

Cambios fisiológicos y bioquímicos inducidos por la salinidad en plantas knock-down Mn-SOD de *Arabidopsis*



Autoras¹: Laura Cervera Martínez y María Moreno Olivo

Tutoras²: Daymi Camejo y Ana Jiménez

¹Instituto de Educación Secundaria IES Domingo Valdivieso, Mazarrón, Murcia
²Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia



Introducción

Arabidopsis thaliana L. tiene un genoma fácilmente manipulable mediante ingeniería genética obteniéndose plantas que sobre-expresan o silencian genes que codifican proteínas de interés. Por tal razón en el presente trabajo se han utilizado plantas de *Arabidopsis* que presentan una mutación que afecta la abundancia de la proteína Mn-Superóxido Dismutasa (Mn-SOD). Esta proteína localizada en las mitocondrias es responsable de eliminar el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en las plantas en condiciones normales de crecimiento y durante el estrés biótico y abiótico, generando en su reacción peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha estudiado el papel de la Mn-SOD sobre el crecimiento de las plantas, la generación de $O_2^{\cdot-}$ y actividad de las distintas isoenzimas como Cu,Zn-SOD y Fe-SOD en plantas crecidas en condiciones de estrés salino.

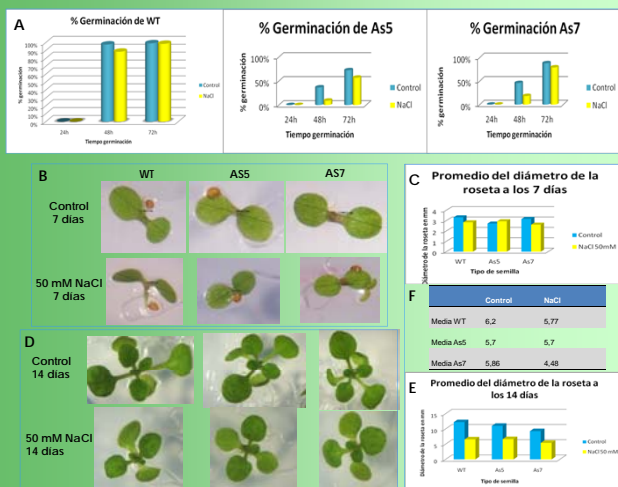
Hipótesis

La deficiencia en un 50% (As5) y 30% (As7) de la proteína mitocondrial Mn-SOD puede provocar una reducción en la germinación de semillas expuestas a condiciones de estrés salino por NaCl y a su vez reducir el crecimiento de la planta. También puede producir cambios en la acumulación del radical superóxido y posiblemente induce cambios en la actividad de isoenzimas superóxido dismutasa de otros compartimentos celulares.

Materiales y métodos

En este trabajo se han utilizado plantas de *Arabidopsis* silvestres y dos líneas en las que se ha mutado el gen Mn-SOD: AS5 (deficiente en un 50%) y AS7 (deficiente en un 30%) que crecieron en placas Petri de Agar en presencia y ausencia de una concentración de NaCl 50 mM. Se midió la germinación de la semillas (emisión de radícula) y algunos parámetros de crecimiento de la planta como número de hojas y diámetro de la roseta. Se ha medido la generación *in vivo* del radical superóxido incubando el tejido en una solución que contenía azul de nitrotetrazolio (NBT), que en presencia del radical se tiñe de azul. Además, se midió la actividad de la proteína Mn-SOD que tienen las plantas realizando una separación de sus proteínas totales en geles de poliacrilamida sometidos a una corriente eléctrica (electroforesis) para que se separen sus isoenzimas. Una vez separadas las proteínas, las distintas isoenzimas SOD se tiñeron con NBT. Se añadieron inhibidores específicos como KCN (inhibe Cu,Zn-SOD) y H_2O_2 (inhibe Cu,Zn-SOD, Fe-SOD) a fin de reconocer a la Mn-SOD, que es resistente a ambos y aparece en los geles en su presencia. Todas las medidas se realizaron paralelamente en plantas silvestres (WT) que no tienen mutado el gen.

Resultados

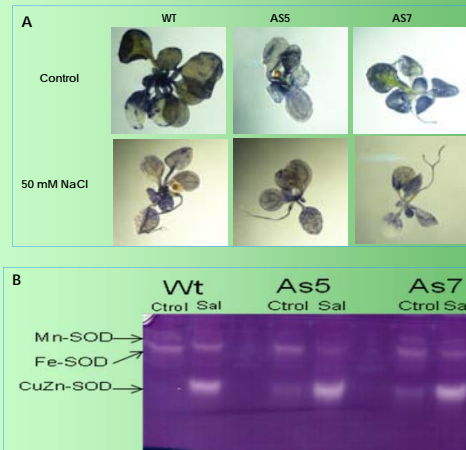


A: En estas figuras se observa la germinación de las plantas WT, As5 y As7 a las 24, 48 y 72 h.

B: En estas figuras se observan plantas de 7 días y en C: el diámetro de la roseta.

D: En estas figuras se observan plantas de 14 días y en E: el diámetro de la roseta.

F: En esta tabla vemos las diferencias entre plantas cultivadas en medio control y salino respecto al número de hojas.



A: En esta figura se observa la tinción que detecta radicales superóxido en plantas en condiciones control y salinas.

B: En esta figura se pueden observar las diferentes isoenzimas de la proteína superóxido dismutasa (Mn-SOD, Fe-SOD, Cu,Zn-SOD), en las plantas crecidas en condiciones control y salinas.

Conclusiones

La falta de la proteína Mn-SOD, provoca que la germinación de las plantas sea diferente, siendo bastante mejor en porcentaje en las plantas silvestres (WT) que en las mutantes (As5 y As7). Además, en condiciones de salinidad, la germinación era mejor en condiciones no salinas. Respecto al análisis del crecimiento, realmente las plantas que tienen menos Mn-SOD crecen menos y se comportan diferentes a las plantas silvestres en una situación de estrés como es el crecimiento en presencia de la sal NaCl. Estos resultados confirman nuestras hipótesis. Respecto al posible aumento en radical superóxido, no es en el medio salino donde siempre se produce una mayor generación del radical superóxido por lo que no queda confirmada del todo otra de nuestras hipótesis. En cuanto a nuestra última hipótesis, se demuestra que analizada la presencia de diferentes isoenzimas de SOD, utilizando inhibidores como son el cianuro y el peróxido de hidrógeno, las plantas mutantes tienen menos Mn-SOD, y además, la Cu,Zn-SOD aumenta su actividad en condiciones salinas, y esto podría ayudar a controlar la generación de superóxido en estas condiciones.