

Diseño de las prácticas de Ecofisiología Vegetal y Biotecnología Vegetal como método de iniciación a la investigación

Ana M. Fernández Ocaña, Julio Alcántara Gámez y M. Victoria Gómez Rodríguez.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales, Campus "Las Lagunillas" s/n, 23071, Jaén, España.

mvgomez@ujaen.es

Resumen

Con este proyecto pretendimos que alumnos de 3er y 4º cursos de Biología, vivieran el desarrollo de un proyecto de investigación desde el trabajo de laboratorio hasta la presentación de los resultados en un foro científico, el X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal.

El trabajo tenía una doble vertiente:

a) Docente. Promover el trabajo cooperativo entre alumnos a la vez que se entrenaban en el desarrollo de un trabajo científico a través de un supuesto real.

b) Investigadora. En Ecofisiología Vegetal (EV) estudiar el efecto protector del BTH (metil éster del ácido benzo(1,2,3) tiodiazol-7-carbotioico) y su influencia sobre la expresión de Ha-PR-5, una proteína relacionada con patogénesis cuya expresión se induce en girasol en respuesta a la infección por este parásito obligado causante del mildiu. En Biotecnología Vegetal (BV) seleccionar el medio más adecuado para el cultivo de distintos explantos de olivo.

Además del trabajo de laboratorio se programaron reuniones para la elaboración, análisis estadístico e interpretación de los resultados, la redacción del resumen que se envió al congreso y por último el diseño de los dos pósters que en él se presentaron. Para mantener el contacto con los alumnos, se utilizó la plataforma de enseñanza virtual de la Universidad de Jaén, un entorno restringido que permitió acceder a los guiones de la práctica y estar al tanto de los resultados.

INTRODUCCIÓN

La reducción del número de alumnos que se matriculan en Biología en la Universidad de Jaén puede ser una oportunidad para abordar planteamientos de docencia impensables en asignaturas masificadas.

Nuestro objetivo primordial fue conseguir que las prácticas tuvieran un sentido investigador real y continuado, y para ello configuramos un grupo de prácticas para que conformaran un breve proyecto de investigación en el que los alumnos pasaran por todas las etapas que van desde el diseño de un experimento hasta la exposición de los resultados a la comunidad científica.

Las asignaturas de EV y BV son optativas de segundo ciclo en la Licenciatura de Biología. EV tiene 6 créditos teóricos, 2 prácticos y se imparte en el primer cuatrimestre. BV tiene 3 y 1.5 créditos y se imparte en el segundo cuatrimestre. En los últimos cursos el número de alumnos que se matriculan es de unos 18.

En EV el "proyecto" de investigación consistió en estudiar el efecto protector que el tratamiento con BTH, de semillas recién germinadas de girasol, tenía sobre la infección por *Plasmopara halstedii*, oomicete que causa la enfermedad del mildiu. También queríamos dilucidar, si la posible protección estaba mediada por el aumento de la expresión Ha-PR-5, una proteína del girasol de tipo taumatina.

BTH es uno de los más reconocidos inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR) y se comercializa bajo el nombre de Bion 50[®]. El pretratamiento con BTH se ha comprobado que hace disminuir los síntomas de la enfermedad en plantas infectadas con el hongo (Gómez Rodríguez et al. 1999 VI Congreso Hispano-Luso de Fis. Veg. Sevilla. Tosi et al., 1999, J. Phytopathol. 147 (6): 365-370).

Las PR-5 son PRPs (proteínas relacionadas con patogénesis) que en ocasiones muestran "in vitro" carácter antifúngico sobre hifas y esporas, probablemente debido a que alteran la permeabilidad de sus membranas (Stintzi, A. et al., 1993, Biochimie 75: 687-706). Algunas PR-5 se acumulan en respuesta a situaciones de estrés abiótico y biótico (Pierpoint, W.S., 1986 Phytochemistry, 25: 1595-1601) y su sobreexpresión puede hacer que se eleve la resistencia a la infección.

En BV se hicieron ensayos para optimizar el medio para el cultivo "in vitro" de diferentes tipos de explantos de olivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

En EV el trabajo de laboratorio se planteó en 5 sesiones prácticas.

La primera sesión incluyó la asepsia y puesta en germinación de semillas de girasol de la línea susceptible Ha89, el tratamiento con BTH y la inoculación con el patógeno.

Las semillas se lavaron 4 minutos con etanol del 70 %, se enjuagaron con agua destilada y se trataron durante 20 minutos con lejía comercial al 10 %. Tras enjuagarlas con agua destilada se dispusieron sobre papel de filtro humedecido, se envolvieron en papel de aluminio y se mantuvieron en oscuridad y a 25 °C. A las 36 h, la mitad de las semillas se sumergió en una solución de BTH (200 mg/l) y la otra mitad en agua destilada. Tras 12 h, ambos lotes se enjuagaron con agua destilada y se inocularon con el patógeno.

La inoculación se llevó a cabo en placas Petri con una suspensión de 90.000 esporangios/ml de *P. halstedii* previamente mantenida en agitación suave durante 2 horas. Las placas se agitaron 10 min en oscuridad. Finalmente las plántulas se sembraron en macetas (20 semillas/maceta) y se cultivaron 9 días en cámara a 21 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz/8 oscuridad).

El problema logístico que la amplia duración de algunos de los procesos planteaba se resolvió teniendo preparados previamente semillas germinadas, plántulas sumergidas durante 12 h en BTH, e inóculo disponible para la infección.

En la segunda sesión se recogió el material para la extracción de ARN y se embolsaron las macetas para provocar la esporulación del oomicete. En cada una de las macetas, control y tratadas con BTH, se recolectó la mitad de los hipocótilos de las plántulas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARN. Las macetas con el resto de las plantas se cubrieron con plástico transparente para asegurar una humedad del 100% que facilitara la esporulación del oomicete y se llevaron a la cámara de cultivo durante dos días.

En la tercera sesión y se contaron los esporangios con una cámara de Neubauer.

En la cuarta sesión se extrajo el ARN, con el reactivo y protocolo de Tri Reagent[®] de Applied Biosystem. Se midió su calidad, mediante electroforesis en gel de agarosa del 2% y a través de la relación entre la absorbancias a 260 y 280 nm. Por último, la concentración se determinó a través de la absorbancia a 260 nm. Cada una de las muestras se hizo por triplicado.

En la quinta y última, a partir de ARN se sintetizó el cDNA con "1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR" de Roche. También se realizó la PCR en tiempo real (RT-PCR) para la cuantificación de la expresión de Ha-PR-5 y Ph-TEF1, una proteína de *P. halstedii* que según la bibliografía sólo se expresa cuando infecta a una planta. Su expresión sirve como indicativo del grado de infección del girasol (Radwan Radwan et al., 2004, *J. Exp. Botany* 56 (412):567-575).

La expresión de ambos tipos de proteínas se determinó por RT-PCR. El volumen final de reacción fue de 20 μl : 1 μl de cDNA, 10 μl de IQTM SYBR[®] Green Supermix de Bio-Rad, 8 μl de agua milli-Q y 0,5 μl de solución 20 μM de cada uno de los dos cebadores. Se empleó el equipo iCycler iQ system de Bio-Rad de los Servicios Técnicos de Investigación. El programa de PCR utilizado fue: T^a inicial de 95°C 4 min; 40 ciclos a 95°C , 30 s; (60.5°C para Ha-PR-5 y 61.9°C para Ph-TEF1), 30s; 72°C , 1 min y una extensión final a 72°C 7 min. Como cebadores se utilizaron los diseñados por Radwan et al. (2004, *J. Exp. Botany* 56 (412):567-575). Los valores de expresión se normalizaron con respecto a los del ARNr 18s.

Los datos se analizaron mediante una prueba de t de Student para dos muestras y suponiendo varianzas desiguales.

Acabado el trabajo de laboratorio, hubo reuniones con los alumnos para enseñarles el manejo del programa del equipo de PCR, analizar y discutir los resultados, elaborar conclusiones, preparar el resumen que se enviaría al congreso, y finalmente diseñar y confeccionar el póster. La gran mayoría de estas actividades se realizaron una vez terminada la docencia y muchas de ellas cuando se habían entregado las calificaciones, lo que da idea del interés que despertó la experiencia. La asistencia a estas reuniones se tuvo en cuenta a la hora de decidir los tres alumnos que acudieron al congreso.

En la asignatura de BV, las dos primeras sesiones prácticas se dedicaron a la preparación de soluciones madre y de los medios adecuados para el cultivo y crecimiento de olivo (*Olea europaea* L.). Se pretendía conseguir a partir de diferentes explantos: 1) enraizamiento de tallos, 2) micropropagación y 3) cultivo de embriones maduros.

Se prepararon tres medios de cultivo basados en el DKW (Driver, Kuniyuki, 1984 *Hort Science*, 19:507-509) con modificaciones que afectaban al tipo y concentración de hormonas. Para conseguir enraizamiento de los explantos, tomamos como referencia los trabajos de Monteuis (2004, *In Vitro Cellular and Develop. Biol.* 40 (1): 102-107) y de Caboni y Damiano (2006, *ISHS Acta horticulturae* 705) reduciendo los macronutrientes a la mitad. Después de tres

semanas en los medios A (AIA, 4 mg/l), B (IBA, 2mg/l) y C (AIA, 1 mg/l), todos los explantos se traspasaron a un mismo medio base sin hormonas con gelrite como agente gelificante para visualizar mejor el desarrollo de la raíz en cada muestra.

Para el cultivo de embriones maduros se siguieron los trabajos de Voyiatzis, (1995, *Physiologia Plant.* 95:444-448) y de Revilla et al., (1996, *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32:257-261). El experimento se repitió en dos ocasiones con embriones de dos variedades de olivo, pero en ambos casos hubo contaminación del 95 % de las muestras, probablemente de origen endógeno.

Para la micropropagación se siguieron los trabajos de Mencuccini et al. (1997, *Italus hortus*, 4 (6):32-37) y de Revilla et al., (1996, *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32:257-261). Se utilizaron tres medios basados en el DKW pero con modificaciones en las hormonas: A (IBA de 0.5 mg/l + BAP 6 mg/l); B (IBA de 0.5 mg/l + zeatina (2mg/l) y C (IBA de 0.5 mg/l + 2iP de 4 mg/l).

RESULTADOS

El trabajo llevado a cabo es docente y también investigador. Por tanto, hablaremos de ambos resultados.

En el campo de la docencia, nuestro principal resultado ha sido que los alumnos vivieran la experiencia de un proceso de investigación de principio a final: formulación de una hipótesis, diseño del experimento para comprobarla, trabajo de laboratorio con variadas técnicas y aparatos, elaboración y análisis estadístico de los resultados y finalmente su exposición a la comunidad científica en un congreso.

Las técnicas y equipos utilizados han sido diferentes en cada una de las dos asignaturas. En BV se han empleado técnicas de cultivo in vitro de plantas, lo que ha exigido rigor a la hora del manejo del material vegetal para evitar su contaminación y el uso de autoclave y cámara de flujo laminar.

En EV, y por la naturaleza del trabajo, las técnicas de laboratorio empleadas han sido más diversas y complejas. Los alumnos han trabajado con espectrofotómetro, centrífuga, termociclador convencional y RT-PCR.

Puesto que los resultados del trabajo se expusieron en un congreso científico de Fisiología Vegetal, los alumnos han seguido paso a paso la dinámica que esto supone. Participaron en la elaboración del resumen previo, en el diseño del póster en el que se mostraban los resultados y finalmente algunos de ellos pudieron estar presentes en la jornada del congreso en la que se presentaba su póster.

En el desarrollo de la experiencia ha habido algunas diferencias entre las dos asignaturas. Cuando el proyecto de innovación docente se aprobó, diciembre de 2006, ya había empezado la docencia práctica de EV. Parte del trabajo se hizo una vez finalizada la docencia, por lo que los alumnos tuvieron una sobrecarga de trabajo en todo aquello que relacionado con elaboración de resultados y confección del póster para el congreso. Este trabajo extra fue voluntario, y por tanto no siempre estuvieron presentes todos los alumnos.

En BV, que se imparte en el segundo cuatrimestre, el proyecto de innovación docente ya se había concedido al comienzo de la asignatura. Se hizo una reorganización de las prácticas, suprimiendo algunas para centrarse en el cultivo in vitro de olivo. Los tiempos de la docencia práctica coincidieron con el

trabajo relacionado con el congreso y prácticamente todos los alumnos se involucraron en igual medida en el trabajo.

Los alumnos más implicados en la experiencia, la gran mayoría de los matriculados, firmaron la comunicación de su asignatura y esto figura en su currículo.

En el aspecto investigador, el resultado del trabajo en ambas asignaturas no es directamente publicable. Se realizó un único experimento con varias réplicas (6 en el caso de EV, una por cada equipo de alumnos, y 50 muestras finales por ensayo en BV) y además la inexperiencia de los estudiantes ha podido introducir algunos errores no detectados. No obstante, realizaron un trabajo en gran medida inédito y los resultados que obtuvieron sirven de base para un estudio más amplio publicable, este sí, en una revista internacional.

Como resultado del tratamiento con BTH, las plantas de girasol quedan protegidas frente a una ulterior infección por *P. halstedii* y esto se demuestra tanto a través del grado de esporulación del oomicete (Fig. 1), algo ya conocido, como sobre la expresión de Ph-TEF1 en los girasoles infectados. Ph-TEF1 codifica un factor de elongación de *P. halstedii*, que se expresa en las plantas atacadas por el oomicete (Radwan et al., 2004, *J. Exp. Botany* 56 (412):567-575). El patógeno no produce esporangios en las plantas tratadas con BTH y la expresión de Ph-TEF1 se reduce drásticamente. El ARNm que lo codifica tiene una expresión 250 veces menor ($t=6.31$; g.l.: 7; $P<0.001$) en las plantas tratadas con BTH que en las control.

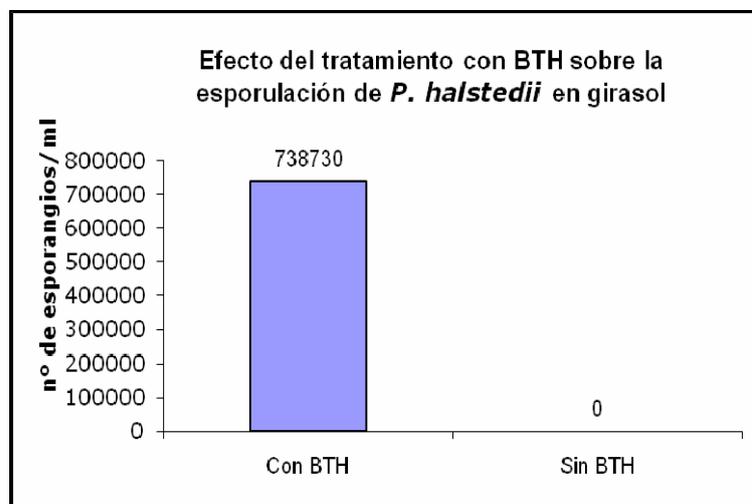


Fig. 1. Efecto protector de la aplicación de 200 mg/l de BTH a semillas recién germinadas de girasol sobre una ulterior infección con el oomicete *P. halstedii*. Las plántulas se cultivaron 9 días y se embolsaron para conseguir una humedad del 100% que facilitara la formación de esporangios en la superficie de los cotiledones.

La expresión de Ha-PR-5 es unas 200 veces mayor en las plantas control que en las tratadas con BTH ($t=3.66$; g.l.: 7; $P<0.01$). Por tanto, el efecto protector de este compuesto no se debe a un aumento de la expresión de esta PRP. La alta expresión de Ha-PR-5 parece un reflejo del estrés que el patógeno causa a la planta. Como el BTH dificulta la infección, se reduce el estrés y su expresión es baja. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Radwan et al. (2004, *J. Exp. Botany* 56 (412):567-575) en líneas de girasol resistente y susceptible al mildiu. Según estos autores, Ha-PR-5 se expresa sólo en las plantas

expuestas al patógeno y es mayor aunque más tardía en las susceptibles.

En BV se pretendía optimizar un medio de cultivo para micropropagación de olivo, otro para crecimiento de embriones maduros, y un tercero para la formación in vitro de raíces, partiendo de los trabajos ya publicados de olivo y de otras especies vegetales.

En el enraizamiento de olivo, la morfología de las raíces varió según el medio empleado (Figura 2). Los explantos tratados con IAA (medios A y C) desarrollaron una o dos raíces principales mientras que los tratados con IBA (medio B), desarrollaron raíces en cabellera. Las medias de crecimiento de la raíz fueron de 15.8 cm, 9.8 cm y 19.6 cm respectivamente para los medios A, B y C, siendo el número medio de raíces desarrolladas por dichos explantos de 5.2, 14.1 y 3.4 raíces respectivamente.



Figura 2. Morfología de las raíces 60 días después de la inserción del tallo en los medios A, B y C.



Figura 3. Aspecto de los explantos de tallo de olivo micropropagados, tras 60 días de su inserción en los medios A, B y C.

En micropropagación de tallos, la contaminación de los explantos fue del 25%. El 95% de las no contaminadas desarrollaron un número variable de brotes axilares. El crecimiento fue muy diferente en los tres medios. El medio B de (2 mg/l de zeatina) fue el que produjo plantas de olivo más vigorosas y de mayor tamaño (Figura 3). La longitud media de los explantos fue de 4.4 cm (A), 9.2 cm (B) y 5.8 cm (C).

En todos los casos se llevó a cabo un control de los explantos contaminados, haciendo recuentos y medidas semanales para observar la evolución de las muestras.

Hubo diferentes reuniones para la organización del trabajo, sugerencias sobre el estilo y organización de los apartados que se iban a exponer en el póster, e incluso una reunión final para la elaboración conjunta de dicho póster, diseñado en Septiembre, unos días antes del congreso. Todos ellos se mostraron muy receptivos e ilusionados y los tres alumnos que asistieron al congreso se eligieron por sorteo de entre todos los participantes.

CONCLUSIONES

I) Experiencias de este tipo incentivan a los alumnos a trabajar con interés y con ilusión, aunque suponga trabajo extra. También motiva a los profesores porque el interés de los estudiantes actúa como un fuerte acicate.

II) El EEES puede ser un marco idóneo para experiencias de este tipo ya que contempla el trabajo en grupo en aula y laboratorio y también el individual.

III) Lo realizado puede servir como un primer ensayo que dé origen a un trabajo de investigación real y publicable.

IV) El eslabón débil del proyecto es que, por economía y organización, no todos los alumnos pueden asistir al congreso. Esto se podría solucionar planteando un "congreso interno" en el que alumnos de varias asignaturas expusieran sus resultados. No descartamos continuar en esta línea

V) A la hora de elaborar resultados y extraer conclusiones, los alumnos deben tener espíritu crítico para hacerlo de la forma más objetiva posible. Este tipo de prácticas fomentan el autoaprendizaje y ayudan al alumno a madurar académicamente, siendo un ejercicio que tendrán que desarrollar cuando se enfrenten a un trabajo profesional como biólogos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Secretariado de Innovación Docente (Vicerrectorado de Ordenación Académica y Profesorado) de la Universidad de Jaén dentro de la III Convocatoria de Proyectos de Innovación Docente.