

RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS SALINO EN CULTIVOS CELULARES *Nicotiana tabaccum* BY-2

Andrea Aznar, Inés Fernández, Enrique Olmos, Nieves Fernández-García.

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Department of Abiotic Stress and Plant Pathology, Campus de Espinardo, P.O. Box 164, 30100 Espinardo-Murcia, SPAIN

Introduction

Our project focuses on studying the cellular response to salt stress in cellular cultures of tobacco. We have developed our work with *Nicotiana tabaccum* L., 1753 cv. Bright Yellow 2 (BY-2) which are transformed with the GFP protein. Salinity stress is the most common type of abiotic stress that limit plant growth and development. Understanding how plant cells tolerate salinity would help to reduce the damage it causes. Salt tolerance of plant cells is mainly achieved by combination of three different mechanisms:

- Osmotic adjustment of the cytoplasm due to the accumulation of compatible solutes.
- Salt extrusion from the cell across the plasma.
- Salt accumulation in vacuoles.

In this project we want to show some hypothesis:

- Which cellular line will grow better?
- Morphologic comparison between the control line and the adapted one.
- We want to check if viability and growth in control cellular line is higher than in the one grown in salt stress.
- PLD α 1 should be induced by salt adaptation.

Resultados

- La Figura 1 muestra el peso fresco al completar el ciclo de cultivo a los 7 días. En esta tabla podemos ver el marcado efecto inhibitor provocado por la salinidad sobre el peso fresco en los diferentes tratamientos.
- La Figura 2 muestra que en la línea celular control la viabilidad se mantiene estable con valores próximos al 100% durante todo el ciclo de cultivo, para la línea celular adaptada los valores oscilan entre el 70 y el 85%. Sin embargo, en los cultivos controles que se les añadió directamente el tratamiento salino 10 y 20 g/L (sin una adaptación progresiva) se observa una caída bastante significativa en esta etapa del ciclo de cultivo.
- La Figura 3 muestra las curvas de crecimiento en base al crecimiento relativo y al peso fresco de las líneas celulares objeto de estudio, la control y la adaptada. Se observa que el crecimiento relativo de la línea celular adaptada se desliza en el tiempo.
- La Figura 4 muestra que mediante la reconstrucción en 3D de la estructura subcelular del retículo endoplasmático en las células BY-2 transformadas con la proteína GFP (fluorescente) podemos observar que la salinidad produce la dilatación del retículo endoplasmático y también de la envoltura nuclear.
- La Figura 5 muestra que el tamaño celular de la línea adaptada disminuyó, esto se vio acompañado por un incremento de la relación citoplasma/vacuola, resultando frecuente el incremento del número de pequeñas vacuolas.
- La Figura 6 muestra que la salinidad induce a una mayor producción del gen PLD α 1.

Conclusiones

- La línea celular control se desarrollará mucho más rápido.
- Las células de tabaco adaptadas a altas concentraciones salinas mostraron importantes modificaciones en la estructura subcelular.
- En función de la fase de crecimiento en la que se encontraban, estas células presentaban un tamaño mucho menor que las células control.
- El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi son modificados en el proceso de adaptación a salinidad en células de tabaco BY-2.
- Para la línea celular control la viabilidad se mantiene estable con valores próximos al 100% durante todo el ciclo de cultivo, mientras que para la línea celular adaptada los valores oscilan entre el 70 y el 85%.
- A través de la realización de la PCR se observó que estábamos en lo cierto al predecir una mayor inducción del gen PLD α 1 en la línea celular adaptada.

Peso fresco (g) a los 7 días del subcultivo.	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Control	6.97	7.72	6.75
10g/L	0.13	0.1	0.09
20g/L	0.03	0.04	0.02

Figura 1. Peso fresco de cultivos celulares crecidos a distintas concentraciones de NaCl (0, 10 y 20 g/L).

Tratamiento NaCl	Porcentaje(%) de células vivas (4días)
Control	98,18
Adaptadas (15 g/L)	80,25
10g/L	18,64
20g/L	13,35

Figura 2. Viabilidad celular. Porcentaje de células vivas en los diferentes tratamientos salinos a los cuatro días de tratamiento (n=300).

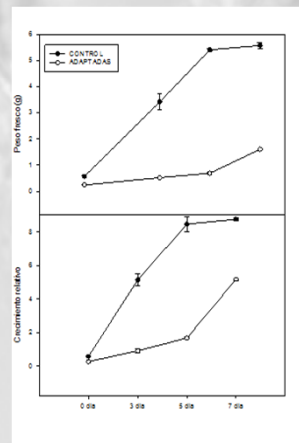


Figura 3. Curvas de crecimiento. Los gráficos muestran las curvas de crecimiento en base al crecimiento relativo y el peso de las líneas celulares control y adaptada. Los datos representan los valores medios \pm error estándar, n=3.

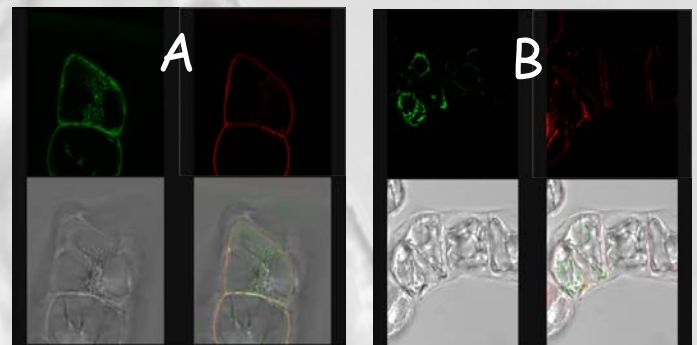


Figura 4. Esta figura muestra células control (A) y células adaptadas a 15g/L (B) vistas con el microscopio de láser confocal. Las imágenes de ambos cuadros situadas arriba a la izquierda representan el retículo endoplasmático, que aparece teñido de color verde, a la derecha vemos la misma imagen marcada con FM4-64 para localizar las membranas biológicas, se observa de color rojo. C, la misma imagen vista con microscopía de campo claro Normasky. D, superposición de A, B y C.

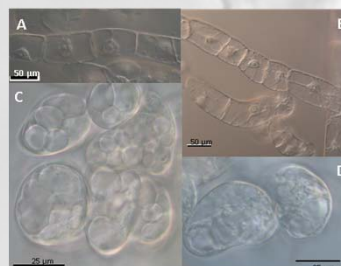


Figura 5. Morfología celular. En esta foto se puede ver la diferencia del tamaño celular entre las células control y las adaptadas a salinidad (15 g/L). (A-B) células controles; (C-D) células adaptadas a salinidad.

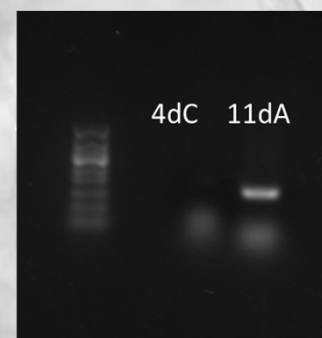


Figura 6. Inducción del gen PLD α 1 en las células adaptadas

Agradecimientos

Agradecemos al CEBAS/CSIC y al IES Domingo Valdivieso su colaboración en la realización de este trabajo. Concretamente a Nieves Fernández y Enrique Olmos, quienes nos han ayudado desde el CEBAS y a Francisco Javier López, Manolo Martín y Esperanza Rodríguez que nos han guiado desde el instituto.

23.81 μ m