

La salinidad es uno de los muchos factores que limitan el crecimiento de la planta, provocando un conjunto de efectos a los que llamamos **estrés salino**.

Los cultivos celulares utilizados en nuestro trabajo provienen de la *Nicotiana tabacum* y en concreto de su línea **BY-2**. Estudiamos en ellos respuestas a la salinidad, y la influencia en las mismas de unas fitohormonas, las giberelinas.

Objetivos

- Estudiar el comportamiento de los cultivos celulares al ser tratados con giberelinas (GAs) y un inhibidor de su síntesis (prohexadiona, Phd).
- Analizar la expresión de dos genes de síntesis y degradación de GAs y comprobar si esta expresión se encuentra regulada de forma diferencial en las células adaptadas a salinidad.
- Aprender técnicas básicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* usando cultivos celulares del tabaco: Utilización del equipamiento básico.

Metodología

Estudio del crecimiento celular

- Preparación de los cultivos celulares y diseño experimental

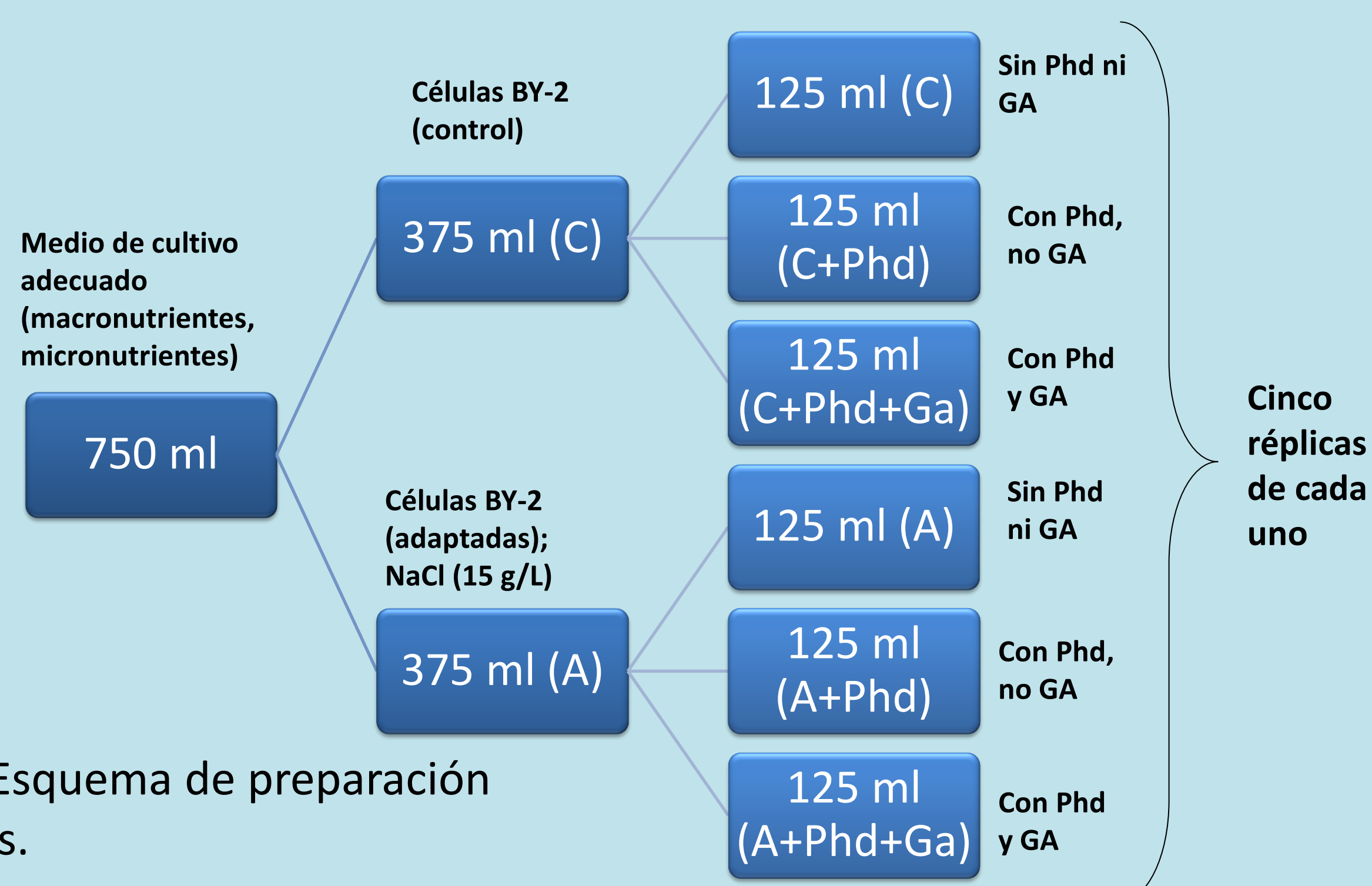


Figura 1. Esquema de preparación de cultivos.

- Pesado de las células
- Pesamos las células control a los 7 días y las adaptadas después de 14. El peso fresco fue cuantificado depositando el contenido de cada matraz en un embudo büchner situado sobre un matraz conectado a una bomba de vacío.



Figura 2. Cultivos celulares.

Estudio de la expresión génica

- PCR
- Realizamos esta técnica de biología molecular con el fin de amplificar el ADNc obtenido tras la retrotranscripción, para así, tener una mayor cantidad con la que trabajar.

- Electroforesis
- En ella, sometimos al ADNc anterior, a un campo eléctrico para su separación e identificación. Los fragmentos de ADN, al estar cargados negativamente, migran hacia el polo positivo de la cubeta de electroforesis, y lo hacen más rápidamente cuanto menor es su masa.

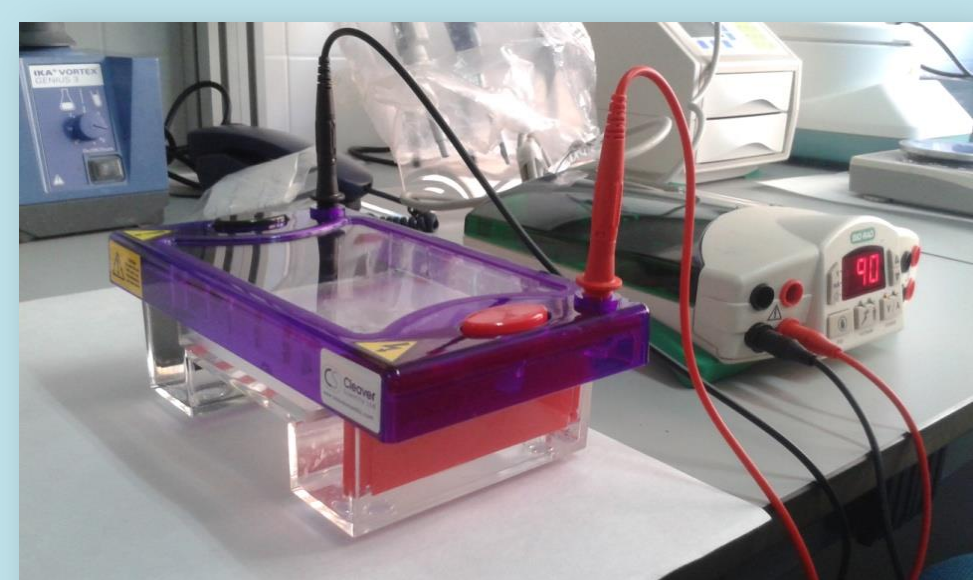


Figura 3. Cubeta de electroforesis.

Autores: Eduardo Rubio Mora, Irene Muñoz Martínez y María García Piñero

Coordinadora: M^a Trinidad Cámara Meseguer

Tutores: Nieves Fernández, Enrique Olmos y José M. Caballero

Instituto Juan Carlos I | 2014-2015

Resultados y discusión

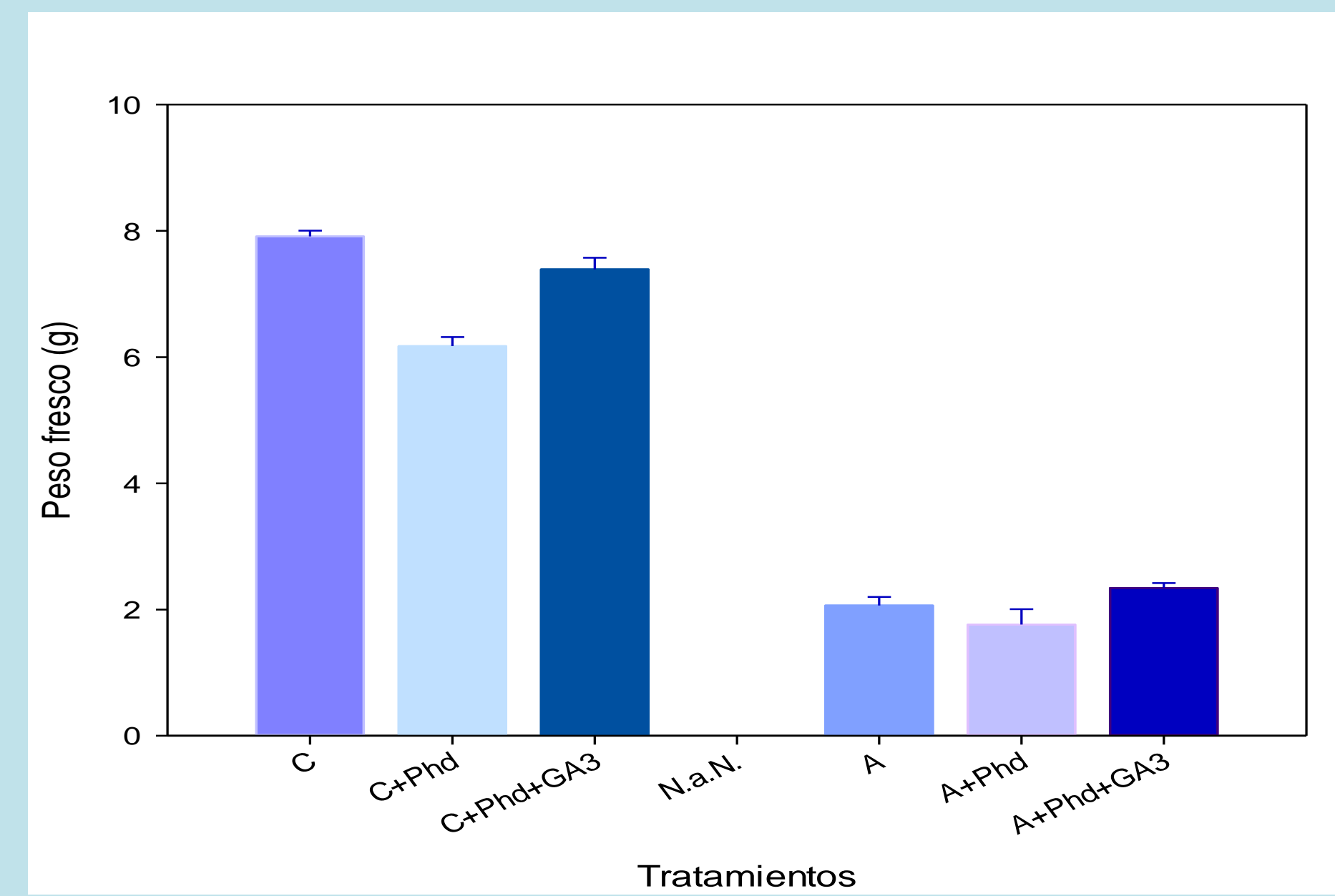


Figura 4. Peso de las células en distintos tratamientos.

En cuanto a la morfología celular, además de la reducción de tamaño, se observa la desaparición de la vacuola única típica en las células control frente a la aparición de numerosas pequeñas vacuolas en las adaptadas.

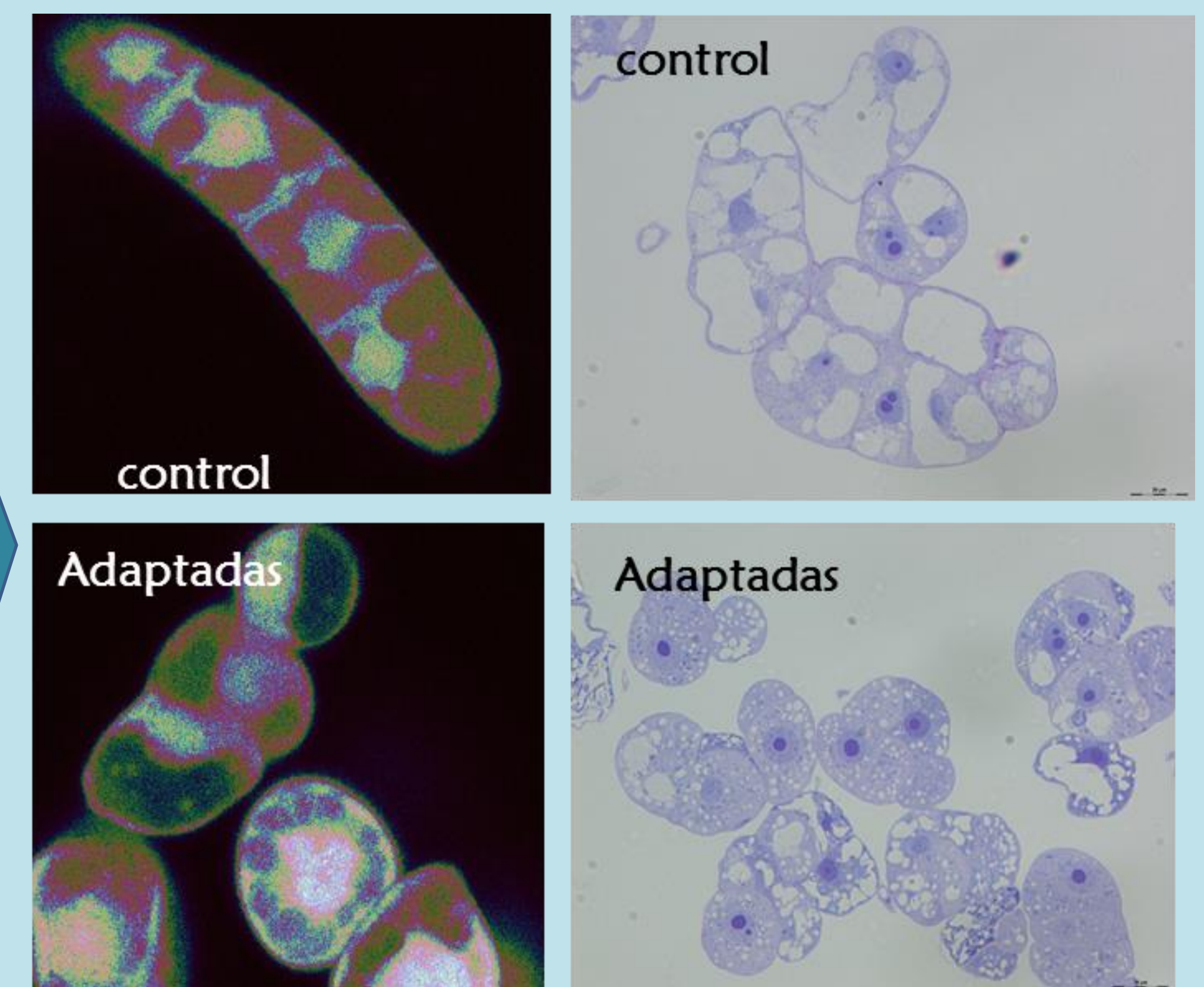


Figura 5. Microfotografías de células control y adaptadas.

La expresión diferencial del 3ox1 esta fuertemente inhibido en las células adaptadas respecto a las control. Por otro lado, los niveles de expresión obtenidos del gen DELLA fueron los esperados según lo descrito en la bibliografía, estando inducido en las células adaptadas a salinidad frente a las células control. De aquí podemos concluir que la disminución de giberelinas podría formar parte de la respuesta a la salinidad.

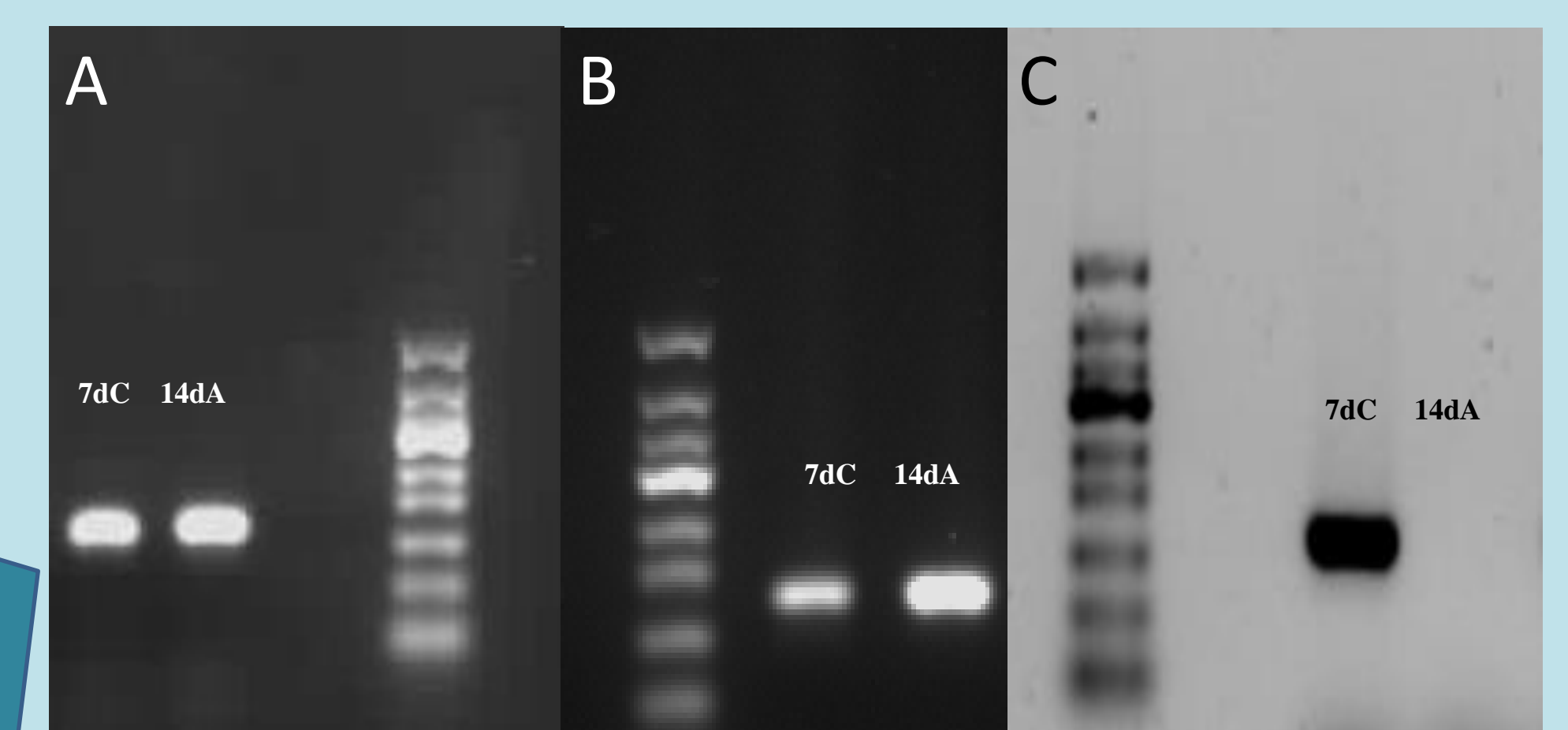


Figura 6. Niveles de expresión correspondientes a: (A) la actina; (B) gen DELLA; (C) la 3ox1. 7dC: células controles a los 7 días del subcultivo. 14dA: células adaptadas a los 14 días del subcultivo.

En las células crecidas en tratamiento salino, el gen 3ox1 no se expresa porque se inhibe la síntesis de giberelinas. Al ser estas escasas, se forma poco complejo receptor+giberelinas, encargado de degradar las proteínas DELLA, y en consecuencia, estas se acumulan progresivamente en las células.

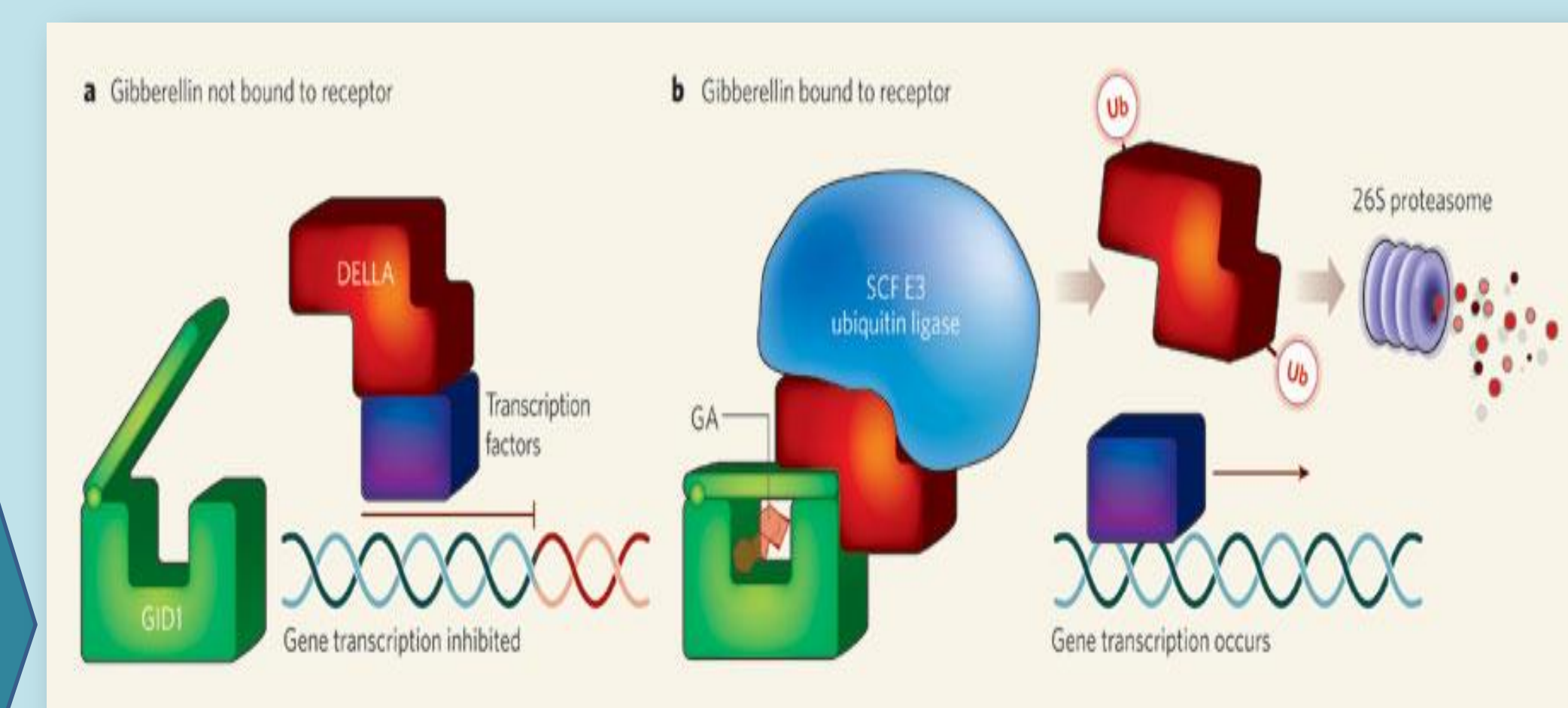


Figura 7. Degradación de proteínas DELLA.

Agradecimientos

- Al personal del CEBAS que nos ha apoyado:
 - Nieves Fernández y Enrique Olmos
- A José María Caballero Fernández-Rufete
- Al IES Juan Carlos I
- A Trinidad Cámara Meseguer
- A la fundación Séneca