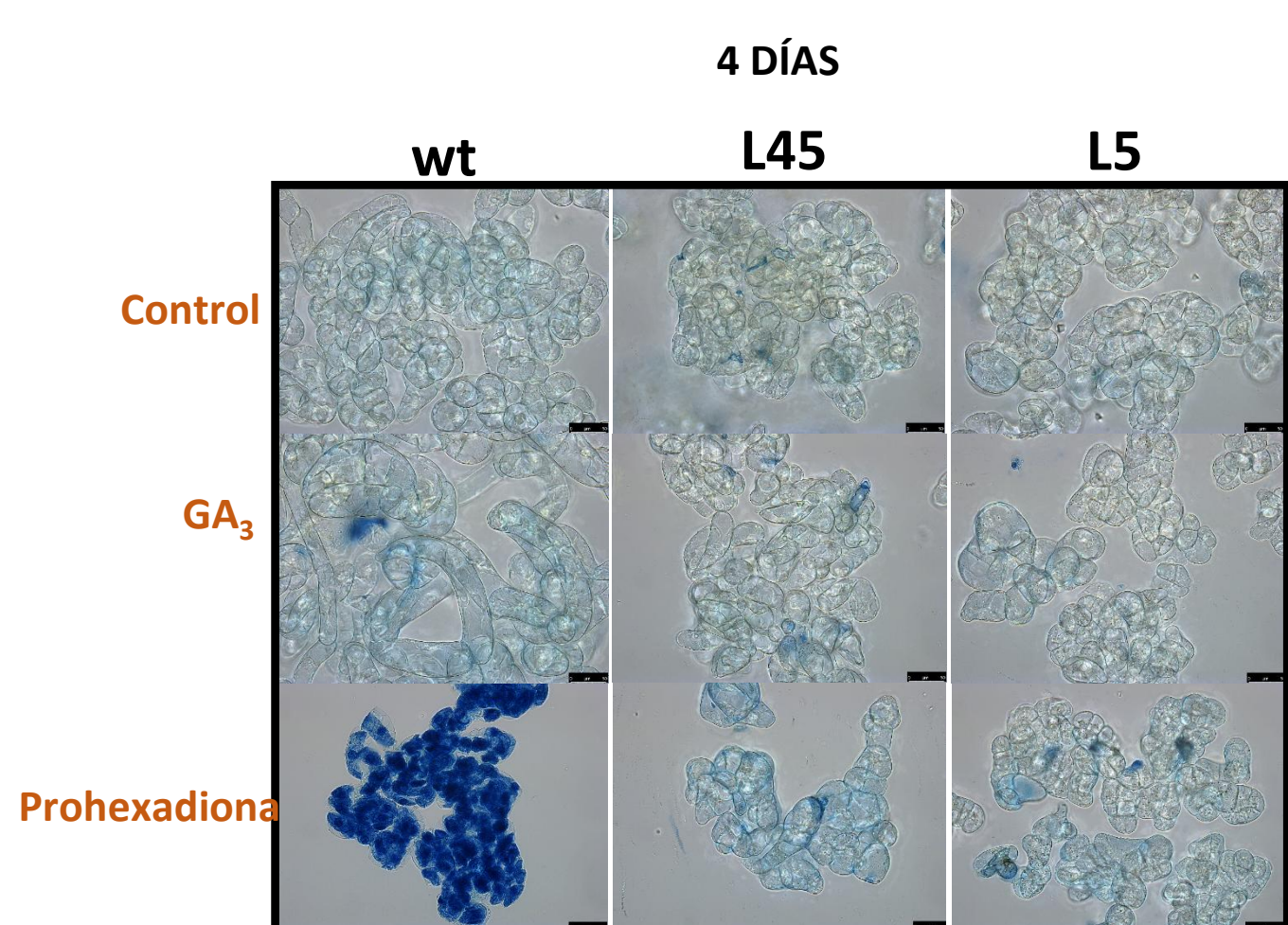


Figura 2. Composición de imágenes correspondientes al estado de las células a los 4 días de la aplicación de los diferentes tratamientos (control, 50 μM de GA₃ y 75 μM de PHD).

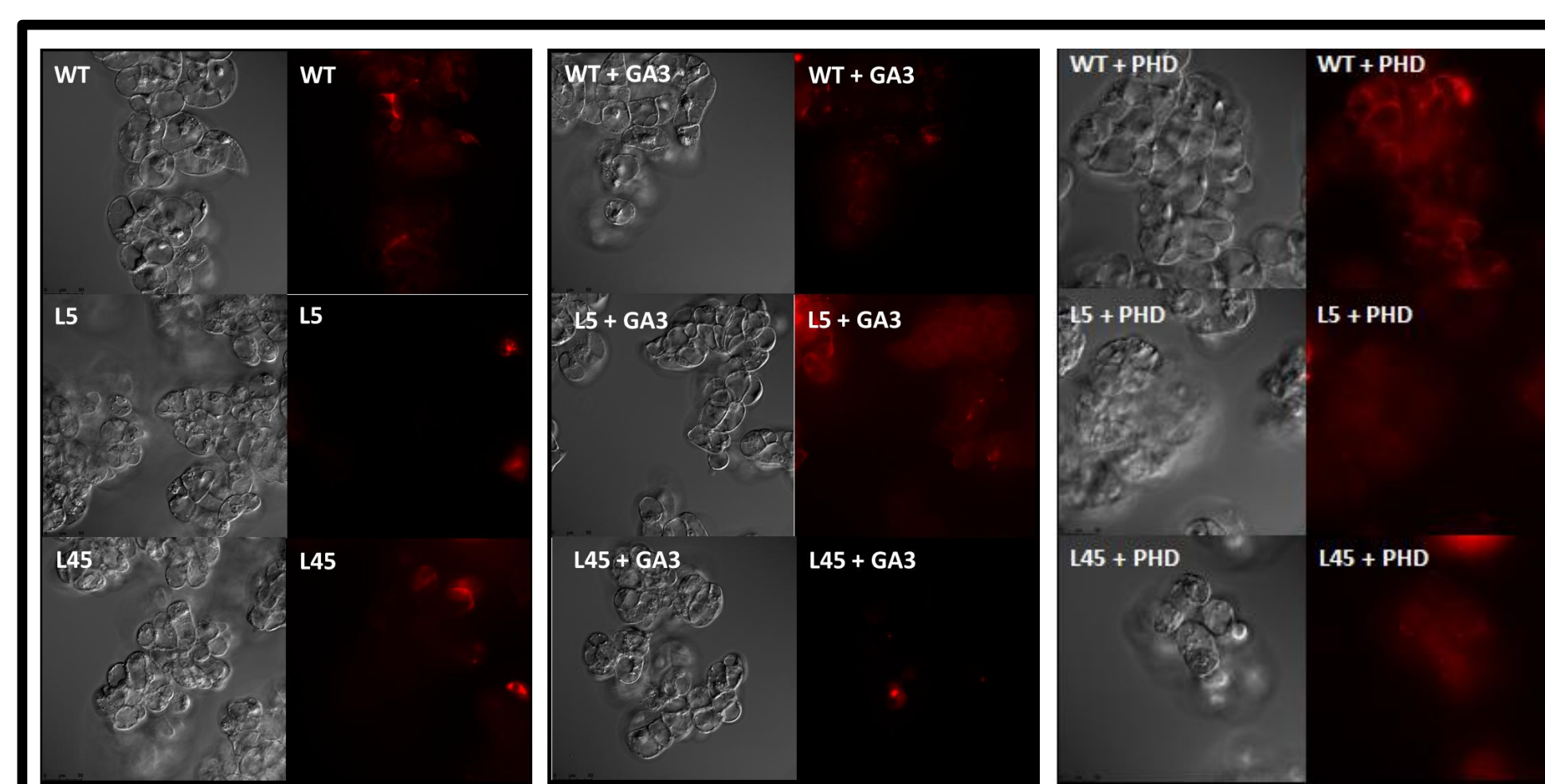


Figura 4. Composición de imágenes correspondientes al estado de las células a los 4 días de la aplicación de los diferentes tratamientos (control, 50 μM de GA₃ y 75 μM de PHD).

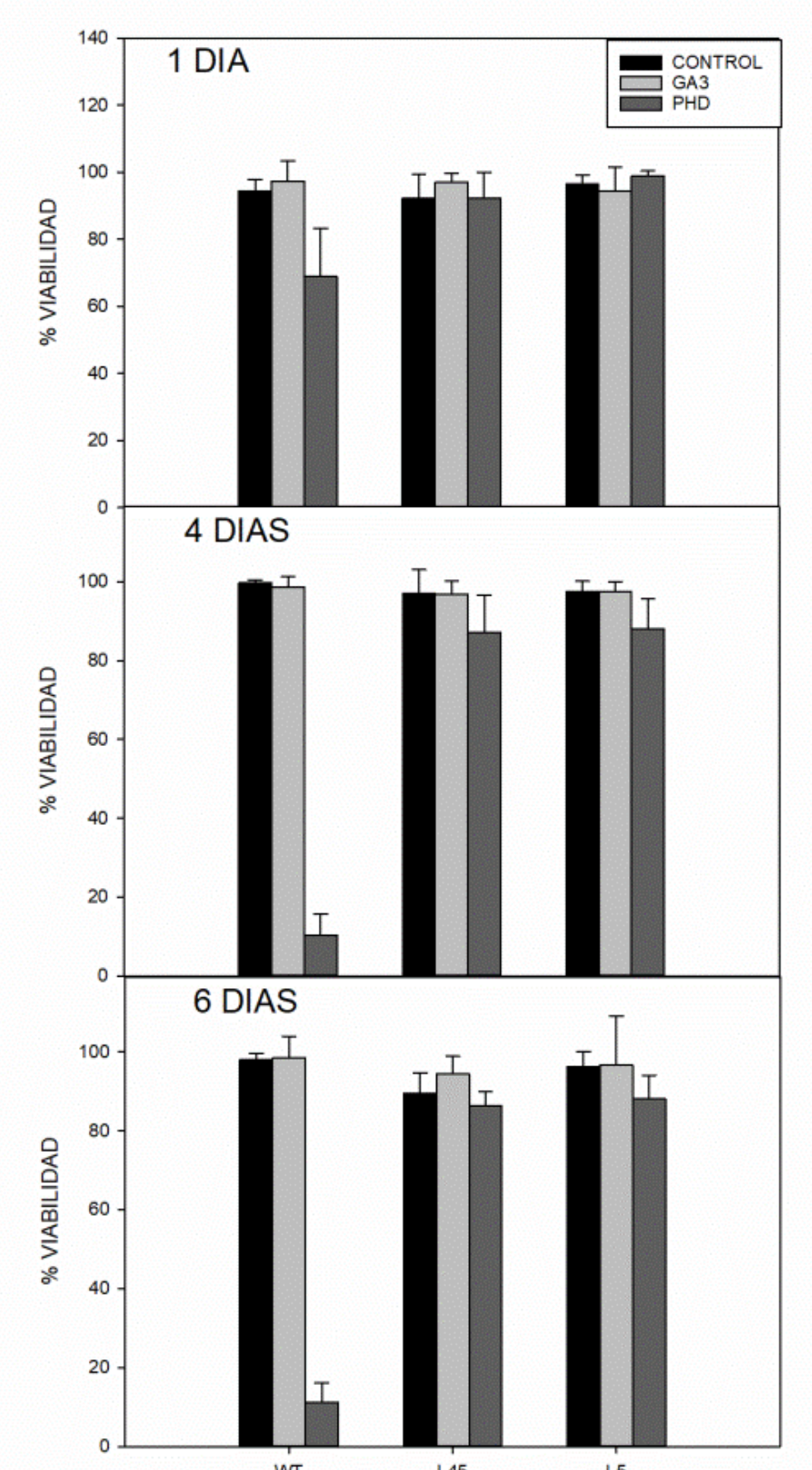


Figura 3. Porcentaje de viabilidad de las células a 1, 4 y 6 días de la aplicación de los diferentes tratamientos (control, 50 μM de GA₃ y 75 μM de PHD).

Agradecimientos

Agradecemos al CEBAS/CSIC y al IES Juan Carlos I su colaboración en la realización de este trabajo, especialmente a Nieves Fernández y Enrique Olmos, quienes nos han guiado desde el CEBAS; también a Luis Martín que nos ha ayudado y apoyado desde el instituto.