

Introducción

El estrés salino es un factor ambiental que limita el crecimiento y la producción de los vegetales, induciendo alteraciones de tipo fisiológico y celular que van a condicionar su supervivencia en dichas condiciones de estrés. En los últimos años, se ha propuesto que las hormonas vegetales pueden tener un papel clave en la respuesta y adaptación a diferentes estreses ambientales tales como el estrés salino. Entre estas hormonas, se ha propuesto que las giberelinas podrían tener un papel muy importante en los mecanismos de adaptación al estrés salino. Las giberelinas (GAs), son hormonas vegetales que participan en procesos vegetales como el crecimiento, germinación de las semillas, floración, etc.. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del estrés salino en plantas de tomate cv. MicroTom a nivel subcelular, comparando los resultados entre plantas silvestres y el mutante *gib3*.

Resultados

Con esta tinción hemos conseguido un mayor contraste de las membranas celulares, observándose bien definidos los dictiosomas y retículo endoplasmático (Fig. 2a), así como las membranas de los tilacoides (Fig. 2a y c). El tratamiento salino indujo la desorganización del grana y la dilatación de los tilacoides en plantas wt (Fig. 2b). Sin embargo, en el mutante *gib3*, el tratamiento salino redujo el número de tilacoides por grana, pero no se observaron los grana desorganizados (Fig. 2d y e) ni el lumen de los tilacoides dilatados. Un hecho interesante fue que *gib3* crecido en tratamiento salino, se observó un proceso de exclusión de los plastoglóbulos al citoplasma (Fig. 1d). Igualmente, se observó la acumulación de unas estructuras lipofílicas en el citoplasma, posiblemente de origen cloroplastídico (Fig. 2e y f) que en algunos casos estaban siendo introducidas en la vacuola (Fig. 2f).

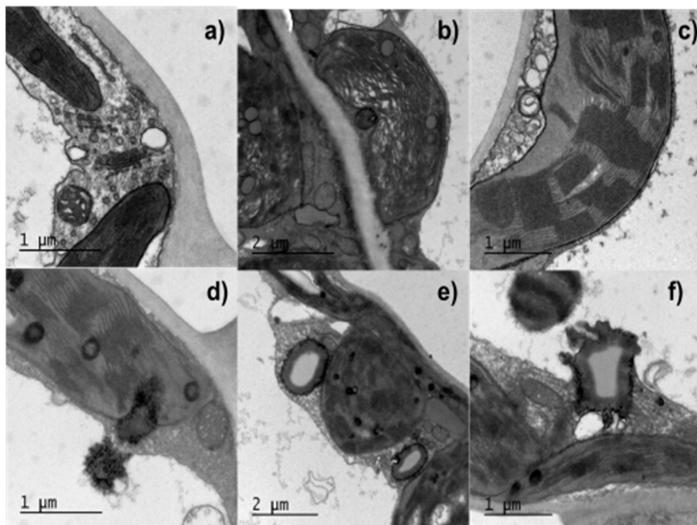


Figura 2. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de plantas wt en condiciones control (a) y condiciones salinas, 150 mM de NaCl (b). Cloroplasto de plantas control del mutante *gib3* (c). Cloroplasto de plantas de *gib3* crecidas en 150 mM NaCl mostrando la exclusión de plastoglóbulos (d). Estructuras lipofílicas citoplasmáticas (e y f).

En el estudio morfométrico, destacar el mayor grosor foliar de *gib3* de un 35% en comparación con wt (Tabla 1 y Figura 3) que parece ser debido a un mayor grosor del parénquima esponjoso que casi es del doble en *gib3* (Tabla 1). El tratamiento salino redujo tanto en wt como en *gib3* el grosor foliar siendo la reducción más marcada en wt, principalmente debido al efecto negativo sobre el parénquima de empalizada (Tabla 1).

	Parenquima empalizada	± SE	± SD	Parenquima esponjoso	± SE	± SD
wt control	1800,12	123,17	275,43	951,20	135,23	427,65
wt salino	915,67	89,44	199,99	536,16	66,70	210,94
<i>gib3</i> control	1455,07	375,74	840,18	1186,36	138,53	438,07
<i>gib3</i> salino	1183,52	153,83	343,97	723,39	95,75	302,79

Tabla 1. Área de las células del tejido parenquimático en empalizada y esponjoso, expresada en μm^2

El análisis de las áreas celulares del parénquima en empalizada y esponjoso confirmaron que al menos en parte, la reducción del grosor foliar se debió a una disminución del tamaño celular inducido por el estrés salino, este efecto fue mas marcado en wt que en el mutante *gib3* (Tabla 2).

	Hoja	Parenquima esponjoso	Parenquima empalizada	± SE	± SD
wt control	268,19	119,27	119,66	12,70	28,05
wt sal	208,59	98,57	89,28	15,52	34,70
<i>gib3</i> control	363,20	220,88	109,88	6,57	14,70
<i>gib3</i> sal	316,26	185,22	102,80	20,84	46,60

Tabla 2. Espesor de cada tejido en un corte transversal de la hoja, expresado en μm .

Material y Métodos

Material vegetal

Para este estudio se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv MicroTom) silvestres (wt) y el mutante *gib3* que es deficiente en giberelinas y presenta fenotipo enano, con una disrupción en el gen que codifica la ent-kaureno sintasa. Dichas plantas fueron crecidas en tratamiento control y 150 mM NaCl.



Figura 2. Plantas wt y *gib3* crecidas en tratamiento control y 150 mM NaCl.

Fijación, contraste e inclusión de las muestras

Después de una fijación con glutaraldehído y paraformaldehído, hemos introducido un paso previo al osmio, que sería una solución de ferrocianuro potásico con osmio que va a reducir el osmio haciéndolo más reactivo e intensificando la tinción de los lípidos. Posteriormente, se tiñó con tiocarbhidrazida seguida de una solución de osmio. Tras ser deshidratadas en una serie alcohólica, las muestras fueron contrastadas con acetato de uranio y citrato de plomo. Finalmente, fueron embebidas en la resina epóxido Epon.

Seccionamiento y observación al microscopio electrónico de transmisión.

Una vez obtenidos los bloques de Epon que contenían las muestras vegetales fueron seccionados para obtener cortes ultrafinos de un grosor de 60 nm mediante un ultramicrotomo Leica UC6 los cuales fueron depositados en rejillas de cobre. La observación y fotografiado se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011.

Estudio morfométrico de la estructura foliar.

Muestras embebidas en resina Epon fueron seccionadas a un grosor de 0,5 μm , montadas en portas y teñidas con azul de toluidina. Las secciones fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Olympus BHX60. Se ha cuantificado el grosor foliar, el del parénquima en empalizada y esponjoso, así como el área celular de ambos parénquimas. El análisis morfométrico se realizó con ImageJ.

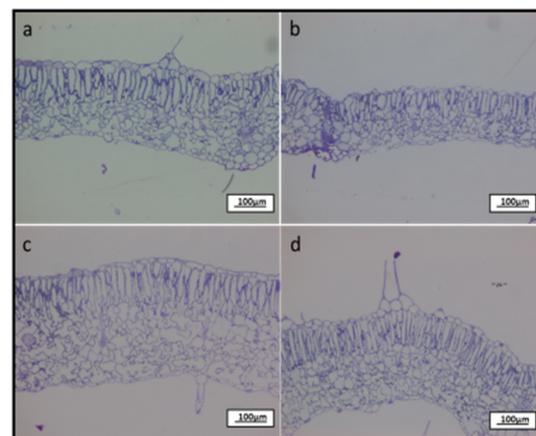


Figura 3. Secciones de tejido foliar observadas al microscopio óptico. (a) Sección foliar de wt en condiciones control. (b) Sección foliar de wt en tratamiento salino 150 mM NaCl. (c) Sección foliar de *gib3* en condiciones control. (d) Sección foliar de *gib3* en tratamiento salino 150 mM NaCl.

Discusión

A nivel subcelular, uno de los efectos más comunes del estrés salino es la alteración de los orgánulos ricos en membranas como son los cloroplastos y aparato de Golgi. Estos efectos suelen mostrarse en los cloroplastos como desorganización de los grana y dilatación del lumen de los tilacoides, así como un incremento de número y/o tamaño de los plastoglóbulos. Como hemos visto, las plantas wt mostraron importantes alteraciones del grana mostrando tilacoides con el lumen dilatado, pudiendo estar afectando de una manera importante al proceso fotosintético, dado que el mantenimiento de la estructura de la cadena electrónica y de los fotosistemas es crítica para el equilibrio iónico entre el lumen del tilacoide y el estroma.

Los plastoglóbulos son estructuras cloroplastídicas de forma esférica y muy ricas en compuestos lipídicos y en menor número de proteínas. Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la estructura y composición de los plastoglóbulos no se sabe mucho sobre su función fisiológica. Nosotros hemos observado que tanto en wt como en *gib3* se produjo un incremento del tamaño y número de los plastoglóbulos, siendo más evidente en *gib3*. Además, en *gib3* se observó la exclusión de los plastoglóbulos al citoplasma. Paralelamente, en *gib3*, observamos la acumulación de estructuras fuertemente lipofílicas de forma más o menos esférica que proponemos que tienen un origen cloroplastídico, probablemente de la fusión de varios plastoglóbulos excluidos del cloroplasto. Se ha propuesto que la exclusión de estos plastoglóbulos podría tener una función de obtención de energía debido a su posterior degradación en el citoplasma y vacuola, mediante la metabolización de los ácidos grasos presentes en los plastoglóbulos. Este hecho podría estar permitiendo que *gib3* presentara una mayor resistencia al estrés salino al ser capaz de reciclar sus membranas tilacoidales y reutilizarlas en la obtención de energía necesaria para hacer frente a las condiciones salinas. Nuestro estudio parece mostrar que *gib3* es más tolerante al estrés salino que wt, posiblemente debido a un menor daño del sistema fotosintético y un mayor recambio lipídico mediado por plastoglóbulos.

Agradecimientos

Agradecemos al CEBAS/CSIC y al IES Juan Carlos I su colaboración en la realización de este trabajo. Concretamente a Nieves Fernández Y Enrique Olmos, quienes nos han ayudado desde el CEBAS y a José María Caballero que nos ha guiado desde el instituto.